UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

EMULSÕES AMAZÔNICAS BIOATIVAS PARA LIMPEZA DO PREPARO CAVITÁRIO: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, CITOTOXICIDADE, ALTERAÇÃO DE COR E COMPATIBILIDADE BIOLÓGICA

CRISTIANE NAGAI COELHO

MANAUS
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CRISTIANE NAGAI COELHO

EMULSÕES AMAZÔNICAS BIOATIVAS PARA LIMPEZA DO PREPARO CAVITÁRIO: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, CITOTOXICIDADE, ALTERAÇÃO DE COR E COMPATIBILIDADE BIOLÓGICA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de concentração "Bioativos para prevenção e instrumentalização de agravos à saúde".

Orientadora: Profª. Drª. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira
Co-Orientadora: Profª. Drª. Tatiana Nayara Libório dos Santos

MANAUS
2011

Ficha Catalográfica

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

Coelho, Cristiane Nagai
C672e Emulsões Amazônicas Bioativas Para Limpeza Do Preparo Cavitário: Atividade Antibacteriana, Citotoxicidade, Alteração De Cor E Compatibilidade Biológica / Cristiane Nagai Coelho. 2011
154 f.: il. color; 29,7 cm.

Orientadora: Maria Fulgência da Costa Lima Bandeira
Coorientadora: Tatiana Nayara Libório dos Santos
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Atividade antibacteriana. 2. biocompatibilidade. 3. Óleo-resina da copaíba. 4. agente de limpeza. 5. Copaifera multijuga. I. Bandeira, Maria Fulgência da Costa Lima II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CRISTIANE NAGAI COELHO

EMULSÕES AMAZÔNICAS BIOATIVAS PARA LIMPEZA DO PREPARO CAVITÁRIO: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, CITOTOXICIDADE, ALTERAÇÃO DE COR E COMPATIBILIDADE BIOLÓGICA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de concentração "Bioativos para prevenção e instrumentalização de agravos à saúde".

BANCA EXAMINADORA

Presidente:_____
Profª. Dra. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira (Orientadora)
Instituição: Universidade Federal do Amazonas - FAO

Titular 1: _____
Profª Dra. Maria Rita Bracini de Oliveira
Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ Faculdade de Odontologia de Araraquara

Titular 2: _____
Profº Dr. Fábio Correa Sampaio
Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Dedico todo este trabalho ao meu pai, minha mãe, irmãos, amigos e namorado que me incentivaram incondicionalmente e souberam compreender a minha ausência durante a realização desta pesquisa .

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por toda a força que foi dada para a realização deste trabalho, nos momentos difíceis me mostrou o caminho a seguir e nos momentos de felicidade me mostrou o prazer da pesquisa.

Agradeço a minha orientadora **Prof[a] Dr[a] Maria Fulgência Costa Lima Bandeira** pela orientação no desenvolvimento desta pesquisa, com sua visão crítica e objetiva. Por ensinar a enxergar como uma pesquisadora, um simples resultado com várias visões e novos pontos de partida. Por mostrar que a humildade, generosidade, dedicação e honestidade estão presentes em todos os momentos de nossa vida. Se fizermos com AMOR tudo o que quisermos conquistar, teremos espaço e reconhecimento, foi assim na graduação e foi assim na pós-graduação. Muito Obrigada pela mãe, orientadora e amiga que foi e será nesses anos de convivência.

Agradeço ao meu pai, **Délcio Canuto Coelho**, que sempre me incentivou nas minhas ousadias, me mostrou que somos capazes de tudo quando sabemos o que queremos.

Agradeço à minha mãe, **Anna Emiko Nagai Coelho**, pelo amor incondicional de MÃE, pela força e incentivo, estando ao meu lado nos momentos de glória e nas dificuldades me orientando a seguir sempre no melhor caminho.

Agradeço aos meus irmãos, **Marta e Júnior**, por estarmos sempre unidos, um apoiando ao outro em todos os momentos de nossas vidas, o que nos torna realmente irmãos.

Agradeço ao meu príncipe, **Daniel,** que esteve ao meu lado nessa batalha, que soube compreender minha ausência e incentivar a conclusão deste trabalho.

Agradeço às minhas amigas de Mestrado, **Mailza e Raquel**, por juntas conseguirmos concluir esta pesquisa, com momentos de alegria, tristeza e dificuldades, mas a amizade nos fez fortes para chegarmos até aqui.

Agradeço aos Professores **Emerson Lima, Maria Francisca, Nikeila Chacon, Tatiana Libório e Valdir Veiga** pelo apoio e orientações nas constantes dúvidas, e sempre com toda a disposição a ajudar e mostrar a visão de pesquisador.

Agradeço à **Taciana Amorim** do Laboratório de Microbiologia por ensinar o caminhar de uma rotina de laboratório microbiológico.

Agradeço à **Dona Nice, a Cyntia e Milena** pelo apoio e dedicação a nossa pesquisa no Biotério do INPA.

Agradeço à **Fatinha, Dona Ioio e a Silvinha** pela apoio no laboratório de histopatologia, fazendo acontecer o nosso trabalho com o carinho diário de vocês.

Agradeço as meninas de ouro, **Thalita, Thamires e Greiciane**, por permitirem entrar no lar de vocês, fazer parte de vossas famílias e permitir a conclusão desta pesquisa, sem a compreensão de vocês não seria possível.

Aos meus amigos, **Aline, Kelmer, Bela, Michel, Olivia, Tiago, Carina, João Paulo, Grazi, Lúcia e Geisy** por permitirem, com suas amizades, a força para a conclusão desta pesquisa.

Agradeço à **Universidade Federal do Amazonas**, ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde, seus coordenadores, professores e funcionários pela cooperação e auxílio durante a conclusão desse projeto.

Agradeço ao **CNPQ**, Projeto MCT/CNPq/CT-Amazônia processo n^0 575752/2008-4, pelo apoio financeiro da pesquisa.

Agradeço a **CAPES** pelo apoio financeiro através da bolsa de estudo.

Agradeço à **Faculdade de Odontologia**, seus coordenadores e funcionários pela cooperação durante a realização desta pesquisa.

Aos **Professores Titulares e Suplentes da Banca Examinadora** de qualificação e de defesa, por sempre estarem dispostos a contribuir com o engrandecimento científico deste trabalho.

Sem esforço de nossa parte, jamais atingiremos o alto da montanha. Não desanime no meio da estrada: siga à frente, porque os horizontes se tornarão amplos e maravilhosos à medida que for subindo.
Mas não se iluda, pois só atingirá o cimo da montanha se estiver decidido a enfrentar o esforço da caminhada.

Carlos Torres Pastorino

RESUMO

O procedimento de limpeza da cavidade é uma etapa do preparo da estrutura dentária para receber o tratamento restaurador, esta etapa visa remover resíduos e microrganismos da cavidade, permitindo uma interface direta entre dente e restauração. Óleo-resina da copaíba é um produto natural, utilizado pelas populações amazônicas e reconhecido pelas suas propriedades medicinais, como atividade antimicrobiana frente aos microrganismos presentes na cavidade oral. Este estudo avaliou a atividade antibacteriana, citotoxicidade, alteração de cor e a compatibilidade biológica em molares de rato das emulsões de limpeza de cavidade formulada a base do óleo-resina da copaíba (*Copaifera multijug*a), nas seguintes concentrações: copaíba a 10%, copaíba a 10% com amirina, copaíba a 30% e copaíba a 30% com amirina. A atividade antibacteriana destas emulsões foram analisadas pelos testes da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima e Análise da Viabilidade Celular por Técnica de Fluorescência, frente aos *Streptococcus mutans* ATCC 25175*; Streptococcus oralis* ATCC 10557*; Streptococcus salivarius* ATCC 7073 *e Lactobacillus casei* ATCC 7469. A atividade citotóxica das emulsões testes foram avaliadas através dos testes de hemólise e de cultura de células, frente a fibroblastos murinos NHI3T3, através do ensaio de Alamar Blue. A alteração de cor avaliou diferença entre a cor inicial e final dos corpos de prova de dentina quando em contato com as emulsões testes, em diferentes períodos, 10 segundos, 30 segundos e 10 minutos. A compatibilidade biológica das emulsões da copaíba foram avaliadas através da lavagem da cavidade com as emulsões testes nas concentrações de 10% e 30% com amirina, seguida do capeamento pulpar com pastas de hidróxido de cálcio associadas com óleo-resina da copaíba 10% com amirina 1% em molares de ratos. As emulsões testes, em todas as concentrações, apresentaram atividade antibacteriana frente aos microrganismos relevantes na odontologia. Nas atividades de citotoxicidade, todas as emulsões testadas apresentaram lise celular, com uma EC50 variando de 11 a 32µL/mL. As emulsões do óleo-resina da copaíba com amirina apresentaram melhor comportamento quanto a atividade hemolítica que as emulsões sem amirina. No teste de cultura de células foi observado que as emulsões do óleo-resina da copaíba diminuem a viabilidade celular apresentando atividade citotóxica. Comparando a cor inicial e final dos corpos de prova quando em contato com as emulsões testes, as emulsões do óleo-resina da copaíba com amirina apresentaram menor alteração de cor perceptível clinicamente, $\Delta E < 3{,}3$, no período de 10 minutos. O capeamento pulpar com emulsões e pastas do óleo-resina da copaíba foi observado um comportamento semelhante ao controle, quando utilizado a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina. Os autores concluíram que as emulsões e pastas testes a base do óleo-resina da copaíba são promissores para aplicação na odontologia, necessitando de mais pesquisas para melhorar a farmacotécnica, propriedades físicas, mecânicas e biológicas.

PALAVRAS CHAVES: Atividade antibacteriana; biocompatibilidade; Óleo-resina da copaíba; agente de limpeza; *Copaifera multijuga*.

ABSTRACT

The cleaning procedure is a step in cavity preparation of tooth structure to receive the restorative treatment, this step aims to remove debris and microorganisms of the cavity, allowing a direct interface between tooth and restoration. Oil-copal resin is a natural product, used by Amazonian populations and recognized for its medicinal properties such as antimicrobial activity against the microorganisms in the oral cavity. This study evaluated the biological compatibility and antimicrobial activity in mouse molar of the emulsions formulated cleaning the cavity of the base oil-resin of copaiba (*Copaifera multijuga*), the following concentrations: 10% copal, copal to 10% with amyrin, copal 30% and 30% with copal amyrin. The antibacterial activity of these emulsions were analyzed by the minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration and cell viability analysis by fluorescence techniques, compared to ATCC 25175 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073 and *Lactobacillus casei* ATCC 7469. The cytotoxic activity of emulsions were evaluated by tests of the hemolysis tests and cell culture, compared to murine fibroblasts NHI3T3 by the Alamar Blue test. The color change was evaluated difference between the starting and ending of the specimens of dentin when in contact with the test emulsions at different times, 10 seconds, 30 seconds and 10 minutes. The biological compatibility of the copal emulsions were evaluated by washing the cavity with the test emulsion followed by pulp capping with calcium hydroxide pastes associated with oil-resin of copaiba amyrin 10% + 1% in molars of rats. The test emulsions at all concentrations showed antibacterial activity against microorganisms relevant to dentistry. In cytotoxic activities, all emulsions tested showed cell lysis, with an EC50 ranging from 11 to 32μL/mL. The emulsions of the oil-resin of copaiba with amyrin showed better behavior and hemolytic activity that the emulsions without amyrin. In the test cell culture was observed that the emulsions of the oil-resin of copaiba decrease cell viability showing cytotoxicity. Evaluating the color change, the emulsions of the oil-resin of Copaiba with amyrin were less clinically noticeable color change, $\Delta E < 3.3$, within 10 minutes. The pulp capping with emulsions and pastes the oil-resin of Copaiba observed behavior was similar to control, when used in the emulsion of the oil-resin of Copaiba to 10% with amyrin. The authors concluded that testing of emulsions and pastes the base of the oil-resin of Copaiba are promising for application in dentistry, requiring more research to improve the pharmacological, physical, mechanical and biological properties.

KEY WORDS: Antibacterial activity; biocompatibility; copaiba oil; cleaning agent; *Copaifera multijuga*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Ilustração esquemática da relação entre fatores etiológicos, comportamentais e sócios-econômicos que influenciam na susceptibilidade do desenvolvimento da lesão de cárie (FEJERSKOV, 2004)..... 19

Figura 02 – Esquema de distribuição dos produtos testes na microplaca de 96 orifícios, para cada bactéria..... 66

Figura 03 – Material utilizado para realização do teste de hemólise..... 71

Figura 04 - Esquema da demonstração da microdiluição..... 72

Figura 05 - A – Distribuição do volumes das emulsões testes nas diferentes concentrações na microplaca; B – Incubação das microplacas em Shaker a 37^{o}C por uma hora; C – Centrifugação das microplacas por 10 minutos para separar o sobrenadante do infranadante; D – Microplacas com os sobrenadantes, já podendo observar os produtos que obtiveram hemólise pela coloração; E – espectrofotômetro para a leitura das microplacas..... 73

Figura 06 – Dente posicionado na cortadeira com disco de diamante..... 75

Figura 07 - Secção a cora da raiz do dente..... 75

Figura 08 - Imersão do corpo de prova sobre a solução teste..... 76

Figura 09 - A - Mensuração da cor sobre o corpo de prova; B – Leitura da cor no espectofotômetro..... 77

Figura 10 – Espectrofotômetro..... 78

Figura 11 - A - Mesa clínica para procedimento de capeamento pulpar; B – Animal posicionado na mesa Doku modificada; C – Antissepsia da cavidade; D – Abertura da cavidade com broca 33 ½ ; E – Exposição pulpar; F – Secagem da cavidade com papel absorvente; G – Dente restaurado com amálgama..... 81

Figura 12 - Emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% e Emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% + amirina a1% frente ao *S.mutans*. Coluna 12 observa-se a viabilidade da bactéria. Linha G observa-se o veículo e na linha H o Digluconato de Clorexidina a 2%..... 88

Figura 13 - CBM da emulsão da copaíba a 10% frente ao *S.mutans*..... 90

Figura 14 - CBM da emulsão da copaíba a 10%+ amirina a 1% frente ao *S.mutans* 90

Figura 15 - CBM da emulsão da copaíba a 10% frente ao *L.casei*..... 90

Figura 16 - CBM da emulsão da copaíba 10% + amirina 1% frente ao *L.casei* ... 91

Figura 17 – Grupo II (7 dias): Área de exposição pulpar (⌘); vasos trombosados (✪); Infiltrado inflamatório leve com células polimorfonucleares (★). HE(200X). 100

Figura 18 – Grupo II (7 dias) - Infiltrado inflamatório leve com células polimorfonucleares (★), células vacuolizadas (∞). HE (400X)..... 100

Figura 19 – Grupo III (7 dias) - Área de exposição pulpar (⌘); vasos trombosados (✪); infiltrado inflamatório moderado; barreira mineralizada (⌫). HE (100X)..... 101

Figura 20 – Grupo III (7 dias) - Vasos trombosados (✪); barreira mineralizada (⌫). HE (200X). 101

Figura 21 – Grupo IV (7 dias) - Área de exposição pulpar (⌘); infiltrado inflamatório moderado (w); barreira mineralizada (⌫). HE (100X)..... 102

Figura 22 – Grupo I (30 dias) - Área de exposição pulpar (⌘);barreira mineralizada (⌫). HE (100X). 103

Figura 23 – Grupo III (30 dias) - Área de exposição pulpar (⌘); vasos trombosados (✪)barreira mineralizada (⌫). HE (100X). 104

Figura 24 – Grupo III (30 dias) - Vasos trombosados (✪), barreira mineralizada (⌫) observando as raspas de dentina sendo englobadas pela barreira (ç). HE (200X)..... 105

Figura 25 – Grupo IV (30 dias) - Área de exposição pulpar (⌘); Vasos trombosados (✪) e congestos (¤); barreira mineralizada (⌫). HE (100X)..... 106

Figura 26 – Grupo IV (30 dias) - Vasos trombosados (✪) e congestos (¤); barreira mineralizada (⌫). HE (200X). 106

Figura 27 - Diagrama do Espaço de Cor CIELAB..... 116

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Cromatograma obtido em cromatógrafo em fase gasosa do óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne utilizado no estudo. 87

Gráfico 02 - Hemólise(%) causada por diferentes emulsões do óleo-resina da copaíba e controles em hemácias humanas em relação ao controle triton X-100.... 92

Gráfico 03 - Curva de hemólise da emulsão do óleo-resina da copaíba a 10%, R^2=0,9593. 93

Gráfico 04 - Curva de hemólise da emulsão da copaíba a 10% + amirina 1%, R^2=0,8594. 93

Gráfico 05 - Curva de hemólise da emulsão do óleo-resina da copaíba a 30%, R^2=0,9465. 93

Gráfico 06 - Curva de hemólise da emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% + amirina, R^2=0,08964. 94

Gráfico 07 - Viabilidade celular das emulsões testes, frente a linhagem celular NHI3T3. 94

Gráfico 08 - Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 10 segundos das emulsões do óleo-resina da copaíba em dentes humanos, Manaus – AM..... 95

Gráfico 09 - Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 30 segundos das soluções testes em dentes humanos, Manaus – AM..... 96

Gráfico 10 - Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 10 minutos das emulsões do óleo-resina da copaíba em dentes humanos, Manaus – AM. 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Diluição da emulsão de copaíba a 10%..... 66
Tabela 02 - Diluição da emulsão de copaíba a 30%..... 67
Tabela 03 - Diluição das emulsões testes para determinar diferentes soluções mãe. 68
Tabela 04 - Diluição da emulsão de Copaíba a 30% na placa de 96 poços para a CIM. 68
Tabela 05 – Distribuição dos grupos e períodos experimentais para capeamento pulpar. 80
Tabela 06 - Concentração inibitória mínima das emulsões frente aos microrganismos. 88
Tabela 07 - Concentração bactericida mínima das emulsões testadas frente as bactérias testes..... 89
Tabela 08 - A viabilidade celular por técnica de fluorescência das emulsões do óleo-resina de copaíba a 30% e a 30% com amirina nas referidas CIM encontradas frente aos microrganismos 91
Tabela 09 - 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..... 98

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 – Estruturas analisadas durante a avaliação histopatológica..... 84

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	American Dental Association
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CG - DIC	Detector de Ionização de Chama
CG - EM	Detector de Espectrometria de Massas
CO_2	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC50	Concentração Efetiva de 50% de lise celular
eV	Elétron Volts
FDA	Food and Drugs Administration
g	Grama
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
h	Hora
HE	Hematoxilina Eosina
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
LAPEC	Laboratório de Pesquisas e Ensaios de Combustíveis
µg	Micrograma

µL	Microlitro
m	Metro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
m/z	Massa Carga
NaCl	Cloreto de Sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanômetro
p. a.	Pró Análise
pH	Potencial de Hidrogênio
Q-Bioma	Laboratório de Biomoléculas da Amazônia
rpm	Rotações por Minuto
U	Unidade
u.m.a	Unidade de Massa Atômica
UFC	Universidade Formadora de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
δ	Gama
®	Marca Registrada
±	Mais ou menos
#	Número
%	Percentual
ºC	Graus Celcius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 19

2. OBJETIVOS..... 23
2.1. Objetivo Geral..... 23
2.2. Objetivos Específicos..... 23

3. REVISÃO DE LITERATURA..... 24
3.1. Biofilme e Cárie dental..... 23
3.2. Soluções de Limpeza de Cavidade..... 28
3.3. Óleo-resina de Copaiba..... 34
3.3.1. Composição Química..... 36
3.3.2. Propriedades Medicinais..... 37
3.3.2.1. Atividade Antimicrobiana..... 38
3.3.2.2. Atividade Anti-inflamatória..... 41
3.4. Amirina 43
3.5. Testes de Citotoxicidade..... 46
3.5.1. Hemólise e Cultura de Células 46
3.6. Testes de Alteração de Cor 50
3.7. Testes de Compatibilidade Biológica..... 54

4. METODOLOGIA 60
4.1. Método de coleta do óleo-resina da copaíba (*Copaifera multijuga*) e obtenção da amirina 60
4.2. Cromatografia do óleo-resina da copaíba 60
4.3 Preparo das emulsões do óleo-resina da copaíba (*Copaifera multijuga*) 62
4.3.1 Emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% 62
4.3.2 Emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% 63
4.3.3 Emulsão do óleo-resina da Copaíba a 10% e amirina a 1% 63
4.3.4 Emulsão do óleo-resina da Copaíba a 30% e amirina a 1% 63
4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana das emulsões do óleo-resina da copaíba.... 64
4.4.1 Microrganismos testes e preparação de inóculos 64
4.4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) 65
4.4.3 Análise de viabilidade celular por técnica de fluorescência 68
4.5 Avaliação da citotoxicidade de emulsões do óleo-resina da *Copaifera multijuga* .. 70
4.5.1 Teste de hemólise 70
4.5.1.1 Preparo da solução de eritrócitos (S.E) 1% 71
4.5.1.2 Diluição das substâncias testes 71
4.5.1.3 Preparo das placas 72
4.5.2 Teste de cultura de células 73
4.6 Influência do tempo de aplicação das substâncias testes na alteração de cor dos dentes humanos 74

4.6.1 Confecção dos corpos de prova 74
4.6.2 Imersão dos corpos de prova nas emulsões testes 76
4.6.3 Leitura de cor 77
4.7Avaliação da compatibilidade biológica de emulsões do óleo-resina da *Copaifera multijuga* em molares de ratos 78
4.7.1. Pastas Experimentais 78
4.7.1.1 Pasta composta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol 400 mais óleo-resina in natura da *Copaifera multijuga* a 10% 78
4.7.1.2 Pasta composta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol 400 79
4.7.2. Animais de experimentação 79
4.7.3. Preparo dos animais 80
4.7.4 Técnica Operatória 81
4.7.5. Sacrifício dos animais 82
4.7.6 Tramitação histopatológica 82
4.7.7 Análise histopatológica 84
4.8 Análise estatística 85
4.9 Aspectos Éticos 86

5. RESULTADOS 87
5.1 Cromatografia 87
5.2 Atividade Antibacteriana 87
5.2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) 87
5.2.2 Análise de viabilidade celular por técnica de fluorescência 91
5.3 Hemólise 92
5.4 Cultura de Células 94
5.5 Influência do Tempo de Aplicação das Substâncias Testes na Alteração de Cor dos Dentes Humanos 95
5.6 Avaliação da compatibilidade biológica de emulsões do óleo-resina da *Copaifera multijuga* em molares de rato 99

6. DISCUSSÃO 107

7. CONCLUSÃO 122

REFERÊNCIAS 123

APÊNDICE 135

ANEXO 150

1. INTRODUÇÃO

A cárie dental é reconhecida como uma doença infecto-contagiosa, de caráter multifatorial, necessitando do hospedeiro, da dieta cariogênica, da microbiota local e do fator tempo (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Esse diagrama da etiologia da cárie por sua simplicidade pode contribuir para uma atitude inadequada do profissional devido a complexidade da doença.

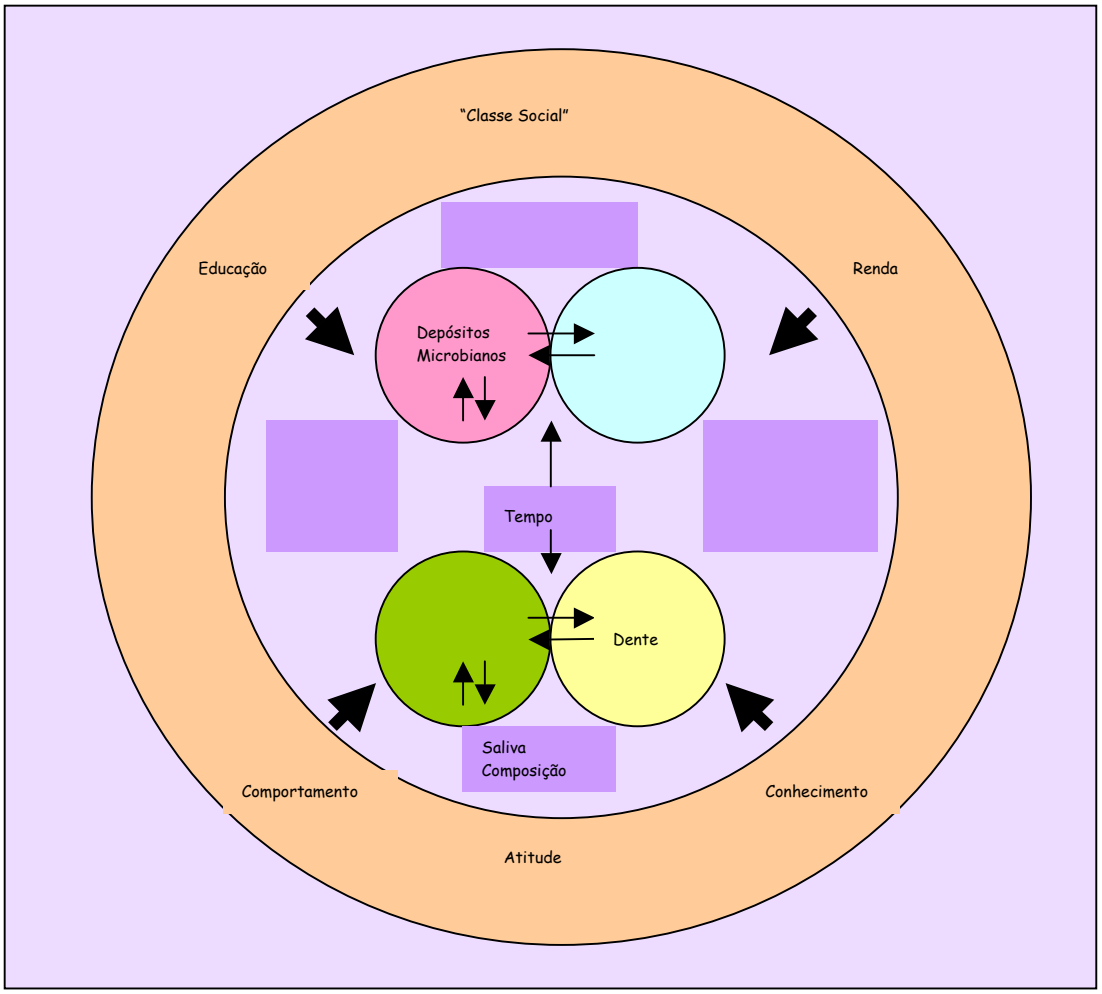

Figura 01 - Ilustração esquemática da relação entre fatores etiológicos, comportamentais e sócios-econômicos que influenciam na susceptibilidade do desenvolvimento da lesão de cárie (FEJERSKOV, 2004).

Neste sentido, Fejerskov (2004) contribuiu cientificamente com os estudos de prevenção da doença, apresentou outro diagrama mais completo demonstrando a complexidade da inter-relação entre a saliva, hábitos alimentares e os vários fatores biológicos que determinam a composição e o metabolismo do biofilme, incluindo os fatores comportamentais e sócio-econômicos que influem na suscetibilidade do desenvolvimento da lesão de cárie em um indivíduo (Figura 01).

É considerada uma doença crônica e, portanto, um processo que progride de forma muito lenta, na maioria dos indivíduos, sendo que raramente é autolimitante e, na ausência de tratamento, progride até destruir totalmente a estrutura dentária. A destruição localizada nos tecidos duros do dente, mesmo imperceptível ao olho nu, é sinal da doença (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Lesões de cárie que não permitem a realização de procedimentos de remineralização necessitam da intervenção invasiva do cirurgião-dentista. Essa intervenção preconiza a remoção da cárie previamente à confecção da reconstrução das estruturas perdidas, protegendo os remanescentes de novas agressões (FRANCO *et* al, 2007).

Durante o preparo cavitário o procedimento de corte com instrumentos rotatórios sobre a dentina, há a formação de uma camada constituída de resíduos do substrato seccionado, sangue, saliva, bactérias, fragmentos do abrasivo e óleos dos instrumentos rotatórios denominada lama dentinária ou *smear layer* (REIS; LOGUERCIO, 2007).

Nos princípios gerais do preparo cavitário, Black idealizou uma seqüência lógica de procedimentos, sendo a limpeza da cavidade que visa remover ou não a *smear layer*, possibilitando a colocação do material restaurador em uma cavidade

completamente limpa melhorando a adaptação e o vedamento marginal da restauração (RODE; SANTOS, 1990).

A importância do uso de um agente de limpeza cavitária é para diminuir a incidência dos microrganismos cariogênicos e assim prevenir a recorrência de cárie, facilitar a retenção de materiais às estruturas dentárias, prevenir a ocorrência de microinfiltração nas restaurações e, consequentemente, diminuir a possibilidade de sensibilidade pós-operatória, manchamento marginal, fraturas marginais e injúrias ao complexo dentino-pulpar.

Existem, basicamente, dois grupos de agentes para limpeza: os desmineralizantes e os não-desmineralizantes. Esses últimos, podendo ser enquadrados o digluconato de clorexidina a 2% e a água de hidróxido de cálcio, que removem os detritos pela força do impacto ou por esfregaço (MONDELLI, 1998).

A clorexidina é um dos agentes antimicrobianos mais estudados, seu efeito antibacteriano é de largo aspectro, apresenta alta substantividade, e atua diretamente na formação do biofilme (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

A água de hidróxido de cálcio proporciona limpeza mecânica, é alcalina, neutralizando a acidez da cavidade, atua como agente bacteriostático, estimula a calcificação dentinária e é hemostática nos casos de exposição pulpar (MONDELLI, 1998).

A utilização de plantas medicinais é descrita desde os primórdios da civilização para fins terapêuticos (DI STASI, 1996). As Copaíbas são árvores nativas da região tropical da America 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-resina secretado do tronco dessas árvores (VALDEVITE, 2007). Este óleo é utilizado há

muito tempo pelos índios para o tratamento de feridas, por sua ação anti-inflamatória, antisépticas, antibacterianas e antifúngicas. Devido a atividade biológica do óleo da copaíba especialmente a ação antibacteriana aos microrganismos da doença cárie, associou-se a utilização do óleo da copaíba com o processo restaurador (VASCONCELOS, 2006).

Com base nas características do potencial anticariogênico do óleo da copaíba, a proposta desse trabalho foi obter uma emulsão de limpeza da cavidade operatória a base do óleo da copaíba e avaliar a ação antimicrobiana, citotoxicidade, alteração de cor da estrutura dentinária e compatibilidade biológica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e a compatibilidade biológica em molares de ratos de emulsões de limpeza de cavidades restauradoras formulada a base do óleo da copaíba (*Copaifera multijug*a)

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Formular emulsões de óleo da copaíba nas concentrações 10% e 30%.

2.2.2 Analisar a atividade antibacteriana da emulsão formulada do óleo da Copaíba (*Copaifera multijuga*) frente as bactérias da cavidade oral.

2.2.3 Verificar a citotoxicidade das emulsões testes.

2.2.4 Analisar as emulsões testes frente a alteração de cor.

2.2.5 Verificar a compatibilidade biológica das emulsões e pastas em exposição pulpar em molares de ratos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biofilme e Cárie Dental

A película adquirida é caracterizada como uma película incolor, aderente e não mineralizada, sustentadas por uma matriz de proteínas salivares, polissacarídeos, células descamadas, leucócitos e restos alimentares, que se formam sobre a superfície dos dentes e tecidos gengivais em diferentes sítios da cavidade bucal (MARSH; BRADSHAW, 1997).

Poucas horas após a exposição ao ambiente bucal, uma superfície dental totalmente limpa não só estará recoberta por esta película, mas também por vários microrganismos, formando o biofilme bacteriano. Esta colonização bacteriana da película adquirida ocorre aproximadamente 2 a 4 horas após a limpeza profissional (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995).

Após a formação da película adquirida deve haver a adesão microbiana para poder ocorrer a colonização bacteriana. Os *Streptococcus mutans* não são considerados bons colonizadores primários dos dentes, já que outros estreptococos bucais, como *Streptococcus sanguis, Streptococcus mitis, Streptococcus gordoni e Streptococcus oralis*, apresentam adesinas, glicoproteínas, com maior afinidade à película adquirida (KOLENBRANDER; LONDON, 1993). Todavia, adesina (Ag I/II) e a proteína ß*glucan-biding* são antígenos do *S.mutans* que parecem estar associados com a capacidade deste microrganismo em aderir e acumular no biofilme dental (NOGUEIRA *et al*, 2005; PECHARKI *et al*, 2005).

Quanto à atividade patogênica, pelo menos três tipos de biofilme podem ser

identificados de acordo com as condições clínicas: biofilme não-associado à doença, biofilme associado à cárie e biofilme associado à doença periodontal.

O biofilme não associado à doença está presente em quase todas as cavidades orais sem determinar consequências graves, à medida que é realizado seu controle mecânico, por exemplo, através de escovação dental correta. Em longo prazo, pode-se mostrar associado à baixa prevalência de cárie, bem como à pequena perda óssea.

O biofilme associado à cárie é adaptado a converter rapidamente sacarose em polímeros intra e extracelulares insolúveis e apresenta níveis de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* elevados.

O biofilme associado à doença periodontal desenvolve-se em indivíduos com higiene oral deficiente, permitindo o acúmulo de verdadeiras massas microbianas em nível da margem gengival e no sulco gengival, tem elevados níveis de bastonetes Gram-negativos anaeróbios e espécies de actinomyces, e não há *S. mutans* (UZEDA, 2002).

O biofilme garante a vida da colônia bacteriana em ambientes instáveis, por proporcionar uma série de vantagens, tais como, melhor comunicação entre as células por estabelecer continuidade entre elas, facilitar as reações bioquímicas, melhorar as condições de proliferação e acesso a recursos que não poderiam ser utilizados por células isoladas, além da defesa coletiva contra fatores antagônicos.

Mas ao contrário do que se possa supor, a colonização microbiana dos dentes pode ser benéfica, na medida em que contribui para a defesa da cavidade bucal contra a instalação de microrganismos patogênicos, através de competição.

A microbiota residente no biofilme dental é uma comunidade relativamente estável com alta diversidade de espécies que podem variar de um sítio para outro, coexistindo através de interações metabólicas altamente relacionadas (VAN DER

HOEVEN; CAMP, 1994). Todavia, para permanecerem na cavidade oral, as espécies bacterianas devem estar aptas a tolerar flutuações bruscas e substanciais do meio em que vivem, sobretudo no que diz respeito ao pH e aos nutrientes disponíveis (LEMOS *et al*, 2005).

No biofilme existe um equilíbrio dinâmico. A lesão de cárie ocorre, então, quando o equilíbrio do processo físico-químico, de des-remineralização, é quebrado, ou seja, quando a composição e as atividades metabólicas desta complexa comunidade que compõe o biofilme são modificadas (BURNE, 1998).

As bactérias metabolicamente ativas que colonizam o biofilme dental, consumindo carboidratos fermentáveis, causam flutuações de pH do meio, que podem culminar com a desmineralização do esmalte dental (MANJI *et al*, 1991) e assim, as lesões cariosas resultam da interação entre as bactérias fermentadoras de carboidratos que colonizam a superfície dos dentes com os constituintes da dieta alimentar, sobretudo a sacarose (VACCA-SMITH *et al*, 1996).

A literatura tem mostrado dados consistentes de que o grupo mutans de bactérias gram positivas, particularmente, o *Streptococcus mutans*, são os microrganismos específicos sempre presentes no biofilme dental potencialmente cariogênico, desempenhando papel chave na patogênese de cáries dentais em humanos (LI; BURNE, 2001).

O *Streptococcus mutans* possui um sistema de transdução de sinal que garante a sua sobrevivência no biofilme dental. Esse microrganismo consegue perceber as mudanças ambientais de pH e, em resposta, sua expressão gênica pode sofrer alterações. O componente regulador de uma proteína histatina quinase associada à membrana, que estimula uma resposta citoplasmática, quando as condições externas de pH são alteradas (LI *et al*, 2002).

O pH intracelular de *S.mutans* é mantido acima do pH extracelular do biofilme dental, através da translocação de prótons (H^+) via ATPases de membranas (STURR; MARQUIS, 1992), ou através de um processo elétron neutro mediado por carreador de membrana celular e sem gasto de energia, onde os prótons são expelidos junto com os metabólitos celulares (DASHPER; REYNOLDS, 1992).

Assim estes mecanismos protegem o *S.mutans* do acúmulo de intermediários da via glicolítica no citoplasma, fazendo com que seja capaz de sobreviver em condições de baixo pH externo. Todavia, tal microrganismo acidifica o biofilme dental, provocando a desmineralização do esmalte e a formação da cárie (HAMILTON, 1995).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* compreendem um grupo de organismos que tem um papel mais importante na progressão do que na instalação da cárie dental. São bastonetes Gram positivos, anaeróbios facultativos e às vezes microaerófilos. Uma característica importante é a sua capacidade acidogênica (produzir ácido) e acidúrica (sobreviver no meio ácido) e sua capacidade de realizar tanto o metabolismo oxidativo como fermentativo (UZEDA, 2002).

Em relação à cáries de superfícies lisas de esmalte ou superfície radicular, os *Lactobacillus* não são capazes de desempenhar papel preponderante como agente etiológico do início da lesão de cárie, por não serem capazes de sintetizar polissacarídeos extracelulares e assim não se aderirem a superfícies lisas, necessitando de sítios retentivos para a sua colonização (sulcos, fissuras e regiões interproximais). Os lactobacilos parecem ser invasores secundários em algumas lesões de cárie, devendo contribuir para a progressão destas, graças as suas características acidogênicas e estão associados ao desenvolvimento da cárie dentária sob circunstâncias específicas, como o consumo frequente e alto de sacarose

(MALTZ, 1996).

A cárie dental deve ser considerada, portanto, um processo dinâmico, dependente das condições da interface biofilme dental esmalte-dentina, em que a concentração de íons hidrogênio e íons de compostos inorgânicos presentes no biofilme estabeleceram condições de supersaturação e subsaturação que favoreceram, respectivamente, a remineralização ou desmineralização do esmalte dental (CURY, 1992). Se o processo de desmineralização predominar por um grande período, e a taxa de desmineralização se sobrepor a de remineralização, o resultado é a perda gradual de minerais do dente, originando a formação de uma cavidade irreversível. (AOBA, 2004)

Lesões de cárie que não permitem a realização de procedimentos de remineralização, necessitam da intervenção invasiva do cirurgião-dentista. Essa intervenção preconiza a remoção da cárie previamente à confecção de uma restauração das estruturas perdidas, protegendo as estruturas remanescentes de novas agressões (FRANCO *et al*, 2007).

3.2 Soluções de Limpeza de Cavidade

A limpeza cavitária é baseada na remoção de detritos oriundos do preparo cavitário, tais como, raspas de dentina e esmalte, bactérias, pequenos fragmentos ou partículas abrasivas dos instrumentos rotatórios, óleos provenientes dos aparelhos de alta e baixa velocidade, formando uma película sobre o dente denominada *smear layer* (FRANCO *et al,* 2007).

Anderson; Loesche; Charneneneu (1985) detectaram através de estudos bacteriológicos, a permanência de bactérias no interior dos túbulos dentinários em cerca de 15 a 40% das lesões de cáries examinadas após o término do preparo cavitário e a aplicação de evidenciadores de cárie. Brännström(1986) afirmou ainda que a presença de bactérias após realizado o processo restaurador permite a difusão de toxinas para a polpa resultando em irritação e inflamação do tecido pulpar.

O esmalte é a estrutura mais mineralizada do corpo humano, possui 97% de sais de cálcio e 3% de matéria orgânica, e a dentina se assemelha mais ao osso, possuindo 70% do total em material inorgânico. No interior da dentina encontram-se os túbulos dentinários que são pequenos canalículos com diâmetro de 2 a 4 μm, por onde passam os prolongamentos citoplasmáticos das células odontoblásticas situadas junto à polpa (BARATIERI *et al*, 2001).

Quando se realiza a remoção da lesão de cárie, quanto mais profundo o preparo da cavidade maior será o número de túbulos dentinários expostos, maior o seu diâmetro e maior a área de canalículos por superfície. Através do corte da estrutura dentária forma a *smear layer*, que se deposita de maneira homogênea sobre os tecidos duros dentais, por isto pode ter uma espessura variável de 0, 5 a 15 μm (REIS; LOGUERCIO, 2007).

Essa camada representa uma proteção natural ao complexo dentino-pulpar contra a invasão de bactérias, produtos tóxicos, toxinas bacterianas e ácidos. Porém, a presença desta camada também apresenta desvantagens como a interferência direta nos mecanismos de adesão de alguns sistemas adesivos e a manutenção de bactérias no interior da camada. Um agente de limpeza ideal deve remover a *smear layer*, não ser tóxico à polpa e aos tecidos adjacentes ao dente, facilitar a remoção dos agentes protetores e combater e eliminar microrganismos patogênicos existentes nas paredes

cavitárias (FRANCO *et al*, 2007).

Mondelli (1998) classificou os agentes de limpeza de cavidade restauradora em dois grupos: os desmineralizantes, que são os ácidos, e os não-desmineralizantes, que são os germicidas e alcalinizantes. Encontram-se no mercado vários produtos que podem ser utilizados como agentes de limpeza cavitária, cuja ação e indicação variam de acordo com a sua natureza química e com a indicação clínica do dente. Além da efetividade em termos de limpeza, é imprescindível observar a biocompatibilidade do agente diante do complexo dentino-pulpar. Por isso, em cavidades profundas, não é aconselhável a utilização de agentes desmineralizantes, que apesar de sua eficiência na ação de limpeza de cavidade pode causar efeitos deletérios ao complexo dentinopulpar .

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 um componente catiônico, pois liga-se imediatamente a superfície bacteriana carregada negativamente, sendo uma bis-biguanida não tóxica que é preparada sob a forma de sais, dentre eles o acetato, hidrocloreto e o gluconato de clorexidina, apresenta propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas. É considerado um

agente antimicrobiano de amplo espectro que atua sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbicos e anaeróbicos, fungos e leveduras. Possui estabilidade, é segura e efetiva. Suas propriedades catiônicas favorecem a adsorção seletiva pela hidroxiapatita do esmalte dos dentes (MENDES *et al*, 1995).

A clorexidina tem duas formas principais de ação. Quando em baixas concentrações, seu efeito é bacteriostático, sua carga positiva se liga à carga negativa da parede da célula bacteriana, alterando o equilíbrio osmótico e fazendo com que haja perda de substâncias intracelulares de baixo peso molecular. Em altas concentrações, ela é bactericida e faz com que o citoplasma da célula se precipite, o que resulta em morte celular.

A clorexidina, mesmo em baixas concentrações também age inibindo o sistema fosfoenolpiruvatofosfotransferase, responsável pelo transporte de açúcar pelas bactérias, e ainda se ligando às bactérias, e glicoproteínas salivares para interferir na adesão da bactéria ao dente (COSTA *et a*l, 1999).

As soluções à base de hidróxido de cálcio são úteis para qualquer tipo de profundidade do preparo cavitário, pois além de limparem mecanicamente a cavidade, neutralizam a acidez bacteriana através de sua alcalinidade e ainda agem como estimuladores na formação de dentina reparadora, em menor tempo que outros materiais (BUSATO, 2002).

Araújo *et al* (1998) avaliaram através da visualização no MEV-DSM 950 a ação de diferentes substâncias para a limpeza dentinária. Os autores realizaram uma cavidade em pré-molares íntegros, extraídos, de 1mm de dentina com alta rotação sob abundante refrigeração ar/água, para produzir a camada de lama dentinária. Em seguida, essa superfície foi tratada com diferentes substâncias e lavada por 30 segundos com "spray" ar/água. Os materiais que mais removeram a camada de

lama foram em ordem crescente: 1. "spray" ar/água; 2. fluoreto de sódio 2%; 3. associação alternada de Dakin/Tergensol; 4. água oxigenada 3%; 5. jateamento com óxido de alumínio 50 μm; 6. flúor acidulado 1,27%; 7. ácido poliacrílico 25%; 8. ácido fosfórico 10%.

Costa *et al* (1999) realizaram um estudo para avaliar o potencial de reparação do complexo dentino-pulpar quando polpas de dentes de ratos foram mecanicamente expostas, capeadas com o sistema adesivo Scotchbond MP, com ou sem aplicação prévia de uma solução de clorexidina a 0,2%. Os autores observaram que independente da aplicação prévia ou não da clorexidina a 0,2% o complexo dentino-pulpar sofreu necrose, se tornando mais extensa nos maiores períodos experimentais. Desta maneira conclui-se que o capeamento pulpar com o sistema adesivo Scotchbond MP foi uma técnica restauradora não aceitável, pois não permitiu a reparação do complexo dentino–pulpar e a reação quanto a aplicação prévia da solução de clorexidina não pode ser observada.

Geraldini *et al* (2000) avaliaram através da microscopia de varredura (DSM 950-ZEISS) a ação do extrato etanólico da própolis como agente de limpeza dentinária. Uma cavidade de 1mm de dentina foi realizada em molares íntegros através de instrumentos de alta rotação, simulando a formação da camada de esfregaço. Em seguida estas superfícies foram tratadas com soluções etanólicas de própolis a 10, 20 e 30% e com etanol 70% puro, como controle foi utilizado o spray água/ar. O extrato etanólico de própolis a 10% promoveu uma camada regular cobrindo a superfície dentinária e a 20% e 30% apresentou partículas com formas esferoidais de vários tamanhos que ficaram sobrepostas ao esfregaço dentinário, o qual se apresentava regular e com poucos detritos, sugerindo ação de limpeza das

substâncias utilizadas.

Andrade *et al* (2005) avaliaram a força de união de 3 diferentes sistemas adesivos a dentina após a remoção de tecido cariado com Carisolv™ e dois métodos de limpeza cavitária. Dentes cariados previamente selecionados foram divididos nos seguintes grupos experimentais: GI profilaxia/Tergentol + SingleBond + Filtek Z250; GII – Hipoclorito de sódio 0.5% + SingleBond + Filtek Z250; GIII - profilaxia /Tergentol + Prime & Bond NT + Surefil; GIV - Hipoclorito de sódio 0.5% + Prime & Bond NT + Surefil; GV - profilaxia /Tergentol + Excite + Tetric Ceram; GVI - Hipoclorito de sódio 0.5% + Excite + Tetric Ceram. Os corpos de prova permaneceram em água destilada a 37ºC por 24 horas e então foram submetidos ao teste de tração. Os valores foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskall-Wallis ($p< 0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os sistemas adesivos utilizados mostraram resistências de união semelhantes à dentina indiferentemente do método limpeza cavitária utilizado.

A perda da integridade da camada híbrida compromete a estabilidade adesiva da resina ao dente. A matriz metaloproteinase (MMP) pode ser parcialmente responsável pela degradação da camada híbrida. Carrilho *et al* (2007) avaliaram a clorexidina a 2% na desaceleração da perda da adesividade resina – dentina, através da confecção de restaurações classe I, em terceiros molares extraídos. Após aplicação do ataque ácido lavou a cavidade com clorexidina a 2%, em seguida seguiu o protocolo de restauração adesiva. Na cavidade controle não realizou a limpeza com clorexidina. Os corpos de prova foram submetidos ao contato com saliva artificial e proteínas de inibição das proteases, e foram avaliados no microscópio de varredura logo após a confecção da restauração e 6 meses depois. Os autores demonstraram que

o uso da clorexidina a 2% após o condicionamento ácido, inibindo a desintegração das MMP da camada híbrida, aumentou o resistência adesiva do material.

3.3 Óleo-resina de copaíba

Entre os produtos naturais utilizados no país, o óleo da copaíba tem uma grande representação social e econômica, especialmente na região amazônica, onde é nativo e largamente empregado (RAMOS, 2006).

As copaibeiras são árvores nativas da região tropical da América Latina e da África Ocidental. No Brasil são encontradas facilmente na região Amazônica e Centro-Oeste, sendo as espécies mais abundantes: *Copaifera officinalis* L., *C.guianensis* Desf., *C. reticulada* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth, *C. langsdorffii* Desf., *C. coriácea* Mart., e *C. cearensis* Huber ex Ducke (VEIGA JR; PINTO, 2002).

De acordo com Alencar (1982), a *Copaifera multijuga* pertence a família Leguminosae-Caesalpinioideae, uma árvore de grande porte que atinge na reserva Ducke até 36 m de altura com diâmetro de até 80cm, sendo mais frequente, os diâmetros de 40-50 cm. Esta espécie tem habitat em floresta de terra firme, encontrada com maior freqüência em solos argilosos, podendo ocorrer em solos arenosos.

Segundo relato de literatura, acredita-se que o óleo da copaíba seja um produto de excreção ou desintoxicação que funciona como defesa da árvore contra animais, fungos e bactérias. Este óleo é encontrado em canais secretores localizados

em todas as partes da árvore, tendo no tronco seu compartilhamento mais saliente (ALENCAR, 1982).

A extração do óleo é feita por uma técnica considerada não agressiva a árvore, consistindo em duas perfurações no tronco com o trado, a primeira deve ser feita um metro acima da base da planta e a segunda de um metro a um metro e meio acima da primeira. Um cano de PVC de ¾ de polegada é inserido nos orifícios. Após a extração, o orifício é vedado com uma tampa vedante de plástico para impedir a infestação da árvore por fungos e cupins (OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006). Esta prática garante também que, de um mesmo espécime, possa ser coletado óleo várias vezes ao ano, sem danos à espécie vegetal (ALENCAR, 1982).

Alguns fatores podem interferir na qualidade do óleo, entre eles estão: espécie da árvore, idade e época do ano (OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006). O melhor período de coleta para a espécie *C.multijuga* são os meses de estiagem (julho a novembro), pois neste período ocorre largo rendimento do óleo (ALENCAR, 1982). No entanto, Tappin *et al* (2004) relataram que os óleos da copaíba apresentam certa variabilidade nos seus componentes, devido a fatores bióticos, como fungos e insetos, a luminosidade e nutrientes do solo.

O produto popularmente denominado de óleo da copaíba é constituído de 40 a 50% de essência e 40 a 60% de resina. Quando pura, a essência é um líquido de aspecto incolor, límpido, transparente com odor e sabor de copaíba. A composição da resina varia de acordo com a sua procedência, no Brasil é composta pelos ácidos paracopaíbico e ilusônico (BANDEIRA *et al*, 1999).

3.3.1 Composição química

Através de relatos na literatura pode-se observar que existe uma variação na composição química dentro do gênero *Copaifera* e até mesmo entre uma mesma espécie. Porém pouco se sabe da relação entre as estruturas e a atividade dos componentes; atividade essas que incluem: ação bactericida, analgésica, anti-helmíntica, anti-inflamatória, gastro-protetora, antitumoral e tripanocida (CASCON;GILBERT, 2000).

Bandeira *et al* (1999b) realizaram análise fitoquímica através de cromatografia gasosa da *Copaifera multijuga*, visando identificar seus principais componentes e ainda obtiveram as frações deste óleo através de destilação, com o intuito de utilizá-las como veículo ao hidróxido de cálcio. Esses autores concluíram que o óleo de *C.multijuga* apresentou vários sesquinterpenos, principalmente β-cariofileno, α-humuleno, bisobolen, cedreno e cadieno.

Cascon; Gilbert (2000) analisaram a composição química quantitativa e qualitativamente dos óleo-resina da copaíba das espécies *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer e *Copaifera multijuga* Hayne através da cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Os autores observaram que a *Copaifera multijuga* foi a espécie que as frações de sesquiterpenos predominaram, enquanto que nas outras espécies analisadas, *C.guianensis* e *C.duckei*, predominaram os ácidos diterpenos. Todas as amostras utilizadas neste estudo apresentaram em comum apenas os sesquiterpenos β-cariofileno e α-bergamoteno que não estão restritos apenas ao gênero *Copaifera*. Relataram ainda, que o óleo-resina da *C.multijuga* das amostras estudadas foi caracterizado pela grande predominância de β-cariofileno e δ-cadineno. Os autores concluíram que ocorre uma

significativa variação química não somente entre as espécies mas também dentro de uma mesma espécie, o que pode ocasionar diferentes ações farmacológicas e citotoxicidades.

Veiga Jr *et al* (2001) analisaram a composição química de amostras comerciais de óleo da copaíba e atividade antiedema das mesmas. A composição química das amostras foram muito similares, com a predominância dos sesquiterpenos β-cariofileno e α-bergamoteno, com exceção de uma amostra. Os resultados sugeriram que os hidrocarbonetos sesquiterpenos presentes nas amostras analisadas foram responsáveis pela atividade antiedema.

Lima *et al* (2003) descreveram que o óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne e suas frações reduziram a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. O β-cariofileno e α-humuleno eram os componentes majoritários, representando 57% e 8,28% (teor relativo) da composição química da óleo-resina. Os autores concluíram que óleo-resina da copaíba pode ser um agente antitumoral e antineoplásico.

3.3.2 Propriedades medicinais

O óleo-resina da copaíba tem sido usado pelas populações amazônicas desde muito tempo, devido suas propriedades medicinais. Assim, é empregado como anti-inflamatório, anestésico, antisséptico, cicatrizante, entre outros (BANDEIRA *et al*, 1999b).

Veiga Junior; Pinto (2002) em revisão de literatura sobre o gênero *Copaifera l.* revelaram que vários dos compostos já isolados ou detectados nos óleos de copaíba tiveram suas propriedades farmacológicas descritas em vários estudos. Entre eles, destaca-se o cariofileno ao qual atribui-se as seguintes ações:

antiedêmica, fagorrepelente, anti-inflamatória, anti-tumoral, antialérgica e bactericida.

Costa-Lotufo *et al* (2002) demonstraram em ensaios *in vitro* que o ácido kaurenóico isolado da óleo-resina da *Copaifera langsdorffi* interferiu no desenvolvimento de embriões de ouriço-do-mar, proporcionou hemólise de eritrócitos humanos e de ratos e inibiu em 95% a proliferação de células leucêmicas humanas e em 45% as câncer de mama e cólon, indicando o potencial citotóxico do ácido kaurenóico.

Gomes *et al* (2007) compararam a atividade antinoceptiva entre as espécies da *Copaifera multijuga* e *Copaifera reticulata*, através de modelos de indução da dor periférica, espinhal e supra-espinhal em ratos. A ação antinoceptiva entre as diferentes espécies não teve diferença estatística significante, e as mesmas apresentaram efeitos antinoceptivos periféricos e centrais, o que indica o uso do óleo-resina da copaíba testados nos tratamentos de desordens álgicas.

3.3.2.1 Atividade antimicrobiana

Bandeira *et al* (1999) avaliaram a atividade antibacteriana e a compatibilidade biológica do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga* em molares de ratos. Pastas foram formuladas com hidróxido de cálcio ou óxido de zinco associados ao óleo essencial ou a resina. Os resultados destes estudos demonstraram que as pastas experimentais de hidróxido de cálcio e óxido de zinco associadas ao óleo essencial ou a resina apresentaram atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus mutans*. O óleo da copaíba expressou efeito bacteriostático e bactericida, e a resina bacteriostática frente ao *Streptococcus mutans*.

Simões (2004) formulou um gel à base de óleo-resina da copaíba (*Copaifera multijuga*), realizou seu controle de qualidade e analisou a atividade antibacteriana do referido gel frente a cepas isoladas do biofilme dental (*Streptococcus mitis, Streptococcus salivarius* e *Streptococcus constellatus)* e cepas padrão (*Streptococcus mutans, Streptococcus mitis, Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis)*. Foi observado que todos os microrganismos testados foram suscetíveis à ação antibacteriana do gel experimental no teste de difusão em ágar.

Abinader (2005) avaliou *in vitro* a atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada aos diferentes veículos: oleoso (óleo-resina *in natura* e óleo essencial da *Copaifera multijuga* e *Copaifera reticulada*), aquoso (soro fisiológico) e viscoso (Polietilenoglicol 400) frente a *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, conclui que todas as pastas experimentais apresentaram atividade antimicrobiana frente a *C.albicans* e ao *E.faecalis* e observou que as pastas formuladas com os óleos essenciais da *C.multijuga e C.reticulata* apresentaram maior halo de inibição.

Valdevite (2007) avaliou a ação do extrato bruto hidroetanólico das folhas (EF), do óleo-resina (OR) e de suas frações, a fração volátil (FV) e a fração resinosa (FR), de Copaíba (*Copaifera langsdorffii)* sobre os fatores de virulência de *S. mutans*, que tanto o extrato hidroetanólico das folhas e as frações não apresentaram nenhum efeito bactericida nas concentrações testadas, sugerindo que eles exercem um efeito bacteriostático. Por outro lado o óleo-resina exibiu um efeito bacteriostático em baixa concentração (concentração inibitória mínima CIM=0,4mg/mL) e um efeito bactericida em concentrações maiores (0,8 mg/mL).

Santos *et al* (2008) compararam a atividade antimicrobiana entre *Copaifera martii, Copaifera officinalis* e *Copaifera reticulata* frente a bactérias Gram-

positivas, Gram-negativas e fungos dermatófitos. Todas as espécies da *Copaifera* estudadas apresentaram atividade antibacteriana frente a microrganismos Gram-positivo, mostrando atividade bactericida, diminuindo a viabilidade das bactérias. Foi observado uma atividade moderada frente aos fungos dermatófitos e não apresentaram atividade frente as bactérias Gram-negativas.

Vasconcelos *et al* (2008) formularam um cimento odontológico obtido da associação do hidróxido de cálcio, óxido de zinco e óleo-resina *in natura* da copaíba (*Copaifera multijuga).* Avaliaram as propriedades físico-químicas de solubilidade e desintegração e a atividade antibacteriana através do teste de diluição em meio líquido frente às cepas padrão de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Streptococcus sanguinis* ATCC 15300. Nesse ensaio foram utilizados os seguintes grupos experimentais: o cimento contendo ZnO, $Ca(OH)_2$ e óleo-resina da copaíba (G1) e cada um dos componentes isoladamente ZnO (G2), $Ca(OH)_2$ (G3) e óleo-resina da copaíba (G4). Os resultados obtidos das propriedades físico-químicas correspondem aos padrões preconizados pela Associação Dental Americana, com um potencial de solubilidade e desintegração inferior a 3%. Todos os grupos analisados demonstraram atividade antibacteriana, o G4 apresentou os melhores resultados e o G1 mostrou-se um cimento promissor a ser utilizado na odontologia.

Souza *et al* (2011) realizaram um estudo da atividade antibacteriana de diterpenos e sesquiterpenos isolados do óleo-resina da *Copaifera langsdorffi* através do teste de Concentração Inibitória Mínima com método de coloração de resazurina (0,025%) frente a *S. salivarius, S. sobrinus, S. mutans, S. mitis, S. sanguinis* e *Lactobacillus casei*. O ácido copálico foi o diterpeno que melhor apresentou atividade antibacteriana (CIM 2,0 a 6,0µg/mL). Os autores concluíram que o ácido

copálico é um importante metabólito na pesquisa de um novo agente antibacteriano contra patógenos responsáveis pela doença cárie.

3.3.2.2 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória do óleo-resina da copaíba tem sido a mais difundida na medicina popular e investigada no meio científico (RAMOS, 2006).

Veiga Jr *et al* (2001) analisaram a composição química de amostras comerciais de óleo da copaíba e atividade antiedema das mesmas. A composição química das amostras foram muito similares, com a predominância dos sesquiterpenos β-cariofileno e α-bergamoteno, com exceção de uma amostra. Os autores relataram ainda que algumas amostras apresentaram a atividade antiedema e estas divergiram quanto ao agente indutor, bradicinina ou carragenina. Porém se obteve melhores resultados contra o edema de pata nos ratos quando se aplicou somente frações de hidrocarbonetos, em relação as frações de álcoois sesquiterpenos e ácidos diterpenos. Os resultados sugeriram que os hidrocarbonetos sesquiterpenos presentes nas amostras analisadas foram responsáveis pela atividade antiedema.

Paiva *et al* (2002) observaram que aplicação tópica do óleo-resina da *Copaifera langsdorffi* acelerou a cicatrização quando comparada com o controle no período experimental de nove dias. Nos demais períodos experimentais não houve diferença estatística. Os autores concluíram que o óleo-resina testado apresenta atividade cicatricial em feridas induzidas nos ratos.

Cavalcanti Neto *et al* (2005) compararam histologicamente o processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos após a aplicação tópica do óleo-resina da *Copaifera reticulata*, adquirida na feira do produtor, solução aquosa de digluconato

de clorexidina a 0,12% e soro fisiológico a 0,9%, como controle, nos períodos experimentais de 1, 7 e 15 dias. As feridas cutâneas tratadas com clorexidina a 0,12% apresentaram melhor cicatrização quando comparadas com os outros grupos. Os autores deste trabalho não descreveram a composição química do óleo-resina, o que nos leva a crer que os resultados conflitantes possam ser atribuídos as diferenças químicas dos óleos-resinas relatados.

Ramos (2006) avaliou a atividade anti-inflamatória e farmacológica de uma fração volátil do óleo-resina da copaíba. A fração microencapsulada inibiu a resposta inflamatória na mesma magnitude que fração volátil livre, mostrando que o processo de microencapsulação não alterou a atividade, possibilitando o seu uso como forma farmacêutica ou intermediária na preparação de outras. O β–cariofileno inibiu a resposta inflamatória na dose de 32 mg/kg, na mesma magnitude que a fração volátil, o que nos permite atribuir a este, a atividade anti-inflamatória observada.

Veiga Jr *et al* (2007) compararam a composição química e a atividade anti-inflamatória do óleo-resina da *Copaifera cearenses* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke e *Copaifera multijuga* Hayne. Na análise química os principais sesquiterpenos foram β-cariofileno, seguido do α-humuleno, α-copaeno, α-bergamoteno, δ-cadieno, com diferentes concentrações em cada óleo-resina. Quanto aos diterpenos, os óleo-resinas não apresentaram um consenso em relação aos compostos químicos, como apresentados nos sesquiterpenos. Na avaliação da atividade anti-inflamátoria os óleos testados reduziram o acúmulo de leucócitos e neutrófilos, em diferentes concentrações. O óleo-resina da *Copaifera multijuga* (100mg/kg) foi considerada a mais potente na atividade anti-inflamatória induzida, os autores correlataram que este óleo foi o qual apresentou maior concentração de β-

cariofileno (57,5%), e que este composto pode ser descrito como um importante agente anti-inflamatório.

No estudo realizado por Pereira *et al* (2008) utilizaram o óleo essencial obtido do pericarpo da *Copaifera langsdorffii* por hidrodestilações sucessivas para verificar sua ação anti-inflamatória através do modelo de edema de pata de rato. Na análise de sua composição química observaram principalmente (*E*)-cariofileno, germacreno B, 1,5-epoxisalvial-4(14)-eno, óxido de cariofileno e isoespatulenol. Os autores observaram a ação anti-inflamatória do óleo hidrodestilado do pericarpo e ressaltaram que deve haver uma padronização dos constituintes do óleo para que a ação seja mesmo eficaz.

Gomes *et al* (2010) avaliaram ações anti-inflamatórias e antinoceptivas de frações obtidas do óleo-resina da *Copaifera multijuga*, que representam as três principais classes de compostos do gênero *Copaifera*, hidrocarbonetos sesquiterpenos, álcoois sesquiterpenos e ácidos diterpenos. Os resultados demonstraram atividade anti-inflamatória e antinoceptiva atuando de forma similar a um anti-inflamatório não esteroidal ou drogas opióides.

3.4 Amirina

A família Burseraceae compreende 16 gêneros e mais de 800 espécies tropicais e subtropicais. Alguns gêneros desta família são produtores de uma seiva oleosa rica em óleo essencial e triterpenos. A espécie *Protium heptaphyllum*, conhecida popularmente como almecegueira, breu-branco-verdadeiro, almecegueira cheirosa, almecegueira de cheiro, almecegueira vermelha ou almecegueiro bravo,

ocorre em todo Brasil, sendo largamente encontrada na região amazônica, onde sua seiva é conhecida como breu branco, goma limão, almécega do Brasil. Na medicina popular, esta espécie é considerada como um importante agente terapêutico, sendo utilizada como anti-inflamatório, analgésico, expectorante e cicatrizante. A composição química da resina, além do óleo essencial, cujo teor é de 11%, foram isolados o monoterpeno triidroxilado **1**, os triterpenos **α**-amirina, **β**-amirina e breina; dos frutos verdes, (-) catequina; dos frutos maduros e folhas, os flavonoides quercetina e quercetina-3-**O**-ramnosil, respectivamente; e do caule, escopoletina (BANDEIRA *et al*, 2002).

Estudos relatam que pela alta concentração da **α**-amirina, **β**-amirina atividades biológicas do Protium possam estar correlacionadas a esta substância isolada.

Otuki *et al* (2005) avaliaram os anti-inflamatórios tópicos obtidos a partir da planta medicinal *Protium kleinii* e de seu constituinte α-amirina, em relação a modelos de inflamação da pele induzida por TPA. A aplicação tópica foi realizada na orelha dos ratos. Em termos de eficácia, a inibição máxima do processo inflamatório obtido foi semelhante a aplicação tópica do dexametasona, impedindo o aumento de células pró-inflamatórias, como citocina e interleucina-1 em níveis de resposta a aplicação tópica de TPA e diminuindo o edema na orelha dos ratos. Estes resultados indicam que os componentes ativos presentes no extrato de *P. kleinii*, incluindo a α-amirina, apresentam atividade anti-inflamatória na forma tópica.

Otuki *et al* (2005) avaliaram os efeitos antinociceptivos periféricos, espinhal e supra-espinhal e alguns dos mecanismos subjacentes à ação de α-amirina e β-amirina (1:1). A mistura dos dois triterpenos pentacíclicos, isolada da resina de *Protium kleinii*, foi dada por via intraperitoneal ou oral contra a dor visceral, produzida pela introdução de ácido acético em camundongos. Diferente da morfina,

α,β-amirina pode não causar analgesia em modelos térmicos de dor. A antinocicepção causada pela α,β-amirina parecem envolver mecanismos independentes de opióides e adrenérgicos. Conclui-se que a mistura de amirinas produziu consistente antinocicepção periférica espinhal e supra-espinhal em roedores, especialmente quando avaliados em modelos inflamatórios da dor. Os mecanismos envolvidos na sua ação não estão completamente compreendidos, mas parecem envolver a inibição da proteína A e C quinase.

Medeiros *et al* (2006) investigaram o mecanismo de ação anti-inflamatória da α-amirina na utilização tópica na pele com inflamação induzida por TPA em camundongos. Foi realizada a aplicação tópica de α-amirina (0,1-1 mg/orelha) nos camundongos e procedimentos funcionais, bioquímicos e moleculares para a verificação do mecanismo de ação anti-inflamatória. Os resultados demonstraram que a aplicação tópica da α-amirina na pele exerce no início uma inibição da inflamação induzida por TPA. Através de ensaios Western Blot a α-amirina inibe por uma dose dependente o mecanismo de inflamação através da supressão da COX-2. Estes resultados indicam que α-amirina e derivados podem ser potencialmente relevantes para o desenvolvimento de um agente tópico para o tratamento de doenças inflamatórias.

Lima-Júnior *et al* (2007) descreveram a propriedade antinociceptiva visceral de α, β-amirina em ratos com cistite induzida por ciclofosfamida (CPM). A diferenciação sensorial foi feita por uma alta dose de capsaicina. Os parâmetros analisados foram: comportamentos nocivos da CPM, edema da bexiga, permeabilidade vascular e reação imunológica de NK1. Para avaliar o papel de K^+ nos canais de ATP em α, β-amirina, os animais foram pré-tratados com glibenclamida. Os resultados comprovaram significância ($p < 0,01$) de

α, β-amirina, onde suprimiu os comportamentos relacionados à dor visceral de NK1 e reação imunológica. Entretanto, não obteve redução significativa do edema bexiga. Glibenclamida reverteu os efeitos da α, β amirina. Foi concluído que α, β-amirina atenua dor visceral por CPM induzida e edema da bexiga por mecanismos que envolvam pelo menos em parte através da abertura de K^+ nos canais de ATP.

3.5 Testes de Citotoxicidade

3.5.1 Hemólise e Cultura de células

Berlinck *et al* (1996) avaliaram complexo de halitoxina extraída de uma esponja marinha, *Amphimedon viridis*, quanto a letalidade, antimitoses, hemólise e a neurotoxicidade. Este complexo de halitoxina foi letal na dose de 1,4mg/kg, promoveu hemólise com uma ED_{50}± SEM 2,2±0,5 ng/mL, interferiu na mitose na ED_{50}± SEM 2,78±0,17 μg/mL, e 5μg do complexo de halitoxina foi capaz de bloquear o potencial de condução nervosa.

Back *et al* (1999) avaliaram a viabilidade celular de precursores e células maduras de olidendrócitos através do ensaio de Alamar Blue, comparando ainda com os testes de MTT e Trypan Blue. O alamar blue, um reagente minimamente tóxico, contém um indicador aquoso de redução extracelular, que quando reduzido por células vivas produz uma reação de fluorescência que indica a viabilidade celular. Os precursores e células maduras de olidendrócitos foram submetidos a produtos que proporcionem toxicidade, através de oxi-redução pela depressão da glutationa ou excitotóxico de receptores kainate. Observaram que o através do método de Alamar Blue houve uma redução da viabilidade celular dos

olidendrócitos 2±2μM, por Trypan Blue 3±3μM e por MTT 1±0,4μM. Este trabalho observou que o Alamar Blue proporciona um rápido e seguro teste de viabilidade celular para precursores de oligodentrócitos e também valida o potencial citotóxico.

Costa-Lotufo *et al* (2002) avaliaram a citoxicidade e a embriotoxicidade do ácido kaurenóico isolado da óleo-resina da *Copaifera langsdorffi* . A continua exposição de embriões de ouriço-do-mar ao ácido kaurenóico inibiu desde a primeira divisão celular IC_{50} 84,2mM e progressivamente induziu a destruição embrionária IC_{50} 44,7mM. No teste de MTT(3 –(4, 5'- dimetylthiazol-2'-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide), o ácido isolado na concentração de 78μM inibiu em 95% a proliferação de células leucêmicas humanas(CEM) e em 45% as câncer de mama (MCF-7) e cólon (HCT-8). A substância teste também proporcionou hemólise nas soluções de eritrócitos humanos e de ratos a 2% com um EC_{50} 56.4 e 74mM respectivamente, indicando o potencial citotóxico do ácido kaurenóico.

Lima *et al* (2003) avaliaram o óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne na inibição de metástases e de crescimento de células de melanoma (B16F10) em ratos (*in vivo*) e sua citotoxicidade e de suas frações *in vitro* através dos testes de MTT e Trypan Blue, com a mesma linhagem de células. Os resultados deste estudo sugeriram que o óleo-resina da copaíba (2g/Kg de peso dos ratos) reduziu significantemente o volume do tumor em 76%, inibiu o crescimento do mesmo em 58% e reduziu significantemente a quantidade de nódulos indicando a metástase. Nos ensaios de Trypan Blue e MTT , o óleo-resina obteve atividade antitumoral contra a linhagem de células B16F10, nas diferentes doses testadas (0,5 e 1 mg/mL) e com os diferentes tempos (1 e 3horas). E as frações, diterpenos e sesquiterpenos, também apresentaram atividades no ensaio de MTT. Os autores sugerem que o óleo-

resina da copaíba pode ser um agente antitumoral e antineoplásico seguro e útil, podendo ser usado como um quimioterápico oral.

Pequeno; Soto-Blanco (2006) observaram que certas espécies de plantas causam toxicose em animais e avaliaram se o teste de hemólise seria capaz de indicar a toxicidade destas plantas previamente selecionadas. As plantas utilizadas não promoveram hemólise em solução de 1% de eritrócitos equinos.

Veiga Jr *et al* (2007) compararam a composição química e a atividade anti-inflamatória do óleo-resina da *Copaifera cearenses* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke e *Copaifera multijuga* Hayne. Na análise química os principais sesquiterpenos foram β-cariofileno, seguido do α-humuleno, α-copaeno, α-bergamoteno, δ-cadieno, com diferentes concentrações em cada óleo-resina. Quanto aos diterpenos, os óleo-resinas não apresentaram um consenso em relação aos compostos químicos, como apresentados nos sesquiterpenos. Quanto ao efeito citotóxico aos macrógrafos o óleo-resina da *Copaifera multijuga* e *Copaifera cearenses* foi citotóxica em 500µg/mL, reduzindo a viabilidade celular em 95% e 94%, respectivamente. Enquanto que na concentração de 50µg/mL 93% das células se tornaram viáveis. O óleo-resina da *Copaifera reticulata* não alterou a viabilidade celular.

Gomes (2008) avaliou a citotoxicidade in vitro de produtos naturais (terpenos, iridóides e derivados fenólicos) em linhagens celulares de adenocarcinoma murino de mama (LM3) e de pulmão (LP07), buscando uma possível correlação entre estrutura molecular e atividade antitumoral. Tingenona, pristimerina, plumericina e cromeno foram mais ativos que o controle positivo, taxol, para as linhagens tumorais LM3 e LP07; Os grupamentos carbonila α,ß-insaturados dos anéis A e B de pristimerina e tingenona parecem ser mais

importantes para a citotoxicidade das moléculas que o anel E, visto a similaridade dos IC50 entre pristimerina e tingenona e sua grande discrepância em comparação com o acetato de bauerenila; Tingenona, pristimerina e plumericina não exibem atividade mutagênica pelo teste de Ames, na presença ou ausência de ativação metabólica. Para os demais compostos não foi possível estabelecer relação entre estrutura e atividade citotóxica nas linhagens tumorais estudadas.

Kouidhi; Zmantar; Bakhrouf (2010) avaliaram o potencial anticariogênico, antibiofilme e antiproliferativo em algumas linhagens celulares de um extrato etanólico da própolis tunisiana. Através da concentração inibitória mínima foi analisado o potencial antibacteriano do extrato estudado frente a 33 patógenos orais. A atividade antibiofilme foi avaliada através do ensaio de coloração cristal de violeta e pelo teste de MTT, observando a redução do crescimento e desenvolvimento do biofilme, formação quantitativamente da biomassa do biofilme e atividade metabólica do mesmo. O teste de cultura de células e citotoxicidade foi avaliado pelo teste de MTT frente a linhagens humanas de células cancerígenas epiteliais (He-2), célula epitelial respiratória (A549), fibroblastos (MRC-5), células epitelial de intestino (HT-29), células epiteliais de fígado de macaco (vero) e macrófagos murinos (raw264.7). Na atividade antibacteriana o extrato testado apresentou ação frente a todas as cepas Stretococcus, em *S.mutans* a CIM foi 8-32µg/mL. O extrato apresentou resistência a *Enterococcus* spp. O percentual de inibição de formação de biofilme do extrato na concentração de 100µg/mL frente a *S. mitis* foi de 87,51%±1,56, para *S. pyogenes* 41,14±1,31, 50% para *S. mutans*. O efeito antiproliferativo do extrato pode ser observado uma maior citotoxicidade na linhagem Hep-2 IC50 15,7±3,4µg/mL e a menor citotoxicidade foi na linhagem A549 IC50 200±22µg/mL. O extrato etanólico de própolis tunisiano foi capaz de

inibir a proliferação de células cancerígenas, de bactérias cariogênicas e a formação do biofilme.

3.6 Testes de Alteração de Cor

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.

Vichi; Ferrari; Davidson (2004) analisaram a mudança de tonalidade de cor e opacidade de corpos de prova feitos com diferentes resinas composta, Spectrum TPH, Tetric Ceram e Z100, em várias tonalidades A2,A3,A3,5, A4, B2 e B3. A cor inicial das amostras foram medidas por um espectofotômetro utilizando o sistema de mensuração de cor CIE L*a*b*. Após a mensuração as amostras ficaram imergidas em um banho de água a 60^{o}C por 30 dias. Passado o período experimental foi

realizada uma nova mensuração de cor comparando com a inicial. Para análise dos resultados os autores consideraram que quando o $\Delta E < 1$ a mudança de cor não é perceptível ao olho humano, $1 < \Delta E < 3,3$ a mudança de cor é perceptível, mas clinicamente aceitável, $\Delta E > 3,3$ é considerado clinicamente não aceitável. A resina que se pode observar mudança de coloração aceitável foi a Tetric Ceram, mas não apresentou diferença estatística entre a Z100. O compósito que apresentou maior alteração de cor foi o Spectrum TPH.

Assunção e Souza *et al* (2006) avaliaram a estabilidade da cor de resinas compostas indiretas, Resilab Master, através de um colorímetro digital, Easyshade. Foram confeccionados 32 corpos de prova, e divididos em 4 grupos (n=8), nos quais foram imersos em diferentes soluções: Grupo 1 (controle): água destilada/ estufa; Grupo 2 : água destilada / termociclagem ($5^{o}C$ a $55^{o}C$ – 3.000 ciclos); Grupo 3: suco de laranja/ termociclagem; Grupo 4: café/ termociclagem. Foi realizado o registro da cor inicial com EasyShade posicionando o corpo de prova sobre uma superfície plana e de fundo branco. Após a exposição das amostras por 60 horas nas soluções colorimétricas, foi registrado a cor final, através do sistema CIE L*a*b*. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de Dunnet – $p<0,005$. Os resultados mostraram que os grupos 3 e 4 apresentaram alteração de cor estatisticamente significante em relação ao grupo controle 1, observando que o café mancha mais que o suco de laranja. Os autores observaram ainda que a termociclagem não contribui para alteração de cor, clinicamente aceitável, da resina composta indireta quando imersa em água destilada.

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.

Dozi`c *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 da 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 L*a*b* 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 no estudo *in vitro*. A precisão obtida foi em ordem decrescente foi Easyshade, ShadeScan, Ikam, IdentaColor, ShadeEye.

Caneppele *et al* (2009) avaliaram *in vitro* a interferência no clareamento dental com peróxido de carbamida (PC) 16% em dentes submetidos à embebição de substâncias com corantes durante o tratamento. Foram utilizados 40 incisivos bovinos, divididos em 4 grupos de acordo com o tratamento: G1 (controle), G2(café), G3(vinho) e G4(refrigerante a base de cola). A aplicação do agente clareador (PC

16%) foi realizada 8 horas/dia durante 14 dias. Os grupos testes G2 ao G4 foram embebidos pelas sustâncias testes durante cinco minutos duas vezes ao dia. E mantidos em saliva artificial durante todos o tratamento. 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 (Grupos 2, 3 e 4) e o grupo submetido somente ao clareamento (Grupo 1 - controle). Concluiu-se que a embebição dos dentes em soluções com corantes não afetou o resultado do tratamento clareador.

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. Foram confeccionados 240 corpos de prova de quatro resinas diferentes de matiz A3. A cor inicial (T0) foi registrada utilizando a máquina Canon EOS Rebel XTi 10Mp 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), simulando a dinâmica da cavidade e colocados em banho-maria sob constante agitação, à temperatura de 37^{o}C por 30 dias. Diariamente os corpos de prova foram imersos nas soluções corantes por 15 minutos. Após 7, 15 e 30 dias realizaram novos registros fotográficos. 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 nenhuma das resinas testadas

apresentaram estabilidade de cor quando expostos a soluções corantes, e que as bebidas da região amazônica mostraram-se menos colorantes que o café.

3.7 Testes de Compatibilidade Biológica

Embora o conceito de tratamento ético de pacientes venha desde o tempo de Hipócrates (460-377 a.C.), a idéia de que novos materiais dentários devem ser testados para segurança e eficácia antes do uso clínico é muito mais recente. Apenas em meados de 1800, cirurgiões-dentistas testaram novos materiais pela primeira vez, colocando-os na boca dos pacientes.

Usar humanos como cobaias de pesquisa atualmente, sem nenhum conhecimento ou testes prévios das propriedades biológicas de um material, é antiético e ilegal. Consequentemente, muitos testes alternativos tem sido desenvolvidos para minimizar os riscos em humanos.

Existe um número possível de reações biológicas aos materiais, embora nem todas tenham sido documentadas para os materiais dentários. Classicamente, essas reações tem sido separadas em reações tóxicas, inflamatórias, alérgicas e mutagênicas.

A divisão entre as reações é baseada nas análises patológicas e histológicas tradicionais dos tecidos. Das respostas biológicas para os materiais, a primeira resposta foi a toxicidade. Os materiais podem ser capazes de liberar substâncias para o corpo dos pacientes e a liberação de certas substâncias em quantidades adequadas podem causar toxicidade evidente (ANUSAVISE, 2005).

Cordeiro *et al* (1985) realizaram um estudo para avaliar a reação da polpa sob ação de materiais à base de hidróxido de cálcio. Os materiais testados foram colocados em contato direto com a polpa dos molares de rato e posteriormente a cavidade foi restaurada com amálgama. Os períodos experimentais foram 48 e 72 horas, 7, 15 e 30 dias. A análise histopatológica demonstrou que o hidróxido de cálcio p.a. apresentou melhores resultados do que os produtos comerciais a base de hidróxido de cálcio, Calvital e Life.

Oliveira *et al* (1988) analisaram o efeito das pastas à base de hidróxido de cálcio sobre a polpa de molares de rato. Nesse experimento as pastas foram divididas em 4 grupos. Grupo I: hidróxido de cálcio + polietilenoglicol 400; grupo II: hidróxido de cálcio + iodofórmio+ polietilenoglicol 400; Grupo III: hidróxido de cálcio+ óxido de zinco + polietilenoglicol 400. De acordo com os dados observou-se que todos os grupos caracterizaram-se como irritantes, persistindo no decorrer dos períodos de evolução por reparação, mas os grupos que tiveram melhor comportamento foram o Grupo I e III quando comparado com o Grupo II. Todas as pastas, a partir do sétimo dia, induziram à formação de massas amorfas como mineralizadas, tendendo a barreira, apresentando variações na qualidade e quantidade .

Ribeiro (1989) avaliou através da determinação quantitativa do líquido plasmático extravasado o potencial irritativo do óleo-resina de copaíba, água de hidróxido de cálcio e eugenol. As substâncias experimentais foram inoculadas no dorso de ratos e após 3 horas foram classificadas considerando-se os valores mínimos, máximos e médios. O autor concluiu que o óleo-resina da copaíba possuiu biocompatibilidade para o seu uso em odontologia, tendo potencial irritativo menor que o eugenol e a água de hidróxido de cálcio.

Costa *et al* (1995) observaram a compatibilidade biológica do cimento de ionômero de vidro fotopolimerizável (Varioglass VLC) como material de forramento em cavidades operatórias confeccionadas nos primeiros molares de ratos. Como grupo controle foi utilizado o Dycal, e em seguida ambos os grupos restaurados com amálgama. Após os períodos experimentais de 3,7,15,30 e 60 dias conclui-se que o Variglass VLC promoveu uma ação mais irritante que o Dycal, este por sua vez formou uma discreta dentina reacional localizada abaixo da parede pulpar da cavidade dentária.

Costa *et al* (1996) estudaram a compatibilidade biológica dos cimentos de óxido de zinco associados a copaíba ou ao eugenol em implantes subcutâneos em ratos. Aos 7 dias no grupo 1 (óxido de zinco + copaíba) houve discreta presença de células inflamatórias, necrose de contato e degradação de fibras colágenas, não sendo observada a presença de neutrófilos ou de células gigantes. Todos esses eventos histopatológicos foram ligeiramente superiores para o grupo 2 (óxido de zinco + eugenol). Com o decorrer do tempo, todos os eventos analisados reduziram em quantidade e o tecido conjuntivo da área principal de análise apresentava características de normalidade para ambos os grupos. Esses achados permitiram concluir que o cimento a base de óxido de zinco e copaíba foi menos irritante que o composto por óxido de zinco e eugenol.

Costa *et al* (1996c) estudaram de forma comparativa e subjetiva a ação irritante sobre dentina e tecido pulpar dos materiais Vitremer 3M e Dycal quando aplicados em cavidades oclusais preparadas nos primeiros molares superiores de ratos nos períodos de 3, 7, 15, 30 e 60 dias. Os dois dentes receberam restaurações com cimento de ionômero de vidro em estudo, sendo que uma das cavidades (lado direito) foi forrada com cimento de hidróxido de cálcio Dycal. Após esses períodos foi

observado que o cimento de ionômero de vidro em teste, quando aplicado sobre dentina em cavidades médias em molares de rato, foi um irritante discreto ao complexo dentino-pulpar.

Hu *et al* (1998) avaliaram vários tipos de fatores de crescimento como agentes de capeamento pulpar, através de uma membrana de colágeno embebida com esses fatores colocadas sobre a pequena exposição pulpar nos primeiros molares superiores dos ratos e seladas com amálgama. Uma membrana impregnada por Dycal e outra sem medicação foram utilizados como controle. Após os períodos experimentais de 14 e 21 dias, o fator de crescimento TGF-β_1 pode ser o único agente de capeamento pulpar dentre os produtos testados, devido ser único a formar dentina reparadora.

Costa *et al* (1999) observaram a compatibilidade biológica da clorexidina a 0,2% como solução de limpeza de cavidade. Uma cavidade operatória foi realizada na face oclusal de molares superiores de ratos, seguida de exposição pulpar, controle da hemorragia e aplicação da solução de clorexidina 0,2%, após o término dos procedimentos operatórios a cavidade foi selada com sistema adesivo Schotbond seguida de resina composta. Os autores demonstraram que dentro dessas condições experimentais a clorexidina 0,2% não influenciou no processo reacional de necrose pulpar, e o capeamento pulpar com sistema adesivo não foi uma técnica restauradora aceitável, pois não permitiu a reparação do complexo dentino-pulpar.

Dammaschke *et al* (2001) avaliaram a reação do tecido pulpar e da dentina quando em contato direto com Carisolv por um, dez e vinte minutos. O estudo demonstrou que o produto teste deve ser utilizado com cautela em cavidades muito profundas, pelo menor tempo de contato, um minuto, houve formação de necrose celular. Porém em todos os tempos de exposição não houve degradação das fibras colágenas.

Salako *et al* (2003) compararam o comportamento do vidro bioativo (VB) com outros agentes de capeamento pulpar, formocresol, sulfato férrico e agregado de trióxido mineral (MTA). Após o contato direto com a polpa das substâncias a serem testadas, a cavidade operatória foi preenchida com amálgama. Ao término dos períodos experimentais de quinze dias , vidro bioativo demostrou pequena resposta inflamatória que passados trinta dias esta reação diminuiu ainda mais. Dentre os materiais testados o MTA presentou melhores resultados, proporcionando formação de dentina e manutenção da polpa de forma normal histologicamente.

Briso *et al* (2006) observaram a reposta da polpa dental de cães ao capeamento com gregado de trióxido mineral (MTA) ou hidróxido de cálcio p. a. A cavidade foi selada com cimento modificado de ionômero de vidro e restauradas com resina composta. Dentre os materiais testados o MTA apresentou maior índice de sucesso em relação ao hidróxido de cálcio, evidenciando menor ocorrência de infecção e necrose pulpar.

Parolia *et al* (2010) compararam a biocompatibilidade da própolis com outros agentes de capeamento pulpar como o MTA e o Dycal. Foram realizadas exposições pulpares nos pré-molares indicados a exodontia por indicação ortodôntica, após a exposição foi realizada a hemostasia, a cavidade foi capeada com os materiais testes, forrada com cimento de ionômero de vidro modificado e restaurada com resina composta. Após os períodos experimentais, 15 e 45 dias, os dentes foram extraídos e o terço apical foi seccionado para melhor permitir a fixação por formol a 10%. Em seguida foi realizada a análise histopatológica. O capeamento pulpar com a própolis foi semelhante a resposta com MTA e Dycal, em que obteve a formação de ponte de dentina a partir do décimo quinto dia.

Dammaschke *et al* (2010) observaram a proliferação celular após capeamento pulpar com agregado de trióxido mineral (MTA) e hidróxido de cálcio. A cavidade operatória na qual realizou-se a exposição pulpar foi nos molares superiores de ratos, seguida do capeamento pulpar com os materiais testes e selada com resina. Após os períodos experimentais de 1, 3 e 7 dias, ambos materiais responderam de maneira similar, proporcionando no primeiro dia formação de tecido de granulação seguido de proliferação de fibroblastos, células endoteliais e células indiferenciadas que posteriormente produzirão odontoblastos.

Lima *et al* (2011) avaliaram o óleo-resina da *Copaifera langsdorffi*, a solução aquosa de própolis verde, a esponja de fibrina e a pasta a base de iodofórmio. Para a realização deste estudo foram confeccionados uma cavidade operatória nos primeiros molares superiores e inferiores de ratos, seguida da exposição pulpar, aplicação do material de capeamento e seladas com cotosol. O óleo-resina da copaíba e a solução aquosa do própolis foram inseridas na cavidade através da esponja de fibrina embebidas na solução. Após os períodos experimentais de 24 horas, 15 e 30 dias os animais foram sacrificados. O capeamento realizado com o óleo-resina da copaíba apresentou uma resposta inflamatória menos severa, e a esponja de fibrina mais intensa. O material que foi capaz de formar uma barreira mineralizada subjacente ao capeamento a partir do décimo quinto dia foi o óleo-resina da copaíba, enquanto os outros materiais tiveram a deposição de tecido mineralizado mais distante do local de capeado.

Estudos *in vivo* em animais demonstraram a validação na utilização dos molares de rato nos testes da compatibilidade biológica de vários materiais odontológicos, estes estudos associados aos *in vitro* sugerem a possibilidade de inferência comparativa a resposta pulpar humana.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Método de coleta do óleo-resina da copaíba (*Copaifera multijuga*) e obtenção da amirina

O óleo-resina da *Copaifera multijuga* foi extraído da reserva Ducke, no Km 17 da Rodovia Manaus-Itacoatiara, catalogada sob o n°.69 pelo Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).

A coleta foi realizada pelo mateiro da reserva, consistindo na confecção de um furo por meio de um trado 7/8 polegada diâmetro e 1,00 metro de comprimento, à altura de aproximadamente 1 metro do chão, até o centro do caule onde se encontram os reservatórios do óleo-resina, com um pequeno declive para escoamento. Após esse procedimento, o óleo-resina começou a escorrer lentamente pelo conduto, sendo coletado em um recipiente estéril previamente preparado para esse fim. Após a coleta, o orifício foi vedado com argila, procedimento de rotina realizado na reserva (BANDEIRA *et al*,1999).

Um produto biotecnológico (amirina) foi isolado no Laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia/Q-Bioma da Universidade Federal do Amazonas a partir de resina de Breu da família *Burseraceae.*

4.2 Cromatografia do óleo-resina da copaíba

As análises cromatográficas do óleo-resina da *Copaifera multijuga* para conhecimento de seus componentes foram realizadas no Laboratório de Pesquisas e

Ensaios de Combustíveis (LAPEC) da Universidade Federal do Amazonas. Para a identificação dos constituintes do óleo-resina da copaíba foi realizada análise por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG-DIC) e a detector de espectrometria de massas (CG-EM).

Anteriormente a todas as análises cromatográficas realizadas o óleo-resina da copaíba sofreram uma modificação química de forma a adequar sua polaridade às necessidades do sistema cromatográfico utilizado. O óleo-resina foi mantido em contato com solução recém preparada de diazometano dissolvido em éter, de forma a produzir a esterificação dos grupamentos carboxila dos ácidos diterpênicos presentes no óleo-resina. Para as análises de CG-DIC foi utilizado um cromatógrafo em fase gasosa modelo Hewlett-Packard HP-6890 com injetor automático Agilent 7893B em split 1:20 com injetor a 220^{o}C, gás de arraste H 2 a 3,6 mL/min, detectores a 270^{o}C, com duas colunas cromatográficas (HP-INNOWAX), de 30 m de comprimento, 0,320 m de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase e HP-5 (5% fenil em metil siloxano), de 30 m de comprimento, 0,320 m de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase.

Utilizou-se um cromatógrafo à Gás Varian (modelo 3900); um Espectrômetro de Massas Varian (modelo Íon Trap 2000); um software de busca com biblioteca NIST, Wiley e um software Saturno 2100 T GC/MS.

Usou-se o seguinte sistema de análise:

- Programação do cromatógrafo em fase gasosa:

- Temperatura do injetor 270 °C.

- Split 1:20.

- Fluxo de hélio na coluna 2,0 mL min^{-1}

- Programação de temperatura do forno - temperatura inicial 110 ^{o}C até 140 ^{o}C com razão de aquecimento de 2 ^{o}C min^{-1}

- 140ºC a 290 ºC com razão de aquecimento de 8 ^{o}C min^{-1}

- Tempo de corrida 35 min.

- Coluna VF-1ms LB com 30 m x 25 mm x 0,25 μm, fase estacionária 100% metil polisiloxano.

- Programação do espectrômetro de massas:

- Temperaturas de massas: transfer line em 200 ºC, mainfold 50 ºC e trap em 190 ºC, range de m/z de 40 a 500 u.m.a.

- Ionização por impacto de elétrons (70 eV).

4.3 Preparo das emulsões do óleo-resina da copaíba (*Copaifera multijuga)*

Foram formuladas emulsões de limpeza de cavidade a base do óleo-resina da *Copaifera multijuga* obedecendo as orientações da Farmacopéia Brasileira (2010) nas concentrações 10% e 30%. Também foram formuladas emulsões associando o óleo-resina da *Copaifera multijuga* nas concentrações 10% e 30% com amirina a 1%.

4.3.1 Emulsão do óleo-resina da copaíba a 10%

Na confecção da emulsão foram utilizados 2mL do óleo-resina da copaíba *in natura,* 0,6mL de Tween 80 (MERCK - Germany), homogeinizados no vortex (MARCONI – MA-162 – Piracicaba,SP - BR) e 17,4mL de água destilada triesterilizada.

4.3.2 Emulsão do óleo-resina da copaíba a 30%

Na confecção da emulsão foram utilizados 6mL do óleo-resina da copaíba *in natura,* 0,6mL de Tween 80 (MERCK - Germany), homogeinizados no vortex (MARCONI – MA-162 – Piracicaba,SP - BR) e 13,4mL de água destilada triesterilizada.

4.3.3 Emulsão do óleo-resina da Copaíba a 10% e amirina a 1%

Na confecção da emulsão foram utilizados 2mL do óleo-resina da copaíba *in natura,* 0,2mg de amirina, homogeinizados primeiramente, e acrescentados 0,6mL de Tween 80 (MERCK - Germany), homogeinizados novamente no vortex (MARCONI – MA-162 – Piracicaba, SP -BR), para então acrescentar 17,2mL de água destilada triesterilizada.

4.3.4 Emulsão do óleo-resina da Copaíba a 30% e amirina a 1%

Na confecção da emulsão foram utilizados 6mL do óleo-resina da copaíba *in natura,* 0,2mg de amirina, homogeinizados primeiramente, e acrescentados 0,6mL de Tween 80 (MERCK - Germany), homogeinizados novamente no vortex (MARCONI – MA-162 – Piracicaba,SP - BR), e acrescentado 13,2mL de água destilada triesterilizada.

A preparação de todas as emulsões foi realizada em capela de fluxo laminar (MARCONI – Piracicaba,SP – BR), utilizando uma balança de precisão 0,0001g (SARTORIUS - Germany) para pesagem dos componentes sólidos e uma micropipeta de variação de 100 – 1000µL para medir o volume dos líquidos. As emulsões foram

mantida em temperatura refrigerada, em frascos de vidro, na cor âmbar, com tampas rosqueáveis, seladas com parafilme e triesterilizadas.

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana das emulsões do óleo-resina da copaíba

4.4.1 Microrganismos testes e preparação de inóculos

Os microrganismos utilizados foram: *Streptococcus mutans* ATCC25175, *Streptococcus oralis* ATCC10557, *Streptococcus salivarius* ATCC7073 *e Lactobacillus casei* ATCC7469.

As cepas bacterianas foram fornecidas pelo laboratório do Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) (Anexo A -D).

Para obtenção do inóculo os microrganismos foram reativados em ágar nutritivo Brain Heart Infusion (BHI – HIMEDIA – Mumbai, IN), em tubos de ensaio 10x150mm, incubados a 37ºC por 24 horas em aerofilia, para *Streptococcus oralis, Streptococcus salivarius e Lactobacillus casei*, e em microaerofilia para *Streptococcus mutans*. Em condições assépticas, foram retiradas alíquotas das bactérias com o auxílio de uma alça de platina esterilizada de 5mm de diâmetro e inoculadas em 5mL de caldo BHI (HIMEDIA – Mumbai, IN), estéril, em tubos de ensaio 10x150mm. As suspensões foram turbilhonadas em vortex (MARCONI – MA-162 - Piracicaba,SP – BR) até se tornarem homogênea. Padronizou-se o inóculo pela escala #0.5 de McFarland (Probac do Brasil – São Paulo,SP - BR) de modo a fornecer um padrão de 10^8 UFC/mL.

4.4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A atividade antibacteriana das emulsões óleo-resina da *Copaifera multijuga*, nas concentrações de 10%, 30%, 10% do óleo-resina de Copaíba + 1% Amirina e 30% do óleo-resina de Copaíba + 1% Amirina foram determinadas segundo metodologia da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em microdiluição proposta por NCCLS (2003), Andrews (2001), adaptação de Sampaio *et al* (2009).

As emulsões testes foram diluídas na concentração de 1:1, com DMSO (VETEC Germany), formando a solução-mãe. O digluconato de clorexidina a 2% (FGM – Joinville, SC - Brasil) foi utilizado como controle.

Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar (MARCONI – Piracicaba,SP – BR), com vidrarias, ponteiras e meios de cultura previamente esterilizados. Foram utilizadas microplacas de 96 orifícios (em forma de "U"), de forma que em cada poço houvesse um volume final de 100 μL. Na placa, as colunas foram distribuídas nos números de 1 a 12 e as linhas nas letras "A "até o "H". Nos poços foram distribuídas as emulsões de forma a conter as diferentes concentrações das substâncias testes. O sistema de diluição foi controlado pelo volume da solução-mãe utilizada, ocupando os poços 2 a 11 (Tabela 01 e 02 - SM). Nos mesmos poços foram acrescentados um volume padrão de inóculo (20μL) e complementou-se o volume final com meio (Tabela 01 e 02 – Meio μL).

A coluna 01 representou a esterilidade da substância teste, emulsão+meio sem bactérias. A coluna 12 representou a viabilidade das bactérias, meio + inóculo sem emulsão teste. A linha G representou o veículo (controle negativo) e linha H o digluconato de clorexidina a 2% (controle positivo) (FGM – Joinville, SC – Brasil).

Para cada bactéria foi utilizada duas microplacas, uma testando a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10%, nas linhas A,B e C, e a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% + 1% de amirina, nas linhas D, E e F. Na outra microplaca testou-se as emulsões do óleo-resina da copaíba a 30%, nas linhas A,B e C, e a emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% + 1% de amirina nas linhas D, E e F (Figura 02). A atividade antibacteriana de cada emulsão foi testada em triplicata.

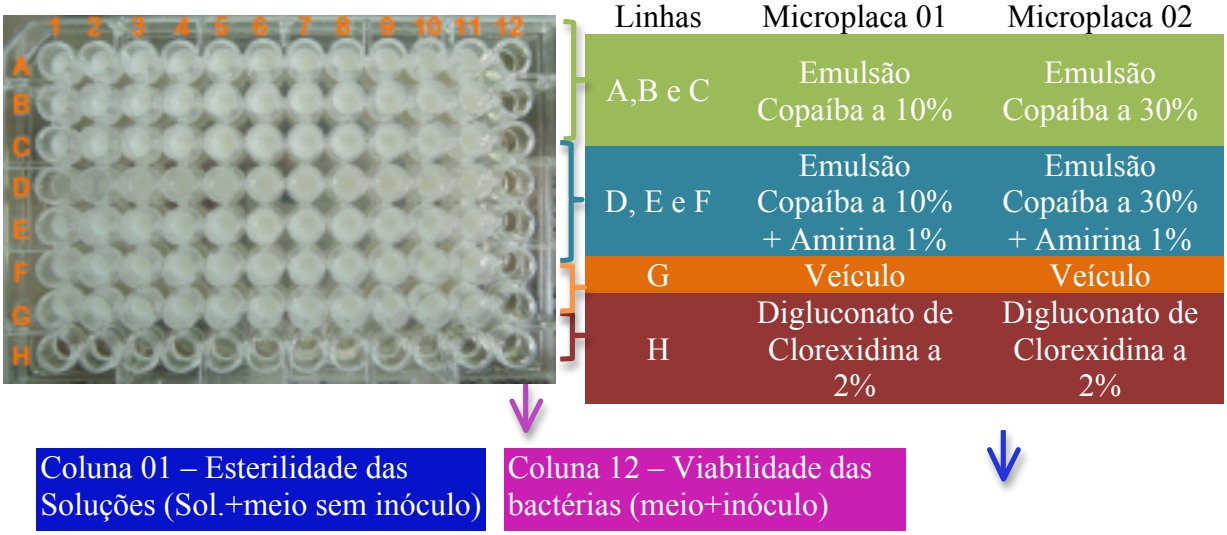

Figura 02 – Esquema de distribuição dos produtos testes na microplaca de 96 orifícios, para cada bactéria.

Poços			Sol. Mãe (SM)	SM (µL)	Inóculo (µL)	Meio (µL)	Vol. Final (µL)	Conc. Final da emulsão (µL/mL)
A1	B1	C1	Copaíba 10%	80	-	20	100	400
A2	B2	C2	Copaíba 10%	80	20	-	100	400
A3	B3	C3	Copaíba 10%	70	20	10	100	350
A4	B4	C4	Copaíba 10%	60	20	20	100	300
A5	B5	C5	Copaíba 10%	55	20	25	100	275
A6	B6	C6	Copaíba 10%	50	20	30	100	250
A7	B7	C7	Copaíba 10%	45	20	35	100	225
A8	B8	C8	Copaíba 10%	40	20	40	100	200
A9	B9	C9	Copaíba 10%	35	20	45	100	175
A10	B10	C10	Copaíba 10%	30	20	50	100	150
A11	B11	C11	Copaíba 10%	25	20	55	100	125
A12	B12	C12	Meio+bactéria	-	20	80	100	-

Tabela 01 - Diluição da emulsão de copaíba a 10%.

Poços			Sol. Mãe	SM (µL)	Inoculo (µL)	Meio (µL)	Vol. final (µL)	Conc. Final da emulsão (µL /mL)
A1	B1	C1	Copaíba 30%	80	-	20	100	400
A2	B2	C2	Copaíba 30%	80	20	-	100	400
A3	B3	C3	Copaíba 30%	70	20	10	100	350
A4	B4	C4	Copaíba 30%	60	20	20	100	300
A5	B5	C5	Copaíba 30%	55	20	25	100	275
A6	B6	C6	Copaíba 30%	50	20	30	100	250
A7	B7	C7	Copaíba 30%	45	20	35	100	225
A8	B8	C8	Copaíba 30%	40	20	40	100	200
A9	B9	C9	Copaíba 30%	35	20	45	100	175
A10	B10	C10	Copaíba 30%	30	20	50	100	150
A11	B11	C11	Copaíba 30%	25	20	55	100	125
A12	B12	C12	Meio+bactéria	-	20	80	100	-

Tabela 02 - Diluição da emulsão de copaíba a 30%.

Após o preenchimento de todos os poços, as microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37^0 C por 24 horas, aerofilia para o *Streptococcus oralis, Lactobacillus casei, Streptococcus salivarius* e em microaerofilia o *Streptococcus mutans*.

Após o período de incubação, foram incluídas nos poços 30µL de resazurina (Sigma Aldrich – USA) preparado em solução aquosa (0,01%, 10 mg diluída em 100 mL). As placas foram novamente incubadas por 30 minutos.

A ausência de mudança de cor nos orifícios foi interpretada como microrganismo sensível à emulsão testada.

Na concentração bactericida mínima (CBM), foram retirados 100µL dos poços das emulsões da copaíba em diferentes concentrações (linha C e F), semeadas em ágar BHI e incubadas a 37^0C em aerofilia e microaerofilia de acordo com o microrganismo testados durante 24 horas para confirmar a presença de bactérias viáveis.

4.4.3 Análise de viabilidade celular por técnica de fluorescência

A atividade de viabilidade celular das emulsões do óleo-resina da *Copaifera multijuga*, nas concentrações de 30% e 30% com amirina 1% foram determinadas segundo metodologia da fluorescência proposta por Filoche *et al* (2007) frente ao *Streptococcus mutans* UA 159-2 e *Lactobacillus casei* ATCC7469.

O volume das emulsões testes seguem as diluições descritas na Tabela 03.

Solução Mãe (SM)	1mL de emulsão+ 1mL Tween 80+ 1mL DMSO	Meio BHI	Volume Total
SM1	500µL	500µL	1000 µL
SM2	500µL	2500µL	3000 µL
SM3	500µL	4500µL	5000 µL

Tabela 03 - Diluição das emulsões testes para determinar diferentes soluções mãe.

O teste de viabilidade celular necessitou da realização da CIM conforme descrito no item 4.4.2. A CIM foi determinada em diferentes concentrações de acordo com a Tabela 04.

Poços			Sol. Mãe	SM (µL)	Inoculo (µL)	Meio (µL)	Vol. final (µL)	Conc. final (µL de Copaíba/mL de emulsão)
A1	C1	E1	SM1	80	20	-	100	120
A2	C2	E2	SM1	70	20	10	100	105
A3	C3	E3	SM1	60	20	20	100	90
A4	C4	E4	SM1	50	20	30	100	75
A5	C5	E5	SM1	40	20	20	100	60
A6	C6	E6	SM1	30	20	50	100	45
A7	C7	E7	SM1	20	20	60	100	30
A8	C8	E8	SM2	55	20	25	100	27,5
A9	C9	E9	SM2	50	20	30	100	25
A10	C10	E10	SM2	45	20	35	100	22,5
A11	C11	E11	SM2	40	20	40	100	20
A12	C12	E12	SM2	35	20	45	100	17,5
B1	D1	F1	SM3	50	20	30	100	15
B2	D2	F2	SM3	45	20	35	100	13,5
B3	D3	F3	SM3	40	20	40	100	12
B4	D4	F4	SM3	35	20	45	100	10,5
B5	D5	F5	SM3	30	20	50	100	9
B6	D6	F6	SM3	25	20	55	100	7,5
B7	D7	F7	SM3	20	20	60	100	6
B8	D8	F8	SM3	15	20	65	100	4,5

Tabela 04 - Diluição da emulsão de Copaíba a 30% na placa de 96 poços para a CIM.

A partir do resultado das CIM das emulsões de Copaíba a 30% e Copaíba 30% com Amirina, a observação de viabilidade celular dessas concentrações foram re-avaliadas por leitura de fluorescência através do LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit L13152 (Molecular Probes - Eugene - Estados Unidos). Neste sistema as células viáveis e sem dano de parede celular são coradas de verde (Componente A: SYTO 9), e em vermelho (Componente B: iodeto de propídeo) as células com danos na membrana celular.

Foram preparadas suspensões bacterianas para construção da curva padrão, através de concentrações conhecidas de bactérias viáveis e células mortas.

Para o preparo das suspensões bacterianas foram utilizados dois tubos falcon, identificados com rótulo de bactérias vivas ou células mortas. Em cada tubo foi inserido 3mL de caldo BHI contendo os inóculos de acordo com os microrganismos testes. Os tubos foram centrifugados durante 15 minutos, em seguida o sobrenadante foi removido.

O infranadante foi ressuspendido com 240 μL de NaCl e homogeinizado no vortex. Em seguida foi acrescentado 4,8mL de NaCl no tubo representante de bactérias vivas e no outro tubo representante de células mortas e em seguida foi adicionado 4,8mL de álcool isopropílico a 70%. Os dois tubos foram incubados em temperatura ambiente por 60 minutos com agitação a cada 15 minutos. Foram novamente centrifugados por mais 15 minutos e o sobrenadante removido e o infranadante ressuspendido com 2,4mL de NaCl.

Os padrões de células bacterianas foram preparados por proporções de concentrações conhecidas de bactérias viáveis e células mortas, da seguinte forma : 0:100, ou seja 0 de bactérias viáveis para 100 de células mortas; 20:80; 50:50; 80:20 e 100:0. Placas com 96 poços de cor negra para controle de luminosidade (Greiner-Bio-

One) foram utilizadas para construção das curvas-padrão. Nos poços A1 a A5 foram inseridos 100 μL das proporções de concentração de bactérias vivas e células mortas. Nos poços B1 a B5 foram colocadas 100 μL das alíquotas do resultado da CIM, considerando duas concentrações a frente e duas após.

Foram preparadas volumes iguais de SYTO9 e Iodeto de propídio e misturados sob forte agitação por 3 minutos. Um volume de 30 μL da mistura foi adicionado na placa de fluorescência. Os poços foram então incubados no escuro e a temperatura ambiente por 15 minutos.

A leitura foi realizada por intensidade de fluorescência através do leitor de microplaca do tipo multi modo (FLUORStar Optima - BMGLab Tech - Alemanha) sob filtro de excitação de 485 nm e de emissão com 520 e 620 nm para detecção do verde e vermelho respectivamente .

4.5 Avaliação da citotoxicidade de emulsões do óleo-resina da *Copaifera multijuga*

4.5.1 Teste de hemólise

A atividade citotoxicidade das emulsões da *Copaifera multijuga*, nas concentrações de 10%, 30%, 10% do óleo-resina da copaíba com 1% de amirina e 30% de óleo-resina da copaíba com 1% de amirina foram determinadas segundo metodologia do teste de hemólise de Malpezzi *et al* (1993), que permite avaliar o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

4.5.1.1 Preparo da solução de eritrócitos (S.E) 1%

Para obtenção da solução de eritrócitos humanos, foi coletado 3 mL de sangue venoso em tubo contendo citrato, em seguida foi centrifugado (Eppendorf - Centrifugue 5804-R) em 2.500rpm em 10 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e do concentrado de hemácias foi transferido 1mL para uma proveta contendo 99 mL de solução fisiológica 0,9 %, obtendo-se então uma solução de eritrócitos a 1%.

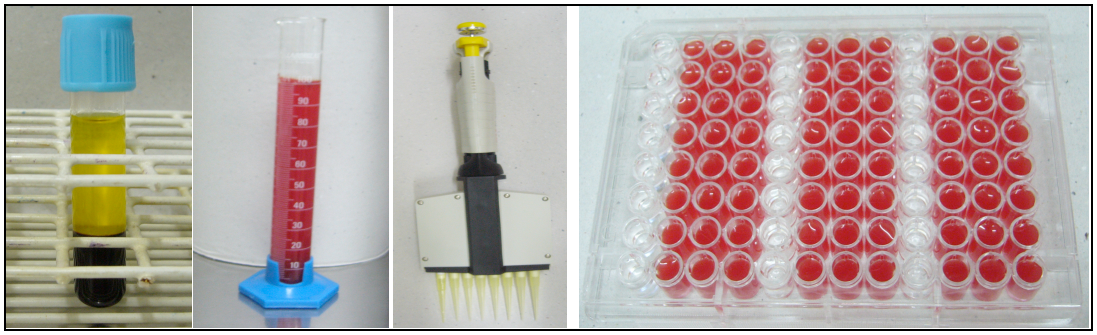

Figura 03 – Material utilizado para realização do teste de hemólise.

4.5.1.2 Diluição das substâncias testes

Foram realizadas oito diluições seriadas das substâncias testes na concentração inicial de 30µL/mL. No suporte de diluições foram colocadas no primeiro poço 970µL de solução fisiológica 0,9% e nos sete poços seguintes 500µL. Um volume de 30µL de solução teste foram adicionados no primeiro poço, homogeinizado e transferido 500µL para o próximo poço, até chegar ao último atingindo uma concentração de 0,23µL/mL (Figura 04).

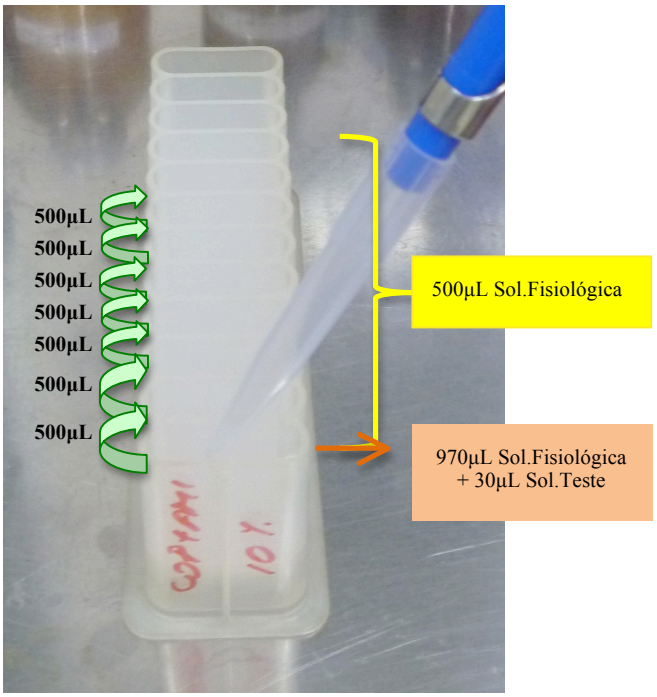

Figura 04 - Esquema da demonstração da microdiluição.

4.5.1.3 Preparo das placas

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, em que foram adicionados 270 µL de suspensão de eritrócitos a 1% e 30 µL da substância teste diluída. As substâncias foram testadas nas concentrações de 30µL/mL a 0,23µL/mL, em triplicata. Foi realizada uma coluna branco, devido as substâncias testes que apresentaram uma coloração esbranquiçada, em que foram adicionados 270µL de solução salina a 0,9% e 30µL da substância teste diluída. Para controle positivo foi utilizado o Triton X (que corresponde a indução de 100% de hemólise) e para controle negativo utilizou-se somente solução salina a 0,9%.

As placas foram incubadas durante uma hora a ±37°C no TermoShaker (Agimax), em seguida foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outra microplaca de 96 poços para a

leitura da absorbância no espectrofotômetro de placa (BackmanCoulter – DTX 800) no comprimento de onda de 540nm. A atividade da substância teste foi determinada diminuindo o valor da absorbância da solução sem eritrócitos e comparando aos controles positivo e negativo (Figura 05).

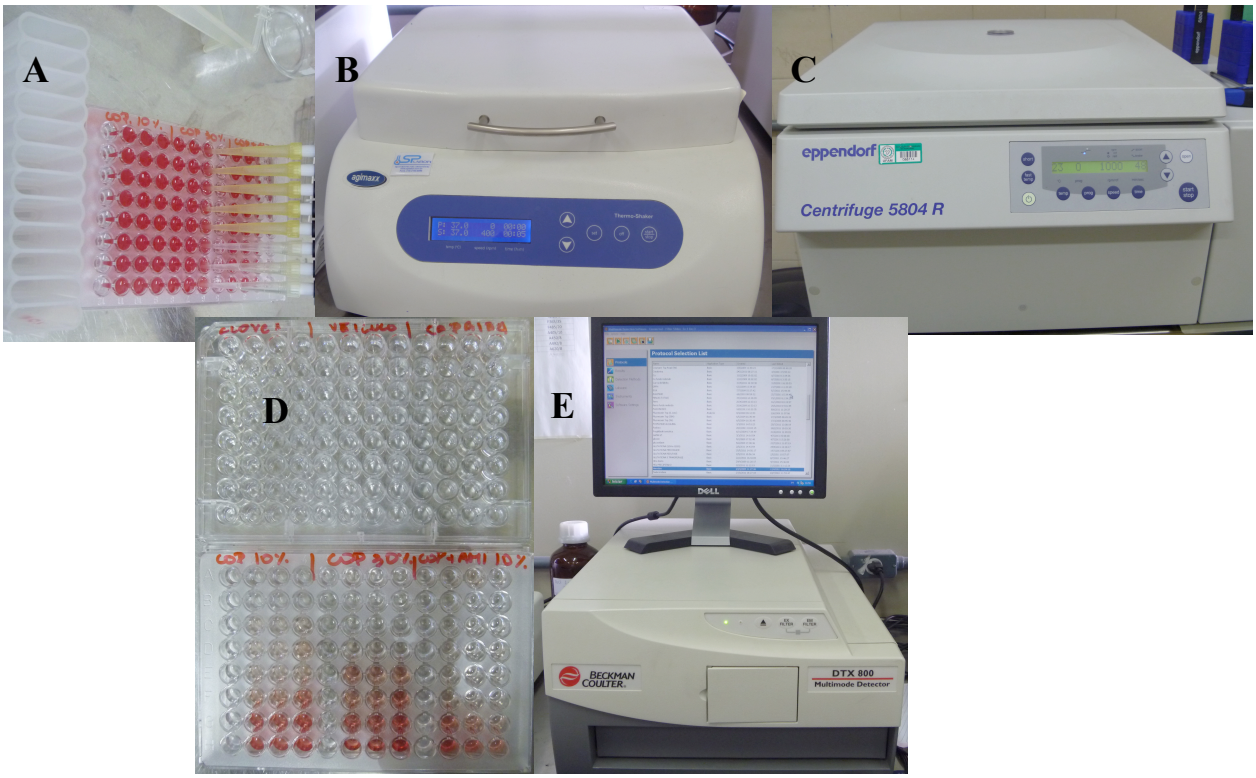

Figura 05 - **A** – Distribuição do volumes das emulsões testes nas diferentes concentrações na microplaca; **B** – Incubação das microplacas em Shaker a 37°C por uma hora; **C** – Centrifugação das microplacas por 10 minutos para separar o sobrenadante do infranadante; **D** – Microplacas com os sobrenadantes, já podendo observar os produtos que obtiveram hemólise pela coloração; **E** – espectrofotômetro para a leitura das microplacas.

4.5.2 Teste de cultura de células

A citotoxicidade dos produtos foram testados frente (fibroblastos murinos) NHI3T3, através do ensaio de Alamar Blue™ (AHMED *et al*, 1994). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino,

2mM de glutamina, 100μg/mL de estreptomicina e 100U/mL de penicilina, e incubados a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO_2.

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 ($2,5 \times 10^4$ células/ 100μL /poço), durante 24h, período necessário para que ocorra a adesão das células na placa, a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO_2. Em seguida, 100µL dos produtos foram adicionados a cada poço na concentração de 5µL/mL e as células incubadas durante 72h, 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, 10µL de Alamar Blue^{TM} 0,02% foi adicionado a cada poço. O sinal de fluorescência foi monitorada através de um leitor multiplaca usando comprimento de onda de excitação 530-560nm e 590nm de comprimento de onda de emissão. O sinal fluorescente gerado foi proporcional ao número de células vivas na amostra, de acordo com o ensaio.

4.6 Influência do tempo de aplicação das substâncias testes na alteração de cor dos dentes humanos

4.6.1 Confecção dos corpos de prova

A confecção dos corpos de prova seguiu a metodologia proposta por Araújo *et al* (1998b). Para este estudo, foram utilizados 75 dentes humanos extraídos por razões

ortodônticas e/ou cirúrgicas para a confecção de 150 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 06 e 07). O segundo corte foi para a secção da coroa no sentido mésio-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 ºC.

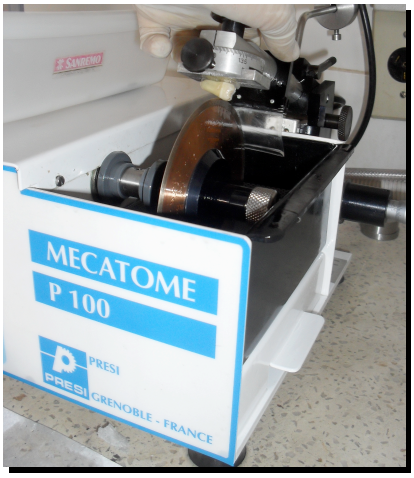

Figura 06 – Dente posicionado na cortadeira com disco de diamante.

Figura 07 - 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 do óleo-resina da copaíba 10% nos períodos de 10 segundos, 30 segundos e 10 minutos;
- Grupo II- 10 corpos-de-prova imersos na emulsão do óleo-resina da copaíba 30% nos períodos de 10 segundos, 30 segundos e 10 minutos;
- Grupo III- 10 corpos-de-prova imersos na emulsão do óleo-resina da copaíba 10% com amirina nos períodos de 10 segundos, 30 segundos e 10 minutos;
- Grupo IV- 10 corpos-de-prova imersos na emulsão do óleo-resina da copaíba 30% com amirina nos períodos de 10 segundos, 30 segundos e 10 minutos;
- Grupo V (Controle)- 10 corpos-de-prova imersos na solução de clorexidina a 2% (FGM – Joinville, SC – Brasil) nos períodos de 10 segundos, 30 segundos e 10 minutos;

4.6.2 Imersão dos corpos de prova nas emulsões testes

Os corpos de prova foram imersos nas substâncias testes durante 10 segundos, 30 segundos ou 10 minutos de acordo com os grupos experimentais (Figura 08).

Figura 08 - Imersão do corpo de prova na emulsão teste.

4.6.3 Leitura de cor

Anteriormente ao tratamento foi realizada a leitura da cor dos dentes no tempo inicial (T0) 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 (Figura 09). 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:

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

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

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

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

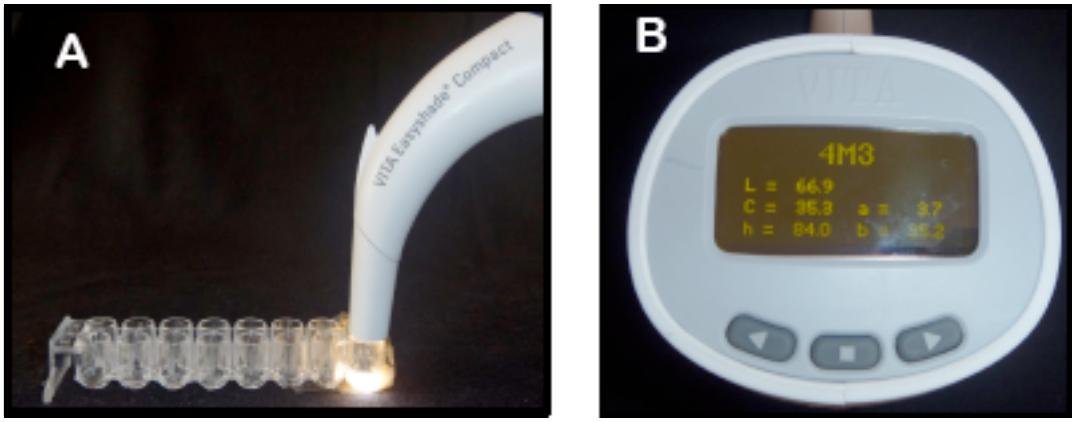

Figura 09 - A - Mensuração da cor sobre o corpo de prova; B – Leitura da cor no espectofotômetro.

Foi utilizado para a mensuração objetiva da cor o aparelho VITAEasyshade (Easyshade®, Vivadent, Brea, CA, USA) (Figura 10).

Figura 10 – Espectrofotômetro.

4.7 Avaliação da compatibilidade biológica de emulsões do óleo--resina da *Copaifera multijuga* em molares de ratos

Os estudos relacionados à compatibilidade biológica da Copaíba, seguiram a metodologia emprega por Bandeira *et al* (1999).

4.7.1. Pastas Experimentais

Foram preparadas pastas com as seguintes formulações:

4.7.1.1 Pasta composta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol 400 mais óleo-resina *in natura* da *Copaifera multijuga* a 10%

Na confecção da pasta foram utilizados 0,098g de hidróxido de cálcio p.a (Biodinâmica – Ibiporã,PR - BR), 0,002g de amirina, 0,08mL de propilenoglicol 400 e 0,02mL do óleo-resina da copaíba *in natura*. Estes materiais foram manipulados com a espátula nº 24 (DUFLEX) sobre uma placa de vidro estéril até obter uma pasta homogênea.

4.7.1.2 Pasta composta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol 400

Na confecção da pasta foram utilizados 0,1g de hidróxido de cálcio p.a (Biodinâmica – Ibiporã,PR - BR), 0,1mL de propilenoglicol 400. Estes materiais foram manipulados com a espátula nº 24 (DUFLEX) sobre uma placa de vidro estéril até obter uma pasta homogênea.

Na preparação de todas as pastas foi utilizada uma balança de precisão 0,0001g (SARTÓRIUS - Geermany) para pesagem dos componentes sólidos e uma micropipeta de variação de 2 – 200µL para medir o volume dos líquidos. As pastas foram manipuladas antes de sua aplicação nas exposições pulpares dos dentes dos ratos.

As emulsões experimentais foram preparadas de acordo com o tópico 4.3. Nesta parte de trabalho só foram realizadas o teste de biocompatibilidade com as emulsões do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina e 30% com amirina, devido aos resultados de atividade hemolítica e alteração de cor realizados anteriormente.

4.7.2. Animais de experimentação

A atividade experimental foi realizada no Biotério do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA. No desenvolvimento da presente pesquisa foram utilizados 12 ratos, do tipo *Rattus norvegicus,* albinus, Holtzman*,* linhagem Wistar, machos, adultos jovens, e pesando em média 180 a 220 gramas.

Foram utilizados 24 primeiros molares superiores, distribuídos em 4 grupos experimentais, utilizando 3 dentes para cada grupo. No experimento os ratos foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais de 7 e 30 dias, em forma de rodízio empregando nos ratos pastas e emulsões de limpezas distintas (Tabela 05).

Grupo	Sol. De Limpeza	Pasta	Número de dentes por Período	
			7 dias	30 dias
Grupo I	Emulsão da Copaíba a 10% + amirina 1%	pasta de hidróxido de cálcio com copaíba a 10% e amirina a1%	3	3
Grupo II	Emulsão da Copaíba a 30%+ amirina 1%	pasta de hidróxido de cálcio com copaíba a 10% e amirina a1%	3	3
Grupo III	Sol. hidróxido de cálcio a 10%	pasta de hidróxido de cálcio com copaíba a 10% e amirina a1%	3	3
Grupo IV - controle	Sol. hidróxido de cálcio a 10%	pasta de hidróxido de cálcio	3	3

Tabela 05 – Distribuição dos grupos e períodos experimentais para capeamento pulpar.

4.7.3. Preparo dos animais

Foi utilizado um relaxante muscular (Rompum - Cloridrato de xilasina à 2%, 0,01mL/100mg, Bayer do Brasil S/A, São Paulo, SP - BR) e um anestésico geral à base de Cetamina (Cetamim®, Cloridrato de Cetamina 10%, 0,15mL/100mg, Syntec do Brasil, Cotia, SP - BR) por meio de injeção intramuscular. Após a anestesia, os animais foram mantidos na mesa de DOKU modificada (DOKU *et al,* 1966) .

Todo o instrumental utilizado foi esterilizado em autoclave a 120^{o}C, por 30 minutos.

Inicialmente foi realizada a antissepsia da cavidade oral dos animais com solução de digluconato de clorexidina a 2% (FGM – Joinville, SC - Brasil), embebida em cotonete, visando reduzir quantitativamente os microrganismos. Foi realizado o isolamento do campo operatório com cones de papel absorvente n^{0} 80.

4.7.4 Técnica Operatória

A abertura inicial da cavidade foi realizada na face oclusal dos primeiros molares superiores. Para isso, foi utilizada inicialmente uma broca cone invertido n◦33 ½, com o objetivo de ampliar a cavidade até próximo ao teto da câmara pulpar, através de movimentos giratórios manuais que permitam melhor controle operatório, além de evitar superaquecimento e diminuir traumatismo.

Utilizou-se um trépano especial de ponta afilada para exposição pulpar e, em seguida, foi irrigada a cavidade com emulsão teste ou o controle, controlando a hemorragia pulpar com auxílio de cones de papel absorvente esterilizados.

Em seguida, foi realizado o capeamento pulpar direto, colocando suavemente as pastas experimentais (Tabela 05), as pastas foram protegidas com guta percha e os dentes posteriormente restaurados com amálgama (Figura 11).

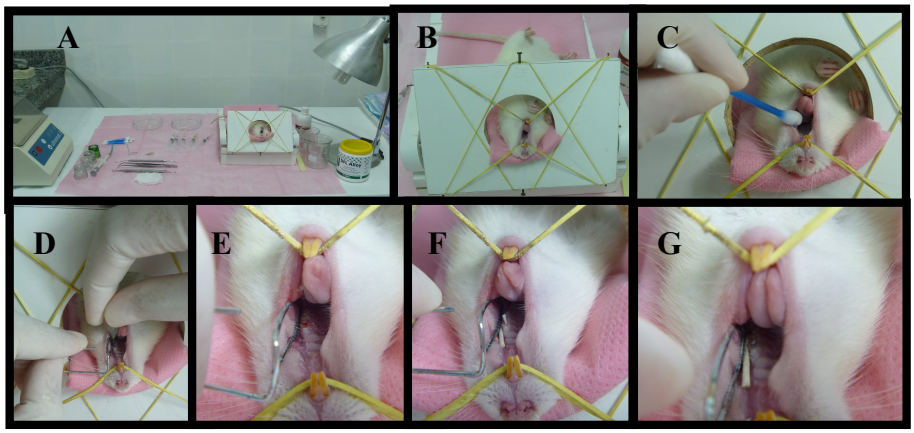

Figura 11 - A - Mesa Clínica para procedimento de capeamento pulpar; B – Animal posicionado na mesa Doku modificada; C – Antissepsia da cavidade; D – Abertura da cavidade com broca 33 ½ ; E – Exposição pulpar; F – Secagem da cavidade com papel absorvente; G – Dente restaurado com amálgama.

Após a remoção do isolamento relativo, os animais foram identificados e mantidos em total recuperação. Posteriormente, os mesmos foram colocados em

gaiolas individuais e alimentados com ração balanceada e água “ad libitum” até que completem os períodos experimentais de 7 e 30 dias.

O estado geral dos animais foi avaliado diariamente e, a cada 5 dias, além das condições do selamento cavitário, através do exame minucioso dos molares utilizados no experimento mediante sedação.

4.7.5. Sacrifício dos animais

Ao final dos períodos experimentais, os animais foram anestesiados e seus maxilares foram removidos, recortados e imediatamente imersos para fixação em formalina neutra tamponada a 10% por 48 horas, colocados em frascos rotulados com identificação do material e período experimental. Os animais foram sacrificados por sobredoses anestésicas.

4.7.6 Tramitação histopatológica

Em seguida, as peças foram lavadas por 24 horas e desmineralizadas com auxílio de solução preconizada por Morse (1945), constituída de ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20%, em partes iguais, por 18 a 20 dias, dependendo da possibilidade de introdução de uma agulha histopatológica.

As peças foram lavadas em água corrente por 24 horas e o amálgama utilizado no selamento cavitário, foi removido. Posteriormente, foram neutralizadas em solução de sulfato de sódio a 5% por 72 horas e, novamente, lavadas em água corrente por 24 horas.

Os espécimes obtidos sofreram tramitação laboratorial de rotina, no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia e Medicina Legal

da Universidade Federal, sendo desidratados em álcoois de concentração crescente, diafanizados em xilol e impregnados em parafina no processador histotécnico (Lupe, processador automático de tecidos Lupe, SP, Brasil).

As peças foram incluídas em parafina, posicionando a face vestibular dos molares na lateral do bloco, a fim de que ficasse (a vestibular dos molares) paralela à navalha do micrótomo. Cada bloco de parafina permaneceu estabilizado em um megacassete para estabilização no micrótomo, a fim de não haver movimentação do mesmo durante os cortes.

A microtomia foi realizada por meio de um micrótomo rotativo (Modelo Histocut 820, Aotec, SP, Brasil), em cortes seriados, com espessura de 5 μm no sentido do longo eixo do dente (sentido mésio-distal) e do trajeto da abertura coronária. Após cada corte, as fitas (contendo os tecidos e a parafina), foram imersas em álcool 20% e em seguida, levadas à água quente (50°C) em banho histológico (modelo OMA, SP - BR). As fitas foram colocadas sobre as lâminas, para posterior coloração.

As lâminas utilizadas foram coradas em hematoxicilina/eosina permitindo a avaliação dos espécimes em microscopia ótica comum da seguinte forma: Inicialmente as fitas de parafinas foram desparafinizadas e hidratadas, foram mantidas durante 3 minutos, respectivamente, nas seguintes soluções: xilol I, xilol II, álcool\xilol (partes iguais), álcool absoluto, álcool 90%, álcool 70%, água destilada. Em seguida, filtrou-se a hematoxilina em papel filtro, despejou-a num reservatório de vidro e imergiu as lâminas durante 4 minutos. Lavou-as em água corrente, removendo o excesso do corante. As lâminas permaneceram em água por 3 minutos. Em seguida, imergiu-as em eosina durante 2 minutos. Lavou-as rapidamente em água corrente para remover o excesso do corante. Lavou-as rapidamente em álcool 95%. Em seguida, foi

realizada a desidratação e diafanização, mantendo durante 3 minutos nas seguintes soluções, respectivamente: álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool\xilol (partes iguais), xilol I e xilol II. Colocou-se sobre o tecido, resina sintética fluida (marca Permount) e lamínula.

Os cortes foram avaliados histomorfologicamente em microscopia óptica comum para análise descritiva do quadro reacional da área adjacente à exposição pulpar, visando às alterações teciduais (grau de inflamação e reparo).

Foi realizada uma descrição detalhada de cada situação experimental, baseada na evolução dos eventos.

4.7.7 Análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada no microscópio (AXIOPLAN- ZEISS) no departamento de Patologia da Universidade Federal do Amazonas.

Os cortes foram avaliados, seguindo a metodologia de Cox *et al* (1996) modificado seguindo o Quadro 01.

n. da lamina	Vasos Sanguíneos		Raspas de dentina	Barreira Mineralizada		Infiltrado Inflamatório			Tipo IF		Cel. Vacuolizadas	Calcificação	Fibrose	Resíduos enegrecidos
	Congestos	Trombosados		Jovem	Madura	Leve	Moderado	Intenso	Mono	PMN				

Quadro 01 – Estruturas analisadas durante a avaliação histopatológica.

Os principais aspectos foram documentados através de fotomicrografias. Os dados foram tabulados em quadros semelhante ao quadro 01, sendo preenchido por período experimental (Apêndice A, B e C).

4.8 Análise estatística

A atividade antibacteriana, a compatibilidade biológica e o teste de hemólise foram analisados de forma descritiva. A compatibilidade biológica em molares de rato foi realizada através de leitura cega, onde o patologista desconhecia os períodos e os grupos experimentais. O teste de hemólise foi demonstrado pela média percentual com desvio padrão, e uma regressão linear sigmoidal, para o cálculo da EC50.

O teste de cultura de células foram avaliados através da análise de variância 1 way com pós teste de comparação múltipla de Dunnett, valores de (*) $p<0,05$ n=3.

Nos testes de alteração cromática dos dentes as variáveis quantitativas foram calculadas 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%.

4.9 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido e aprovado sob CAAE n.°0312.0.115.000-08 no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas, conforme parecer em anexo (Anexo – E).

O projeto foi submetido no Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas.

5. RESULTADOS

5.1 Cromatografia

Os resultados da análise cromatográfica do óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne revelaram que entre os seus componentes estão vários sesquiterpenos, principalmente β-cariofileno (9,2%), α-humuleno (1,8%), germacreno D (3,5%), óxido de cariofileno (11,5%), cubenol (16,7%) e bisabolol (7,2%) e também diterpenos de esqueleto labdano, como os ácidos copálico (2,1 %), 3β-hidróxi-copálico (1,7%) e pinifólico (1,3%).

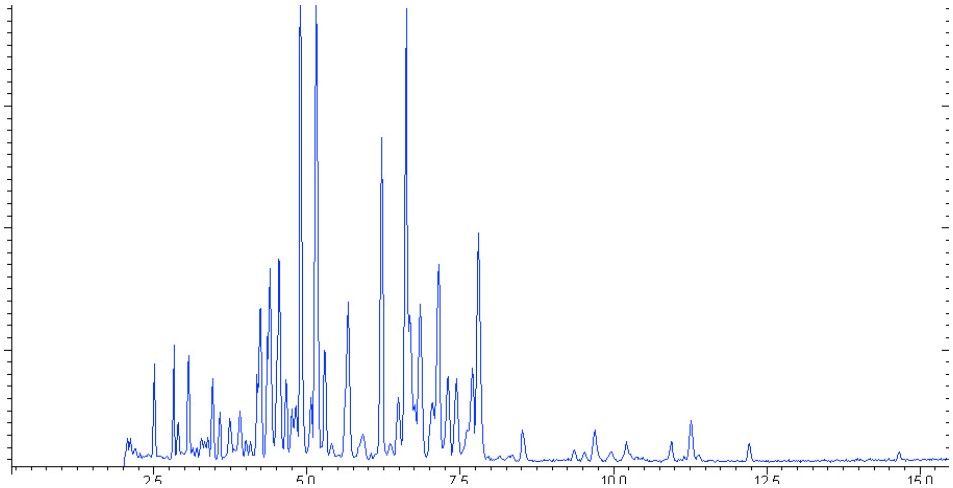

Gráfico 1- Cromatograma obtido em cromatógrafo em fase gasosa do óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne utilizado no estudo.

5.2 Atividade Antibacteriana

5.2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O resultados da atividade antibacteriana através do teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) estão expressos na Tabela 06.

Emulsões Testes	CIM das Emulsões (µL/mL) frente as bactérias testes			
	S. mutans	*S. oralis*	*S. salivarius*	*L. casei*
Emulsão copaíba10%	125	125	125	125
Emulsão copaíba10% + amirina 1%				
Emulsão copaíba 30%	125	125	125	125
Emulsão copaíba 30% + amirina 1%				

Tabela 06 - Concentração inibitória mínima das emulsões frente aos microrganismos.

A tabela 06 demonstra a atividade antibacteriana das emulsões do óleo-resina da copaíba a 10% e a 10% com amirina foram 125µL/mL enquanto as emulsões do óleo-resina da copaíba a 30% e a 30% com amirina foram a 125µL/mL frente *Streptococcus mutans, Streptococcus oralis, Streptococcus salivarius, Lactobacillus casei* (Figura 12).

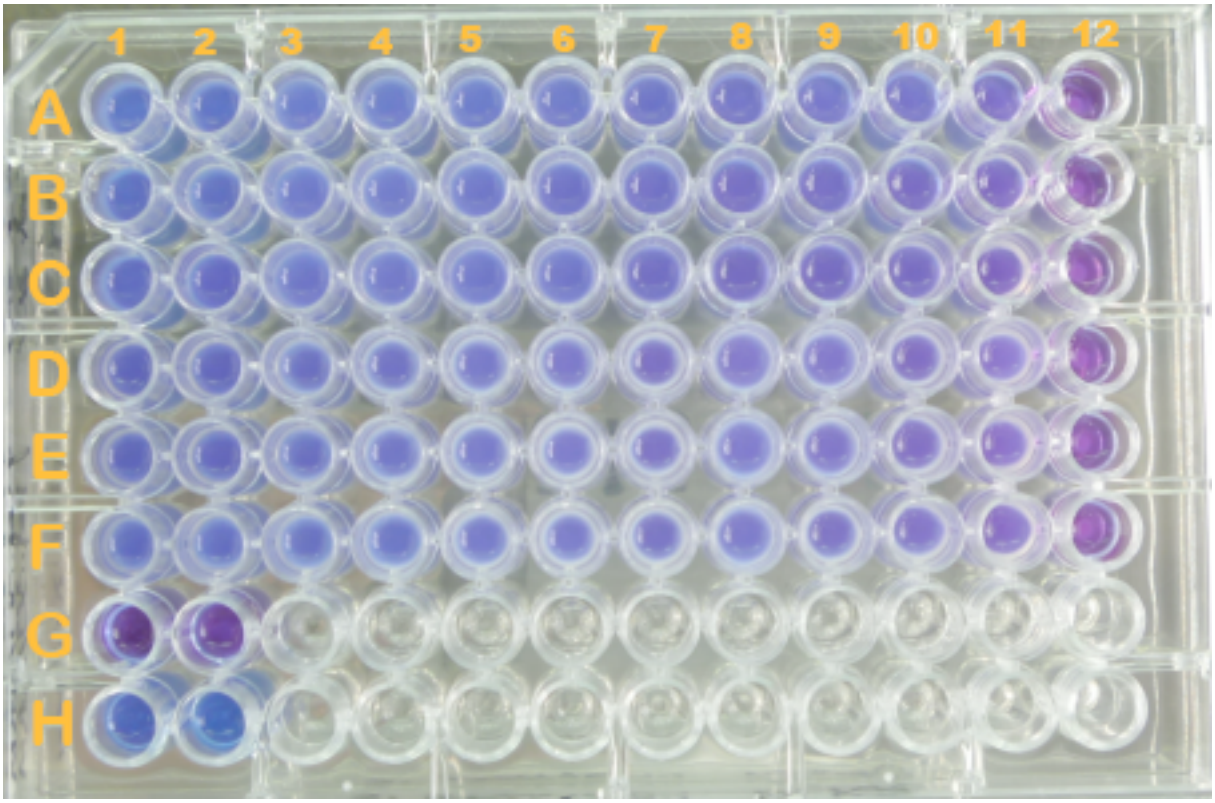

Figura 12 - Emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% e Emulsão do óleo-resina da copaíba a 30%+ amirina a1% frente ao *S.mutans*. Coluna 12 observa-se a viabilidade da bactéria. Linha G observa-se o veículo e na linha H o Digluconato de Clorexidina a 2%.

A atividade da concentração bactericida mínima (CBM) esta apresentada na Tabela 07.

Emulsões Testes	CBM das Emulsões (µL/mL) frente as bactérias testes			
	S. mutans	*S. oralis*	*S. salivarius*	*L. casei*
Emulsão copaíba 10%	175	125	Acima de 125	350
Emulsão copaíba 10% + amirina 1%	150	125	Acima de 125	300
Emulsão copaíba 30%	125	125	Acima de 125	300
Emulsão copaíba 30% + amirina 1%	125	125	Acima de 125	275

Tabela 07 - Concentração bactericida mínima das emulsões testadas frente as bactérias testes.

A Tabela 07 demonstrou que a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% apresentou atividade bactericida nas concentrações de 175µL/mL, a copaíba a 10% com amirina a 150µL/mL frente ao *Streptococcus mutans* (Figura 13 e 14); emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% e a 10% com amirina apresentou atividade bactericida a 125µL/mL frente ao *Streptococcus oralis*; emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% apresentou atividade bactericida a 350µL/mL e a 10% com amirina a 300µL/mL frente ao *Lactobacillus casei* (Figura 15 e 16).

As emulsões do óleo-resina da copaíba a 30% e a 30% com amirina apresentaram atividade bactericida nas concentrações de 125µL/mL frente ao *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*; as emulsões do óleo-resina da copaíba a 30% apresentou atividade bactericida na concentração de 300µL/mL e a copaíba a 30% com amirina a 275µL/mL frente ao *Lactobacillus casei*.

As emulsões testadas frente ao *Streptococcus salivarius* não apresentaram atividade bactericida.

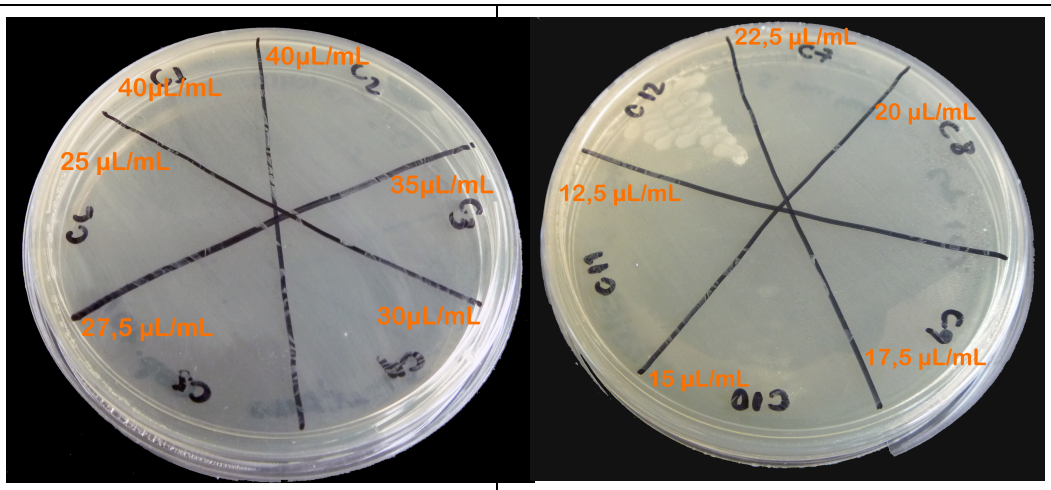

Figura 13 - CBM da emulsão da copaíba a 10% frente ao *S.mutans*.

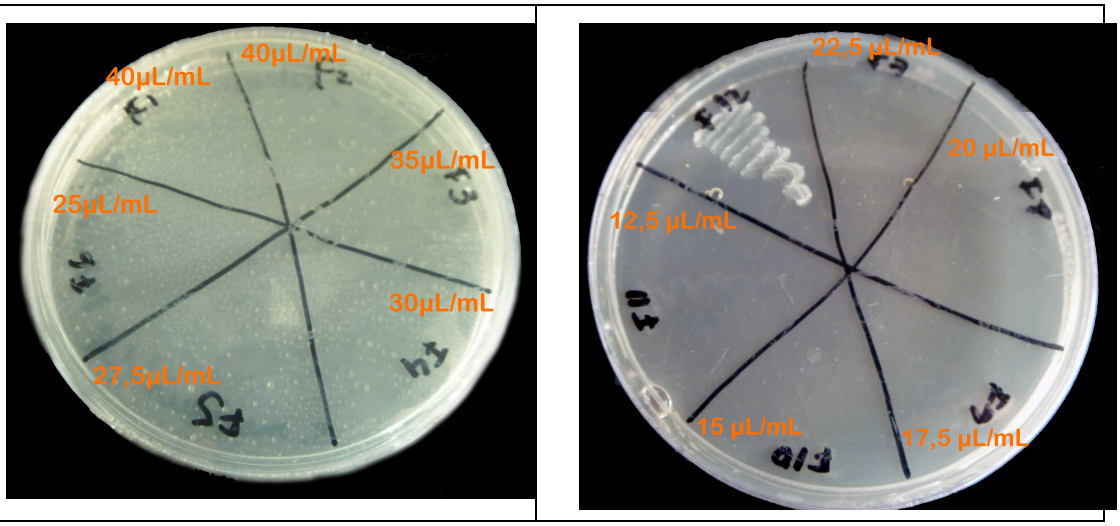

Figura 14 - CBM da emulsão da copaíba a 10%+ amirina a 1% frente ao *S.mutans*.

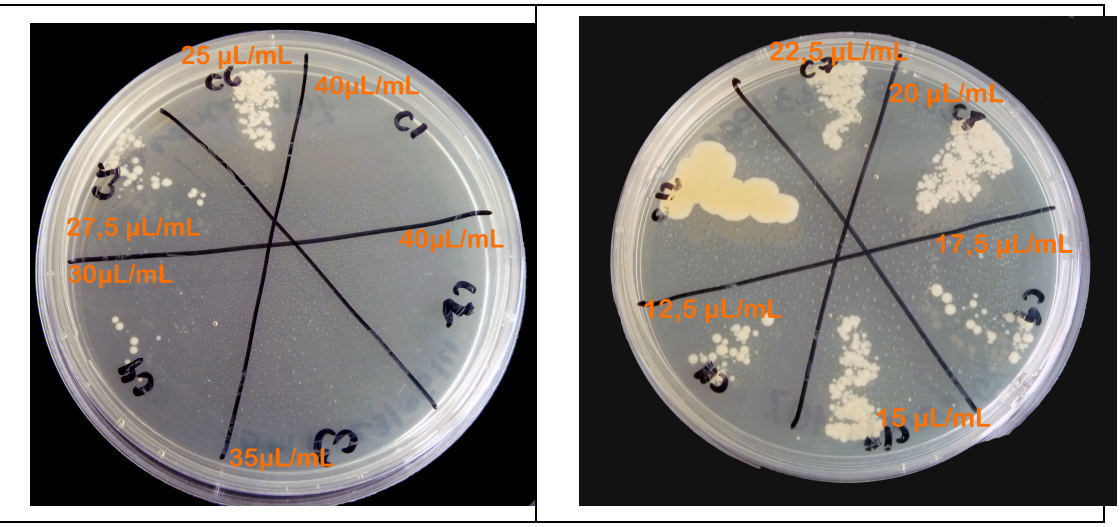

Figura 15 - CBM da emulsão da copaíba a 10% frente ao *L.casei*.

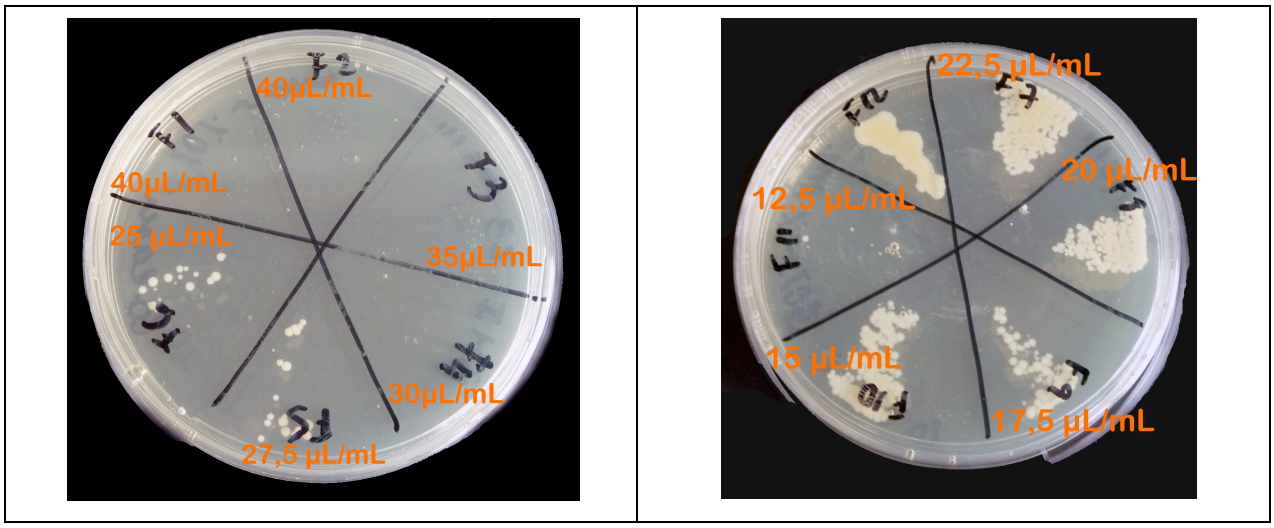

Figura 16 - CBM da emulsão da copaíba 10% + amirina 1%.

5.2.2 Análise de viabilidade celular por técnica de fluorescência

Os resultados da análise de viabilidade celular por técnica de fluorescência estão expressos na Tabela 08.

Emulsões	***Stretococcus mutans***		***Lactobacillus casei***	
	CIM µL/mL	**% células viáveis**	**CIM µL/mL**	**% células viáveis**
Copaíba 30%	9	8,59	12	6,59
Copaíba 30% + amirina	45	11,22	60	11,20

Tabela 08 - A viabilidade celular por técnica de fluorescência das emulsões do óleo-resina de copaíba a 30% e a 30% com amirina nas referidas CIM encontradas frente aos microrganismos.

A CIM e a viabilidade celular da emulsão da copaíba a 30% foi 9µL/mL e 8,59% de células viáveis para o *Streptococcus mutans,* respectivamente; 12µL/mL e 6,59% de células viáveis para o *Lactobacillus casei,* respectivamente*;* a CIM e a viabilidade celular da emulsão da copaíba a 30% + amirina foi 45µL/mL e 11,22% de células viáveis para o *Streptococcus mutans,* respectivamente; 60µL/mL e 11,20% de células viáveis para o *Lactobacillus casei,* respectivamente.

5.3 Hemólise

Os resultados do teste de hemólise estão expressos gráfico 02.

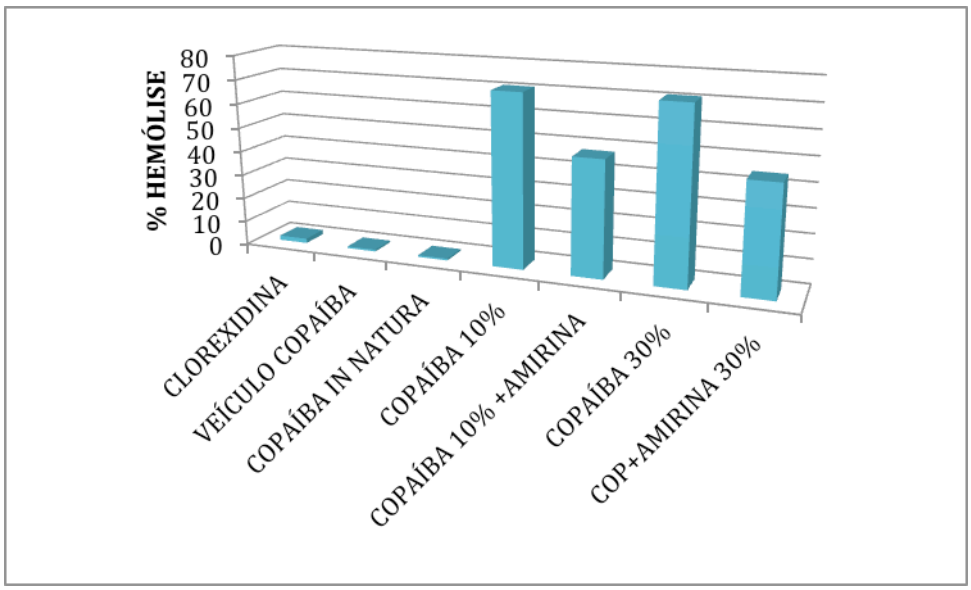

Gráfico 02: Hemólise (%) causada por diferentes emulsões do óleo-resina da copaíba e controles em hemácias humanas em relação ao controle triton X-100.

A emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% na concentração de 30µL/mL apresentou atividade hemolítica de 70,82% (±7,81) de lise celular, enquanto a copaíba a 10% com amirina na concentração de 30µL/mL apresentou 47,58% (±14,65). A emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% nas concentração de 30µL/mL apresentou uma atividade hemolítica de 71,16% (±12,51) de lise celular, e emulsão a 30% com amirina na mesma concentração apresentou uma atividade de hemolítica de 44,67% (± 14,52).

O óleo-resina da copaíba *in natura*, o veículo das emulsões e a clorexidina a 2% proporcionaram lise celular de 0,72%, 0,71% e 1,87%, respectivamente.

Os gráficos 03, 04, 05 e 06 demonstraram a Concentração Efetiva de 50% de lise celular (EC50) das substâncias testes: emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% EC50 = 11,15µL/mL; emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina EC50 =

15,78µL/mL; emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% EC50 = 16,55µL/mL e emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% com amirina EC50 = 32,89 µL/mL.

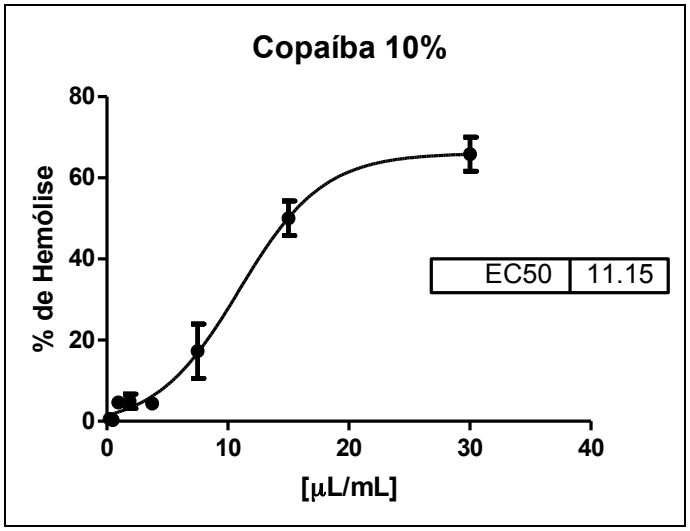

Gráfico 03 - Curva de hemólise da emulsão do óleo-resina da copaíba a 10%, R^2=0,9593.

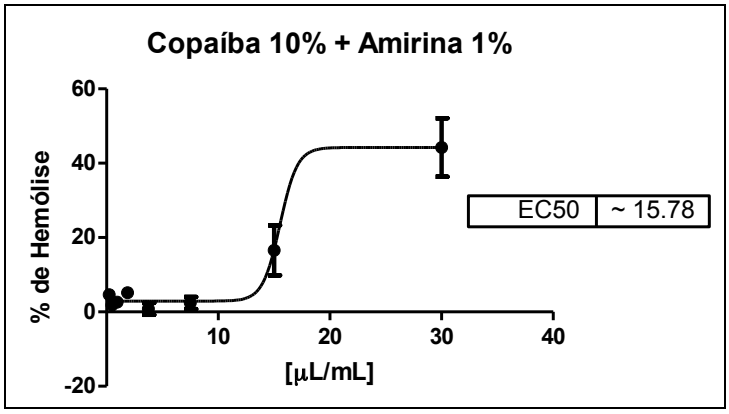

Gráfico 04 - Curva de hemólise da emulsão da copaíba a 10% + amirina 1%, R^2=0,8594.

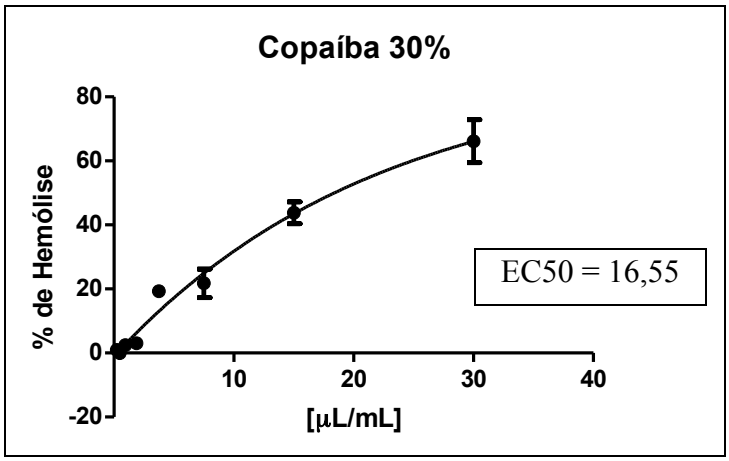

Gráfico 05 - Curva de hemólise da emulsão do óleo-resina da copaíba a 30%, R^2=0,9465.

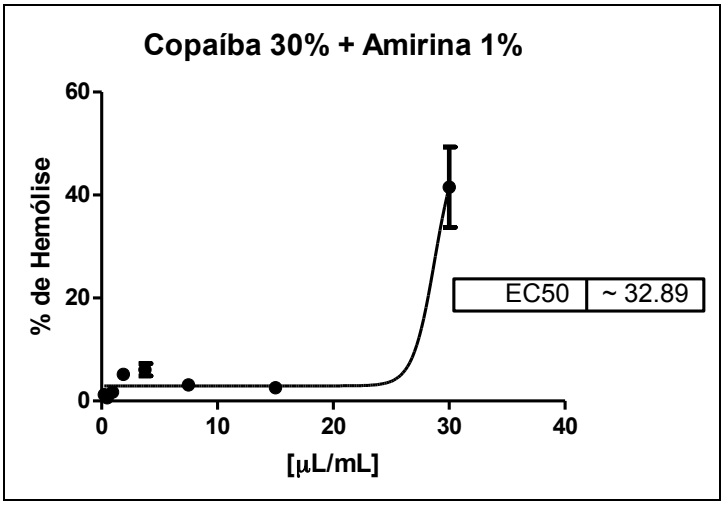

Gráfico 06 - Curva de hemólise da emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% + amirina, R^2=0,08964.

5.4 Cultura de Células

Os resultados da cultura de células estão expressos no Gráfico 07.

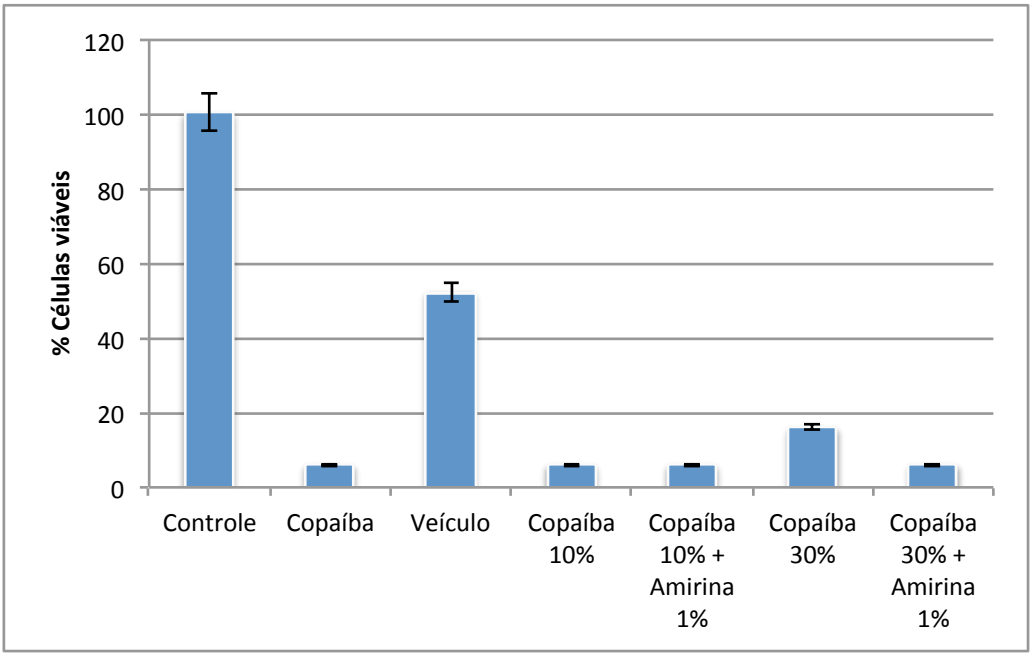

Gráfico 07 - Viabilidade celular das emulsões testes, frente a linhagem celular NHI3T3.

O Gráfico 07 demonstra que o óleo-resina de copaíba *in natura* reduziu a viabilidade celular em 94%. As emulsões do óleo-resina da copaíba a 10%, a 10% com amirina e a emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% com amirina a 1% reduziram a viabilidade celular semelhante ao óleo-resina *in natura.* A emulsão na concentração de 30% de óleo-resina da copaíba sem amirina apresentou maior viabilidade celular (16%).

5.5 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 do óleo-resina da copaíba nas diferentes concentrações estão expressos nos gráficos 08, 09, 10 e tabela 09.

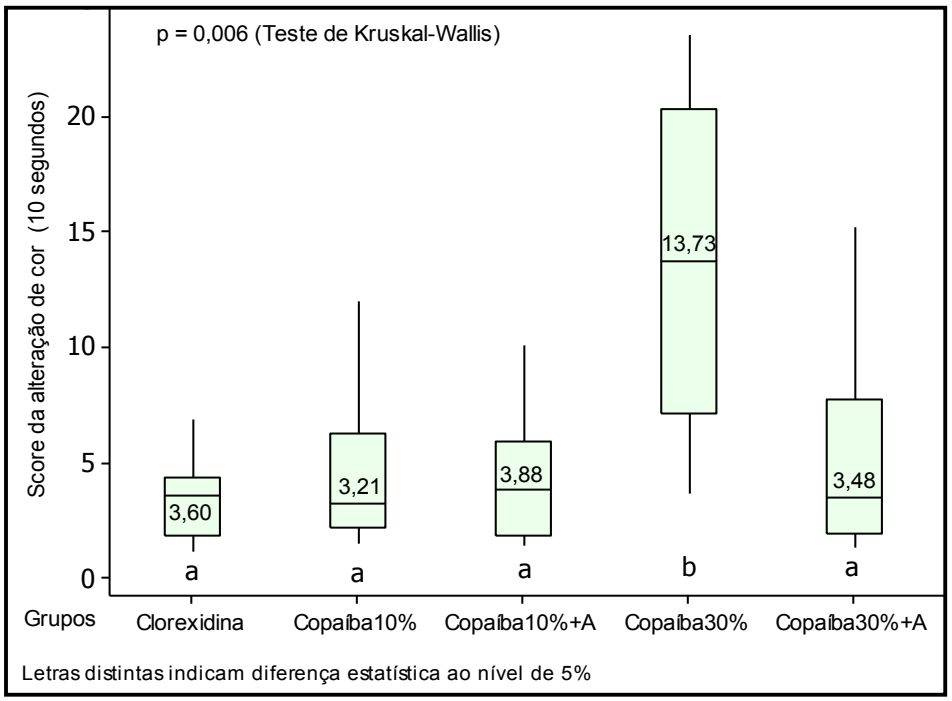

Gráfico 08 - Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 10 segundos das emulsões do óleo-resina da copaíba em dentes humanos, Manaus – AM.

O gráfico 08 demonstra que no período de 10 segundos os grupos experimentais da clorexidina 2%, emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% e a 10% com amirina e emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% com amirina não apresentaram diferença estatística significativa entre si na alteração de cor dos dentes humanos (ΔE). A emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% apresentou maior alteração de cor dentes humanos (ΔE) em relação aos grupos experimentais sendo significativamente diferente.

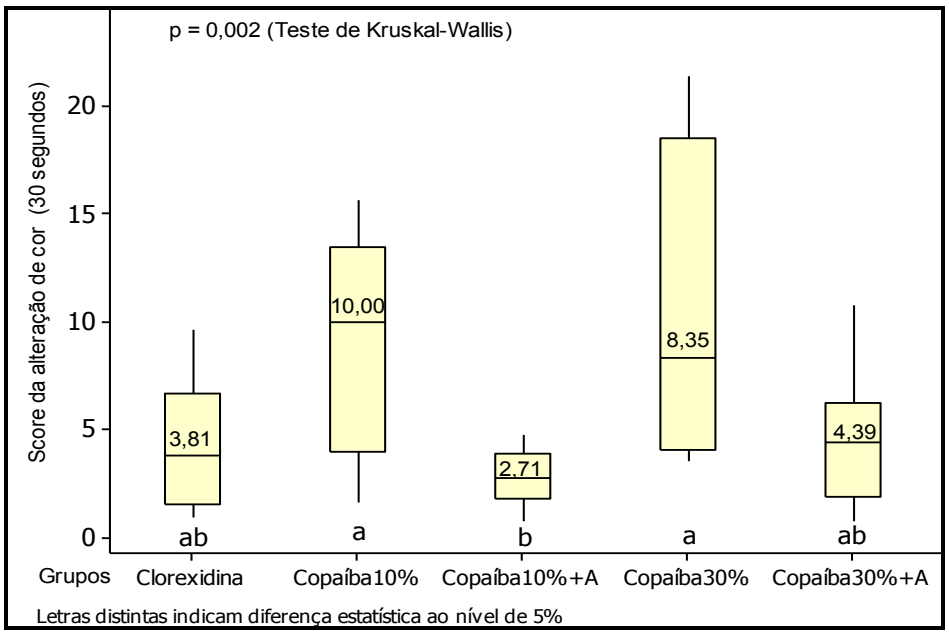

Gráfico 09 - Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 30 segundos das soluções testes em dentes humanos, Manaus – AM.

O gráfico 09 demonstra que no período de 30 segundos os grupos experimentais da emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% + amirina apresentou menor alteração de cor nos dentes humanos (ΔE). A clorexidina a 2% e a emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% + amirina foram semelhantes entre si. A emulsão do

óleo-resina da copaíba a 10% e a 30% apresentaram maior alteração de cor nos dentes humanos (ΔE) e foram semelhantes entre si p≤0,05.

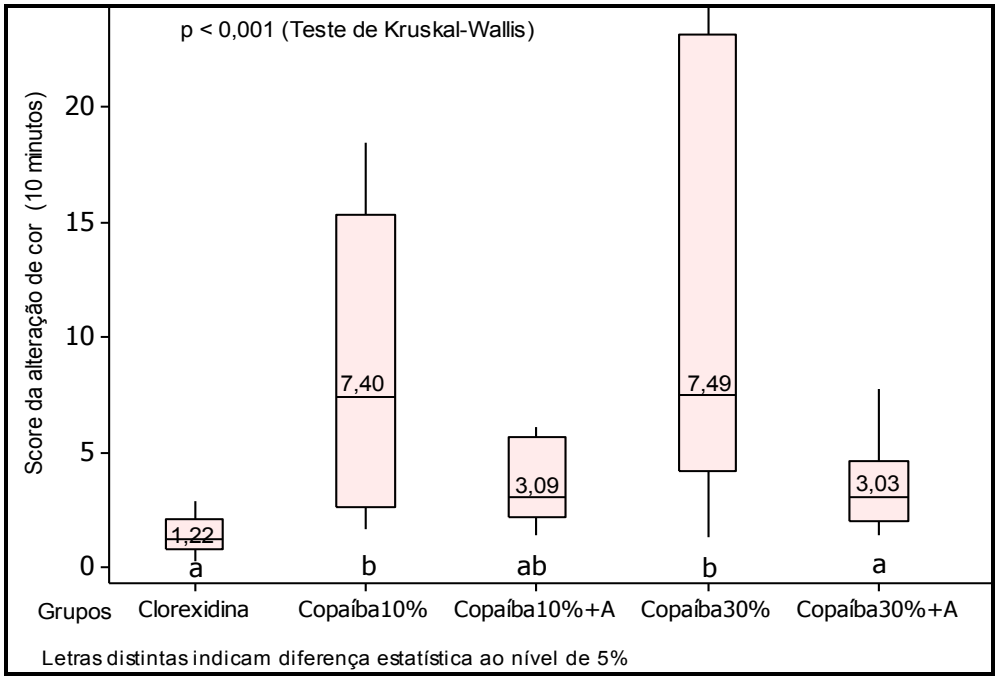

Gráfico 10 - Distribuição segundo a mediana do score da alteração de cor final em 10 minutos das emulsões do óleo-resina da copaíba em dentes humanos, Manaus – AM.

O gráfico 10 demonstra que no período de 10 minutos os grupos experimentais da clorexidina 2% e da emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% + amirina apresentaram menor alteração de cor nos dentes humanos (**ΔE)** sendo semelhantes entre si. A emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% e a 30% apresentaram maior alteração de cor nos dentes humanos (**ΔE)** e foram semelhantes entre si. A emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% + amirina foi semelhante a todos os grupos experimentais, apresentando, no entanto, menor alteração de cor nos dentes humanos (**ΔE)** em relação a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% e a 30% p≤0,05.

	Score						
	10 segundos		*30 segundos*		*10 minutos*		
Grupos	*Med*	*Q_1/Q_3*	*Med*	*Q_1/Q_3*	*Med*	*Q_1/Q_3*	*p**
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

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

Tabela 09 - 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 09 demonstra que nos períodos experimentais todas as substâncias testes apresentaram alteração de cor nos dentes humanos (**ΔE)**, sendo que a clorexidina a 2% 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 emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% apresentou menor alteração de cor nos dentes humanos (ΔE). No período de 30 segundos foi a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% + amirina e em 10 minutos essa alteração foi verificada na clorexidina 2%, emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% + amirina e emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% + amirina.

5.6 Avaliação da compatibilidade biológica de emulsões do óleo-resina da *Copaifera multijuga* em molares de ratos

Período de 7 dias:

Neste período foram analisados 02 molares de ratos no grupo I (Emulsão de óleo resina da copaíba a 10% + amirina a 1% / Pasta de hidróxido de cálcio + óleo resina da copaíba a 10% + amirina a 1%) apresentaram infiltrado inflamatório moderado (50%), sendo que em 01 molar não foi possível visualizar as células inflamatórias; presença de raspas de dentina e de barreira mineralizada jovem (100%).

Nos grupos II, III e IV foram analisados 03 molares de ratos.

O grupo II (Emulsão de óleo resina da copaíba a 30% + amirina a 1% / Pasta de hidróxido de cálcio + óleo resina da copaíba a 10% + amirina a 1%) demonstrou presença de infiltrados inflamatórios leve (33,33%), moderado (33,33%), sendo que em 01 molar não foi possível visualizar as células inflamatórias; presença de células mononucleares com predomínio de polimorfonucleares; presença de vasos congestos (33,33%) e vasos trombosados (33,33%), células vacuolizadas (33,33%) e raspas de dentina; presença de barreira mineralizada jovem (33,33%).

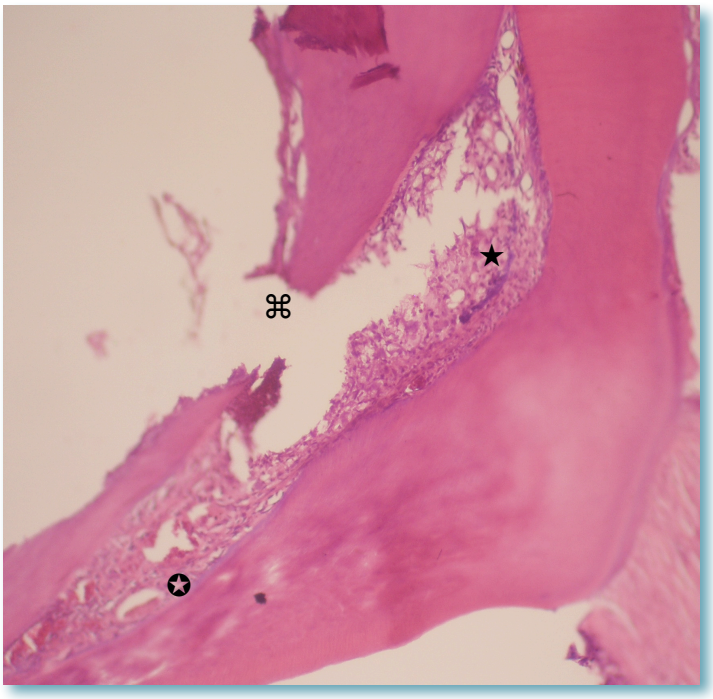

Figura 17 – Grupo II (7 dias): Área de exposição pulpar (⌘); vasos trombosados (✪); Infiltrado inflamatório leve com células polimorfonucleares (★). HE(200X).

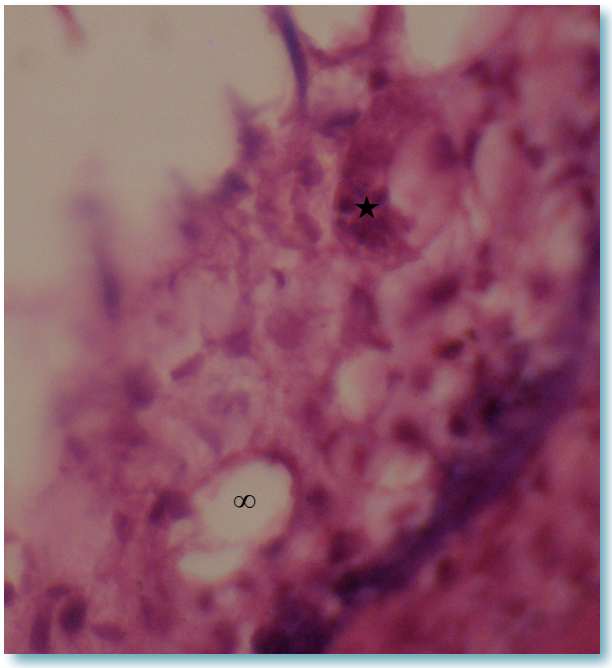

Figura 18 – Grupo II (7 dias) - Infiltrado inflamatório leve com células polimorfonucleares (★), células vacuolizadas (∞). HE (400X).

No Grupo III (Solução de hidróxido de cálcio a 10% / Pasta de hidróxido de cálcio + óleo resina da copaíba a 10% + amirina a 1%) foi evidenciado infiltrado

inflamatório leve (33,33%), moderado (33,33%), sendo que em 01 molar não foi possível visualizar as células inflamatórias; presença de células mononucleares e polimorfonucleares; presença de vasos congestos (33,33%) e trombosados (66,66%), células vacuolizadas e raspas de dentina; presença de barreira mineralizada jovem (33,33%), leve fibrose (33,33%).

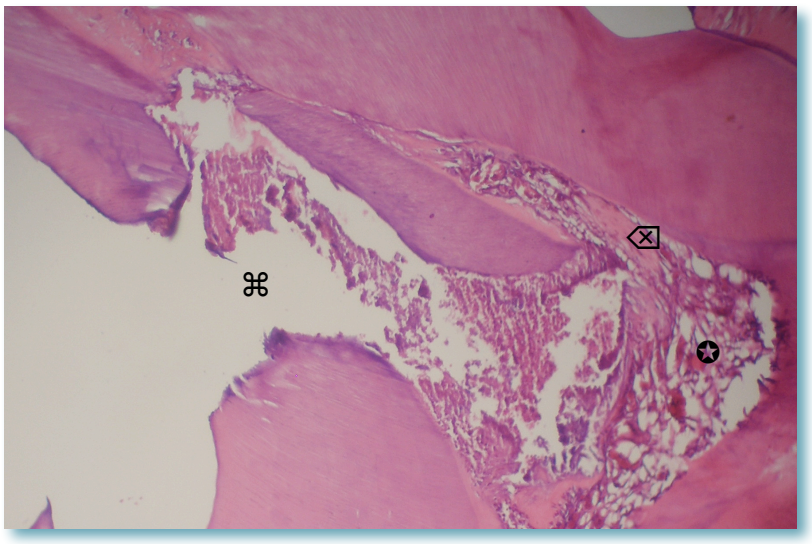

Figura 19 – Grupo III (7 dias) - Área de exposição pulpar (⌘); vasos trombosados (✪); infiltrado inflamatório moderado,; barreira mineralizada (⌫). HE (100X).

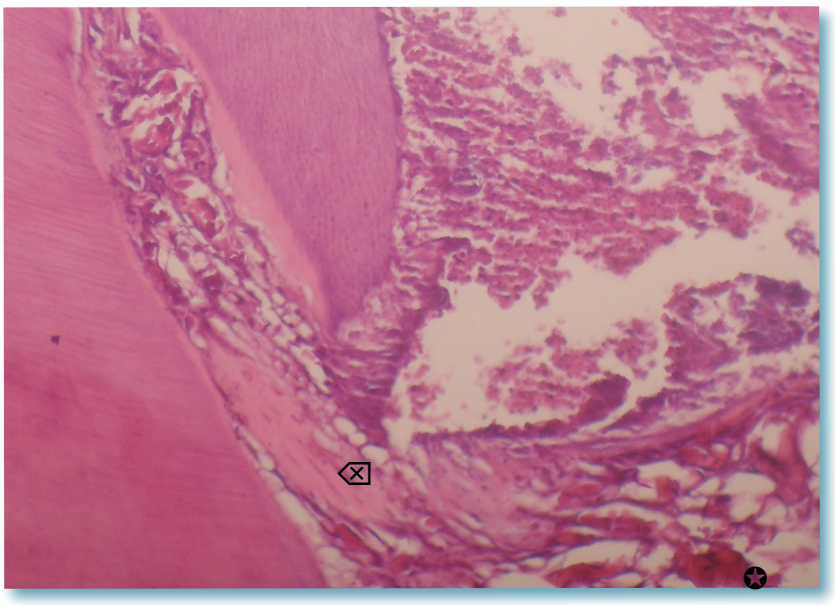

Figura 20 – Grupo III (7 dias) - Vasos trombosados (✪); barreira mineralizada (⌫). HE (200X).

No Grupo IV (Controle - Solução de hidróxido de cálcio a 10% / Pasta de hidróxido de cálcio) foi encontrado infiltrado inflamatório moderado (33,33%), sendo que em 02 molares não foi possível visualizar as células inflamatórias; presença de células de polimorfonucleares com predomínio de células mononucleares; ausência de vasos congestos, trombosados e células vacuolizadas; presença de raspas de dentina e de barreira mineralizada jovem (66,66%); calcificação em formação (33,33%).

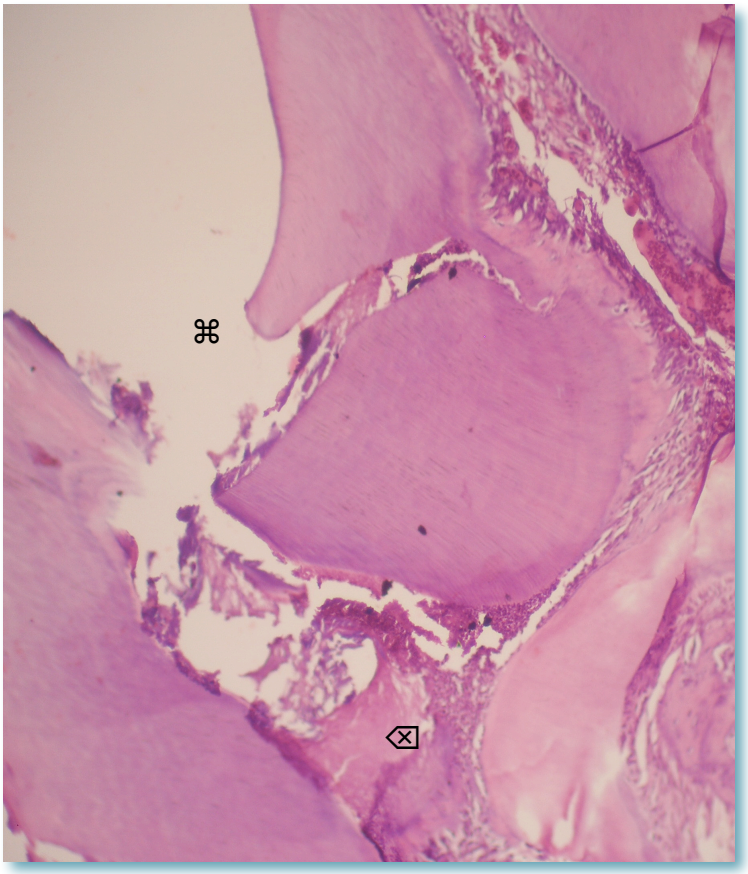

Figura 21 – Grupo IV (7 dias) - Área de exposição pulpar (⌘); infiltrado inflamatório moderado (⬥); barreira mineralizada (⌫). HE (100X).

Período de 30 dias:

Em todos os grupos experimentais foram analisados 03 molares de ratos.

O grupo I (Emulsão de óleo resina da copaíba a 10% + amirina a 1% / Pasta de hidróxido de cálcio + óleo resina da copaíba a 10% + amirina a 1%) apresentou infiltrado inflamatório moderado (33,33%) e intenso (33,33%), sendo que em 01 molar não foi possível visualizar as células inflamatórias; presença de células mononucleadas e com predomínio de polimorfonucleares; ausência de vasos congestos e trombosados; presença de células vacuolizadas (66,66%), raspas de dentina (66,66%), calcificação em formação (66,66%) e de barreira mineralizada madura (100%).

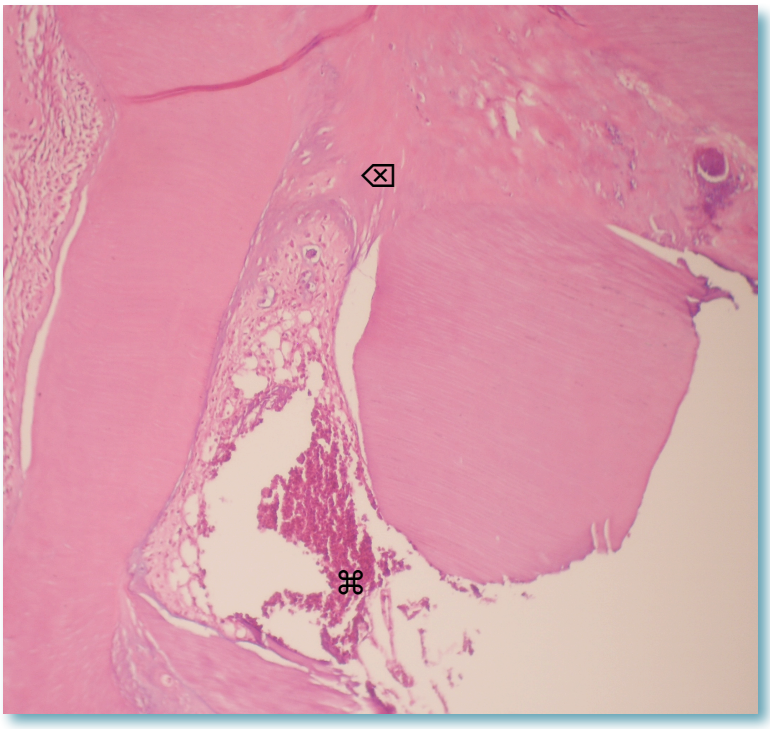

Figura 22 – Grupo I (30 dias) - Área de exposição pulpar (⌘);barreira mineralizada (⌫). HE (100X).

O grupo II (Emulsão de óleo resina da copaíba a 30% + amirina a 1% / Pasta de hidróxido de cálcio + óleo resina da copaíba a 10% + amirina a 1%) demonstrou

presença de infiltrados inflamatórios leve (33,33%), sendo que em 02 molares não foi possível visualizar as células inflamatórias; presença de células mononucleares e polimorfonucleares; presença de vasos congestos (33,33%), vasos trombosados (33,33%), células vacuolizadas (66,66%); calcificação em formação (33,33%); raspas de dentina e presença de barreira mineralizada madura (33,33%).

No Grupo III (Solução de hidróxido de cálcio a 10% / Pasta de hidróxido de cálcio + óleo resina da copaíba a 10% + amirina a 1%) não foi possível evidenciar o infiltrado inflamatório; presença de vasos trombosados (33,33%), células vacuolizadas (66,66%) e raspas de dentina; presença de barreira mineralizada madura em (66,66%), em um caso houve a presença de barreira jovem e madura.

Figura 23 – Grupo III (30 dias) - Área de exposição pulpar (⌘); vasos trombosados (✪)barreira mineralizada (⌫). HE (100X).

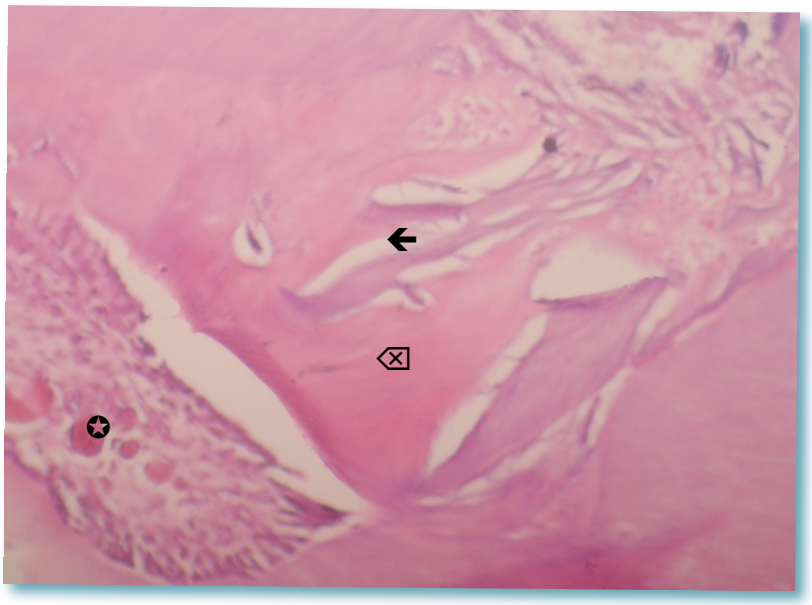

Figura 24 – Grupo III (30 dias) - Vasos trombosados (✪), barreira mineralizada (⌫) observando as raspas de dentina seno englobadas pela barreira (🡐). HE (200X).

No Grupo IV (Controle - Solução de hidróxido de cálcio a 10% / Pasta de hidróxido de cálcio) foi encontrado infiltrado inflamatório leve (66,66%), sendo que em 01 molar não foi possível visualizar as células inflamatórias; presença de células mononucleares e polimorfonucleares; vasos congestos e trombosados (33,33%); células vacuolizadas (66,66%); presença de raspas de dentina e de barreira mineralizada jovem (33,33%) e madura (66,66%); calcificação em formação (33,33%).

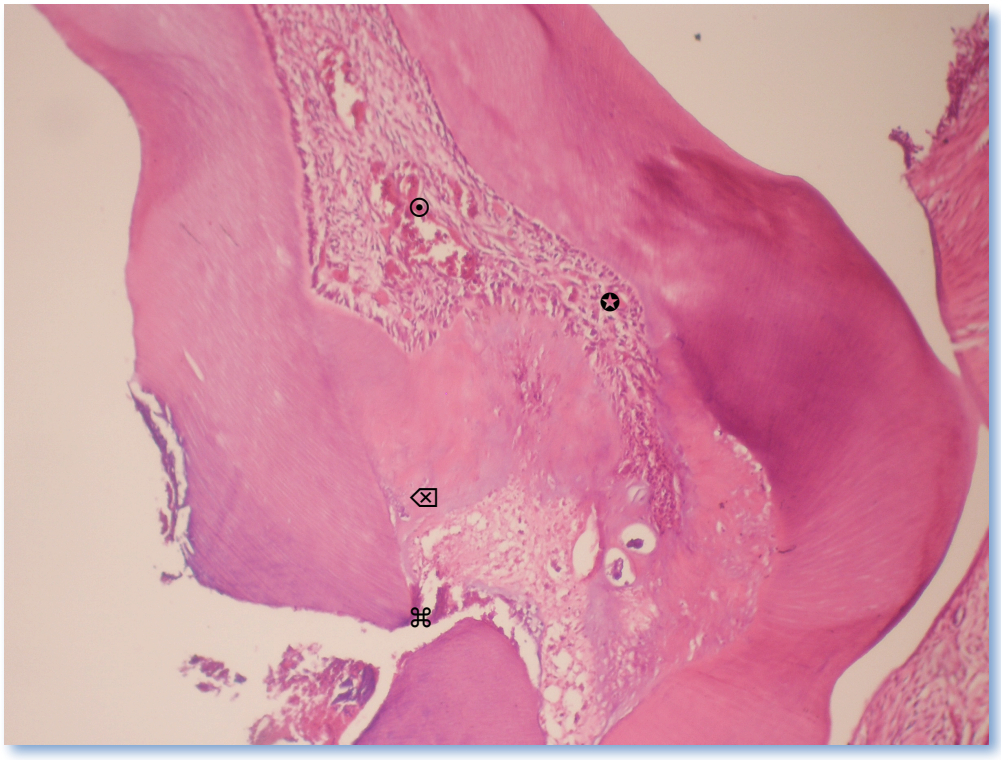

Figura 25 – Grupo IV (30 dias) - Área de exposição pulpar (⌘); Vasos trombosados (✪) e congestos (⊙); barreira mineralizada (⌫). HE (100X).

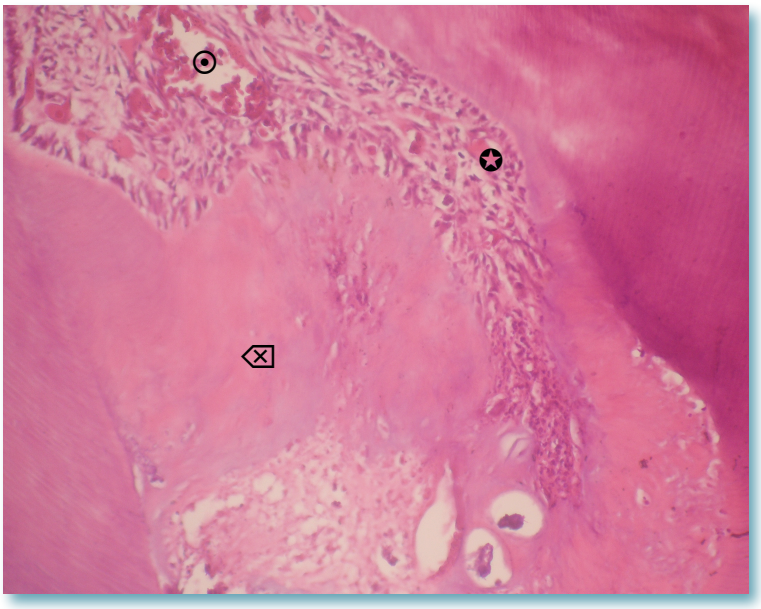

Figura 26 – Grupo IV (30 dias) - Vasos trombosados (✪) e congestos (⊙); barreira mineralizada (⌫). HE (200X).

6. DISCUSSÃO

O óleo-resina da copaíba vem sendo utilizado para diversos fins, farmacológico ou não; suas propriedades medicinais foram bastante difundidas entre os índios latino-americanos à época que os primeiros exploradores europeus chegaram ao Brasil no século XVI. Este conhecimento, tudo indica, veio da observação do comportamento de certos animais que, quando feridos, esfregavam-se nos troncos das copaibeiras para cicatrizarem suas feridas (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

As propriedades medicinais deste óleo-resina tem sido comprovadas com trabalhos científicos, como nas atividades antibacteriana, anti-inflamatória, antinoceptiva e anticancerígena (BANDEIRA *et al*, 1999; VEIGA JR *et al*, 2007; GOMES *et al,* 2007; GOMES, 2008). Trabalhos tem demonstrado que o óleo-resina da copaíba apresenta atividade para uso na odontologia: na atividade antibacteriana frente aos microrganismos de interesse odontológico, no capeamento pulpar, no controle microbiológico do biofime dental utilizando um gel a base de copaíba, como um cimento obturador provisório, e como cimento endodôntico (BANDEIRA *et al*, 1999; SIMÕES, 2004; ABNADER, 2005; VASCONCELOS *et al,* 2008; GARRIDO *et al* 2010; SOUZA *et al*, 2011).

Os resultados da análise cromatográfica do óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne revelaram que entre os seus principais componentes estão β-cariofileno, α-humuleno, bisaboleno, cedreno e cadineno. Estes resultados foram semelhantes aos resultados de Bandeira *et al* (1999), Cascon; Gilbert (2000), Veiga Junior; Pinto (2002); Lima *et al* (2003), Simões (2004) e Vasconcelos *et al* (2008).

As emulsões do óleo-resina da copaíba testadas apresentaram atividade antibacteriana frente a microrganismos da cavidade oral, resultados semelhantes analisando o óleo de copaíba em várias apresentações foram encontrados por Bandeira *et al* (1999), Simões (2004), Abinader (2005), Vasconcelos *et al* (2008) e Souza *et al* (2011).

As emulsões testes à 10% e 10% com amirina apresentaram uma CIM de 125µL/mL, a concentração de 30% e 30% com amirina apresentaram uma CIM de 125µL/mL, frente a todas as bactérias testadas.

As emulsões do óleo-resina da copaíba a 10% e a 10% com amirina frente ao *Streptococcus mutans* apresentaram uma CBM de 175 µL/mL e 15o µL/mL, respectivamente.

A CBM das emulsões do óleo-resina da copaíba a 10% e 10% com amirina frente ao *Lactobacillus casei* foram 350µL/mL e 300 µL/mL, respectivamente; nas emulsões do óleo-resina da copaíba a 30% e a 30% com amirina foram 300µL/mL e 275µL/mL, respectivamente, para o microrganismo citado anteriormente. As substâncias testes apresentaram atividade bacteriostática nas concentrações testadas frente ao *Streptococcus salivarius.*

Souza *et al* (2011) utilizando a mesma metodologia empregada neste estudo, verificou que o ácido copálico, um diterpeno do óleo-resina da *Copaifera langsdorffi,* apresentou atividade antibacteriana na CIM de 2 a 6µL/mL frente *Streptpcoccus mutans.* Este estudo sugere que nos constituintes do óleo de copaíba existem substâncias que, possivelmente, são responsáveis pela atividade antibacteriana, como sugerido por Bandeira *et al* (1999).

A resazurina é comercialmente chamada de Alamar Blue®, usada para monitorar a proliferação e a viabilidade das células bacterianas eucarióticas, baseada

na detecção do metabolismo celular, que induz a um processo de oxi-redução, convertendo a resazurina, que detecta a atividade metabóllica indicada pela a cor azul, não fluorescente, em resofurina, que tem a cor rosa e fluorescente, indicando a presença de células vivas, sendo um procedimento simples, rápido e de baixo custo (SCHIRMER *et al*, 1998; O'BRIEN *et al*, 2000).

Analisando as propriedades da resasurina em identificar o metabolismo celular, é possível que as concentrações das emulsões de copaíba não interferiram a tal ponto que provocasse a alteração no metabolismo bacteriano na observação visual humana.

Cantrell *et al* (1996) afirmaram ainda que este corante não é citotóxico, pois não é necessária a morte celular para se obter resultados dos testes aplicados.

A divergência encontrada nos resultados da CIM e CBM, pode ser atribuído a subjetividade na leitura da CIM, fato que pode ser solucionado com uma avaliação mais acurada da leitura das placas.

Diante disso realizou-se a análise da viabilidade celular por fluorescência em que os resultados corroboraram com as afirmações acima, nas CIM das emulsões do óleo-resina da copaíba a 30% e a 30% com amirina frente ao *Streptococcus mutans* foi de 9 μL/mL e 45 μL/mL apresentando 8,59% e 11,22% das células viáveis, respectivamente. Para *Lactobacillus casei* a emulsão do óleo-resina de copaíba a 30% foi de 6,59% de células viáveis quando se aplica uma CIM de 12 μL/mL e para a emulsão do óleo-resina de copaíba a 30% com amirina foi de 11,20% de células viáveis quando se aplica uma CIM de 60 μL/mL.

Um aumento significativo do estudo da biocompatibilidade dos materiais odontológicos é uma realidade para pesquisadores das diversas especialidades. Testar a citotoxicidade é a primeira etapa para assegurar a biocompatibilidade de um

material e pode ser medida através de três tipos de testes: *in vitro* através de testes culturas de células, *in vivo*, em animais e através de estudos clínicos (WATAHA, 2001).

O teste de ação hemolítica *in vitro* tem sido utilizado como uma das metodologias de triagem para diversos agentes tóxicos, as membranas de eritrócitos são estruturas dinâmicas que podem ditar mudanças significativas quando interagem com drogas (KUBLIK *et al*, 1996).

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 *et al*, 2009).

A emulsão do óleo-resina da copaíba nas diferentes concentrações, 10%, 10% com amirina, 30% e 30% com amirina apresentaram atividade hemolítica, semelhante à pesquisa de Costa-Lotufo *et al* (2002), que avaliaram um isolado do óleo-resina da *Copaifera langsdorffi*, ácido karenoico, que proporcionou lise celular em 50% dos eritrócitos humanos com 54,6μM. As emulsões do óleo-resina da copaíba a 10% e a 30% na concentração de 30μL/mL proporcionaram 70,82% e 71,16%, respectivamente, de lise celular, maior porcentagem de hemólise que as emulsões a 10 % com amirina e 30% com amirina na mesma concentração proporcionando 47,58% e 44,67%, respectivamente. Sugerindo que o produto biotecnológico adicionado favoreceu a diminuição da citotoxicidade do produto.

O óleo-resina da copaíba *in natura* não apresentou atividade hemolítica significativa, discordando da pesquisa de Costa-Lutufo *et al* (2002). Este fato pode estar relacionado a ausência de um detergente para quebrar as macromoléculas do

óleo de copaíba em micromoléculas, possibilitando o contato do óleo-resina da copaíba com a solução de eritrócitos e assim proporcionar lise celular.

O trabalho de Pequeno; Soto-blanco (2006) avaliaram a ação hemolítica de plantas consideradas tóxicas, e as mesmas não apresentaram atividade de lise celular, considerando que o teste não pode ser aplicado com segurança na avaliação preliminar de plantas tóxicas, sendo ainda necessário a utilização de animais.

Os resultados com alta atividade hemolítica, como a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% (70,82% de lise celular) e 30% (71,16% de lise celular), podem apresentar comportamento biológico diferenciado quando testado *in vivo*. Entretanto como medida de segurança devido a alta atividade hemolítica destas substâncias sugere-se trabalhar com concentrações menores, como as encontradas pela Concentração Efetiva de 50% de lise celular (EC50), onde a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% apresentou uma EC50 de 11,15µL/mL, emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina EC50 = 15,78µL/mL, emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% EC50 = 16,55µL/mL e uma emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% com amirina EC50 = 32,89 µL/mL.

O teste de cultura de células mostrou que todas as emulsões do óleo-resina da copaíba a 10%, a 10% com amirina, 30% e 30% com amirina foram tóxicas, ocasionando a diminuição da viabilidade celular. Estes resultados foram confirmados pelos resultados de Costa-Lotufo *et al*, (2002), Lima *et al* (2003) e Veiga Jr *et al* (2007), observando que os resultados desses autores estão associados a células tumorais e os nossos resultados estão relacionados a fibroblastos sadios, sugerindo que a copaíba não faz uma seletividade celular para expressar a sua toxicidade.

Correlacionando os resultados da atividade antibacteriana e de citotoxicidade é possível sugerir que existe a viabilidade de utilizar as mesmas concentrações das emulsões testes ajustando a quantidade em μL/mL para aplicação clínica.

O veículo utilizado na formulação das emulsões foi o Tween, que é um sulfactante 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 testadas (DOMINGUES *et al*, 2000).

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 da membrana celular, necessitando de maiores investigações.

Apesar da alta toxicidade na cultura de células das emulsões do óleo-resina da copaíba, existem vários estudos demonstrando as atividades biológicas destas substâncias, tais como: antibacterianas, antiinflamatórias, antinoceptiva e antitumoral (BANDEIRA *et al*, 1999; VEIGA JR *et al*, 2007; GOMES *et al,* 2007; GOMES, 2008). 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.

Sendo assim, a realização da pesquisa *in vitro* não pode ser totalmente extrapolada para uma situação *in vivo*, pois esta é mais complexa e os fatores relacionados com a farmacodinâmica dos materiais ensaiados, pH, dinâmica biológica do tecido onde será utilizado, podem justificar a falta de correlação entre os resultados

in vitro e a prática clínica. Entretanto, o desenvolvimento aperfeiçoado dos testes *in vitro* tem fornecido melhor correlação com a situação *in vivo* e tem recebido considerável atenção (ISO, 1984).

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 refratem parte da luz incidente, assim produzindo a cor do dente.

Os espectrofotômetros têm grandes vantagens sobre as escalas de cor, pois a leitura da cor é objetiva, repetitível, 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,* a leitura da cor na dentina dos dentes humanos foi simulada para cavidade classe V de incisivo anterior, devido a confecção dos corpos de prova no sentido mésio distal e confecção de um dispositivo para padronizar a leitura. 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 utilizando corpos de prova de dentina (TEN BOSCH; COOPS, 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 testes alteraram a cor dos dentes humanos ***(ΔE)*** sendo semelhantes entre si, somente emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% apresentou maior alteração com significância estatística entre as substâncias testes.

Comparando os períodos de 30 segundos e 10 minutos as emulsões do óleo-resina da copaíba a 10% e a 30% apresentaram maior alteração de cor nos dentes humanos (ΔE) e foram semelhantes entre si. Em 30 segundos a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina apresentou menor alteração de cor nos dentes humanos (ΔE), enquanto que em 10 minutos a clorexidina a 2% e a emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% com amirina 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 emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% (ΔE= 3,21) apresentou menor a alteração de cor nos dentes humanos (ΔE); No período de 30 segundos foi a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina (ΔE= 2,70); em 10 minutos essa alteração foi verificada na clorexidina 2% (ΔE= 1,22), emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina (ΔE= 3,08), copaíba a 30% com amirina (ΔE= 3,03).

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 (VICHI; FERRARI; DAVIDSON, 2004). Baseado nestes fatos as substâncias testes onde a alteração na cor dos dentes não seriam perceptíveis clinicamente foram: em 10 segundos a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10%; em 30 segundos emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina; no período de 10 minutos a clorexidina 2%, a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina e copaíba a 30% com amirina.

Estes resultados foram analisados seguindo o sistema e diagrama CIELAB (Figura 27) com a seguinte equação:

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

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

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

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

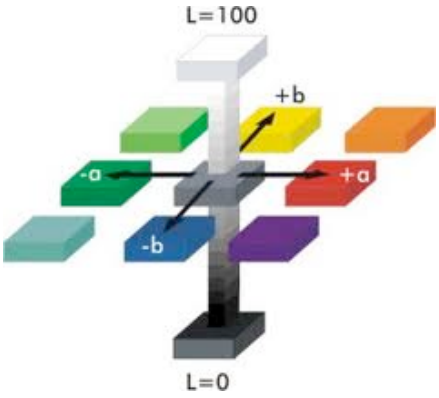

Figura 27 - Diagrama do Espaço de cor CIELAB

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 das emulsões do óleo-resina da copaíba a 30% com amirina e da copaíba 10% com amirina nos períodos de 10 e 30 segundos revelam que houve clareamento no uso dessas substâncias (Apêndice D), (TOUATI; MIARIA; NATHANSON, 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 a 2% no tempo de 30 segundos e a emulsão do óleo-resina da copaíba a 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; SHARMA; HAYWOOD, 1998).

Estudos demonstraram que quando usado prolongadamente a clorexidina 0,12% utilizada para bochecho 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 do óleo-resina da 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.

Segundo as recomendações preconizadas pela FDI/ADA o teste de biocompatibilidade fornece resultados mais aproximados da resposta em humanos, devido a este fato é considerado um teste comparativo específico, onde existe o contato do material diretamente em contato com o tecido específico (BANDEIRA, 1998).

Assim o comportamento biológico das emulsões testadas foram analisadas diretamente no tecido pulpar dos molares de ratos, associadas a várias pastas experimentais contendo óleo resina de copaíba e um produto isolado da

biodiversidade amazônica. O capeamento pulpar com pastas de hidróxido de cálcio como controle foi selecionado pela sua atividade biológica reconhecida na literatura.

O preparo cavitário realizado durante o procedimento restaurador ou a injúria pela infecção bacteriana proporcionada pela cárie dental pode desencadear danos ao complexo dentino-pulpar ocasionando resposta inflamatória, que está intimamente ligada ao processo de reparo, visando livrar o organismo tanto da causa inicial da agressão celular quanto de suas consequências.

O processo de reparo da polpa do molar do rato é caracterizada inicialmente, pelo aparecimento de uma zona superficial de necrose, sob o qual pode ser observada uma reação inflamatória. Posteriormente, aparece uma intensa proliferação fibroblástica, tendendo a isolar a área de exposição. Em seguida, ocorre a formação de uma barreira mineralizada, e o processo é concluído com a formação da ponte de dentina. A resposta pulpar em molares de ratos, depende de vários fatores, incluindo o tamanho da exposição, o grau do trauma, a pressão exercida sobre o material de selamento, a idade do animal, controle da hemorragia durante a exposição pulpar e do material aplicado no local da exposição (ROWE, 1967).

Os grupos experimentais foram distribuídos em 4 grupos: Grupo I – Emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina 1% + pasta de hidróxido de cálcio com copaíba a 10% com amirina 1%; Grupo II – Emulsão do óleo-resina da copaíba a 30% com amirina 1% + pasta de hidróxido de cálcio com copaíba a 10% com amirina 1%; Grupo II – Solução de hidróxido de cálcio a 10% + pasta de hidróxido de cálcio com copaíba a 10% com amirina 1% e Grupo IV (Controle) – Solução de hidróxido de cálcio a 10% + pasta de hidróxido de cálcio

Analisando comparativamente os resultados do período de 7 dias foi observado que o grupo I, emulsão do óleo-resina da copaíba a 10%, obteve um

comportamento semelhante ao grupo IV, controle, formando barreira mineralizada jovem em 66,66% dos casos, e em alguns cortes histológicos foi observado a presença de infiltrado inflamatório moderado (33,33%).

No grupo I, a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina, comparado com o grupo III, solução de hidróxido de cálcio a 10%, sugeriu que o produto teste aplicado antes do capeamento pulpar, possivelmente, favoreceu a resposta reparadora da polpa, proporcionando maior formação de barreira mineralizada.

Observando os resultados do período experimental de 30 dias no grupo I, a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina, obteve um comportamento semelhante ao grupo IV, controle, quanto a presença da formação de 100% de barreira mineralizada, divergindo quanto a presença do infiltrado inflamatório, onde a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina apresentou um infiltrado inflamatório moderado a intenso com predomínio de células polimorfonucleares enquanto que o grupo IV, controle, apresentou um infiltrado inflamatório leve.

O grupo I, emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% com amirina, comparado com o grupo III, solução de hidróxido de cálcio a 10%, sugeriu que o produto teste aplicado antes do capeamento pulpar possivelmente proporcionou maior frequência de barreira mineralizada madura, assim como apresentado no período experimental de 7 dias, se diferenciando pelos infiltrados inflamatórios que no grupo I foi de moderado a intenso enquanto que no grupo III foi leve.

Estes resultados corroboram com a pesquisa realizada por Bandeira (1998) ao avaliar o óleo essencial e resina da copaíba associado ao hidróxido de cálcio e ao óxido de zinco como agente de capeamento pulpar em molares de ratos, apresentaram formação de barreira mineralizada no período experimental de 30 dias.

Outro aspecto observado no histopatológico foi a amplitude da preparo cavitário, que segundo Mondelli (1998) não há evidentemente nenhum limite de tamanho da exposição pulpar para o sucesso do capeamento, o seu tamanho não parece ter consequência, caso a técnica do capeamento pulpar seja judiciosamente aplicada. Stanley (1998) defende ainda que o tamanho da exposição deve proporcionar contato do material de capeamento com o tecido pulpar, visando a reparação pelos odontoblastos, deve permitir a remoção das raspas de dentina e revelou ainda que o sucesso do capeamento está na dependência da habilidade do operador. Entretanto Christensen (1998) relatou que além da adequada hemostasia evitando a formação de barreiras mineralizadas com túneis de dentina o tamanho da exposição, preferencialmente, não deve ultrapassar a 0,5 mm que corresponde a ponta da sonda exploradora quando padronizada por ISO.

Avaliando comparativamente os resultados todos os períodos e grupos experimentais, apresentaram resíduos, principalmente raspas de dentina. Segundo Oliveira *et al* (1987) a presença de fragmentos de dentina é um achado comum em trabalhos com dentes de animais podendo afetar negativa ou positivamente os resultados, dependendo da presença ou não de contaminação.

Stanley (1998) concordou com estes fatos e citou que alguns pesquisadores acreditam que raspas de dentina sem contaminação podem estimular a formação de barreira, como ocorreu na presente pesquisa, e outros a descrevem como locais de inflamação focal e formação de abcesso. Trabalhos como Decup *et al* (2000) descreveram que durante o procedimento operatório raspas de dentina foram projetadas para dentro da câmara pulpar, e foi observado que esses fragmentos contribuíram para a mineralização do tecido pulpar.

No intuito de evitar viés na pesquisa os capeamentos pulpares dos molares de ratos que tiveram ausência da restauração foram descartados.

Segundo Mondelli (1998), considerando que o sucesso de uma proteção pulpar direta, culmina com a formação de uma barreira calcificada ou ponte de dentina para vedar a exposição e manter a vitalidade pulpar, sugerimos que dentre os grupos experimentais analisados aquele que melhor apresentou compatibilidade biológica foi o grupo IV, seguido do grupo I, III e II.

Em continuidade com a presente pesquisa salientamos que o número de amostras será aumentada para que tenhamos um n=5 molares de rato, que os grupos experimentais utilizando as emulsões do óleo-resina da copaíba a 10% e 30% serão incluídos, além do acréscimo do período experimental de 15 e 60 dias.

A realização desta pesquisa vislumbra a possível introdução de produtos bioativos da região amazônica na odontologia como solução de limpeza de cavidade e/ou pastas para capeamento pulpar. Esta sugestão está baseada nos resultados encontrados nesta pesquisa, onde as soluções testes apresentaram atividade antibacteriana em maior ou menor potencialidade frente a microrganismos de interesse odontológico; apresentando assim um dos requisitos para esta função, além de apresentar resultados promissores na biocompatibilidade e na alteração de cor em dentes humanos.

No entanto é imperativo a continuidade das pesquisas visando alteração na formulação para melhorar a citotoxicidade, analisar as propriedades físicas, mecânicas e biológicas dos produtos *in usage* teste em dentes humanos.

7. CONCLUSÃO

Baseada na metodologia empregada, pode-se concluir que as emulsões do óleo-resina da copaíba a 10% e 30% com e sem amirina demonstraram resultados promissores para a utilização na odontologia, com destaque para a emulsão de copaíba a 10% com amirina na atividade hemolítica, na alteração de cor e na compatibilidade biológica, necessitando de ensaios pré-clínicos e clínicos na farmacotécnica; nas propriedades físicas, mecânicas e biológica; e ainda verificar da influência das emulsões testes na interface dente restauração para que os produtos possam ser considerados como aceitáveis tanto como solução limpeza de cavidades e/ou pasta para capeamento pulpar.

REFERÊNCIAS

ABINADER, C.D. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada a diferentes veículos frente a *Candida albicans* e ao *Enterococcus faecalis*. 2005. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

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, J.C. Estudo silviculturais de uma população de *Copaifera multijug*a Hayne-Leguminosae, na Amazônia Central 2 – Produção de óleo resina. Acta Amazônica, v. 1, n. 1, p. 75-89, 1982.

ANDERSON, M.H.; LOESCHE, W.J.; CHARBENEAU, G.T. Bacteriologic Study of a basic fuchsin caries disclosing dye. The Journal of Prosthetic Dentistry, v. 54, n. 1, p. 51-55, 1985.

ANDRADE, A.P. et al. Influência da limpeza cavitária na força de união de sistemas adesivos à dentina após remoção do tecido cariado com Carisolv. Odontologia Clin-Cientif., v. 4, n. 1, p. 29-34, 2005.

ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentration. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 48, Suppl. S1, p. 5-16, 2001.

ANUSAVICE, K.J. Materiais dentários de Phillips. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2005.

AOBA, T. Solubility properties of human tooth mineral and pathogenisis of dental caries. Oral Diseases, v. 10, n. 5, p. 249-257, 2004.

ARAUJO, 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. 02, p. 99 -104, 1998.

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. 1998b.

ASSUNÇÃO e SOUZA, R.O. et al. Estabilidade de Cor de uma Resina Composta Indireta. Cienc Odontol Bras., v. 9, n. 3, p. 73 – 77, 2006.

BACK, S.A. et al. A new Alamar Blue viability assay to rapidly quantify oligodendrocyte death. Journal of Neuroscience Methods, v. 91, p. 47-54, 1999.

BANDEIRA, M.F.C.L. et al. Estudo comparativo da compatibilidade biológica em molares de rato do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba) associados ao hidróxido de cálcio. Jornal Brasileiro de Clínica Estética Em Odontologia, v. 3, n. 16, p. 42-49, 1999.

BANDEIRA, M.F.C.L. et al. Estudo farmacológico preliminar of *Copaifera multijuga.* (óleo de copaífera). Jornal Brasileiro de Clínica Estética Em Odontologia, v. 3, n. 16, p. 39-41, 1999b.

BANDEIRA, M.F.C.L. Estudo comparativo da compatibilidade biológica do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga*, associados ao hidróxido de cálcio, em diferentes níveis de pesquisa: farmacológico, microbiológico e molares de rato. 1998. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

BANDEIRA, P.N. et al. Metabolitos secundários de *Protium Heptaphyllum* March. Quim. Nova, v. 26, n. 6B, p. 1078-1080, 2002.

BARATIERI, L.N. et al. Odontologia Restauradora: Fundamentos e Possibilidades. 1.ed. São Paulo: Santos, 2001.

BERLINCK, R.G.S. et al. Chemical and Pharmacological Characterization of the Halitoxin from *Amphimedon viridis*(Porifera) from the Southeastern Brazilian Coast. Comp. Biochem, Physiol C Phamacol Toxicol Endocrinol, v. 115, n. 2, p. 155-163, Out. 1996.

BRÄNNSTRÖM, M. The cause of postrestorative sensitivity and its prevention. Journal of Endodontics, v. 10, n. 10, p. 475-481, 1986.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 2.

BRISO, A.L.F. et al. Biological response of pulps submitted to different capping materials. Braz Oral Res., v. 20, n. 3, p. 219-225, 2006.

BURNE, R.A. Oral streptococci: products of their enviroment. Journal Dental of Research, v. 77, n. 3, p. 445-452, 1998.

BUSATO, A.L.S. Dentística: Restaurações estéticas. 1 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2002.

CANEPPELE, T. F. et al. Influência da embebição dental em substâncias com corantes na eficácia do clareamento dental com peróxido de carbamida a 16%. Arquivos em Odontologia, v. 45, n. 04, Out./Dez. 2009.

CANTRELL, C.L. et al. Antimycobacterial cycloartanes from Borrichia frutescens. J. Nat.
Prod., v. 59, p. 1131-1136, 1996.

CARDOSO, P.C. et al. Influência do tempo de aplicação de um gel clareador a base de peróxido de carbamida a 10% na cor dos dentes - um estudo in vitro. Cienc Odontol Bras., v. 10, n. 1, p. 78-83, 2007.

CARRILHO, M.R.O. et al. In vivo Preservation of the Hybrid Layer by Chlorhexidine. J Dent Res, v. 86, n. 6, p. 529-533, 2007.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf. *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. Phytochemistry, v. 55, n. 7, p. 773-778, 2000.

CORDEIRO, R.C.L.; GONZALEZ VONO, R.M.; LIA, R.C.C. Capeamento pulpar com materiais à base de hidróxido de cálcio. Estudo histológico comparativo em molares de rato. Revista de Odontologia da UNESP, v. 14, n. 1/2, 1985.

COSTA, C.A.S. et al. Compatibilidade biológica do ionômero de vidro fotopolimerizável (Variglass VLC). Avaliação histológica dos seus efeitos sobre a dentina e tecido pulpar em dentes de rato. Revista de Odontologia da UNESP, v. 24, n. 2, p. 309-316, 1995.

COSTA, C.A.S. et al. Estudo preliminar da compatibilidade biológica dos cimentos de óxido de zinco e copaíba e óxido de zinco e eugenol. Avaliação histológica de implantes subcutâneos em ratos. Revista de Odontologia da UNESP, v. 25, n. 1, p. 19-26, 1996.

COSTA, C.A.S. et al. Uso do Duraphat como protetor pulpar: compatibilidade biológica do verniz fluretado Duraphat: avaliação histológica de implantes subcutâneos em ratos. Revista Gaúcha de Odontologia, v. 44, n. 3, 1996b.

COSTA, C.A.S. et al. Compatibilidade biológica do ionômero de vidro fotopolimerizável (Vitremer 3M). Avaliação histológica dos seus efeitos sobre dentina e tecido pulpar em dentes de rato. Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo, v. 11, n. 4, 1996c.

COSTA, C.A.S. et al. Efeito da clorexidina 0,2% sobre o complexo dentino-pulpar quando aplicada em associação com o sistema adesivo Scotchbond MP em molares de ratos. Revista Odontológica do Brasil Central, v. 8, n. 25, p. 4-9, 1999.

COSTA E SILVA, D. Color change using HSB color system of dental resin composites immersed in different common Amazon region beverages. Acta Amazonica, v. 39, n. 4, p. 961-968, 2009.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* óleo-resin. Toxicon, v. 40, n. 8, p. 1231-1234, 2002.

COX, C.F. et al. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. Oper Dent., v. 21, n. 1, p. 4 -11, 1996.

CURY, J.A. Uso do Flúor. In: BARATIERI, L.N. Dentística – procedimentos invasivos e restauradores. Rio de Janeiro: Quintessence, 1992.

DA SILVA, J.D. et al. Clinical performance of a newly developed spectrophotometric system on tooth color reproduction. Journal of Prosthetic Dentistry, v. 99, n. 5, p. 361-368, May. 2008.

DAMMASCHKE, T. et al. Histocytological evaluation of the reaction of rat pulp tissue to Carisolv. J Dent, v. 29, n. 4, p. 283-290, 2001.

DAMMASCHKE, T. et al. Direct Pulp Capping with Mineral Trioxide Aggregate:An Immunohistologic Comparison with Calcium Hydroxide in Rodents. Basic Research Biology. V. 36, n. 5, p. 814-819, 2010.

DASHPER, S.G.; REYNOLDS, E.C. pH regulation by *Streptococcus mutans*. J. Dent. Res., v. 71, n. 5, p. 1159-1165, 1992.

DECUP, F. et al. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. Clin. Oral Invest, v.4, p. 110-119, 2000.

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

DOMINGUES, F.C. et al. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by Trichoderma reesei Rut C-30. Enzyme Microb Technol, v. 26, p. 394-401, 2000.

DOZI´C, A. et al. Performance of five commercially available tooth color-measuring devices. Journal of Prosthodontics, v. 16, n. 2, p. 93-100, mar./abr. 2007.

FEJERSKOV, O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. Caries Res., v. 38, p. 182-191, 2004.

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

FILOCHE, S.K. et al. A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. Journal of Microbiological Methods, v. 69, p. 489-496, 2007.

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

FRANCO, A.P.G.O. et al. Desinfecção de cavidades com clorexidina. Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde, v. 13, n. 1-2, p. 53-58, 2007.

GARRIDO, A.D.B. et al. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copaifera multijuga oil-resin. International Endodontic Journal, v. 43, p. 283-291, 2010.

GERALDINI, C.A.C.; SALGADO, E.G.C.; RODE, S.M. Ação de diferentes soluções de própolis na superfície dentinária - avaliação ultra-estrutural. Pos-Grad Rev Fac Odontol São Jose dos Campos, v. 3, n. 2., p. 37-42 , Jul./Dez., 2000.

GOMES, J.P.N. Pesquisa de Atividade Antitumoral e Mutagênica *In Vitro* de Produtos Naturais. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

GOMES, N.M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba Oils. Journal of Ethnopharmacology, v. 109, p. 486-492, 2007.

HAMILTON, C.J. Atividades metabólicas das bactérias da cavidade oral. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Cariologia Clínica. São Paulo: Santos, 1995.

HU, C.C. et al. Reparative Dentin Formation in Rat Molars after Direct Pulp Capping with Growth Factors. Journal of Endodontics, v. 24, n. 11, p. 744-751, 1998.

VAN DER HOEVEN, J.S.; CAMP, P.J.M. The use of lectins in monitoring degradation of oligosaccharide chains in mucin by oral streptococci. Caries Research, v. 28, n. 4, p. 257-261, 1994.

International Organization of Standardization. Biological evaluation of dental materials. Geneve, 1984, 54p. (ISO/Techinal Report 7405).

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

KOLENBRANDER, P.E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. The Journal of Bacteriology, v. 175, n. 11, p. 3247-3252, 1993.

KOUIDHI, B.; ZMANTAR, T.; BAKHROUF, A. Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. Anaerobe, v. 16, p. 566-571, 2010.

KUBLIK, H. et al. Nasal absorption of 17-!-estradiol from different yclodextrin inclusion formulations in sheep. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 42, n. 5, p. 320-324, 1996.

LEMOS, J.A.; ABRANCHES, J.; BURNE, R.A. Responses of cariogenic streptococci to enviromental stress. Current Issues in Molecular Biology, v. 7, n. 1, p. 95-107, 2005.

LEONARD, R.H.; SHARMA, A.; HAYWOOD, V.B. Use of different concentrations of carbamide peroxide for bleaching teeth: an in vitro study. Quintessence Int., v. 29, n. 8, p. 503-507, Aug. 1998.

LI, Y.; BURNE, R.A. Regulation of the gtfBC and ftf genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and cabohydrate. Microbiol. v. 147, p. 2841-2848, 2001.

LI, Y. et al. Novel two-component regulatory system involved biofilm formation and acid resistence in *Streptococcus mutans*. Journal of Bacteriology, v. 184, n. 22, p. 6333-6342, 2002.

LIMA JUNIOR, R.C.P. et al. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, a, b-amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK1-receptors, and K+ATP channels. Inflamm Res, v. 56, p. 487-494, 2007.

LIMA, R.V.E. et al. Pulp Repair after Pulpotomy Using Different Pulp Capping Agents: A Comparative Histologie Analysis. Pediatric Dentistry, v. 33, n. 1, p. 14-18, 2011.

LIMA, S.R.M. et al. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity os *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. Phytotherary Research, v. 17, p. 1048-1053, 2003.

MALPEZZI, E.L.L.A. et al. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. Toxicon, v. 31, n. 7, p. 853-864, 1993.

MALTZ, M. Prevenção das doenças cárie e periodontal. In: Toledo, O.A. Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica. São Paulo: Premier, 1996.

MANJI, F. et al. A random effects model for some epidemiological features of dental caries. Community Dentistry and Oral Epidemiology, v. 19, n. 6, p. 324-328, 1991.

MARSH, P.D.; BRADSHAW, D.J. Physiological approaches to the control oral biofilms. Advances in Dental Research, v. 11, n. 1, p. 176-85, 1997.

MEDEIROS, R. et al. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. European Journal of Pharmacology, v. 559, p. 227-235, 2007.

MENDES, M.M.S.G.; ZENÓBIO, E.G.; PEREIRA, O.L. Agentes químicos para controle de placa bacteriana. Revista Periodontia, v.5, n. 2, p. 253-256, Jul/Dez. 1995.

MONDELLI, J. Proteção do Complexo Dentinopulpar. São Paulo: Artes Médicas EAP-PCD, 1998.

MORSE, A. Formic acid-sodium citrate dcalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in parafin. J Dent Res, v. 24, p. 143-53, 1945.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically;Approved Standard. Pennsylvania: M7-A6. 2003. 6 ed.

NOGUEIRA, R.D. et al. Characterization of salivary immunoglobulin A response in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans* influence os specific antigen recognition in infection. Infection and immunity, v. 73, n.9, p. 5675-5684, Set. 2005.

PAIVA, L.A.F. et al. Investigation on the wound healing activity of óleo-resin from *Copaifera langsdorffi*ii in rats. Phytotherapy Research, v. 16, p. 737-739, 2002.

PAROLIA, A. et al. A comparative histological analysis of humam pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. Australian Dental Journal, v. 55, p. 59-64, 2010.

PECHARKI, D. et al. Involvement of antigen I/II surface proteins in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius* biofilm formation. Oral Microbiol Immunology, v. 20, n.6, p. 3663971, Dec. 2005.

PEQUENO, N.F. 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, F.J. et al. Isolamento, composição química e atividade anti-inflamatória do 'oleo Essencial do Pericarpo de *Copaifera langsdorffii* Desf. de acordo com hidrodestilações sucessivas. Latin American Journal Pharmacy, v. 27, n. 3, p. 369-374, 2008.

PONTEFRACT, H. et al. Development of methods to enhance extrinsic tooth discoloration for comparison of toothpastes: two-product clinical study. J Clin Periodontol., v. 31, p. 7-11, 2004.

O'BRIEN, W.J. et al. Color distribution of three regions of extracted human teeth. Dent Mater, v. 13, p. 179-185, 1997.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Enr. J. Biochem., v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OLIVEIRA, D.C. Efeito de pastas à base de hidróxido de cálcio sobre a polpa de molares de ratos, expostas experimentalmente. Estudo histológico comparativo. 1987. 172 f. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) – Faculdade de odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

OLIVEIRA, D.C.; LIA, R.C.C.; BENATTI NETO, C. Efeito de pastas à base de hidróxido de cálcio sobre a polpa de molares de ratos, exposta experimentalmente. Estudo histopatológico comparativo. Revista de Odontologia da UNESP, v. 17, n. 2, p. 43-61, 1988.

OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; ZOGHBI, M.G.B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (Copaifera spp.) no município de Moju, PA. Rev Bras PI Med, v. 8, n. 3, p. 14-23, 2006.

OTUKI, M.F. et al. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and a-amyrin pentacyclic triterpene. European Journal Pharmacology, v. 507, p. 253-259, 2005.

OTUKI, M.F. et al. Antinociceptive properties of mixture of α-amyrin and β-amyrin triterpenes: evidence for participation of Protein Kinase C and Protein Kinase A Pathways. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 313, n. 1, p. 310-318, 2005 b.

RAMOS, M.F.S. Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: esturo de estabilidade e avaliação farmacológica. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

REIS, A.; LOGUERCIO, A.D. Materiais dentários diretos – dos fundamentos à aplicação clínica. São Paulo: Santos, 2007.

RIBEIRO, A. Avaliação do potencial irritativo do óleo-resina de copaíba na fase irritativa do processo inflamatório. 1989. Dissertação (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

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.

ROWE, A.H.R. Reaction of the rat molar pulp to various materials. Br.Dent J., v. 122, p. 291-299, 1967.

SALAKO, N. et al. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide, aggregate, ferric sulfate and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. Dental Traumatology, v. 19, p. 311-320, 2003.

SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.O.; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, M.A.R. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia férrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.289-294, 2009.

SCHIRMER, K. et al. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. Toxicology, Limerick, v. 127, p. 129-141, 1998.

SIMÕES, C.A.C.G. Formulação de um gel de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga) e* avaliação de sua atividade antibacteriana sobre cepas de *Streptococcus* SP. Isoladas da placa dental. 2004. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SOUZA, A.B. et al. Antimicrobial Activity of Terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. Against Cariogenic Bacteria. Phytother Res, v. 25, p. 215-220, 2011.

SOUZA, A.O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008

STANLEY, H.R. Criteria for standardizing and increasing credibility of direct pulp capping studies. Am.J.Dent, v. 11, p. 17-34, 1998.

STURR, M.G.; MARQUIS, R.E. Comparative acid tolerance and inhibitor sensitive os isolated ATPase of oral lactic acid bactéria. Enviromental microbiology, v. 58, p. 2287-2291, 1992.

TAPPIN, M.R.R. et al. Análise química quantitativa para padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. Quimica Nova, v. 27, n. 2, p. 236-240, 2004.

TEN BOSCH, J.J.; COOPS, J.C. Tooth Color and Reflectance as Related to Light Scattering and Enamel Hardness. Journal Dent Res, v. 74, n. 1, p. 374-380, Jan. 1995.

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

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Cariologia Clínica. São Paulo: Santos, 1995.

UZEDA, M. Microbiologia Oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

VACCA-SMITH, A.M. Caracterization of glucosyltransferase of human saliva adsorbed onto hydroxyapatite surface. Caries Research, v. 30, p. 354-360, 1996.

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.

VASCONCELOS, K.R.F. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento obtido da associação do óleo-resina *in natura* da *Copaifera multijuga* Hayne ao óxido de zinco e ao hidróxido de cálcio frente aos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*. 2006. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

VASCONCELOS, K.R. et al. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico a base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, Supl., p. 733-738, Dez. 2008.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. Química Nova, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. Journal of Ethnopharmacology, v. 112, p. 248-254, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F. et al. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaíba oils available in Brazil. Phytotherary Research, n. 15, p. 476-480, 2001.

VICHI, A.; FERRARI, M.; DAVIDSON, C.L. Color and opacity variations in three different resin-based composite products after water aging. Dental Materials, v. 20, p. 530-534, 2004.

WATAHA, J.C. Principles of biocompatibility for dental practioners. J Prosthet Dent, v. 86, n. 2, p. 203-209, 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Planilha de Análise Histopatológica.

Grupo 30 Dias

n. de Lâminas	Vasos Sanguíneos		Raspas de dentina	Barreira Mineralizada		Infiltrado Inflamatório			Tipo de IF		Cél. Vacuolizadas	calcificação	Fibrose	Resíduos Enegrecidos Amarelados
	Congestos	Trombosados		Jovem	Madura	Leve	Moderado	Intenso	Mono	PMN				

APÊNDICE B – Planilha de Análise Histopatológica Período 7 dias.

Grupo 7 Dias														
n. de Lâminas	Vasos Sanguíneos		Raspas de dentina	Barreira Mineralizada		Infiltrado Inflamatório			Tipo de IF		Cél. Vacuolizadas	calcificação	Fibrose	Resíduos Enegrecidos Amarelados
	Congestos	Trombosados		Jovem	Madura	Leve	Moderado	Intenso	Mono	PMN				
113. D.3			X	X										COLONIAS
115. D.1			X	FORM.			X		XX	X		FORM.		
116. D.1		X	X			X			X	X	X		LEVE	COLONIAS ACELULAR
116. E.3				FORM.			X							
117. D.1			X											ACELULAR
118. E.3	X					X				X	X			
119. E.4		X	X				X		X	X				AMARELADO
140. D.1			X	X COR										COLONIAS
114. D.3		X												COR
123. D.2			X	X COR										ACASTANHADO
140. E.2	X			X			X		X	X	X			
140. E.2	X			X			X		X	X	X			
GRUPO I - (EMULSAO DE COPAÍBA 10% + AMIRINA) + (PASTA DE HIDRÓXIDO DE CALCIO + COPAÍBA)														
n. de Lâminas	Vasos Sanguíneos		Raspas de dentina	Barreira Mineralizada		Infiltrado Inflamatório			Tipo de IF		Cél. Vacuolizadas	calcificação	Fibrose	Resíduos Enegrecidos Amarelados
	Congestos	Trombosados		Jovem	Madura	Leve	Moderado	Intenso	Mono	PMN				
116. E.3				FORM.			X							
140. D.1			X	X COR										COLONIAS
GRUPO II - (EMULSAO DE COPAÍBA 30% + AMIRINA) + (PASTA DE HIDRÓXIDO DE CALCIO + COPAÍBA)														

n. de Lâminas	Vasos Sanguíneos		Raspas de dentina	Barreira Mineralizada		Infiltrado Inflamatório			Tipo de IF		Cél. Vacuolizadas	calcificação	Fibrose	Resíduos Enegrecidos Amarelados
	Congestos	Trombosados		Jovem	Madura	Leve	Moderado	Intenso	Mono	PMN				
118. E.3	X					X				X	X			
119. E.4		X	X				X		X	X				AMARELADO
123. D.2			X	X COR										ACASTANHADO
GRUPO III - (SOL.DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO)+ (PASTA DE HIDRÓXIDO DE CALCIO + COPAÍBA)														
n. de Lâminas	Vasos Sanguíneos		Raspas de dentina	Barreira Mineralizada		Infiltrado Inflamatório			Tipo de IF		Cél. Vacuolizadas	calcificação	Fibrose	Resíduos Enegrecidos Amarelados
	Congestos	Trombosados		Jovem	Madura	Leve	Moderado	Intenso	Mono	PMN				
116. D.1		X	X			X			X	X	X		LEVE	COLONIAS ACELULAR
114. D.3		X												COR
140. E.2	X			X			X		X	X	X			
140. E.2	X			X			X		X	X	X			
GRUPO IV - (SOL.DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO)+ (PASTA DE HIDRÓXIDO DE CALCIO)														
n. de Lâminas	Vasos Sanguíneos		Raspas de dentina	Barreira Mineralizada		Infiltrado Inflamatório			Tipo de IF		Cél. Vacuolizadas	calcificação	Fibrose	Resíduos Enegrecidos Amarelados
	Congestos	Trombosados		Jovem	Madura	Leve	Moderado	Intenso	Mono	PMN				
117. D.1			X											ACELULAR
113. D.3			X	X										COLONIAS
115. D.1			X	FORM.			X		XX	X		FORM.		

APÊNDICE C - Planilha de Análise Histopatológica Período 30 dias.

Grupo 30 Dias

n. de Lâminas	Vasos Sanguíneos		Raspas de dentina	Barreira Mineralizada		Infiltrado Inflamatório			Tipo de IF		Cél. Vacuolizadas	calcificação	Fibrose	Resíduos Enegrecidos Amarelados
	Congestos	Trombosados		Jovem	Madura	Leve	Moderado	Intenso	Mono	PMN				
136. D.2			X		X						X			
165. D.1			X	X		X					X			
116. E.1			X		X									
164. E.3					X									
168. E.3			X		X						X			ACELULAR
173. D.3	X	X	X		X									
162. D.4		X	X	X	X									ACELULAR
165. E.2					X				X	XX		FORM.		
166. D.4			X								X			ACELULAR
172. D.1			X		X		X		X	XX	X			
167. E.1			X								X			ACELULAR
168. D.3	X	X	X			X			X	X		FORM.		
170. D.4			X		X			X	XX	X	X	FORM.		
174. D.2			X			X			X	X	X	FORM.		ACELULAR

GRUPO 03 - (EMULSAO DE COPAÍBA 10% + AMIRINA) + (PASTA DE HIDRÓXIDO DE CALCIO + COPAÍBA)

n. de Lâminas	Vasos Sanguíneos		Raspas de dentina	Barreira Mineralizada		Infiltrado Inflamatório			Tipo de IF		Cél. Vacuolizadas	calcificação	Fibrose	Resíduos Enegrecidos Amarelados
	Congestos	Trombosados		Jovem	Madura	Leve	Moderado	Intenso	Mono	PMN				
165. E.2					X				X	XX		FORM.		
172. D.1			X		X		X		X	XX	X			
170. D.4			X		X			X	XX	X	X	FORM.		

GRUPO 04 - (EMULSAO DE COPAÍBA 30% + AMIRINA) + + (PASTA DE HIDRÓXIDO DE CALCIO + COPAÍBA)														
n. de Lâminas	Vasos Sanguíneos		Raspas de dentina	Barreira Mineralizada		Infiltrado Inflamatório			Tipo de IF		Cél. Vacuolizadas	calcificação	Fibrose	Resíduos Enegrecidos Amarelados
	Congestos	Trombosados		Jovem	Madura	Leve	Moderado	Intenso	Mono	PMN				
174. D.2			X			X			X	X	X	FORM.		ACELULAR
166. D.4			X								X			ACELULAR
173. D.3	X	X	X		X									
GRUPO 05 - (SOL.DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO)+ (PASTA DE HIDRÓXIDO DE CALCIO + COPAÍBA)														
n. de Lâminas	Vasos Sanguíneos		Raspas de dentina	Barreira Mineralizada		Infiltrado Inflamatório			Tipo de IF		Cél. Vacuolizadas	calcificação	Fibrose	Resíduos Enegrecidos Amarelados
	Congestos	Trombosados		Jovem	Madura	Leve	Moderado	Intenso	Mono	PMN				
162. D.4		X	X	X	X									ACELULAR
168. E.3			X		X						X			ACELULAR
166. D.4			X								X			ACELULAR
GRUPO 06 - (SOL.DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO)+ (PASTA DE HIDRÓXIDO DE CALCIO)														
n. de Lâminas	Vasos Sanguíneos		Raspas de dentina	Barreira Mineralizada		Infiltrado Inflamatório			Tipo de IF		Cél. Vacuolizadas	calcificação	Fibrose	Resíduos Enegrecidos Amarelados
	Congestos	Trombosados		Jovem	Madura	Leve	Moderado	Intenso	Mono	PMN				
168. D.3	X	X	X		x	X			X	X		FORM.		
165. D.1			X	X		X					X			
136. D.2			X		X						X			???

APÊNDICE D – Planilha de registro de cor das emulsões testes.

ΔE_10segundos : 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

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 16,3311
Graus de liberdade = 5
Valor p= 0,0060

Lo 10segundos : Substancia
Lo = 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

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 26,4245
Graus de liberdade = 5
Valor p= 0,0001

Lf_10segundos : Substância
Lf = 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

H de Kruskal-Wallis (equivalente ao Qui-quadrado)= 17,8012
Graus de liberdade = 5
Valor p= 0,0032

ANEXO

ANEXO A – Informe de bactéria de referência – *Streptococcus mutans*

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INCQS

Laboratório de Microrganismos de Referência

Informe de bactéria de referência *06-jul-10*

MICRORGANISMO:	*Streptococcus mutans (CT)*
INCQS:	00504
ORIGEM:	CCT 3440 (ATCC 25175)
LOTE:	0508504
HISTÓRIA:	JCM 5705; DSM 20523; NCTC 10449; W. Sims; ATCC 25175; IFO 13955
ISOLAMENTO:	Cárie
MEIO DE CULTURA INDICADO:	Trypticase soy agar (BBL 11043) com 5% de sangue de carneiro desfibrinado estéril.
TEMPERATURA (em Graus Celsius):	37
TEMPO DE INCUBAÇÃO(em horas):	24
RESPIRAÇÃO:	5% CO2
APLICAÇÃO:	Cepa Tipo
SOROLOGIA:	Sorogrupo C
PRODUÇÃO DE ENZIMAS:	
PRODUÇÃO DE TOXINAS:	
VALIDADE:	Indeterminada se mantida entre -10C e -20 °C.
OBSERVAÇÕES:	O lote é constituido de sete dígitos distribuidos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos digitos o número da cepa INCQS.
REFERÊNCIAS:	Clarke, J. K. (1924) Br. J. exp. Path. 5, 141; Abercrombie, G. F. & Scott, W. M. (1928) Lancet ii, 697

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915
www.incqs.fiocruz.br

ANEXO B – Informe de bactéria de referência – *Streptococcus oralis*

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INCQS

Laboratório de Microrganismos de Referência

Informe de bactéria de referência *06-jul-10*

MICRORGANISMO:	*Streptococcus oralis*
INCQS:	00477
ORIGEM:	IAL 1676 (ATCC 10557)
LOTE:	0602477
HISTÓRIA:	NCTC 7864; SK 2
ISOLAMENTO:	
MEIO DE CULTURA INDICADO:	Trypticase soy agar (BBL 11043) com 5% sangue de carneiro desfibrinado
TEMPERATURA (em Graus Celsius):	37
TEMPO DE INCUBAÇÃO(em horas):	24
RESPIRAÇÃO:	Aerobiose
APLICAÇÃO:	
SOROLOGIA:	Tipo II
PRODUÇÃO DE ENZIMAS:	
PRODUÇÃO DE TOXINAS:	
VALIDADE:	Indeterminada se mantida entre -10C e -20 °C.
OBSERVAÇÕES:	O lote é constituido de sete dígitos distribuidos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos digitos o número da cepa INCQS.
REFERÊNCIAS:	J. Bacteriol. 51: 723-729, 1946; Kilian M et al. Taxonomic study of viridans streptococci: description of Streptococcus gordonii sp. nov. and emended descriptions of Streptococcus sanguis (White and Niven 1946), Streptococcus oralis (Bridge and Sneath 1982), and Streptococcus mitis (Andrewes and Horder1906). Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 471-484, 1989

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915
www.incqs.fiocruz.br

ANEXO C – Informe de bactéria de refêrencia – *Streptococcus salivarius*

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INCQS

Laboratório de Microrganismos de Referência

Informe de bactéria de referência

06-jul-10

MICRORGANISMO:	*Streptococcus salivarius*
INCQS:	00457
ORIGEM:	NCTC 8618 (ATCC 7073)
LOTE:	0305457
HISTÓRIA:	ATCC <-- New York State Department of Health <-- J.C. Small cepa 275
ISOLAMENTO:	Sangue de paciente com reumatismo
MEIO DE CULTURA INDICADO:	Brain Heart Infusion Agar (BD 241830) ou Brain Heart Infusion (BD 237500)
TEMPERATURA (em Graus Celsius):	37
TEMPO DE INCUBAÇÃO(em horas):	24
RESPIRAÇÃO:	Aerobiose
APLICAÇÃO:	
SOROLOGIA:	
PRODUÇÃO DE ENZIMAS:	
PRODUÇÃO DE TOXINAS:	
VALIDADE:	Indeterminada se mantida entre -10C e -20 °C.
OBSERVAÇÕES:	O lote é constituido de sete dígitos distribuidos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos digitos o número da cepa INCQS.
REFERÊNCIAS:	

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915
www.incqs.fiocruz.br

ANEXO D – Informe de bactéria de referência – *Lactobacillus casei*

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INCQS

Laboratório de Microrganismos de Referência

Informe de bactéria de referência *06-jul-10*

MICRORGANISMO:	*Lactobacillus casei subsp. rhamnosus (CT)*
INCQS:	00006
ORIGEM:	ATCC 7469
LOTE:	0193006
HISTÓRIA:	BUCSAV 227; P.A.Hansen 300; NCDO 243; NCIB 6375; NCIB 8010; NCTC 6375; NRC 488.
ISOLAMENTO:	
MEIO DE CULTURA INDICADO:	Caldo Lactobacilus MRS (Difco 0881)
TEMPERATURA (em Graus Celsius):	37
TEMPO DE INCUBAÇÃO(em horas):	24-48
RESPIRAÇÃO:	Aerobiose
APLICAÇÃO:	Ensaio de: ácido fólico, ácido nicotínico, riboflavina, biotina, glicose, azatioprina e 6-mercaptopurina em soluções aquosas; determinação de fator strepogenina e determinação enzimática de isomeros ativos do ácido lático. Utiliza piruvato.
SOROLOGIA:	
PRODUÇÃO DE ENZIMAS:	Ptn. transportadora de folato
PRODUÇÃO DE TOXINAS:	
VALIDADE:	Indeterminada se mantida entre -10C e -20 °C.
OBSERVAÇÕES:	O lote é constituido de sete dígitos distribuidos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos digitos o número da cepa INCQS.
REFERÊNCIAS:	J. Med. Lab. Technol. 20:26-33, 1963; AOAC Methods 940.33, 1990; J. Gen. Microbiol. 79:351-353, 1973.

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915
www.incqs.fiocruz.br

ANEXO E – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas

UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM

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 CEP/UFAM com CAAE nº. 0312.0.115.000-08, intitulado: **"Bioativos amazônicos na Odontologia: estudo etnobotânico, atividade antibacteriana e compatibilidade biológica de soluções para limpeza de cavidades"**, tendo como Pesquisadora Responsável Maria Fulgência 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 CEP/UFAM

Rua Teresina, 495 – Adrianópolis – Cep. 69.057-070 – Manaus/AM – Fone: (92) 622-2724 r. 32
E-mail: cep@ufam.edu.br