UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
CENTRO DE PESQUISAS LEÔNIDAS E MARIA DEANE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE, SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

ESTUDO PRELIMINAR DA VIABILIDADE DE UM EXTRATO À BASE DE PRÓPOLIS PARA LIMPEZA DE CAVIDADES

LORENA CRISTINA RAPOSO DA CÂMARA GONDIM

MANAUS
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
CENTRO DE PESQUISAS LEÔNIDAS E MARIA DEANE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE, SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

LORENA CRISTINA RAPOSO DA CÂMARA GONDIM

ESTUDO PRELIMINAR DA VIABILIDADE DE UM EXTRATO À BASE DE PRÓPOLIS PARA LIMPEZA DE CAVIDADES

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas, Universidade Federal do Pará e Fiocruz/Am, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof[a].Dr[a].Maria Fulgência Costa Lima Bandeira

MANAUS
2009

LORENA CRISTINA RAPOSO DA CÂMARA GONDIM

ESTUDO PRELIMINAR DA VIABILIDADE DE UM EXTRATO À BASE DE PRÓPOLIS PARA LIMPEZA DE CAVIDADES

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas, Universidade Federal do Pará e Fiocruz/Am, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Presidente: _____
Profª Drª Maria Fulgência Costa Lima Bandeira (Orientadora)
Instituição: Faculdade de Odontologia-FAO/UFAM

Titular 1:_____
Profª Drª Tatiana Nayara Libório dos Santos
Instituição: Faculdade de Medicina-FM/UFAM

Titular 2:_____
Profª Drª Maria Augusta Bessa Rebelo
Instituição: Faculdade de Odontologia-FAO/UFAM

Suplente 1:_____
Prof. Dr. Diego Ferreira Regalado
Instituição: Universidade Estadual do Amazonas-UEA

Suplente 2:_____
Profª Drª Ana Cyra dos Santos Lucas
Instituição: Faculdade de Farmácia-FCF/UFAM

Ao meu querido filho, Paulo Vitor, que pela sua simples presença em minha vida e seu singelo sorriso, me tornou uma pessoa mais feliz e completa. A você, meu eterno e sincero amor, dedico todas as minhas vitórias!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, sabedoria e por iluminar sempre os meus caminhos;

Aos meus queridos pais, Ana Paula e Hamilton Gondim, por terem sido o alicerce na minha formação pessoal e profissional, sempre me guiando ao caminho certo, proporcionando-me as melhores oportunidades para estudar, lutar e vencer os obstáculos da vida. O amor de vocês me incentiva a cada dia! Muito obrigada por tudo que vocês foram e ainda são para mim. Obrigada também por terem cuidado do Paulo Vitor na minha ausência, durante as noites que precisei estudar e que não pude cuidar dele. Sem o apoio de vocês, esse objetivo não teria como ser alcançado.

A minha orientadora, Prof[a.]Fulgência, pelo apoio, compreensão, amizade, por nunca ter me deixado desanimar ou desistir apesar das dificuldades que surgiram nessa trajetória. Obrigada por ser esse exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa e por sempre ter me transmitido esse exemplo de responsabilidade. Ensinar é uma arte e como tal, reservada àqueles poucos que amam a sua profissão e a ela dedicam grande parte de sua vida. Dentística é a sua arte, que através de nossa intensa convivência, você me ensinou a amar. Obrigada por ter acreditado nesse projeto e por ter a mim confiado a execução dele.

Ao Giorge, meu namorado e sempre muito companheiro, por ter me cedido os dentes humanos utilizados no decorrer do trabalho, pelas fotografias em Presidente Figueiredo, pelo amor, paciência, e por ter entendido a minha ausência no decorrer da pesquisa;

À Dona Nice, funcionária do biotério do INPA, por seu auxílio, sempre com boa vontade e simpatia, colaborando na etapa da pesquisa com os animais experimentais;

Aos funcionários do Laboratório de Patologia da UFAM, Maria de Fátima, Creuzimar, Dona Yolanda e aos estagiários, Guidia e Benedito, por ter me auxiliado no preparo histopatológico;

À Prof[a].Dr[a].Tatiana Libório, pelo empenho e tempo dedicado no decorrer do estudo histopatológico;

Ao José Antônio Zuanon, técnico em Patologia da UNESP/Araraquara, pessoa maravilhosa que tive oportunidade de conhecer e conviver. Obrigada por toda atenção e empenho no preparo histopatológico dessa dissertação.

À Fiocruz/Am, Faculdade de Farmácia e Faculdade de Odontologia da UFAM, bem como aos funcionários dessas instituições, pela cessão de laboratórios e materiais necessários para execução do trabalho;

Aos apicultores Adul e Sr.Egídio, pelo acompanhamento e orientação durante a coleta das amostras de própolis.

Eis o meu segredo: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos. Foi o tempo que perdeste com tua rosa que a fez tão importante. Os homens esqueceram essa verdade, mas tu não a deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas. Tu és responsável pela rosa.

Saint-Exupéry

RESUMO

A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas, as quais misturam enzimas salivares, cera, pólen e materiais inorgânicos para obtenção desse produto. Suas principais propriedades são: atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, antifúngica, anticancerígena e antioxidante. Atualmente a própolis tem sido utilizada como base em diversas pesquisas odontológicas. Baseado nos princípios biológicos, o objetivo desse estudo foi obter um extrato etanólico de própolis (EEP) a 8% e realizar testes preliminares a fim de verificar se há viabilidade de formular uma solução para limpeza de cavidades. Foram realizados controle microbiológico, testes para verificar alteração de cor em dentes humanos extraídos (esmalte e dentina) quando imersos no EEP, teste de citotoxicidade e biocompatibilidade do EEP através de capeamento pulpar em molares de ratos. No controle microbiológico, foram utilizados os meios de cultura PCA, Baird-Parker, Cetrimid, Caldo E.C e Ágar Sabouraud, a fim de verificar, respectivamente, a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas*, coliformes totais, além de fungos e leveduras. Os extratos permaneceram armazenados em geladeira, temperatura ambiente e estufa, nos períodos de 0, 7, 15, 30, 45 e 90 dias. No estudo da alteração de cor em dentes humanos frente às soluções teste, os corpos-de-prova foram imersos nas soluções (própolis I, própolis II, água destilada e clorexidina) durante 15 e 30 segundos e 10 minutos, registrando, fotograficamente, os tempos iniciais e finais e analisando as alterações de cor utilizando o sistema HSB. A citotoxicidade foi verificada através do teste de *Artemia franciscana*, enquanto que na biocompatibilidade realizou-se capeamento pulpar em 21 molares de ratos, linhagem *wistar*, pesando entre 180 e 300 gramas. Os grupos experimentais foram divididos conforme a substância teste utilizada no capeamento pulpar (própolis I, própolis II e pasta de hidróxido de cálcio) e o tempo de avaliação (7, 15 e 30 dias). Dentre os resultados, no controle biológico, não foi observada a contaminação do extrato. O teste de alteração de cor mostrou em ordem decrescente: no tempo de 15 segundos: própolis I, clorexidina, e no mesmo nível, própolis II e água destilada; no tempo de 30 segundos: água destilada, própolis I, própolis II e clorexidina, sendo os três últimos em níveis semelhantes; em 10 minutos: própolis I, própolis II, clorexidina e água destilada. No teste de citotoxicidade utilizando *Artemia franciscana* a própolis mostrou-se altamente tóxica comprovando sua ação biológica. Baseados nos resultados obtidos no estudo de biocompatibilidade, observou-se que a própolis I e II apresentaram biocompatibilidade em tecido pulpar de molares de ratos, sendo o hidróxido de cálcio o de melhor resultado. Concluiu-se, através dessa pesquisa, a viabilidade da introdução do EEP na limpeza de cavidades, sendo ainda necessários mais estudos.

Palavras chave: própolis, limpeza de cavidades, compatibilidade biológica

ABSTRACT

Propolis consists in a resinous substance collected by bees, that blend salivary enzymes, wax, pollen, and inorganic substances to the final results of the product. Its main properties are: antimicrobial activity, antiflammatory, cicatrizant, antifungi, anti-cancer, and antioxidant. Nowadays propolis has been used as base to many dental researches. Based on biological principles, the purpose of this research was to obtain an ethanolic extract of propolis up to 8% (EEP) and formulate preliminary tests to verify whether there is viability to make a solution for the cavity-cleaning. The tests were performed in microbiological control, changing color of removed human tooth (enamel and dentine) while immersed in EEP, citotoxicity test and EEP biocompatibility through pulpal capping in rats molar. In the microbiological control, the culture PCA, Baid-Parker, Cetremid, Caldo E.C and Ágar Sabouraud, were used in order to verify, respectively, the counting of aerobic mesophiles microorganisms, *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosas*, total coliforms, besides fungi and yeast. The extracts were stored in the refrigerator, room temperature and stove, in periods of 0, 7, 15, 30, 45 and 90 days. In the tests procedure was observed changing color in human tooth. The test samples were immersed in test solutions (propolis I, propolis II, distilled water and chlorhexidine) during 15 and 30 seconds and 10 minutes, photographically registered the initial and final times and analyzing the changing color by using HSB system. The citotoxicity was verified though Artemia Test, whereas the biological compatibility were performed pulpal capping in 21 rats molar, line wistar, weighting between 180 and 300 grams. The experimental groups were divided according to the test substance used in the pulpal capping (propolis I, propolis II and calcium hydroxide paste) and the evaluation time (7, 15 and 30 days). Among the results, in the microbiological control, no contamination was found. In the changing color-test showed, in decreasing order: in 15 second: propolis I, chlorhexidine, and in the same level, propolis II and distilled water; in 30 seconds: distilled water, propolis I, propolis II and chlorhexidine, with the last three in similar level; in 10 minutes: propolis I, propolis II, chlorhexidine and distilled water. In the citotoxicity test using ”Franciscan Artemia”, propolis became highly toxic, proving thus, its biological action. In the biocompatibility research, concluded, in decreasing order, at calcium hydroxide paste became more compatible, followed, respectively, by propolis I and propolis II. This research's conclusion was the feasibility introduction of EEP into cavity-cleaning with need of more researches.

Key-words: propolis, cavity-cleaning, biological compatibility

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B1	Tiamina
B2	Riboflavina
B6	Piridoxina
BHI	*Brain Heart Infusion*
BP	*Baird-Parker*
C	Ascorbato
CCDAE-FR	cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CG-EM	cromatografia gasosa-espectrometria de massas
CIM	concentração inibitória mínima
CL50	concentração letal média
CLAE-FR	cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
cm	centímetro
CONAPIS	Cooperativa Nacional de Apicultura
DMSO	dimetilsulfóxido
E	Tocoferol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
etc.	et cetera
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	grama
GL	Gay Lussac-unidade de medida de soluções alcoólicas.
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HSB	matiz saturação brilho
kg	quilograma
mg	miligrama

mL	mililitro
Nm	nanômetro
mg/mL	miligrama/mililitro
EEP	extrato etanólico de própolis
CBM	concentração bactericida mínima
mm	milímetro
PMCC	paramono clorofenol canforado
nº	número
sp.	espécie
PCA	*Plaque Count Agar*
PG	polietilenoglicol
et al	*et alii.*
pH	potencial hidrogeniônico
RPM	rotação por minuto
spp.	espécies
U.V	ultravioleta
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFC/g	unidade formadora de colônia/gramas
UFPA	Universidade Federal do Pará
RNA	ácido ribonucléico
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
CP	corpos-de-prova
T0	tempo inicial
n	amostra
G1	grupo 1
G2	grupo 2
G3	grupo 3
G4	grupo 4
T1	tempo inicial
T2	tempo 2
T3	tempo 3
NT	não-tóxico

LT	ligeiramente tóxico
T	tóxico
AT	altamente tóxico
TAS	toxicidade sobre *Artemia salina*
BCA	agentes fúngicos biocontrolados
D. ecastophyllu	*Dalbergia ecastophyllum*
B. dracunculifolia	*Baccharis dracunculifolia*
S. mutans	*Streptococcus mutans*
S. sobrinus	*Streptococcus sobrinus*
S. pyogenes	*Streptococcus pyogenes*
OOS	*Oosperim*
Caldo EC	Caldo *Escherichia coli*
a.C.	antes de Cristo
A.salina	*Artemia salina*
A.franciscana	*Artemia franciscana*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	-	percentual
° C	-	graus Celsius
®	-	marca registrada
–	-	menos
±	-	mais ou menos
% M	-	percentual de mortalidade
µL	-	microlitros
µg/mL	-	micrograma por mililitro
µm	-	micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coleta da própolis em Presidente Figueiredo.....49

Figura 2 - Utilização do fumacê durante a coleta.....50

Figura 3 - Raspagem das bordas da melgueira.....50

Figura 4 - Colméias no interior da melgueira.....50

Figura 5 - Própolis *in natura*.....51

Figura 6 - Armazenamento da própolis em caixa metálica.....51

Figura 7 - *Apis mellifera*.....51

Figura 8 - Própolis *in natura* antes da trituração.....53

Figura 9 - Própolis I.....53

Figura 10 - Própolis em dissecador.....53

Figura 11 - Cadinhos para trituração das amostras.....54

Figura 12 - Própolis adicionada ao etanol, em tubo de ensaio.....54

Figura 13 - Própolis + etanol 80% em banho-maria 54

Figura 14 - Sobrenadante = EEP.....55

Figura 15 - Homogeneização da solução.....57

Figura 16 - Semeadura.....58

Figura 17 - Placa de Petri contendo meio + EEP diluído.....58

Figura 18 - Caldo E.C + tubos de Duhan invertidos.....58

Figura 19 - Primeiro corte do CP no sentido mésio-distal.....59

Figura 20 - Segundo corte do CP no sentido mésio-distal.....60

Figura 21 - Primeiro corte do CP no sentido longitudinal.....60

Figura 22 - Segundo corte no CP no sentido longitudinal (4mm de distância).....60

Figura 23 (a/b) - Máquina fotográfica estabilizada.....62

Figura 24 - Imersão dos corpos-de-prova nas soluções teste.....62

Figura 25 (a/b) - Sistema *HSB*.....64

Figura 26 - Cistos de *Artemia*.....65

Figura 27 - Cistos em solução salina a 35%.....65

Figura 28 - *Artemia franciscana* 65

Figura 29 - Placa multipoços contendo náuplios e substância teste.....66

Figura 30 - Divisão, em rodízio, dos elementos dentários.....67

Figura 31 - Pesagem dos animais.....69

Figura 32 - Anestesia intra-peritoneal.....70

Figura 33 - Posicionamento do animal na mesa operatória.....70

Figura 34 - Mesa operatória.....70

Figura 35 - Confecção do preparo cavitário.....71

Figura 36 - Exposição pulpar.....71

Figura 37 - Irrigação com soro fisiológico.....71

Figura 38 – Própolis após evaporação do álcool.....72

Figura 39 - Inserção da substância teste.....72

Figura 40 - Esquema do tratamento realizado.....72

Figura 41 - Confecção da restauração em amálgama.....73

Figura 42 - Biópsia separando a maxila em duas hemi-arcadas.....75

Figura 43 - Bioensaio com *A.fransciscana* do material teste, mostrando 100% de letalidade.....85

Figura 44 - Grupo I (07 dias): 1) raspas de dentina; 2) barreira mineralizada; 3) células vacuolizadas; 4) infiltrado inflamatório moderado a intenso, apresentando células polimorfonucleares e mononucleares, sobretudo, mononucleares. H.E. (200x).....93

Figura 45 – Grupo I (07 dias): 1) raspas de dentina; 2) barreira mineralizada; 3) células vacuolizadas; 4) dentina; 5) (A) área de calcificação, com maior detalhe em (B). H.E. (400x).....93

Figura 46 - Grupo I (07 dias): 1) barreira mineralizada; 2) barreira mineralizada jovem; 3) vasos trombosados; 4) vasos congestos; 5) células alongadas e\ou cubóides. H.E (400x).....94

Figura 47 – Grupo I (15 dias): Aspecto panorâmico: 1)abertura da cavidade; 2)raspas de dentina; 3)infiltrado inflamatório leve a moderado. H.E.(40x).....94

Figura 48 – Grupo I (15 dias): 1)áreas de calcificação; 2)infiltrado inflamatório de leve a moderado; 3)vasos congestos. H.E. (400x) 95

Figura 49 - Grupo I (15 dias): 1)áreas de calcificação; 2) barreira mineralizada jovem; 3)barreira mineralizada madura; 4)células polimorfonucleares e mononucleares. H.E.(200x).....95

Figura 50 - Grupo I (30dias): 1)barreira mineralizada no assoalho e teto da camara pulpar; 2)barreira mineralizada jovem; 3)raspas de dentina. H.E.(200x).....96

Figura 51 – Grupo I (30 dias): 1)células vacuolizadas; 2)barreira mineralizada; 3) áreas de calcificação. H.E.(400x).....96

Figura 52 – Grupo II (7 dias): Aspecto panorâmico: 1) infiltrado inflamatório moderado a intenso; 2)raspas de dentina; 3)dentina; 4)canal radicular mesial. H.E.(40x).....97

Figura 53 – Grupo II (7 dias):1) infiltrado inflamatório intenso, difuso, com presença de polimorfonucleares e mononucleares, sobretudo, mononucleares. H.E. (400x).....97

Figura 54 - Grupo II (15dias): 1)dentina; 2)infiltrado inflamatório moderado a intenso. H.E.(100x).....98

Figura 55 - Grupo II (15dias): 1)áreas de calcificação; 2)células vacuolizadas; 3)vasos congestos. H.E.(400x).....99

Figura 56 - Grupo II (30dias): Aspecto panorâmico: 1)tecido conjuntivo frouxo; 2)infiltrado inflamatório discreto; 3)barreira mineralizada; 4)raspas de dentina. H.E. (40x) 99

Figura 57 – Grupo II (30dias): 1)discreta formação de barreira mineralizada; 2)raspas de dentina e restos necróticos. H.E.(200x).....99

Figura 58 – Grupo III (7dias): 1) tecido mineralizado; 2) fibroblastos jovens com células de aspecto cuboidal ou fusiforme; 3)vasos trombosados. H.E.(400x).....100

Figura 59 – Grupo III (7dias): 1)barreira mineralizada; 2)raspas de dentina; 3)infiltrado inflamatório leve a moderado; 4)dentina. H.E.(100x).....100

Figura 60 – Grupo III (30 dias): 1 e 2)barreira mineralizada; 3)fibras colágenas; 4)áreas de mineralização e ausência de infiltrado inflamatório. H.E. (200x) 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Grupos experimentais e diferentes tempos de imersão nas soluções teste.....61

Tabela 02 - Avaliação microbiológica do extrato de própolis I de acordo com os locais de armazenamento e períodos experimentais.....79

Tabela 03 - Comparação de médias entre tratamentos, em cada tempo avaliado.....81

LISTA DE QUADROS

Quadro 01- Grupos divididos conforme substâncias teste e período experimental.....67

SUMÁRIO

1.0)INTRODUÇÃO 20

2.0)REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....22

2.1)Conhecendo a Própolis.....22

2.2)Composição.....23

2.3)Emprego da própolis 26

2.4)Atividade Antimicrobiana.....28

2.5)Controle Microbiológico do Extrato.....35

2.6)Citotoxicidade.....36

2.6.1)Teste de *Artemia franciscana*.....36

2.7)Alteração cromática.....39

2.8)Biocompatibilidade..... 41

2.9)Clorexidina e Própolis como agente de limpeza de cavidade.....44

3.0)OBJETIVO.....46

3.1)Objetivo geral.....46

4.0)MATERIAIS E MÉTODOS.....47

4.1)Modelo de Estudo.....47

4.2)Considerações éticas.....47

4.3)Critérios de inclusão.....47

4.4)Critérios de exclusão.....47

4.5)Benefícios.....48

4.6)Riscos.....48

4.7)Coleta das amostras de própolis 48

4.8)Tratamento da amostras de própolis *in natura*.....52

4.9)Obtenção do extrato da própolis.....52

4.10)Controle microbiológico do extrato.....55
4.11)Preparo dos meios de cultura.....56
4.12)Preparo e semeadura do inóculo.....56
4.13)Avaliação da influência do EEP em relação à alteração de cor.....59
4.13.1) Confecção de corpos-de-prova.....59
4.13.2)Registro fotográfico da cor inicial dos corpos-de-prova.....61
4.13.3)Imersão dos corpos de prova nas soluções testes.....62
4.13.4)Leitura de cor.....63
4.14)Citotoxicidade.....64
4.14.1)Teste de *Artemia franciscana*.....64
4.14.2)Ensaio da toxidez dos extratos frente à *Artemia franciscana* 65
4.15)Avaliação da biocompatibilidade da própolis em molares de ratos.....66
4.15.1)Animais de experimentação.....66
4.15.2)Elementos dentários 67
4.15.3)Preparo dos animais.....68
4.15.4)Técnica operatória.....68
4.15.5)Controle pós-operatório 73
4.15.6)Preparo histopatológico.....73
4.15.7)Análise histopatológica 75
5.0)ANÁLISE ESTATÍSTICA.....77
6.0)RESULTADOS E DISCUSSÃO.....78
7.0)CONCLUSÃO.....108
8.0) REFERÊNCIAS.....109
9.0)ANEXOS.....117

1.0) INTRODUÇÃO

Durante o preparo cavitário ocorre formação da *smear layer*, que significa camada agregada, barro ou lama dentinária. Segundo Mandarino (2007), *a smear layer* é um substrato dinâmico produzido clinicamente, sendo formada por duas camadas: a camada externa superficial e amorfa (*smear on*) agregada sobre a superfície dentinária, e a interna (*smear in* ou *plug*), composta por micropartículas que penetram forçadamente por alguns micrômetros no interior do complexo tubular da dentina.

A lama dentinária apresenta a seguinte constituição: componentes orgânicos e inorgânicos dos tecidos dentários, microrganismos, saliva e outros. Essa camada está presente em maior ou menor quantidade, variando em relação ao tipo de instrumental utilizado. Dependendo do agente de união indicado em Odontologia adesiva, há necessidade ou não da remoção da camada de lama da superfície dentinária (ARAÚJO et al, 1998).

Segundo Black (1908), a limpeza cavitária consiste na última etapa do preparo cavitário. Essa limpeza pode ser executada através de diferentes substâncias, as quais têm a função de remover resíduos do preparo e é recomendado que seja realizada previamente à inserção do material protetor do complexo dentino-pulpar.

Os agentes de limpeza cavitária devem apresentar características e ações físico-químico-biológicas, dentre elas: limpar as paredes cavitárias removendo os microfragmentos orgânicos e dentinários, contaminados ou não, acumulados durante a instrumentação do preparo, não ser tóxico, facilitar a ação dos agentes protetores e combater ou eliminar possíveis microrganismos patogênicos no interior da cavidade. Os agentes de limpeza, segundo Nagem Filho (1985), enquadram-se basicamente em dois grupos: os desmineralizantes, representados pelos ácidos, e os não-desmineralizantes, que são os germicidas, detersivos e alcalinizantes. Dentre os materiais de limpeza de cavidades presentes

no mercado, os mais utilizados atualmente são a clorexidina e a água de hidróxido de cálcio (água de cal) ambos considerados não-desmineralizantes. A clorexidina é um dos agentes antimicrobianos mais estudados, apresentando propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas (THYLSTRUP, FERJERSKOV, 1995). A água de hidróxido de cálcio proporciona limpeza mecânica, apresenta pH alcalino neutralizando a acidez da cavidade, atua como agente bacteriostático, estimula a calcificação dentinária e é hemostática nos casos de exposição pulpar (MONDELLI, 1998).

A Fitoterapia atualmente está sofrendo uma fase de inúmeros estudos com o propósito de desenvolver medicamentos preventivos e curativos através do aproveitamento dos princípios bioativos e, consequentemente, dos benefícios oferecidos pelos produtos oriundos da Natureza.

De modo a possibilitar a utilização clínica de um novo biomaterial inúmeras pesquisas são necessárias, dentre elas o estudo inicial sobre a avaliação da biocompatibilidade do produto, para comprovar a sua segurança, possibilitando sua aplicação na Odontologia. A toxicidade de um material odontológico pode ser avaliada através de testes *in vivo* em animais e humanos. Quando um novo produto é elaborado, torna-se necessária a realização de testes laboratoriais nos quais entrará em contato, promovendo sua utilização clínica segura, dando maiores subsídios para seu emprego (BUSSADORI et al, 2005).

Diante de algumas pesquisas que relataram inúmeras propriedades benéficas apresentadas pela própolis e em decorrência da carência de informações na literatura do emprego da mesma na limpeza de cavidades, este estudo se propõe a realizar testes preliminares de um extrato etanólico de própolis a 8% (controle microbiológico, alteração de cor, citotoxicidade e biocompatibilidade em molares de ratos) a fim de verificar a viabilidade de formular uma solução para limpeza de cavidade nos preparos cavitários.

2.0)REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1)Conhecendo a Própolis

A própolis consiste em uma substância resinosa coletada, transformada e utilizada pelas abelhas com o propósito de selar orifícios presentes nas colméias, vedando a parede interna da mesma e protegendo-a contra a entrada de intrusos. Segundo relatos da literatura, a própolis tem sido utilizada como produto medicinal desde 300 a.C. (GHISALBERTI, 1979) apresentando como características: atividade anticancerígena, antioxidante, antiinflamatória, antibiótica e antifúngica (BURDOCK, 1998; BANSKOTA, TEZUCA, KADOTA, 2001; MARCUCCI, 1995).

Os sacerdotes do antigo Egito utilizavam a própolis para embalsamar os mortos. Posteriormente, os gregos passaram a utilizá-la na forma de ungüento e, por conseguinte, a eles se deve a etimologia da palavra: *pro*, que significa “em defesa de” e *épolis*, “cidade”, ou seja, “em defesa da cidade” (ou colméia). Países europeus, principalmente do leste, há dois mil anos utilizam a resina das colméias para tratar doenças infecciosas. Também na colméia a própolis tem a função de evitar a entrada de corrente de ar ou frio, embalsamar os cadáveres dos inimigos que entram no interior da colméia evitando sua decomposição, envernizar o interior (atuando como agente desinfetante) e os favos de crias antes que a rainha desove para obter assepsia dos ninhos, protegendo-os contra bactérias e vírus (ANDRÉA, COSTA, CLARTON, 2005).

Breyer, em 1980, relatou que a própolis foi utilizada desde a antiguidade como isolador para a execução de trepanações (operação onde se abre o crânio) minimizando infecções e, consequentemente, morte do paciente. Na guerra de bôeres da África do Sul, durante o período de 1899 a 1902, misturavam própolis com vaselina, formando uma pomada

que auxiliou na execução de aproximadamente 100 intervenções cirúrgicas. Relatos de Matsuno (1997), afirmaram também que a própolis misturada à vaselina, no início desse século, já era utilizada sobre ferimentos, e também como pomada pós-operatória em soldados feridos na guerra, indicando o conhecimento de seu poder terapêutico. Aristóteles, em seu livro denominado "Catálogo Animal", registrou a própolis como medicamento para tratar abscessos e feridas, ou seja, utilizada no tratamento de infecções.

2.2)Composição

Apresenta aroma característico, cor variando entre amarelada, esverdeada clara ao pardo escuro e consistência também variada, dependendo da sua origem botânica. A própolis é coletada pelas abelhas *Apis mellifera* em diferentes pontos das plantas: brotos, botões florais e exsudatos resinosos, sendo transportada à colméia, onde são acionadas e modificadas em sua composição, através de secreções próprias das abelhas, como cera e secreções salivares essenciais ou, ainda, sendo resultante do processo de digestão do pólen (GHISALBERTI, 1979). As abelhas operárias da espécie *Apis mellifera* removem a própolis dos brotos e secreções resinosas presentes nas árvores. Através de suas mandíbulas e de suas patas, realizam a mistura dessas secreções com a cera por elas sintetizadas (MATSUNO, 1997).

> ...os vegetais no estágio de brotos estão vulneráveis a microrganismos e insetos; para se proteger, produzem enzimas que funcionam como os anticorpos dos humanos. A colméia, que guarda o néctar da plantas, ficaria igualmente vulnerável a invasores. Ocorre que as abelhas aprenderam a coletar as enzimas que protegem os vegetais, fechando com elas a parte externa das colméias (PARK, 2007).

A composição da própolis varia de acordo com o local de coleta e da espécie vegetal utilizada pelas abelhas na sua confecção. Alguns componentes estão presentes em todas as amostras, enquanto outros ocorrem somente em própolis colhidas de espécies particulares de plantas. Estudos com o propósito de verificar a composição da própolis mostraram que mais de trezentas substâncias foram identificadas, com predominância de flavonóides (flavonas,

flavonóis, flavononas) das quais se destacam: galangina, crisina, tectocrisina, pinocembrina, campferol e quercetina, bem como os aldeídos aromáticos (vanilina e isovanilina), cumarinas, ácidos fenólicos (ácido caféico, ferúlico, cinâmico e cumárico), ácidos orgânicos (ácido benzóico) e alguns oligoelementos, tais como: alumínio, vanádio, ferro, cálcio, silício, manganês, estrôncio, e vitaminas B1, B2, B6 e C (BANKOVA, POPOV, MAREKOV, 1989; BANKOVA, CASTRO, MARCUCCI, 2000; MARCUCCI et al, 2001).

Além de estar diretamente relacionada à ecologia da flora de cada região, a composição química da própolis também depende da espécie das abelhas. Segundo Ghisalberti (1979), de modo geral, a própolis é composta por 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de micro-elementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E.

Park et al (1998) estudaram a preparação dos extratos de própolis utilizando água e diferentes concentrações de etanol (60, 70 e 80%), comparando-as quanto ao espectro de absorção por espectrofotometria na região ultravioleta por cromatografia delgada de alta performance, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), efeito antimicrobiano, antioxidante e antiinflamatório. Os resultados mostraram que o pico de absorção máxima de todos os extratos foi de 290nm, sendo o extrato etanólico a 80% o que apresentou maior absorção. A maioria dos flavanóides foi extraída na concentração alcoólica entre 60 a 80%. Em relação à atividade antimicrobiana, constataram que as concentrações 70 e 80% inibiram o crescimento microbiano e apresentaram grande atividade antioxidante e o extrato a 80% foi o que apresentou melhor resultado sobre a inibição da atividade da enzima hialuronidase.

Ishida (2006) traçou o perfil químico de amostras da própolis amazonense através de análises como reações de identificação para hidróxidos fenólicos, espectrofotometria U.V., espectrofotometria infravermelho, cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de

massa (CG/EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados obtidos com as reações de identificação de hidróxidos fenólicos e com espectrofotômetro U.V. demonstraram a presença de substâncias aromáticas do tipo compostos fenólicos. Os espectros infravermelhos apresentaram variação entre amostras, demonstrando que algumas apresentavam maior quantidade de substâncias fenólicas. As análises realizadas através do CG/EM e HPLC mostraram que os principais constituintes são benzofenonas preniladas, divergindo dos compostos normalmente encontrados na própolis brasileira. Triterpenóides pentacíclicos, tais como a alfa e beta-amirinas, também foram encontradas, sugerindo que a própolis da região amazônica pode ser proveniente de espécie do gênero *Clusia*.

Daugsch et al (2007) estudaram a própolis vermelha e sua origem botânica através de amostras coletadas nos manguezais dos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. As abelhas foram observadas coletando exsudato resinoso vermelho de *Dalbergia ecastophyllum* (família *Leguminosae-Papilionatae*) para produção de própolis. Utilizaram os métodos cromatográficos CLAE-FR e CCDAE-FR para analisar os flavanóides da própolis e da resina vermelha. Concluíram que a origem botânica da própolis vermelha é a *D. ecastophyllum* e que quando é coletada exclusivamente desta planta apresenta atividade antimicrobiana maior do que aquela misturada a outras plantas. Nas áreas onde a *D. ecastophyllum* é rara ou não está presente, as abelhas coletam de outras plantas.

Os efeitos terapêuticos da própolis têm sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos que compõem a mesma. Destes, os flavanóides podem ser considerados os principais compostos, encontrando-se ainda, alguns ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos e seus ésteres, alcoóis e cetonas (BANKOVA, POPOV, MAREKOV, 1983; BANKOVA et al, 1992).

Fatores como a ecologia vegetal da região onde a própolis foi coletada (PARK et al, 1995; PARK, KOO, CONTADO, 1997) e, até mesmo, a variabilidade genética das rainhas,

também influenciam na composição química da própolis. Segundo a CONAPIS (2007), a própolis ideal é aquela produzida em regiões onde exista o mínimo possível de poluição ambiental, longe dos centros urbanos e de fábricas que emitam poluentes.

Park et al (2002) avaliaram a própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai em busca de evidências fitoquímicas de sua origem vegetal por meio de técnicas cromatográficas. Relataram que a composição da própolis depende da época, vegetação e área da coleta. Após os resultados obtidos por CCDAE-FR, CLAE-FR e CG-EM, as própolis do Sul do Brasil foram classificadas em 5 grupos distintos, conforme os componentes químicos encontrados. Com base nas evidências fitoquímicas, *Papulus alba* foi identificada como a principal fonte de própolis do grupo 3 (quimicamente similar à resina do álamo) do sul do Brasil, Argentina e Uruguai.

Alencar et al (2005) realizaram análises fitoquímicas de própolis produzidas através de *Baccharis dracunculioflia* (alecrim-do-campo) por abelhas *Apis mellifera* africanizadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Os autores relataram presença de alta proporção de artepilin C e outros derivados do ácido cinâmico. Com base nas evidências fitoquímicas, *B. dracunculifolia* foi identificada como a principal fonte vegetal das própolis produzidas nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

2.3)Emprego da própolis

A própolis tem se tornado popular como alimento saudável, sendo utilizada extensivamente em alimentos e bebidas em várias partes do mundo, trazendo como benefícios, mais saúde, e agindo também na prevenção de doenças, tais como inflamações, doenças cardíacas, diabetes, câncer, etc. (SHOUQIN, JUN, CHAGZHENG, 2004). Dentre produtos apícolas como mel, geléia real, pólen, entre outros, a própolis vem se destacando

tanto pelas suas propriedades terapêuticas, como pelas atividades antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica (BANKOKA, POPOV, MAREKOV, 1998; GHISALBERTI, 1979) e anticariogênica (PARK et al, 1998), quanto pela possibilidade de aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia na forma de alimentos funcionais. Atualmente existem diversos produtos contendo própolis que estão sendo comercializados em todo mundo, principalmente no Japão, como balas, chocolates, doces, xampus, cremes para pele, soluções anti-sépticas e pastas de dente (ACKERMANN, 1991).

Hoje o Brasil é o maior exportador de própolis para o Japão, Estados Unidos e Europa, e pode ampliar a balança comercial com a comprovação da qualidade de seus produtos (ROSA, 2000). Segundo Levya (1989), dentro de cada colméia vivem em torno de cinquenta a sessenta mil abelhas sob uma temperatura média no interior de 30°C, sendo esta ideal para o crescimento de larvas. O autor também afirma que a flora ecológica da região consiste em um fator de fundamental importância na determinação das características químicas da própolis, através dos ciclos evolutivos das plantas provedoras de resinas (floração e frutificação) e dos fatores climáticos.

Grégio et al (2005) avaliaram o efeito da própolis *Apis mellifera* sobre o processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos. Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem *wistar*, divididos em 2 grupos: controle (receberam soro fisiológico) e tratado (à base de extrato alcoólico de própolis a 30%). Induziram lesões ulceradas no dorso da língua através da aplicação de hidróxido de sódio a 40%. O resultado mais significativo foi observado nos animais tratados com extrato alcoólico de própolis aos 21 dias, onde não foi observado sinal flogístico em nenhum animal desse grupo, enquanto que nos animais do grupo controle, três dos seis ratos ainda exibiam infiltrado inflamatório moderado no tecido conjuntivo subjacente à área em que havia a lesão ulcerada.

2.4)Atividade Antimicrobiana

Gebara, Zardetto e Mayer (1996) avaliaram a ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. As substâncias testadas foram: cacau, tomilho, sálvia, malva e própolis. O tomilho, o cacau e a própolis apresentaram atividade antibacteriana frente aos microrganismos testados, já as tinturas de sálvia, malva e camomila não apresentaram a mesma atividade. Na análise de inibição sobre os *S. mutans* e *S. sobrinus*, a própolis apresentou resultado efetivo em menor concentração, 0,01 mg/mL. Esses resultados sugerem a possibilidade do uso dessas substâncias no controle das bactérias presentes no biofilme dental.

Park et al, em 1998, avaliaram a atividade do extrato etanólico de própolis (EEP) sobre os *Streptococcus mutans*, principal microrganismo responsável pela lesão cariosa, e pela enzima secretada por este, responsável pela aderência de outros microrganismos à superfície dental denominada glicosiltransferase. Para avaliar a ação da própolis sobre a atividade da glicosiltransferase foram organizados tubos contendo a mistura da reação enzimática com o EEP, enquanto que para a observação da ação antibacteriana foram utilizados discos que continham o EEP sobre placas que haviam sido semeadas por *S. mutans*. Observaram a inibição da ação da glicosiltransferase e durante a leitura das placas foram notados halos de inibição extensos, confirmando a propriedade anticariogênica da própolis.

Bianchini e Bedendo (1998) avaliaram o efeito antibiótico do extrato aquoso de própolis em várias concentrações testando cinco espécies de bactérias fitopatogênicas: *Agrobacterium tumefaciens, Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia chrysantheni, Pseudomonas syringae* pv. *tabaci e Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. O estudo foi realizado utilizando nutriente-ágar contendo concentrações de própolis a 0,1%, 1% e 10%. Bactérias provenientes de colônias de 48 horas de crescimento foram repicadas para o

centro da placa de Petri contendo o meio de cultura, sendo 5 placas com própolis e 5 placas sem própolis. A avaliação foi feita visualmente no terceiro dia após a repicagem. Os resultados mostraram que *Agrobacterium tumefaciens, Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foram completamente inibidas em meio de cultura contendo extrato de própolis a 10%, a *Erwinia chrysantheni* foi parcialmente inibida, enquanto *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* mostrou-se insensível ao extrato. Resultados idênticos foram observados quando a própolis foi incorporada ao meio antes e após a autoclavagem, mostrando que a substância ativa no extrato não é termo-sensível. Através desse estudo, os autores concluíram o uso potencial da própolis como antibiótico para o controle de bactérias fitopatogênicas.

Bosio et al (2000) estudaram a atividade da própolis sobre o *Streptococcus pyogenes*, um dos principais microrganismos responsáveis por diversas infecções otorrinolaringológicas. A atividade antibacteriana foi determinada pelas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações bactericidas mínimas (CBMs). Os resultados demonstraram a efetividade *in vitro* da própolis sobre o *S. pyogenes*, sugerindo a utilização desse medicamento natural em infecções otorrinolaringológicas. Os autores concluíram que a atividade antibacteriana da própolis provavelmente tem como mecanismo de ação a inibição do RNA polimerase da bactéria por seus flavonóides.

Ota et al (2001) avaliaram *in vitro* propriedades antifúngicas da própolis brasileira em 80 cepas de *Candida sp*, divididas em: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida guilliermondii*. Todas se mostraram sensíveis ao extrato etanólico de própolis. Os autores analisaram também, através de uma pesquisa *in vivo*, a quantidade de *Candida sp.* presente na saliva de pacientes usuários de prótese total que apresentavam estomatite. Os pacientes fizeram uso de um bochecho de própolis duas vezes ao dia durante duas semanas.

Ao final da pesquisa, os autores observaram diminuição significativa na quantidade de *Candida* sp. na saliva desses pacientes, sugerindo ação antifúngica da própolis.

Koo et al (2002) avaliaram um enxaguatório à base de própolis sobre o biofilme. Para isso, os voluntários envolvidos na pesquisa não realizaram higiene oral por três dias, além de bochecharem solução com 20% de sacarose 5 vezes ao dia. Para avaliar a eficácia do extrato da própolis, os voluntários realizaram bochechos com solução à base de própolis duas vezes ao dia. Os resultados demonstraram que o colutório à base de própolis foi eficiente na redução da formação do biofilme supragengival e a concentração de polissacarídeos insolúveis no biofilme diminuiu em 67,7%. Os autores afirmaram que a própolis pode ser um novo agente na prevenção de patologias orais. Porém, outras pesquisas ainda são necessárias para identificar os componentes responsáveis pela suas propriedades biológicas.

Gebara, Lima e Mayer (2002) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato de própolis sobre patógenos periodontais e sobre microrganismo causadores de infecções graves da cavidade oral. Foram testados os seguintes microrganismos: *Prevotella intermedia, Prevotella melaninogenica, Porphyromonas gigivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Capnocytophaga gingivalis, Fusobacterium nucleatum, Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* e *Staphylacoccus aureus*. Todas as cepas testadas foram susceptíveis ao extrato Os resultados positivos sugeriram que o extrato de própolis pode ser utilizado, futuramente, na terapia periodontal.

Vargas et al (2004) avaliaram a ação antibacteriana da própolis através da inoculação de placas de ágar BHI contendo 5% de extrato alcoólico de própolis a 50% em solução de álcool etílico 96ºGL, com inóculo bacteriano de 1 X 10^6 células mL^{-1}. Testaram 161 isolados bacterianos, Gram-positivo e Gram-negativo. Observaram que os isolados foram sensíveis ao extrato, pois não ocorreu crescimento bacteriano na placa após 72 horas de incubação a 37ºC. O extrato alcoólico de própolis a 50% foi capaz de exercer ação antibacteriana efetiva contra a

maioria dos isolados testados, inibindo o crescimento de 67,7% das amostras de *Nocardia asteroides, Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Rhodococcus equi, Salmonella* sp., *Escherichia coli, Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosas.* As bactérias Gram-positivas mostraram-se mais sensíveis (92,6%) ao extrato testado do que as Gram-negativas (42,5%). Dentre as bactérias avaliadas, a *Nocardia asteroides* foi a bactéria Gram-positiva mais sensível (100%) e *Pseudomonas aeruginosas* a Gram-negativa que apresentou maior sensibilidade (72,41%) ao extrato de própolis.

Silici et al (2005) estudaram a atividade antifúngica de própolis coletadas de diferentes raças de abelhas frente a fungos isolados de pacientes com micoses superficiais. Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) foram obtidos utilizando métodos de diluição em ágar, comparando os diâmetros das zonas de inibição, através de métodos de difusão. Os resultados mostraram que a *Candida albicans, Candida glabrata, Trichosporon spp*., e *Rhodotorula sp.*, foram susceptíveis a baixas concentrações de própolis. Relacionadas às outras própolis testadas, as amostras de própolis coletadas pelas abelhas *Apis mellifera caucasica* apresentaram maior atividade antifúngica frente a todas as micoses superficiais. Em contrapartida, as amostras de própolis obtidas por *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera anatolica* apresentaram as piores atividades. As amostras de própolis da região Adana (Turquia) se mostraram mais ativas que as amostras das outras regiões. Aumentos nos valores da CIM foram acompanhados da diminuição dos diâmetros das zonas de inibição de crescimento.

Yaghoubi et al (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis Iraniano utilizando o método de discos de difusão sobre os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus liqueiniformis, Candida albicans, Salmonella enteritidis,, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris*. O EEP apresentou atividade

antimicrobiana frente aos microrganismos Gram-positivos e fungos. Porém, nenhuma atividade antimicrobiana foi apresentada em relação aos Gram-negativos. Na cromatografia de camada delgada foi revelada a presença de pinocembrina, ácido caféico, campferol, crisina e galangina (corante). O total de flavonóides e fenólicos foi 7,3% e 36%, respectivamente, fato este que sugere que a forte atividade antimicrobiana da própolis Iraniana pode ser devido aos altos níveis de fenólicos e compostos flavanóides.

Almeida et al (2006) avaliaram uma solução anti-séptica à base de extrato de própolis sobre os índices clínicos e contagem de *Streptococcus mutans*. Prepararam uma solução para bochecho à base de própolis (6,25%) a partir da concentração inibitória mínima, sendo considerada a solução teste e compararam-na ao controle positivo: clorexidina (0,12%). Através de um ensaio clínico cruzado, 15 crianças utilizaram a solução teste durante 15 dias consecutivos e, com intervalo de 21 dias, realizaram bochechos com clorexidina. Foram coletados os índices para acúmulo de biofilme oral e doença gengival antes e 24 horas após o uso das soluções. Os autores realizaram a contagem de *S. mutans* de amostras da saliva nos seguintes períodos: antes e 24 horas, 07 dias, 15 dias e 21 dias após o final de ambos os bochechos. Os resultados indicaram que a solução de própolis apresentou satisfatória atividade antimicrobiana, semelhante à ação da clorexidina, atuando na presença de biofilme e doença gengival.

Sperança et al (2007) avaliaram extratos alcoólicos de própolis em diferentes concentrações através de testes de difusão *in vitro* em culturas mistas oriundas de bolsas periodontais, em condições de anaerobiose facultativa e microaerofilia. A leitura e a mensuração dos halos de inibição foram realizadas através de régua milimetrada e computação gráfica. Os resultados encontrados mostraram que os extratos em todas as concentrações testadas inibiram o crescimento bacteriano. As soluções utilizadas foram de 30%, 20%, 10% e 5%, que na condição de anaerobiose facultativa apresentaram,

respectivamente, valores médios de halo de inibição de 16,20mm, 15,41mm, 15,11mm e 13,07mm; na condição de microaerofilia os valores médios foram de 16,12mm, 15,03mm, 14,10mm, 13,20mm, respectivamente.

Da Silva (2005) avaliou a ação de Nistatina, Fluconazol e gel orabase de própolis sobre a superfície de resina acrílica. Corpos-de-prova (3,0 x 2,5 x 0,5 cm) foram confeccionados em resina polimerizada no banho de água (Clássico, grupos 1 a 5) ou por energia de microondas (OndaCryl, grupos 6 a 10). Após a confecção, os espécimes receberam acabamento e polimento e a rugosidade superficial, ângulo de contato, energia livre de superfície (ELS) e dureza de superfície (DS) foram mensuradas. Os espécimes foram imersos nas substâncias teste e controle. As superfícies foram escovadas com dentifrício e escova macia 3 vezes ao dia durante o tratamento. Os meios de imersão foram substituídos diariamente. Novas mensurações para as variáveis foram executadas após 14 dias de imersão. Os resultados mostraram que a rugosidade superficial aumentou para ambas as resinas sendo a própolis e os antifúngicos responsáveis pelo maior aumento e diferente dos demais (Tukey, $p < 0,05$). Para a energia livre de superfície e ângulo de contato não foram encontradas diferenças (Tukey, $p > 0,05$) entre as resinas acrílicas. Concluiu-se que os antifúngicos podem interferir nas propriedades da superfície de resina acrílica que são associadas à adesão de microrganismos.

Costa et al (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de 11 substâncias: 1) extrato de própolis verde; 2) Pasta Guedes-Pinto (iodofórmio + PMCC + Rifocort®); 3)extrato de própolis verde + Rifocort® + iodofórmio; 4) Rifocort® + extrato de própolis verde; 5) hidróxido de cálcio + extrato de própolis verde; 6) hidróxido de cálcio + soro fisiológico; 7) iodofórmio + extrato de própolis verde; 8) iodofórmio + soro fisiológico; 9) Rifocort®; 10) PMCC canforado e 11) soro fisiológico (controle negativo) contra cepas de *Enterococcus faecalis*. No estudo, utilizaram a técnica de difusão em ágar através do método do poço e

obtiveram os seguintes resultados: o Rifocort®, o Rifocort® com extrato de própolis verde, a pasta Guedes-Pinto, a pasta de própolis verde com Rifocort® e iodofórmio e o PMCC apresentaram ação antimicrobiana contra o *E. faecalis* significativamente superior quando comparadas às demais substâncias testadas. A pasta de hidróxido de cálcio + própolis verde, a solução de extrato de própolis verde, a pasta de iodofórmio com solução de própolis verde apresentaram menor atividade antimicrobiana, não havendo diferença estatisticamente significativa entre si. O soro fisiológico, a pasta de hidróxido de cálcio com soro fisiológico e a pasta de iodofórmio com soro fisiológico não apresentaram atividade antimicrobiana. Os autores concluíram que a solução de extrato de própolis verde apresentou baixa atividade antimicrobiana contra o *E. faecalis* e, dentre as substâncias testadas, o Rifocort® apresentou maior ação antimicrobiana.

Sanchez-Ayala, Silveira e Santos (2008) avaliaram o efeito do extrato etanólico de própolis nas concentrações 20 e 40% sobre a ação antibacteriana do hidróxido de cálcio. Foram preparadas suspensões contendo 10^8 células/mL das bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus* e Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Alíquotas de 0,1 mL das suspensões foram semeadas em duplicata, em Ágar Müller Hinton. Discos de papel de filtro foram embebidos em extratos etanólicos de própolis a 20 e 40%, em $Ca(OH)_2$ preparado com os referidos extratos de própolis e $Ca(OH)_2$ preparado em solução fisiológica, sendo em seguida posicionados sobre o meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C durante 24h e os halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos. Os autores verificaram que $Ca(OH)_2$ em solução fisiológica mostrou maior halo de inibição do crescimento bacteriano ($p<0.001$) em comparação com o hidróxido de cálcio preparado com própolis, tanto frente a bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas ($p<0.001$). Os resultados sugerem que o hidróxido de cálcio associado à própolis tem menor atividade antibacteriana e estudos

posteriores devem verificar se a característica resinosa da própolis pode ter dificultado a difusão e, conseqüente, ação antibacteriana do $Ca(OH)_2$.

2.5)Controle Microbiológico do Extrato

A instrução normativa do Ministério da Agricultura nº3 de 19 de janeiro de 2001, que regulamenta a identidade e qualidade de extratos de própolis, alega que os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes no produto em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelo regulamento vigente.

Furlaneto et al (2004) analisaram dez amostras de drogas vegetais comercializadas livremente nas ruas da cidade de Londrina/PR quanto à qualidade microbiológica antes e após o processo de infusão. Nas drogas vegetais antes do processo de infusão, constataram cargas de microrganismos aeróbios mesófilos viáveis variando de 1 x 103 a 1 x 107 UFC/g, bolores e leveduras de 4 x 102 a 4 x 103 UFC/g e presença de enterobactérias a 102 UFC/g, em uma única amostra. Nos infusos, as cargas microbianas contaminantes de mesófilos e de bolores e leveduras foram menores. Não houve presença de enterobactérias nas amostras após o tratamento de infusão, nem presença de *Staphylococcus aureus* nas amostras analisadas. Os autores concluíram que as drogas vegetais testadas estavam em condições de qualidade sanitária precárias para consumo, segundo padrões estabelecidos, indicando condições insatisfatórias de armazenamento e comercialização.

Yamamoto et al (2004) avaliaram a qualidade microbiológica de produtos de indústrias farmacêuticas, cosméticas, fitoterápicas e farmácias de manipulação da região da Zona da Mata. Foram analisadas 240 amostras e verificadas a presença dos microrganismos patogênicos *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp e *Staphylococcus*

aureus. Dentre as amostras analisadas, 7,7% foram reprovadas por presença de microrganismos acima do limite máximo.

Medeiros et al (2007) estudaram a qualidade dos produtos comercializados por farmácias de manipulação. Foram adquiridas nove amostras, as quais foram analisadas pelo método de contagem em placas (*Pour Plate*). Os autores observaram que 55,5 % das amostras estudadas não apresentaram valores significativos para contagem de microrganismos viáveis dentro dos limites especificados pela Farmacopéia Brasileira. Foi observada a presença de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* nas amostras estudadas. Verificaram também que os prováveis fungos encontrados nas amostras poderiam ser dos seguintes gêneros: *Arpergillus, Penicillium, Fusarium, Cladosporium, Microsporum, Epidermophyton* e *Phialophora.* Diante dos resultados obtidos, os autores ressaltaram a grande necessidade da implantação das normas estabelecidas pela RDC nº 33, que rege a garantia da qualidade referente ao controle microbiológico interno de produtos não-estéreis.

2.6)Citotoxicidade

2.6.1)Teste de *Artemia franciscana*

A *Artemia franciscana* consiste em um microcrustáceo amplamente utilizado em experimentos com o intuito de detectar o potencial bioativo de algumas substâncias, dentre elas, extratos de plantas. São artrópodes da classe crustáceo, possuem cistos de baixo custo facilmente encontrados no comércio, e permanecem viáveis por anos no estado seco (MEYER, 1982). O ensaio de testes citotóxicos utilizando *Artemia franciscana* tem sido introduzido na rotina em muitos grupos de pesquisa (LHULLIER, HORTA, FALKENBERG, 2006), sendo úteis para o desenvolvimento de medicamentos e para testar materiais dentários.

A citotoxicidade pode ser aferida através da contagem de células, capacidade proliferadora e determinação da atividade enzimática (PELKA et al, 2000).

O bioensaio de *Artemia franciscana* é simples, rápido, prático, permite que um grande número de amostras sejam processadas adequadamente e é útil para avaliar a toxidez de uma grande variedade de extratos (RICE, MANESS, 2006). *Artemia franciscana* pode ser utilizada sozinha, como uma única espécie de teste de toxicidade ou combinada com outros estudos simultaneamente (NUNES et al, 2005).

Esse teste vem se popularizando no meio científico devido ao baixo custo para implantação e manutenção de culturas. Além disso, foi mostrada uma importante correlação de testes *in vivo* com vários extratos de plantas e testes *in vitro* ($r = 0,85$, $p < 0,05$), e concluíram que o bioensaio com *A. franciscana* foi a ferramenta mais vantajosa para predizer uma toxicidade oral aguda dos extratos de plantas (PARRA et al, 2001).

Fontenele et al (1988) avaliaram a toxicidade dos extratos de nove plantas medicinais que apresentam atividade antibiótica e que são consumidas ampla e indiscriminadamente pela população (*Lippia didoides, Lippia gracillis, Stenocalyx michelli, Punica granatum, Mimosa hostilis, Psidium guajava, Ccombretum leprosum, Mentha cf. rotundifolia* e *Coleus amboinicus*). Foram obtidos extratos (aquoso, acetônico e hidroalcoólico) de cada planta e, em seguida, foi testada a concentração inibitória mínima (CIM). Dos extratos aquosos, somente os de *Punica granatum, Stenocalyx michelli* e *Psidium guajav*a apresentaram uma taxa de sobrevivência de 92, 79 e 91%, respectivamente. O extrato acetônico de *Stenocalyx michelli* e *Combretum leprosum* apresentaram, respectivamente, uma taxa de sobrevivência de 81 e 96%, e o extrato hidroalcoólico de *Combretum leprosum*, uma taxa de sobrevivência de 73%. Os demais extratos não apresentaram sobreviventes. Contudo, dentre os dezoito extratos diferentes de plantas, somente seis extratos não apresentaram toxicidade à *Artemia salina*.

Cavalcante et al (2000) estudaram a síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliaram a toxicidade frente à *Artemia salina*. Os compostos sintetizados foram testados quanto à toxicidade geral utilizando o bioensaio de letalidade frente à *Artemia salina.* A toxicidade à *Artemia salina* foi determinada através da dose letal de 50% (DL50) para os microcrustáceos. Os derivados 1,3,5-triazínicos foram ensaiados em 4 concentrações diferentes em tubos de ensaio contendo água do mar artificial e 10 náuplios. As larvas vivas e mortas foram contadas após 24 horas e os valores de DL50 determinados a partir das equações obtidas por regressão linear. Os ensaios foram realizados em quintuplicata, assim como o ensaio controle. O bioensaio utilizando a letalidade da *Artemia salina* apresentou-se simples e eficiente, indicando resultados interessantes para os compostos ensaiados.

Sallenave-Namont et al (2000) avaliaram a toxicidade de fungos saprófitos isolados do solo, água do mar e mariscos. Foram identificadas 456 espécies, sendo 68% deles *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Cladosporium.* Para avaliar a toxicidade, os autores utilizaram o teste de *Artemia salina.* O resultado demonstrou que 35,5% das espécies testadas apresentaram toxicidade frente à *Artemia salina*, confirmando a existência de fungos saprofíticos em mariscos e sugerindo risco potencial de contaminação ao serem consumidos na alimentação.

Moreira et al (2003) pesquisaram o efeito citotóxico dos extratos de *Baccharis pseudotenuifolia* utilizando ensaios com *Artemia salina.* Os extratos em clorofórmio e em metanol de folhas da espécie *Baccharis pseudotenuifolia* foram submetidos ao bioensaio de toxicidade sobre *Artemia salina*, sendo que ambos foram considerados ativos (TAS < 1000 ppm). A maior atividade concentrou-se no extrato clorofórmico (TAS = 115 ppm), no qual os autores detectaram a presença do triterpeno ácido oleanólico. A realização do bioensaio com os compostos isolados demonstrou que o ácido oleanólico (TAS = 85 ppm) pode ser o

princípio ativo responsável pela atividade do extrato clorofórmico da *Baccharis pseudotenuifolia*.

Olguin et al (2005) avaliaram o potencial biológico alelopático dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico da raiz da *Vernonia tweediana* (assa peixe). Realizaram testes de toxicidade sobre *Artemia salina* e, verificaram que dos extratos hexânicos, acetato de etila e metanólico da raiz da *Vernonia tweediana* (assa peixe) somente o extrato hexânico é bioativo.

Lhullier, Horta e Falkenberg (2006) utilizaram o teste de *Artemia salina* para avaliação de extratos de macro-algas bênticas. As amostras foram coletadas de algas marinhas de 19 espécies (sendo 4 pertencentes ao filo Chlorophyta, 5 ao filo Phaeophyta e 10 ao filo Rhodophyta) em dois locais do litoral catarinense. Observaram-se diferenças entre as espécies de um mesmo gênero (*Codium decorticatum* e *Codium isthmocladium*) e também a influência de fatores ambientais (*Hypnea musciformis*) na toxicidade dos extratos.

2.7)Alteração Cromática

Fondriest (2003) apresentou a classificação tridimensional de cor descrita por Albert Munsell, em 1917. 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 do 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 à

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.

Leão (2005), em seu estudo sobre controle de cor nas imagens digitais, define o modelo HSB como um sistema digital de identificação de cores baseado na percepção humana das cores a partir de 3 propriedades fundamentais: matiz, saturação e brilho. O autor concluiu que o sucesso na implementação do gerenciamento de cores está baseado no conhecimento dos equipamentos utilizados para medir as cores e sua melhor aplicabilidade, bem como o princípio de funcionamento dos dispositivos a serem calibrados e caracterizados.

Costa-e-Silva, Bandeira e Parente (2007) avaliaram *in vitro* a estabilidade de cor de alguns compósitos de última geração quando expostos a bebidas da Região Amazônica com alto teor de corante, em diferentes tempos de exposição. Foram confeccionados 240 corpos-de-prova (CP) de quatro resinas compostas no matiz A3. A cor inicial das resinas (T0) foi registrada fotograficamente utilizando a máquina Canon EOS Rebel XTi 10Mp. Os CP foram divididos em 4 grupos (n=15): G1 (café), G2 (suco de açaí), G3 (guaraná energético) e G4 (controle-água deionizada), colocados em banho-maria, sob constante agitação, à temperatura de 37°C. Os CP foram submetidos a soluções de desmineralização (6h) e remineralização (18h) durante 30 dias. Diariamente os grupos foram imersos nas soluções corantes durante 15 minutos. Após 07, 15 e 30 dias realizaram novos registros fotográficos (T1, T2 e T3). As imagens foram analisadas pelo programa Corel PHOTO-PAINT 12 para a identificação das cores através do sistema HSB. Na maioria das soluções testadas, a alteração de cor ocorreu na primeira semana. Comparando a alteração de cor das resinas em relação às soluções, observou-se que a resina 1 (Natural Look) apresentou alteração de cor no açaí, as resinas 2 e 3 (Z350 e 4Seasons) apresentaram alteração de cor no café e no guaraná e a resina 4 (Opallis) apresentou alteração de cor em todas as soluções testadas. Os autores concluíram que todos os

materiais sofreram alteração de cor significativa frente às bebidas de consumo da Região Amazônica com alto teor de corante.

2.8)Biocompatibilidade

Scheller (1978) avaliou a influência do extrato etanólico de própolis sobre a regeneração pulpar. O estudo foi realizado em dois cães, totalizando 48 dentes. Nos elementos dentários foram realizados preparos cavitários classe I até ocorrer exposição pulpar. Em seguida, as cavidades foram lavadas com solução hidroalcoólica de própolis a 5% e, na sequência, aplicada própolis em estado sólido sobre a polpa dental. Após 28 dias, os cães foram sacrificados e realizados cortes histológicos dos dentes. Os autores verificaram que tal procedimento provocou redução dos distúrbios circulatórios e processos inflamatórios, com a formação de colágeno e ponte de dentina.

Bretz et al (1999) realizaram estudos com ratos a fim de avaliar o emprego da própolis em exposição pulpar, tendo como grupo controle o hidróxido de cálcio. Os autores compararam a reorganização e vascularização normal da polpa, sendo observada melhor resposta no emprego da própolis após 07 dias. Após 14 dias, observou-se que o hidróxido de cálcio apresentou resultado superior à própolis devido baixa resposta inflamatória e por conferir estabilidade à população bacteriana. Comparando a própolis e o hidróxido de cálcio em relação à formação de pontes de dentina e reorganização de tecidos moles, a própolis foi a mais eficaz.

Sabir et al (2005) avaliaram a resposta pulpar de dentes de ratos quando realizado o capeamento pulpar direto com própolis. Cavidades classe I foram preparadas na face oclusal de primeiros molares até o momento da exposição pulpar. Em seguida, os animais foram divididos em grupos e em cada um deles, a polpa recebeu diferentes tratamentos: capeamento

com óxido de zinco, própolis com componentes flavonóides ou própolis sem componentes flavonóides. Os autores observaram que em polpas capeadas com própolis que apresentavam flavonóides não se observou inflamação e houve o aparecimento de dentina reparadora. Já em polpas que haviam sido capeadas com própolis sem componentes flavonóides e em polpas capeadas com óxido de zinco, a inflamação estava presente e não houve formação de ponte de dentina. Os autores sugeriram que atividade antiinflamatória da própolis é proveniente de seus componentes flavonóides.

Reis (2005) realizou um estudo em relação a propriedades físico-químicas (liberação de cálcio e pH) e biocompatibilidade em tecido subcutâneo de ratos das pastas à base de hidróxido de cálcio. Nos resultados, os autores observaram que as pastas UltraCal, Calcicur e controle mantiveram-se com pH acima de 12 até 60 dias. Na pasta UltraCal, a liberação de íons hidroxila e cálcio ocorreu de forma mais lenta e gradual. A liberação de íons cálcio e hidroxila das pastas controle e Calcicur, ocorreu de forma mais rápida, até 45 dias. As pastas controle, Calcicur e UltraCal mostraram um comportamento biológico semelhante no tecido subcutâneo nos períodos de 07 e 30 dias. Houve uma redução significativa nos eventos inflamatórios de 07 para 30 dias, sendo possível inferir a biocompatibilidade das 03 pastas testadas.

Accorinte et al (2006) realizaram estudos através do capeamento com $Ca(OH)_2$ de polpas de pré-molares humanos com indicação de exodontia por razões ortodônticas. Em seguida, os elementos dentários foram restaurados com adesivo Scotchbond Multi-Uso Purpose e resina composta Z100. Os dentes foram extraídos e processados para avaliação histomorfológica após 30 e 60 dias (n = 10 para cada agente hemostático), sendo observada a formação de barreira dentinária (BD) e infiltrado inflamatório (II), além da presença de bactérias (PB). Os dados foram avaliados pelos testes de Kruskal-Wallis e Conover (alfa = 0,05). Ocorreu formação de BD em 60, 70 e 80%, respectivamente para os grupos SS30, SS60

e SH30, sendo significantemente diferente para o grupo SH60 (BD em 30% dos casos). Não houve diferença no II entre os grupos, com a maioria dos grupos mostrando uma polpa com aspecto de normalidade (80% para SS30 e SS60, 100% para SH30 e 90% para SH60). Bactérias foram detectadas em apenas 10% dos grupos SS30 e SH60, não havendo diferença entre os grupos.

Esmeraldo (2006) avaliou histologicamente a reação inflamatória da polpa dental de molares de ratos após proteção pulpar direta com as seguintes substâncias: extrato de própolis verde, pasta Guedes-Pinto, extrato de própolis verde com iodofórmio e hidróxido de cálcio com soro fisiológico. Os períodos de análise foram de 24 horas, 72 horas e 07 dias. O extrato de própolis produziu no tecido pulpar aumento da intensidade do infiltrado inflamatório e necrose no decorrer do tempo. A pasta de própolis verde com iodofórmio induziu no tecido pulpar uma reação inflamatória predominantemente severa nos três períodos de tempo analisados, enquanto que no grupo do hidróxido de cálcio, a presença de infiltrado inflamatório severo prevaleceu apenas no período de 72 horas. Achados como congestão vascular e edema foram observados em todos os casos do estudo.

Reda (2006) avaliou *in vivo* a biocompatibilidade do MTA, do cimento de Portland e do cimento de Portland modificado em subcutâneos de ratos. Foram utilizados 28 ratos Wistar que receberam 4 tubos de polietileno contendo cada uma das substâncias testadas e um controle (sem material). Realizou-se biópsia da região implantada após o período de 7, 15, 30 e 60 dias. A análise histopatológica foi qualitativa e os resultados revelaram reação inflamatória nos primeiros 7 dias em todos os grupos. Porém foi mais exacerbada no grupo do cimento de Portland modificado. Após 15 dias, o grupo controle, MTA e cimento de Portland exibiam escasso processo inflamatório, maior fibrose e aumento do número de vasos enquanto que o cimento de Portland modificado mantinha um quadro inflamatório moderado. Após 30 e 60 dias todos os materiais tiveram comportamento semelhante, mostrando-se

biocompatíveis nos períodos analisados, entretanto o cimento de Portland modificado por gesso exibiu reação inflamatória mais intensa nos períodos iniciais.

Leites et al (2006) analisaram a resposta histológica pulpar mediante a aplicação direta de Agregado Trióxido Mineral (MTA) e cimento de hidróxido de cálcio (Dycal) em dentes suíno da espécie *Susscrofa domesticus*. Cavidades classes V foram preparadas nos incisivos e pré-molares. Realizaram exposição pulpar e, após hemostasia com soro fisiológico, efetuaram o capeamento pulpar através da aplicação direta de MTA (Angelus) ou Dycal (controle-Dentsply). Os animais foram abatidos após o período de 7 e 70 dias. Os grupos foram formados pela combinação dos dois materiais (MTA, n = 10 e HC n = 5) e dos períodos experimentais. A inflamação observada após sete dias em dentes onde o Dycal foi aplicado demonstrou ser estatisticamente superior àqueles capeados com MTA ($p < 0,004$). Os escores entre os materiais foram semelhantes após 70 dias. Para a dentina reparativa foi encontrada diferença significante ($p < 0,004$) entre os tempos para cada material (7 < 70 dias).

2.9)Clorexidina e Própolis como agente de limpeza de cavidade

A limpeza cavitária tem como objetivo favorecer a adaptação do material restaurador a uma dentina limpa e o mais livre possível da contaminação por microrganismos. A clorexidina tem sido empregada largamente como solução desinfetante, crescendo em popularidade devido sua capacidade de reduzir microrganismos e também, devido a sua substantividade, que consiste na propriedade de manter-se estável e em ação por longos períodos de tempo. A clorexidina não remove a *smear layer*, atuando como um agente de limpeza cavitária não-desmineralizante (CONCEIÇÃO et al, 2000).

Estudos realizados na área odontológica têm avaliado a atuação de soluções de própolis sobre a superfície de esmalte e dentina, sugerindo a capacidade de se produzir uma

solução de limpeza de cavidades à base desse fitoterápico. Dentre eles, podemos citar o trabalho de Geraldini, Salgado e Rode (2000) em que avaliaram *in vitro* a ação de um extrato etanólico de própolis sobre a dentina utilizando 15 dentes, divididos em 5 grupos. Foram confeccionados corpos-de-prova de aproximadamente 1 mm de dentina em alta rotação, a fim de produzir a *smear layer*. As superfícies foram esfregadas por 30 segundos com diferentes concentrações etanólicas de própolis e com etanol 70% puro. Os espécimes foram lavados e secos, fixados e avaliados em microscopia eletrônica de varredura. Observaram que foi removida parte da camada do esfregaço, sem expor os túbulos dentinários. O extrato etanólico de própolis a 10% promoveu uma camada regular, cobrindo a superfície dentinária e as concentrações de 20% e 30% apresentaram partículas com formas esferoidais de vários tamanhos.

Através do aprimoramento nos estudos das riquezas da biodiversidade amazônica, pesquisas na área odontológica têm sido desenvolvidas com o propósito de buscar novos princípios bioativos para a formulação de medicamentos com diferentes aplicabilidades na Odontologia, agindo tanto na terapêutica como na prevenção.

3.0)OBJETIVO

3.1)GERAL

- Realizar testes preliminares de um extrato etanólico de própolis a 8% (alteração de cor, controle microbiológico, citotoxicidade e biocompatibilidade em molares de ratos) a fim de verificar a viabilidade de formular uma solução para limpeza de cavidade nos preparos cavitários.

4.0)MATERIAIS E MÉTODOS

4.1)Modelo de Estudo

Para realização do trabalho, optou-se por um estudo experimental, primário, experimental, com delineamento do tipo relação estímulo-efeito do extrato etanólico da própolis, visando à produção de uma solução para limpeza de cavidades.

4.2)Considerações éticas

Foram utilizados 92 dentes humanos hígidos selecionados aleatoriamente, extraídos por razões ortodônticas, sendo pré-molares e terceiros molares inclusos ou erupcionados. Diante disso, foi solicitada dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFAM. O projeto foi analisado e deferido no CEP\UFAM sob CAAE n° 0240.0.115.000-07 (anexo 1).

4.3)Critérios de inclusão

Elementos dentários hígidos (dentes livres de cárie e/ou restaurações), extraídos por razões ortodônticas, sendo pré-molares e terceiros molares inclusos ou erupcionados, provenientes de pacientes de idade e gênero aleatórios.

4.4)Critérios de exclusão

Foram excluídos aqueles elementos dentários que apresentavam cárie, restaurações, micro-trincas ou fraturas, quando analisados na lupa esteroscópica.

4.5)Benefícios

A produção de uma solução de limpeza de cavidades à base de própolis viabilizará sua utilização nos preparos cavitários previamente à inserção do material restaurador. Devido às propriedades antimicrobianas, acredita-se que essa solução poderá contribuir na diminuição da incidência de cárie secundária através da diminuição da quantidade dos microrganismos presentes na cavidade antes da inserção do material restaurador. Além disso, proporcionará a comprovação da eficácia de um fitoterápico presente na biodiversidade Amazônica e a viabilidade de sua introdução como agente de limpeza de cavidades.

4.6)Riscos

Os elementos dentários utilizados na pesquisa foram extraídos por razões ortodônticas, obtidos através de cirurgias realizadas por cirurgiões-dentistas supervisionados por professores especializados em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, no Curso de Aperfeiçoamento realizado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas. Para esses dentes serem utilizados na pesquisa os mesmos já haviam sido removidos da arcada dentária, não implicando riscos ao paciente.

4.7)Coleta das amostras de própolis

As amostras de própolis foram coletadas em dois diferentes apiários localizados no município de Presidente Figueiredo, no estado do Amazonas (figura 1). Com o intuito de evitar a aproximação das abelhas durante a coleta, utilizou-se o “fumacê” (intensa fumaça produzida através da queima de serragens) (figura 2). O método de coleta escolhido foi raspagem com o auxílio de espátula metálica nas partes internas e bordas da melgueira, ninho e tampa das colméias (figuras 3 e 4). O material coletado foi separado dos resíduos de madeira e excessos de cera e acondicionado em caixas metálicas com tampa, esterilizadas, identificadas (figura 5 e 6) e transportadas ao laboratório de Bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Figura 1 - Coleta da própolis em Presidente Figueiredo

Figura 2 - Utilização do “fumacê” durante a coleta

Figura 3 - Raspagem das bordas da melgueira

Figura 4 - Colméias no interior da melgueira

Figura 5 - Própolis *in natura*

Figura 6 - Armazenamento da própolis em caixa metálica

Figura 7 – *Apis mellifera*

4.8)Tratamento da amostras de própolis *in natura*

Posteriormente à coleta, as amostras foram pesadas em balança analítica (AA- 200 DS, DENVER INSTRUMENT COMPANY, Denver, Colorado, USA) e acondicionadas em recipientes de vidro fechado com lâmina de papel alumínio perfurada para saída da umidade. Em seguida, foram colocadas em um dessecador com sílica gel (Figura 10), permanecendo por sete dias em temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram trituradas e homogeneizadas em um cadinho.

4.9)Obtenção do extrato da própolis

Para obtenção do extrato etanólico de própolis foi seguida a metodologia relatada por Park, 1998. Para isso, foram utilizadas amostras de 2 gramas de própolis *in natura* (figura 9) trituradas em cadinhos (figura 11), homogeneizadas e depositadas em tubos de ensaio (25 mm X 180 mm) (figura 12). Em seguida, foram pipetados 25 mL de álcool etílico a 80% e realizada extração em banho de água termostatizada (Banho-maria agitador, marca Dubnoff, modelo 145-FANEM, São Paulo/Brasil, 2000) a 70ºC durante 30 minutos, sob agitação constante (figura 13). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas 3500 rpm em centrífuga (SIGMA Laborzentrifugen Modelo 2K15, Osterode am Harz, Alemanha) por 26 minutos a 5ºC. O sobrenadante obtido, denominado extrato etanólico de própolis (EEP) (figura 14), foi acondicionado em frascos de vidro âmbar previamente esterilizados, expostos à luz ultravioleta na cabine de segurança biológica (Purificadora Classe II-A, Tipo 36212, LABCONCO, Kansas City, Missouri, USA) por vinte minutos. O extrato foi envasilhado e lacrado em condição asséptica, seguindo o criterioso protocolo de controle de qualidade para evitar contaminação, segundo instrução normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001.

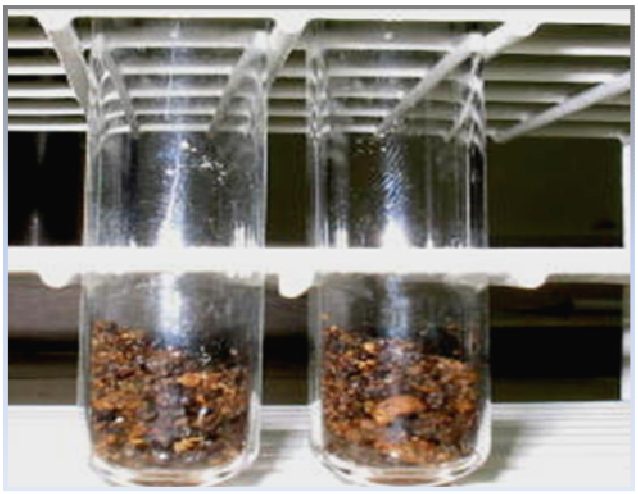


Figura 8 - Própolis *in natura* antes da trituração

Figura 9 - Própolis I

Figura 10 - Própolis em dessecador

Figura 11 - Cadinhos para trituração das amostras

Figura 12 - Própolis adicionada ao etanol, em tubo de ensaio

Figura 13 - Própolis + etanol 80% em banho-maria

Figura 14 - Sobrenadante = EEP

4.10)Controle microbiológico do extrato

Após o envasilhamento, os EEP foram mantidos em locais com diferentes temperaturas e condições ambientes, visando os testes de controle microbiológico. Os locais selecionados para o teste foram: estufa (± 37°C), geladeira (± 4-8ºC) e temperatura ambiente (± 24-26°C). Foram avaliados 4 extratos (EEP I,II, III e IV), oriundos de diferentes apiários (SIMÕES, 2006).

A primeira avaliação microbiológica (TO) foi realizada imediatamente após o envasilhamento dos extratos, sendo regularmente repetidas nos períodos de 07, 15, 30, 45 e 90 dias após a obtenção do EEP.

Com finalidade de padronizar as leituras das placas foram estabelecidos critérios de classificação conforme a presença ou não de bactérias:

- ausência, placas sem crescimento macroscópico de colônias microbianas;

- presença, placas com crescimento macroscópico de colônias microbianas.

Foi realizada a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, verificação da presença de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas* em meios PCA (*Plaque Count Agar) (*Himedia Laboratories PVT Limited, Mumbai, India), Baird-Parker (BP)

*(*Himedia Laboratories PVT Limited, Mumbai, India) e Cetrimid *(*Himedia Laboratories PVT Limited, Mumbai, India), respectivamente. A presença de fungos e leveduras foi pesquisada utilizando o meio ágar Saboraud (MERCK – Darmstadt- Alemanha).

4.11)Preparo dos meios de cultura

Os meios de culturas foram preparados seguindo as recomendações dos fabricantes. Para cada meio, os componentes foram dissolvidos em água destilada no interior de um Erlenmeyer e aquecidos para completa homogeneização. Em seguida, foram esterilizados em autoclave, a 121º C, durante 15 minutos e, posteriormente, distribuídos em placas de Petri (90mm X 150mm) na proporção de 25 mL para cada placa, proporcionando uma espessura uniforme do meio. As placas foram distribuídas de acordo com os grupos experimentais.

Para a contagem de coliformes totais (grupos de bactérias gram-negativas aeróbicas ou anaeróbicas, que não formam esporos e são associadas à decomposição de matéria orgânica) foi utilizado o caldo EC (Caldo *E. coli)* na proporção de 10 mL para cada tubo com tampa (15mm X 150mm) contendo tubos de Durhan invertidos. Em seguida, foram esterilizados em autoclave a 121º C, durante 15 minutos.

Os meios preparados foram acondicionados sob refrigeração a 4ºC até o momento de sua utilização.

4.12)Preparo e semeadura do inóculo

Os extratos de própolis foram diluídos e homogeneizados na proporção 1/10. Foram utilizados 9 mL de água peptonada distribuídos em tubos de ensaio com tampão de algodão hidrófobo.

Para cada ambiente de armazenamento (estufa, temperatura ambiente, geladeira) e período experimental (0, 7, 15, 30, 45 e 90 dias) foram retiradas com auxílio de uma pipeta (Easypet 4421, EPPENDORF, North Ride, NSW, Austrália) assepticamente, alíquotas de 1mL dos extratos, diluídos em água peptonada (9mL) e colocados no tubo contendo caldo EC. O tubo foi levado ao Vortex (Thermolyne Maximix II M37615, BARNSTEAD, Sparks, NV, U.S.A) (figura 15) para ser homogeneizado.

Nas placas de Petri contendo os meios de cultura PCA, Baird Parker e Cetrimid foram adicionados 0,1 mL do extrato diluído em água peptonada e semeado com auxílio da alça de Drigalski (figura 16).

Todo o procedimento experimental foi realizado em cabine de biossegurança Classe II, previamente limpa e esterilizada.

Para as placas contendo Ágar Sabouraud foram semeados 500µL do extrato sem diluição pela técnica de esgotamento com auxilio de um *swab*.

As placas com os meios PCA, Cetrimid, Baird-Parker (figura 17) e os tubos com caldo EC (figura 18) contendo as amostras de extrato foram incubados em estufa bacteriológica a 37ºC, sendo as leituras realizadas após 24 e 48 horas. As placas semeadas em Ágar Saboraud foram deixadas invertidas em temperatura ambiente e as leituras foram realizadas após 07 dias. Para cada meio de cultura, foram realizadas duplicatas, além do controle negativo.

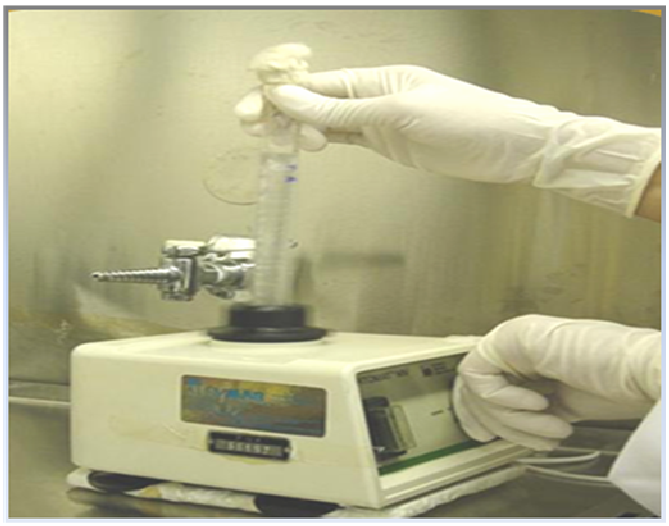


Figura 15 - Homogeneização da solução

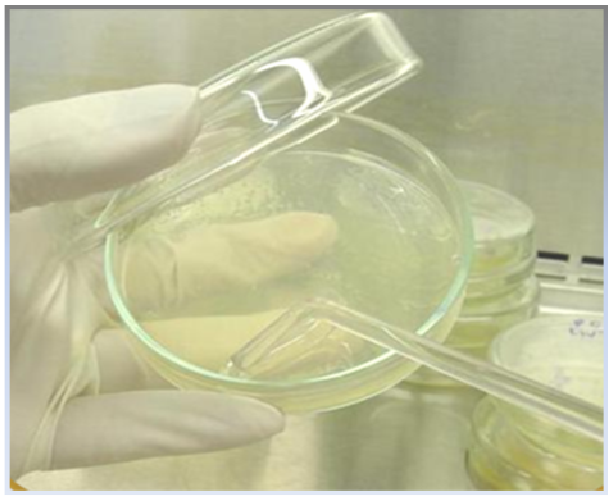


Figura 16 – Semeadura

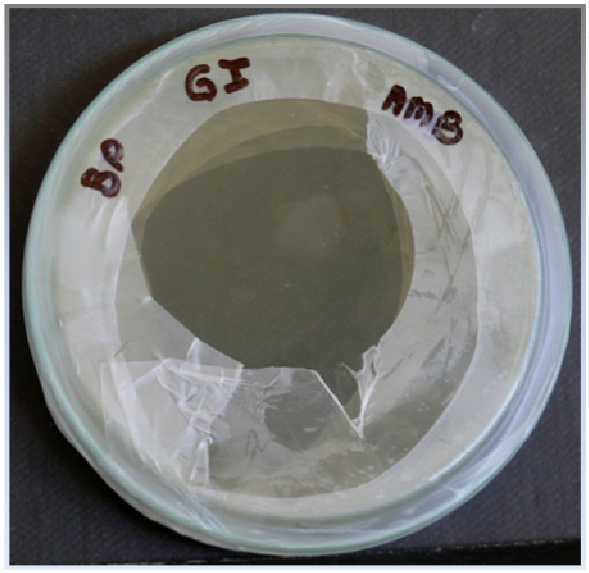


Figura 17 – Placa de Petri contendo meio + EEP diluído

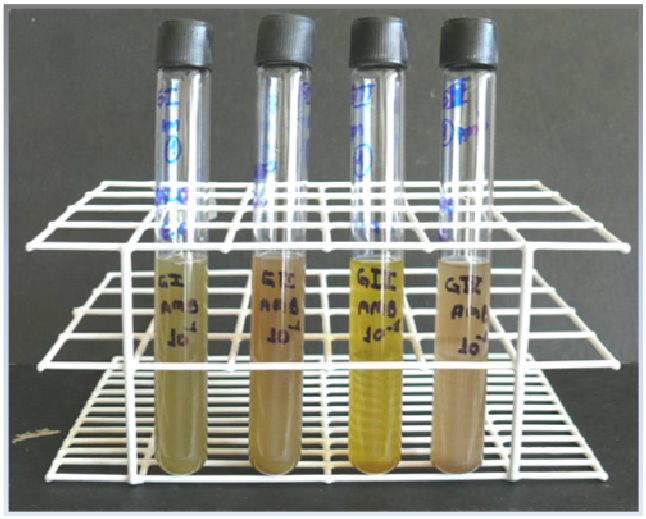


Figura 18 - Caldo E.C + tubos de Duhan invertidos

4.13)Avaliação da alteração de cor do extrato de própolis em dentes humanos

4.13.1)Confecção de corpos-de-prova

A confecção dos corpos-de-prova seguiu a metodologia proposta por Fushida e Cury (1999).

Nesse estudo foram utilizadas 92 coroas de molares e pré-molares humanos hígidos. Após a exodontia, os dentes foram armazenados em formol 2%, pH 7, durante 30 dias. A coroa foi separada da raiz ao nível da junção amelo-cementária, com o auxílio de um disco de diamante.

Para a confecção dos corpos-de-prova de esmalte e dentina foi utilizada uma cortadeira (Marca Mecatome, modelo P100, Grenoble-França) ajustada com dois discos diamantados dupla face, separados por um espaçador de 4 mm. As coroas foram fixadas com a face seccionada voltada para o acrílico, visando paralelismo. Foram realizados cortes no sentido transversal para obtenção do esmalte vestibular e da dentina coronária (figuras 19 e 20.). Cada corpo-de-prova (esmalte e dentina) foi armazenado em recipientes individuais contendo água deionizada e mantido a temperatura de 37ºC.

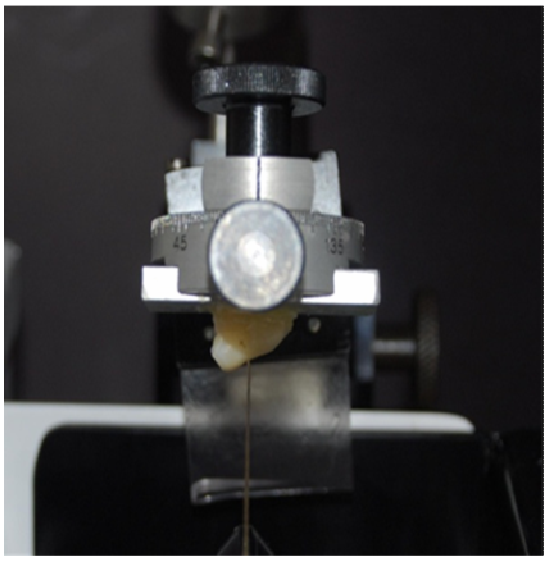


Figura 19 - Primeiro corte do CP no sentido mésio-distal

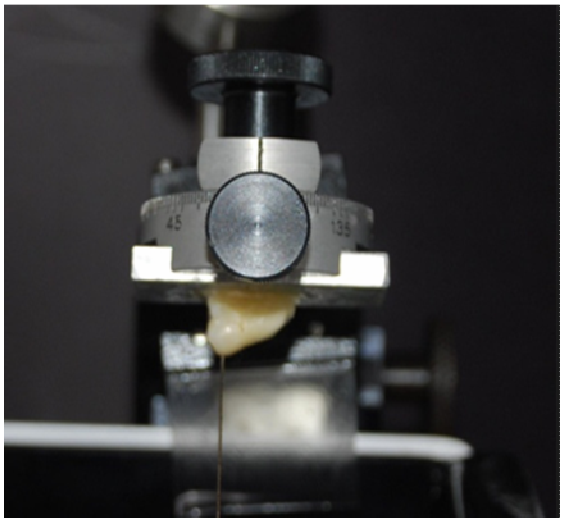


Figura 20 - Segundo corte do CP no sentido mésio-distal (4mm de distância)

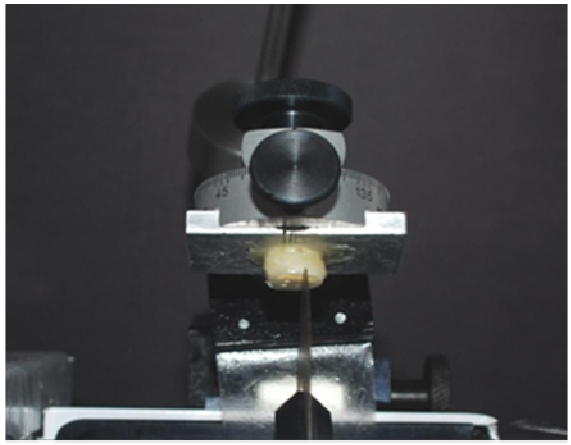


Figura 21 - Primeiro corte para confecção do CP no sentido longitudinal

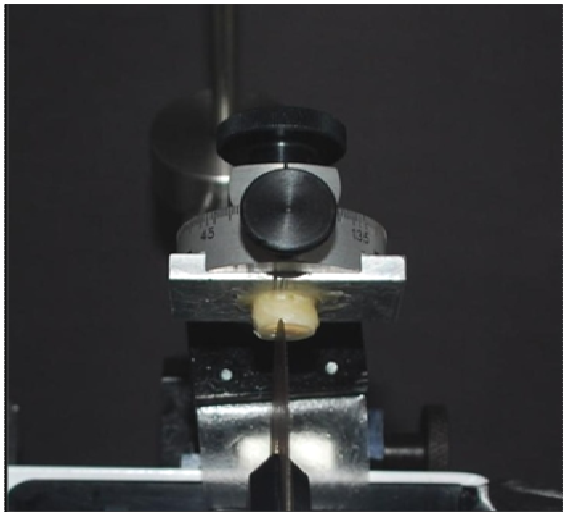


Figura 22 - Segundo corte para confecção do CP sentido longitudinal (4mm de distância)

4.13.2)Registro fotográfico da cor inicial dos corpos-de-prova

Seguindo a metodologia proposta por Costa e Silva, Parente e Bandeira (2007), inicialmente foram realizados os registros da cor no tempo inicial (T0), antes da imersão dos corpos-de-prova nas soluções teste. Para realizar o registro da cor foi utilizada uma máquina fotográfica de alta resolução, marca Canon, modelo EOS Rebel XTi 10 megapixels acoplada a um estativo, previamente fabricado, visando a padronização dos registros fotográficos (figura 23/a), e uma matriz confeccionada em papel adesivo de cor preta e textura fosca, perfurada em formato de um quadrado com dimensões de 2mm X 2mm, onde os corpos-de-prova foram encaixados (figura 23/b) e distribuídos de acordo com os grupos experimentais, conforme tabela 1.

Tempo/ Grupo	**15 segundos (T15)**	**30 segundos (T30)**	**10 minutos (T10´)**
Grupo I	15 corpos-de-prova de esmalte imersos no extrato de própolis I	15 corpos-de-prova de esmalte imersos no extrato de própolis I	15 corpos-de-prova de esmalte imersos no extrato de própolis I
Grupo II	15 corpos-de-prova de dentina imersos no extrato de própolis I	15 corpos-de-prova de dentina imersos no extrato de própolis I	15 corpos-de-prova de dentina imersos no extrato de própolis I
Grupo III	15 corpos-de-prova de esmalte imersos no extrato de própolis II	15 corpos-de-prova de esmalte imersos no extrato de própolis II	15 corpos-de-prova de esmalte imersos no extrato de própolis II
Grupo IV	15 corpos-de-prova de dentina imersos no extrato de própolis II	15 corpos-de-prova de dentina imersos no extrato de própolis II	15 corpos-de-prova de dentina imersos no extrato de própolis II
Grupo V	15 corpos-de-prova de esmalte imersos em clorexidina a 2%	15 corpos-de-prova de esmalte imersos em clorexidina a 2%	15 corpos-de-prova de esmalte imersos em clorexidina a 2%
Grupo VI	15 corpos-de-prova de dentina imersos em clorexidina a 2%	15 corpos-de-prova de dentina imersos em clorexidina a 2%	15 corpos-de-prova de dentina imersos em clorexidina a 2%
GrupoVII	15 corpos-de-prova de esmalte imersos em água destilada	15 corpos-de-prova de esmalte imersos em água destilada	15 corpos-de-prova de esmalte imersos em água destilada
GrupoVIII	15 corpos-de-prova de dentina imersos em água destilada	15 corpos-de-prova de dentina imersos em água destilada	15 corpos-de-prova de dentina imersos em água destilada

Tabela 1: Grupos experimentais e diferentes tempos de imersão nas soluções teste.

4.13.3)Imersão dos corpos-de-prova nas soluções testes

Após registro inicial da cor (T0), os corpos-de-prova, de acordo com os grupos experimentais, ficaram imersos nas soluções (figura 24) durante 15 segundos (T15), 30 segundos (T30) ou 10 minutos (T10) de acordo com os grupos experimentais e, em seguida, novos registros fotográficos foram realizados ao final de cada período experimental (PRADO, PORTO, 2000)

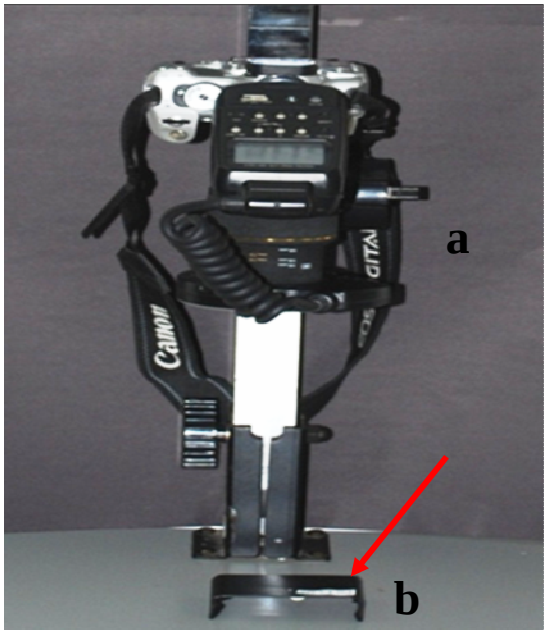


Figura 23 (a/b) - Máquina fotográfica estabilizada para padronização dos registros fotográficos (a) e matriz confeccionada em papel adesivo de cor preta e textura fosca (seta indicativa, b)

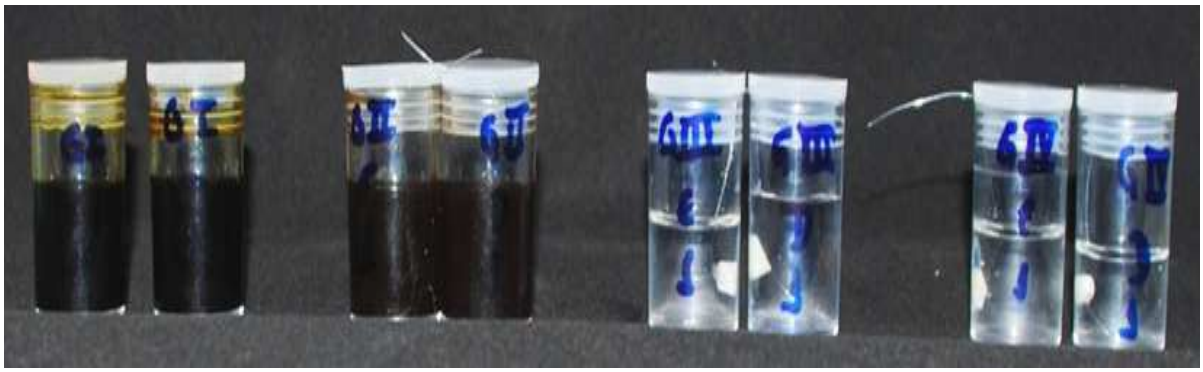
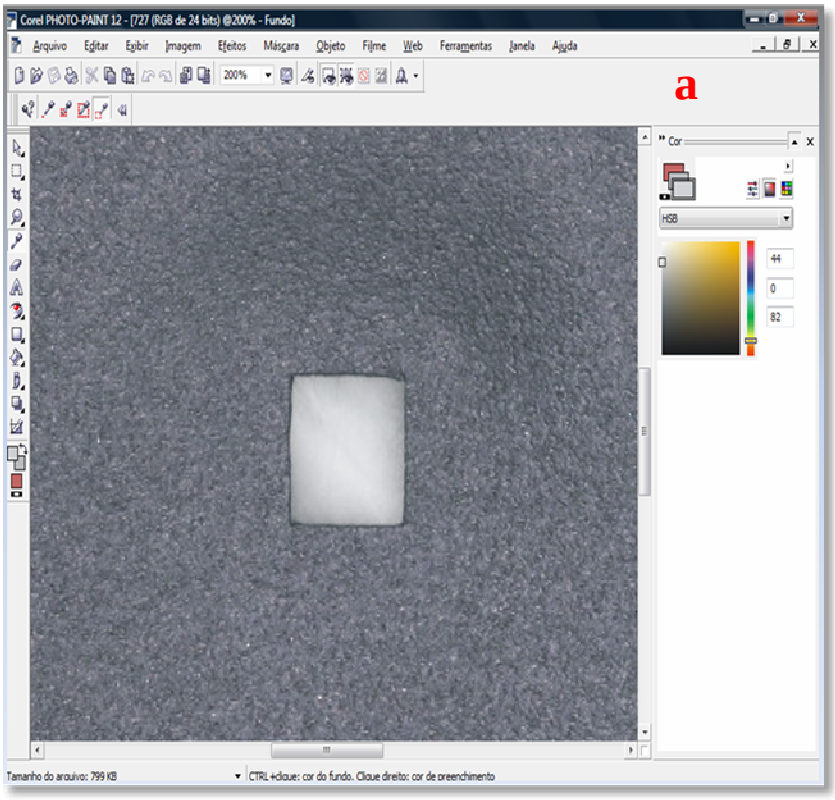


Figura 24 - Imersão dos corpos-de-prova nas soluções teste (GI, GII, GIII e GIV)

4.13.4)Leitura de cor

As imagens fotográficas foram digitalizadas e a análise foi executada no programa *Corel PHOTO-PAINT 12* para a identificação das cores inicial (T0), após 15 segundos (T15), 30 segundos (T30) e 10 minutos (T10') de cada corpo-de-prova. Essa identificação foi realizada através do sistema *HSB* de descrição de cores (figuras 25 a\b). Cada propriedade do sistema (matiz, saturação e brilho) foi determinada em porcentagens, as quais foram padronizadas em cores presentes na escala Vita universal, ao comparar os valores determinados pelo programa dos corpos-de-prova com os valores das cores já existentes na escala. Dessa maneira foi possível descrever uma análise final em linguagem odontológica familiar. Os testes foram realizados com cinco repetições, contendo cinco fotos de cada corpo-de-prova em cada período experimental.



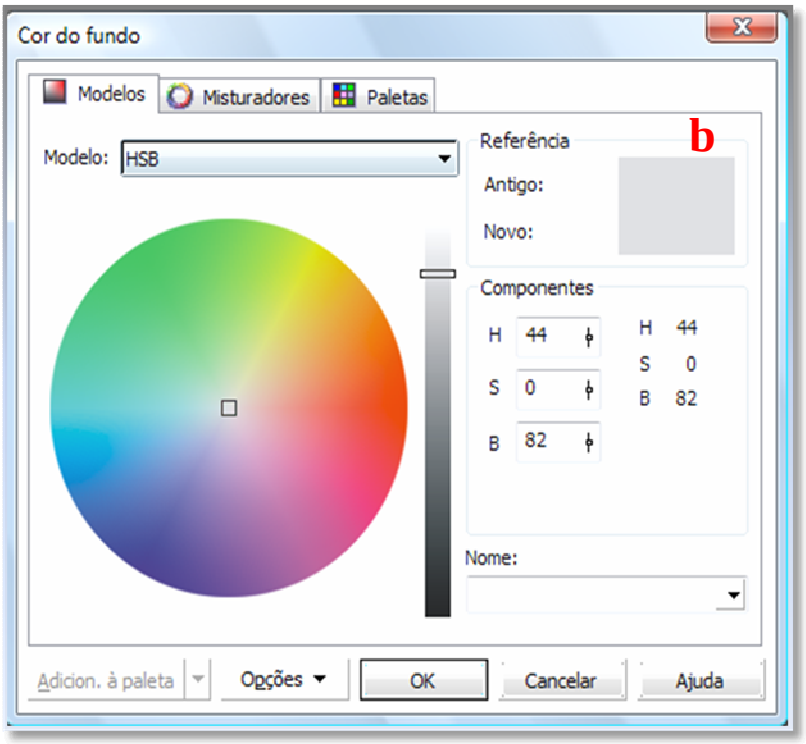


Figura 25 (a/b) - Sistema *HSB*

4.14)Citotoxicidade

4.14.1)Teste de *Artemia franciscana*

Para eclosão dos cistos foram adicionados 0,2 mg de cistos de *Artemia franciscana* (figura 26) (MARAMAR®) em placa de Petri (90mm x 15mm) contendo 100mL de solução salina (água do mar artificial) a 35% (figura 27). As placas foram cobertas com papel de filtro e ficaram expostas a uma temperatura de ± 25 a 28ºC, a uma distância de 50 cm de uma lâmpada fluorescente (40 *watts*) recebendo contínua luminosidade por 48 horas (MEYER, 1982).

Figura 26 - cistos de *Artemia*

Figura 27 – cistos em solução salina a 35%

Figura 28 - *Artemia franciscana*
Fonte: Retirado de < www.wikipedia.org>, acesso em 10/01/2009

4.14.2)Ensaio da toxidez dos extratos frente à *Artemia franciscana*

Após o período de eclosão dos cistos, em uma placa de multipoços (4x6) foram adicionados 1.800 mL de solução de água do mar artificial (salina 35%) e inseridos (em cada poço), com auxilio de uma pipeta de Pasteur, 10 náuplios de *Artemia franciscana* (figura 29). Em seguida, 20µL do extrato foram adicionados aos poços, ficando incubados por 24 horas à temperatura ambiente, protegido de luminosidade, sendo este procedimento desenvolvido em triplicata. O controle negativo seguiu o mesmo procedimento, porém utilizando-se 20µL de DMSO sem adição do extrato.

A taxa de mortalidade foi determinada em percentual de mortalidade (%M) = (número de indivíduos mortos x 100) ÷ número total de indivíduos. Em relação ao grau de toxidade, este foi classificado de acordo a mortalidade observada: 0-9% = não tóxico (NT); 10-49 = ligeiramente tóxico (LT); 50-89% = tóxico (T); 90-100% = altamente tóxico (AT) (FORGIARINI, 2006).

A porcentagem de mortalidade (% M) foi estimada como: % M = porcentagem de sobreviventes no controle – a porcentagem de sobreviventes com composto teste (CARBALLO et al, 2002).

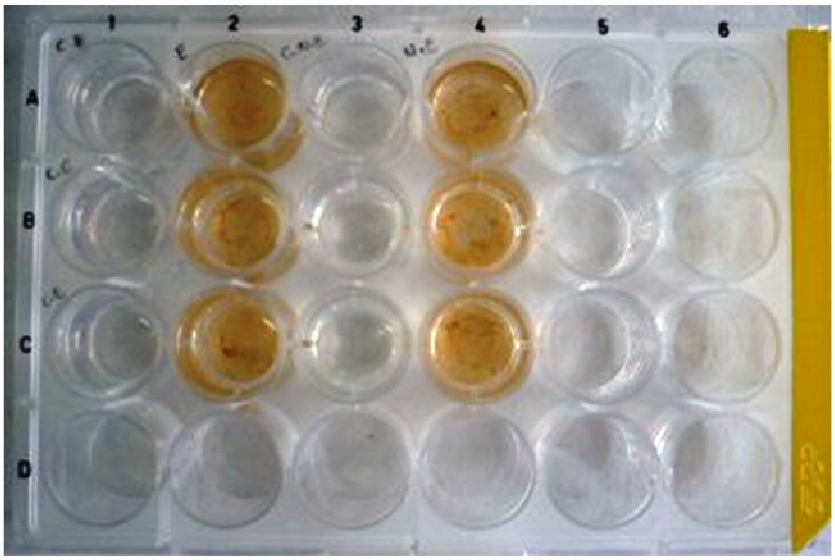


Figura 29 - Placa multipoços contendo náuplios e substância teste

4.15)Avaliação da biocompatibilidade da própolis em molares de ratos

Os estudos relacionados à biocompatibilidade da própolis seguiram a metodologia emprega por Bandeira et al (1998).

4.15.1)Animais de experimentação

A avaliação da biocompatibilidade foi realizada no Biotério do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA. Foram empregados 11 ratos. Como critérios de inclusão, foram considerados os seguintes padrões: ratos machos do tipo *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, adultos jovens, pesando em média 180 a 300 gramas, com idade aproximada de 90 dias. Os animais foram distribuídos em grupos conforme a substância utilizada no capeamento pulpar (própolis I, própolis II e pasta de hidróxido de cálcio) e tempo de avaliação de 07, 15 e 30 dias (quadro 01).

Grupo	**Substância**	**Tempo**	**Tempo**	**Tempo**
		07 dias	15 dias	30 dias
I	Própolis I	5	3	2
II	Própolis II	4	2	2
III (controle)	Pasta de Ca $(OH)_2$	1	-	1

Quadro 01- Grupos divididos conforme substâncias teste e período experimental

Figura 30 – Esquema mostrando o rodízio realizado nos animais (GI=própolis I, GII=própolis II, GIII=pasta de hidróxido de cálcio-controle) (Bandeira, 1998)

4.15.2)Elementos dentários

Os elementos dentários que receberam o capeamento pulpar associado à restauração de amálgama foram os primeiros molares superiores (direto e esquerdo), sendo que cada animal apresentou em cada hemi-maxila uma determinada substância teste (figura 30).

4.15.3)Preparo dos animais

Os animais foram pesados (figura 31) e em seguida, anestesiados (figura 32) através de injeção intraperitonial de hidrato de cloral a 10% (Biomedicinal, Manaus-AM), sendo a dosagem utilizada de 0,4 mL por cada 100 gramas de peso corporal. Após anestesia, os animais foram fixados em mesa operatória previamente idealizada nesta pesquisa (figura 33).

Realizou-se a antissepsia da cavidade oral dos animais com solução de clorexidina a 2%, embebida em cotonete, visando reduzir quantitativamente os microrganismos. Devido à impossibilidade da utilização do isolamento absoluto, foi realizado isolamento relativo, utilizando cones de papel (Marca Dentsply, segunda série), previamente cortados e adaptados corretamente entre a mucosa julgal, face vestibular e lingual dos elementos dentários dos animais.

4.15.4)Técnica operatória

O preparo cavitário foi realizado na face oclusal do primeiro molar superior na fóssula mesial, inicialmente utilizando uma broca cone invertida n◦33 ½ (marca KG Sorense). A instrumentação da cavidade foi realizada manualmente, com uma adaptação na haste da broca com resina acrílica, aumentando o comprimento, a fim de facilitar os movimentos oscilatórios para abertura. Durante a confecção do preparo cavitário (figura 35), ao ser observada a proximidade da câmara pulpar, optou-se por utilizar um trépano especial de ponta afilada para realização da exposição pulpar (figura 36). Após exposta, a cavidade foi irrigada com soro fisiológico (figura 37), controlando a hemorragia pulpar com auxilio de cones de papel absorvente esterilizados. O capeamento pulpar foi realizado ao se conseguir hemostasia na área da exposição.

Para utilização do extrato de própolis na avaliação de biocompatibilidade foi efetuada a evaporação o álcool em temperatura ambiente, em frasco de vidro coberto suavemente com gaze esterilizada (figura 38).

Após a exposição pulpar, alternadamente em sistema de rodízio (figura 30), as substâncias própolis I, própolis II e pasta de hidróxido de cálcio (grupo controle) foram aplicadas suavemente sobre a exposição pulpar (figura 39). Em seguida, os elementos dentários foram restaurados com amálgama (figura 41). Os animais foram identificados com numeração na cauda e mantidos em total recuperação. Posteriormente, foram colocados em gaiolas individuais, recebendo cuidados de higiene e alimentados com ração balanceada (LABINA - Nestlé Purina PetCareCompany) e água “ad libitum” até que completassem os períodos experimentais.

Figura 31 - Pesagem dos animais

Figura 32 - Anestesia intra-peritoneal

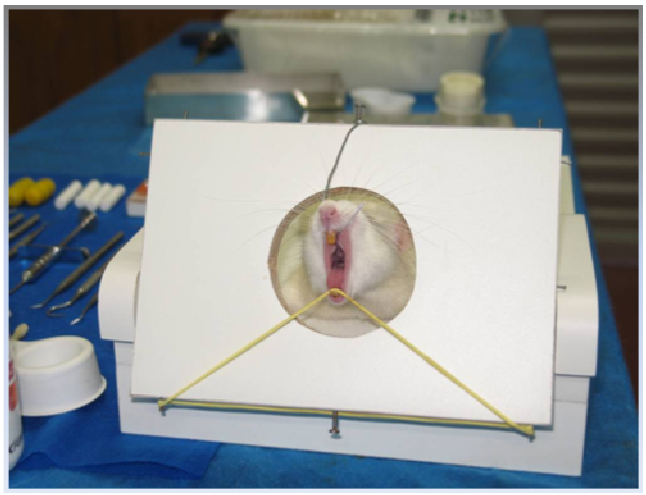


Figura 33 - Posicionamento do animal na mesa operatória

Figura 34 - Mesa operatória

Figura 35 – Confecção do preparo cavitário

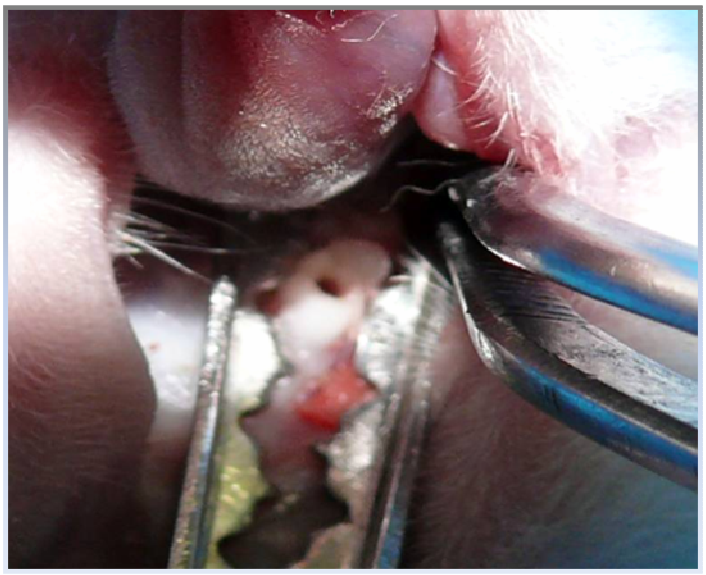


Figura 36 - Exposição pulpar

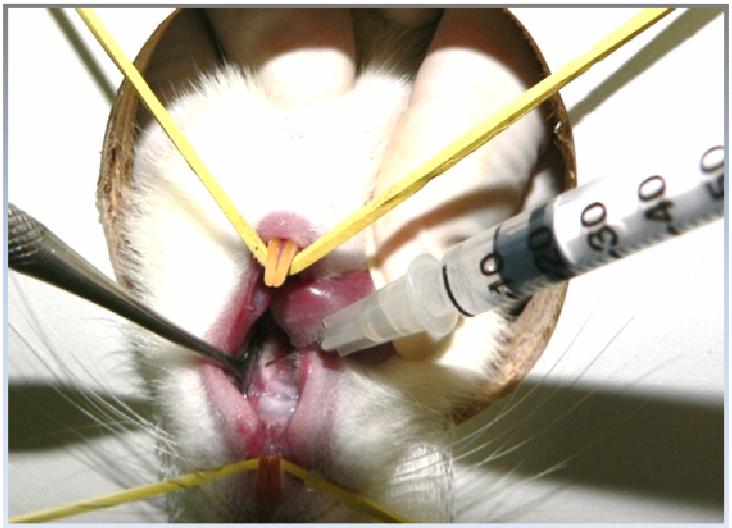


Figura 37 - Irrigação com soro fisiológico

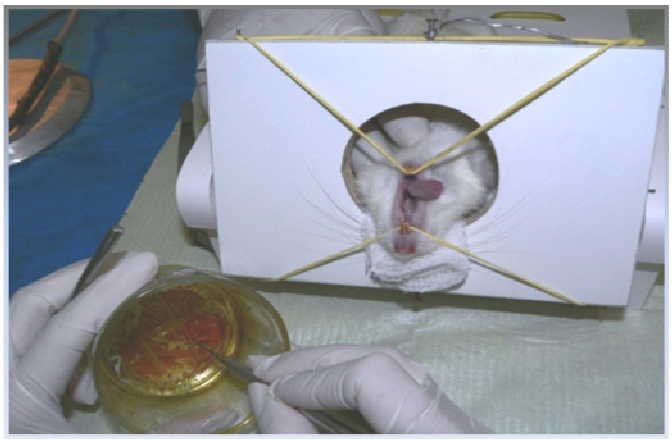


Figura 38 – Própolis após evaporação do álcool

Figura 39 - Inserção da substância teste

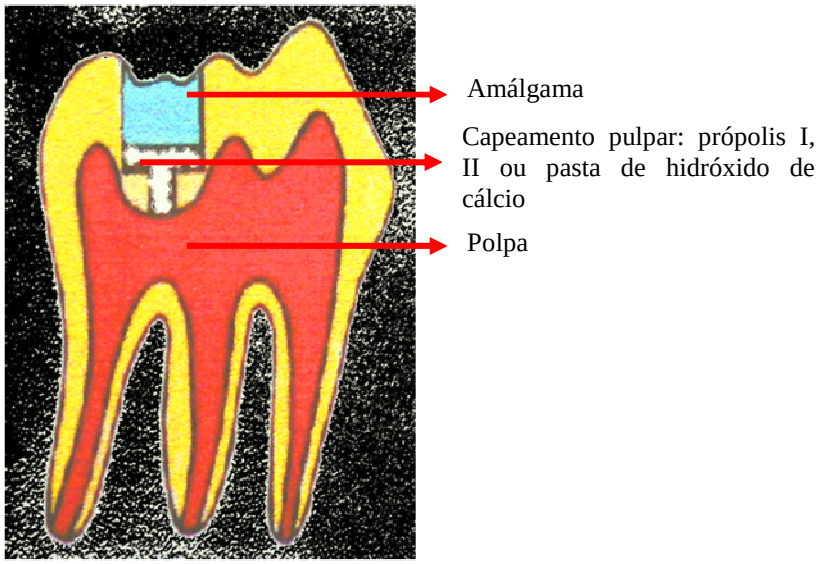


Figura 40 - Esquema do tratamento realizado

Figura 41 – Confecção da restauração em amálgama

4.15.5)Controle pós-operatório

O estado geral dos animais foi avaliado diariamente e, a cada 5 dias, foram avaliadas as condições do selamento cavitário através do exame minucioso dos molares utilizados no experimento mediante sedação. Os elementos dentários em que o material restaurador não permaneceu na cavidade foram descartados da pesquisa.

4.15.6) Preparo histopatológico

Decorridos os períodos experimentais, os animais foram anestesiados e seus maxilares removidos, recortados (em hemi-maxilas) e imediatamente imersos para fixação em formol a 10% por 48 horas, em frascos rotulados com identificação do material e período experimental.

As peças foram lavadas por 24 horas em água corrente e desmineralizadas com solução preconizada por Morse (1945), constituída por ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20%, em partes iguais, durante 18 dias. A descalcificação foi considerada satisfatória no

momento em que foi possível a introdução de uma agulha de insulina no dente ao lado daquele tratado. Após descalcificadas as peças, o amálgama utilizado no selamento cavitário foi removido com sonda exploradora. As peças foram clivadas (permanecendo o primeiro, segundo e terceiro molar), inseridas em megacassetes, identificadas e lavadas em água corrente por 24 horas. Em seguida, foi realizada a neutralização dos espécimes, através da imersão em sulfato de sódio 5% durante 4 dias. As peças foram lavadas novamente em água corrente durante 24 horas e imersas em álcool 70% por 24 horas.

Os espécimes obtidos sofreram tramitação laboratorial de rotina, sendo desidratados em alcoóis de concentração crescente, diafanizados em xilol e impregnados em parafina no processador histotécnico (Lupe, processador automático de tecidos Lupe, SP, Brasil). Em seguida, foram levadas à estufa (modelo 099EV, Fanem, São Paulo-SP) com adaptação de bomba a vácuo (marca Quimis aparelhos científicos Ltda, Diadema, São Paulo), a 60°C durante 2 horas. 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, MJ62, Metalúrgica OMA Ltda, São Paulo). As fitas foram colocadas sobre as lâminas, para posterior coloração.

As técnicas de coloração utilizadas foram hematoxicilina/eosina, permitindo a avaliação dos espécimes em microscopia ótica comum (BAUER, AL-RUBAYI, 1987). Para desparafinizar e hidratar, 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.

Figura 42 - Biópsia separando a maxila em duas hemi-arcadas

4.15.7)Análise histopatológica

A análise histológica foi realizada através da análise qualitativa dos eventos histológicos, relatando se houve ou não inflamação, tipo de inflamação (aguda ou crônica) bem como, quando possível, o grau de inflamação (leve, moderada ou intensa). Analisou-se

também, a formação fibrosa através da proliferação fibroblástica e deposição de colágeno, bem como a formação de calcificação e barreira mineralizada.

5.0)ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados da alteração de cor do presente trabalho foi realizada através do delineamento de parcela sub-dividida no tempo não-paramétrico. No tempo inicial (padrão) foi feita análise não paramétrica utilizando o teste de Kruskal-Wallis. A comparação de médias foi realizada utilizando teste t para pares de médias. Em todos os testes foi considerado $p< 0,05$.

Os testes biológicos foram analisados através da descrição dos resultados.

6.0)RESULTADOS E DISCUSSÃO

É imprescindível que qualquer medicamento cumpra os requisitos básicos de eficácia, segurança e qualidade. Para tal, é necessário o controle através de uma gama de testes em que, sem dúvida, se insere a avaliação do controle microbiológico. Na literatura são escassas as publicações referentes a esse tema específico (SANTOS, OLIVEIRA, TOMASSINI, 1995).

A presença de contaminantes biológicos em um produto pode interferir na sua estabilidade físico-química, mesmo não havendo alteração do teor do princípio ativo, pode ocorrer mudança de cor, odor ou pH. Portanto, ainda em produtos não-estéreis há necessidade de se estabelecer padrões qualitativos e quantitativos de microrganismos presentes na amostra, a fim de assegurar a estabilidade do produto durante o prazo de validade, de modo a garantir inocuidade e eficácia terapêutica ao paciente (OHARA, SAITO, 1984).

Além de interferir na estabilidade físico-química do produto, a presença de cepas patogênicas representa potencial risco de aquisição de quadro clínico infeccioso ou de transferência de toxinas igualmente indesejáveis (PINTO et al, 2000).

Os resultados da avaliação da estabilidade microbiológica estão apresentados na tabela 2. Tais resultados foram analisados levando em consideração a amostra da solução de própolis (I, II, III e IV), diferentes locais de armazenamento e períodos experimentais.

Tratamento	Local	Período Experimental					
		0	7	15	30	45	90
Própolis I	Estufa	A	A	A	A	A	A
	Geladeira	A	A	A	A	A	A
	Ambiente	A	A	A	A	A	A
Própolis II	Estufa	A	A	A	A	A	A
	Geladeira	A	A	A	A	A	A
	Ambiente	A	A	A	A	A	A
Própolis III	Estufa	A	A	A	A	A	A
	Geladeira	A	A	A	A	A	A
	Ambiente	A	A	A	A	A	A
Própolis IV	Estufa	A	A	A	A	A	A
	Geladeira	A	A	A	A	A	A
	Ambiente	A	A	A	A	A	A

A= ausência de contaminação; P= presença de contaminação

Tabela 2 - avaliação microbiológica do extrato de própolis I de acordo com os locais de armazenamento e períodos experimentais.

Os testes do controle microbiológico foram realizados em duplicata, analisando os resultados obtidos observou-se ausência de crescimento de colônias de bactérias, fungos e leveduras nos diferentes meios de cultura e diferentes tempos e condições de armazenamento de EEP. Resultados semelhantes foram observados em um estudo avaliando a contaminação de um gel à base de óleo de Copaíba, fitoterápico proveniente da Amazônia (SIMÕES, 2006).

Os materiais vegetais contêm um grande número de fungos e bactérias que são pertencentes a sua microbiota natural ou mesmo introduzidos durante a manipulação, contaminação esta que pode ser intensificada com o tempo (MIGLIATO et al, 2007). No entanto, no presente estudo, observou-se a ausência de contaminação em todos os períodos

experimentais, podendo ser resultado das boas práticas na coleta e manipulação, ou relacionado à ação antimicrobiana da própolis.

Medeiros et al (2007), ao avaliar a qualidade de produtos farmacêuticos comercializados por farmácias de manipulação, observaram que 45,5% das amostras estudadas apresentaram valores para contagem de microrganismos dentro dos limites especificados pela Farmacopéia Brasileira IV edição. Dentre as amostras testadas, o xarope de acerola, constituído por extrato fluido de acerola, própolis e mel de abelha, não apresentou contaminação. Segundo os autores, tal resultado provavelmente ocorreu devido à presença do mel de abelha e da própolis, substâncias comprovadamente antimicrobianas.

Dozic et al (2004) e Volpato et al (2005) 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, limitações do olho e cérebro humano.

Da Silva et al (2008) afirmaram que um dente é composto por camadas estratiformes e semi-translúcidas de esmalte e dentina que absorvem, refletem, transmitem ou refratem parte da luz incidente, assim produzindo a cor do dente.

A cor do dente pode ser mensurada pela avaliação visual, através de colorímetro, espectrofotômetro e mesmo através de câmeras digitais (DOZIC et al, 2004). Jendresen et al (1998), Tung et al (2002), Volpato, Baratieri e Monteiro Júnior (2005), Paravina, Ontiveiros e Powers (2002) afirmaram que a avaliação de cor pela comparação visual humana tem demonstrado ser inexata pelas inconsistências na percepção de cor entre observadores. Segundo tais autores, as mensurações instrumentais podem quantificar a cor e fazer com que a comunicação entre profissionais seja mais uniforme e precisa.

Smith et al (2008) demonstraram em seu estudo que o sistema digital baseado em câmera móvel, sem contato, demonstrou ser um reproduzível meio de medir cor de dentes tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Dozic et al (2004) afirmaram que a maioria dos instrumentos para a mensuração da cor do dente são mais exatos quando utilizados *in vitro* do que *in vivo*, e que espectrofotômetros e câmeras digitais são significantemente mais consistentes do que colorímetros.

TEMPO	TRATAMENTO	ESMALTE			DENTINA		
		H	S	B	H	S	B
T15 segundos	Própolis I	-155,04a	9,44 a	-11,40 a	3,84 a	8,36 b	-6,44 a
	Própolis II	-59,08 b	-0,12 b	-9,36 ab	-0,28 a	1,28 a	-4,44 a
	Clorexidina	-23,00 b	1,96 a	-1,64 b	-10,96a	3,24 a	-0,64 a
	Água Destilada	-39,04 b	-0,12 b	-5,36 b	8,56 a	0,16 a	-8,32 a
T30 segundos	Própolis I	-104,68a	1,64 a	-9,84 a	-4,04 a	5,56 a	-4,52 a
	Própolis II	12,00 b	1,28 a	-6,12 a	-2,96 a	0,96 a	-3,84 a
	Clorexidina	-117,04a	-1,00 a	-3,44 a	2,80 a	-1,64 a	2,40 a
	Água Destilada	-21,88 b	0,64 a	-4,80 a	-0,92 a	0,52 a	-12,72 b
T10 minutos	Própolis I	149,00b	9,48 b	-6,72 a	-3,64ab	27,24 b	-5,60 a
	Própolis II	-22,92 a	2,88 ab	-2,40 a	-11,84a	13,64 a	3,20 a
	Clorexidina	-53,08 a	-0,80 a	3,12 a	-29,60a	3,04 c	6,12 a
	Água Destilada	-18,16 a	-0,36 a	4,04 a	5,80 b	-2,0 c	2,88 a

média seguida por letras distintas diferem entre si no nível de significância de 5%

Tabela 3 - Comparação de médias entre tratamentos, em cada tempo avaliado.

A tabela 3 demonstra a diferença de matiz inicial e final dos corpos-de-prova de esmalte em imersão durante 15 segundos. Pode-se notar que não foi significativa a diferença entre o tratamento com clorexidina, água destilada e própolis II, sendo a própolis I, o tratamento que causou maior alteração cromática. A média de saturação da própolis II foi muito pequena, semelhante a da água destilada. Já a própolis I foi a que apresentou maior

média de saturação, porém foi estatisticamente semelhante à da clorexidina. Houve uma diminuição de brilho referente a todos os tratamentos, no entanto, a clorexidina, a água destilada e própolis II apresentaram as menores médias, não diferindo estatisticamente, enquanto que a própolis I mostrou a maior média.

Analisando os corpos-de-prova de esmalte no tempo experimental de 30 segundos é possível observar que a maior diferença de matiz ocorreu com a clorexidina e própolis I. Já a água destilada e a própolis II apresentaram as menores diferenças e não diferiram estatisticamente. Em relação à saturação, não houve diferença entre as soluções. O brilho diminuiu com o tratamento em todas as soluções, porém não houve diferença entre elas.

Avaliando os corpos-de-prova de esmalte no tempo experimental de 10 minutos foi observado que a própolis I foi a solução que apresentou maior média no matiz, enquanto que a própolis II, a clorexidina e a água destilada apresentaram os menores valores, sem diferença significativa entre elas. Referente à saturação, a própolis I foi a que apresentou a maior média sendo semelhante à própolis II que, por sua vez, também se equiparou à clorexidina e à água destilada. Em relação ao brilho, todos se apresentaram estatisticamente semelhantes.

Observando os corpos-de-prova de dentina que ficaram imersos durante 15 segundos foi possível notar que a solução que apresentou maior média de matiz foi a clorexidina, apresentando um valor negativo, ou seja, descolorindo os corpos-de-prova. Já a própolis II foi o tratamento que menos divergiu de cor, porém, estatisticamente não houve diferença entre nenhuma das soluções. A média da saturação da solução de própolis II apresentou-se estatisticamente semelhante à água destilada e à clorexidina, divergindo apenas da própolis I que demonstrou o maior aumento. Com relação ao brilho, não houve diferença estatística entre as soluções.

Nos corpos-de-prova de dentina imersos durante 30 segundos não houve diferença significativa no matiz entre as soluções em estudo. Analisando a saturação, a maior média foi

a da própolis I, enquanto que as menores foram a própolis II e água destilada, porém estatisticamente todas as soluções apresentaram respostas semelhantes. Observou-se diminuição no brilho nos corpos-de-prova imersos em água destilada, própolis I e própolis II e aumento no da clorexidina, porém estatisticamente a única solução que diferiu das demais foi a água destilada, demonstrando a maior média.

No tempo experimental referente a 10 minutos pôde-se observar que a solução que mais alterou o matiz dos corpos-de-prova de dentina foi a clorexidina, seguida da própolis II, própolis I e então, água destilada. Não houve diferença significativa entre a clorexidina, própolis I e própolis II, da mesma forma que enquanto a própolis I também foi similar ao resultado da água destilada. Com relação à saturação, a maior média foi da própolis I seguida pela própolis II e, igualmente com menor saturação, foi a clorexidina e a água destilada, que não apresentaram diferença entre si. Em relação ao brilho houve um aumento deste nas soluções de clorexidina, água destilada e própolis II e uma diminuição na solução de própolis I, porém tais valores foram estatisticamente similares.

Uma solução destinada à limpeza de cavidades permanece em contato com o tecido dentário por no máximo 15 segundos, o que torna o resultado do tempo experimental T15 o mais relevante. A própolis I foi a solução que apresentou a maior média de alteração. A própolis II teve um comportamento semelhante ao da clorexidina que é a solução de escolha para limpeza de cavidades rasas e médias. Segundo Conceição et al (2000) e Nagem Filho (1985), a clorexidina tem sido empregada largamente como solução desinfetante, crescendo em popularidade devido sua capacidade de reduzir microrganismos e substantividade.

A água destilada, na maioria dos tempos experimentais e tecido dentários, conferiu diminuição no brilho dos cp, aumentando sua opacidade, fato que está de acordo com os achados de Mayekar (2001) e Smith et al (2008), que demonstraram que quando há uma desidratação do dente ele aparenta estar mais branco. Maixner e Susin (2001), Vichi, Ferrari e

Davidson (2004) e Costa-e-Silva, Parente e Bandeira (2007) demonstraram, em estudos envolvendo resinas compostas, que a água atua como um agente descolorante, aumentando a opacidade do material, situação esta observada na presente pesquisa.

Comparando as soluções teste em ordem decrescente de alteração cromática no tempo de 15 segundos observou-se: própolis I, clorexidina, e no mesmo nível, própolis II e água destilada; no tempo de 30 segundos: água destilada, própolis I, própolis II e clorexidina, sendo os três últimos em níveis semelhantes; em 10 minutos: própolis I, própolis II, clorexidina e água destilada.

Kugel et al (2006) afirmaram que os dentes extraídos utilizados em pesquisas *in vitro* são privados do fluido dentinário e provavelmente tal situação permitiu que o agente clareador permeasse o dente mais eficazmente do que se fosse um estudo *in vivo.* Semelhante pode ter acontecido no presente estudo, onde a ausência dos fluidos dentinários pode ter permitido uma maior infiltração das soluções teste, e conseqüentemente, maior manchamento ou descoloração, quando comparado a um dente vital.

Cavalcante et al (2000) citaram em seu trabalho que a letalidade da *A.salina* permite a avaliação da toxicidade geral, ou seja, o monitoramento da resposta biológica dos compostos em estudo.

Os resultados obtidos na presente pesquisa confirmaram que a *Artemia franciscana* foi sensível a 100% dos extratos testados, tanto em relação à própolis I quanto em relação à própolis II. Dessa forma, observou-se que os extratos testados com base na taxa de mortalidade de *A. fransciscana* foram classificados em AT (altamente tóxico) (100%), mostrando sua propriedade biológica.

O bioensaio de *Artemia franciscana* é simples, rápido, prático e permite que um grande número de amostras sejam processadas adequadamente. Além do que, estes bioensaios

são úteis para avaliar a exposição de uma grande variedade de extratos: microbiana, animal, vegetal ou mineral (RICE, MANESS, 2006).

Este teste vem se popularizando no meio científico devido ao seu baixo custo para implantação e manutenção de culturas, além disso, foi mostrada uma importante correlação através de testes *in vivo* com vários extratos de plantas e testes *in vitro* ($r = 0.85$, $p < 0,05$), e concluíram que o bioensaio com *Artemia salina* foi uma ferramenta mais vantajosa para predizer uma toxicidade oral aguda dos extratos de plantas (PARRA et al, 2001).

Artemia pode ser utilizada sozinha, como uma única espécie de teste de toxicidade ou combinada com outros estudos simultaneamente (NUNES et al, 2005).

Favilla (2006) utilizou em seus estudos o teste de *A. salina* para analisar agentes fúngicos biocontrolados (BCAs) e demonstrou que *A.salina* mostrou-se sensível a todas toxinas analisadas com exceção do *Oosporein* (OOS). O mesmo ocorreu com Pelka et al (1999) que em estudos testando materiais dentários (Arabesk®, Solitaire®, Pertac II®, Tetric®,Herculite®, Dyract®, Hytac®, e Compoglass®) observaram que após 24 horas todos os materiais mostraram 100% de letalidade como mostrou o presente trabalho com própolis.

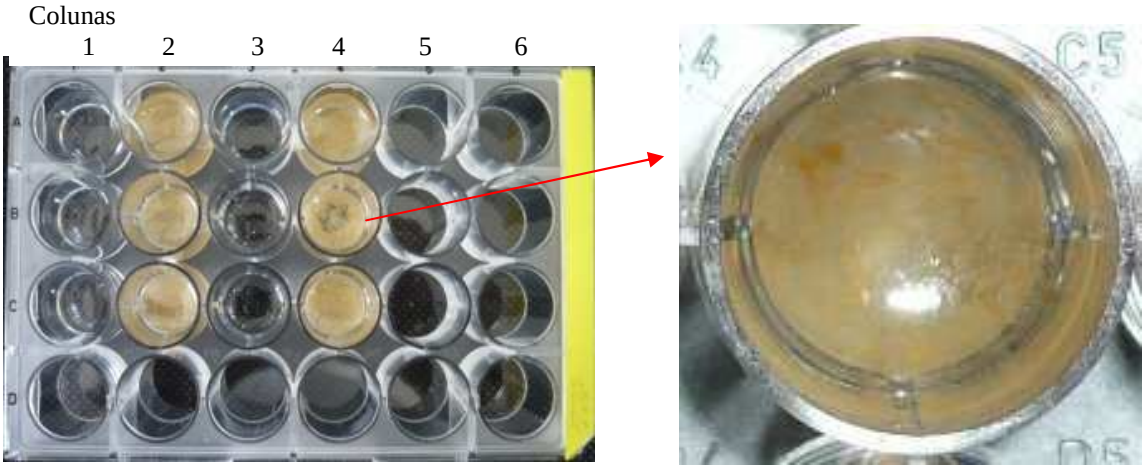


Figura 43 - Bioensaio com *A.fransciscana* do material teste, mostrando 100% de letalidade (colunas 2 e 4).

Com o intuito de avaliar a viabilidade da própolis como solução de limpeza de cavidades, essa pesquisa avaliou a biocompatibilidade do EEP através do capeamento pulpar direto de molares de ratos. Esses animais, segundo Daniel (2001), apresentam o organismo dotados da capacidade de se defender de agressões de natureza física, química e biológica, além de permitirem obtenção de cortes histológicos em períodos de tempo curto, devido sua facilidade de descalcificação. Além do que, são animais de fácil obtenção e alocação em biotérios. Stanley et al (1956) e Rowe (1967) relataram que a polpa do molar do rato responde a injúrias provocadas com formação de dentina reparadora sob a área da exposição.

Os resultados do estudo da biocompatibilidade no tecido pulpar de molares de ratos foram avaliados através da descrição dos resultados, avaliando comparativamente os grupos experimentais. A análise histopatológica foi cega, pois o patologista não foi informado a respeito do material utilizado no capeamento e nem dos períodos experimentais.

Durante o preparo cavitário, objetivou-se causar o menor trauma possível no órgão pulpar. Dessa maneira, o acesso à cavidade foi realizado com broca tronco-cônica, através de movimentos oscilatórios e a exposição foi executada com um trépano afiado. Segundo Woehrlen (1978), o objetivo do capeamento pulpar direto é a obtenção do selamento biológico no local da exposição através da deposição de uma barreira de tecido mineralizado entre o material capeador e o tecido pulpar. Essa barreira pode ser denominada de ponte de dentina. O autor também citou funções fundamentais atribuídas ao hidróxido de cálcio: neutralização da acidez da camada de dentina desmineralizada, promoção da remineralização e manutenção da vitalidade pulpar em casos de exposição.

No período de 07 dias (figuras 44, 45, 46), os elementos do grupo I (própolis I) apresentaram infiltrado inflamatório de moderado a intenso, com presença de polimorfonuclear e mononuclear, sobretudo, mononuclear, presença de vasos congestos, restos de material (esparsas áreas necróticas e raspas de dentina). Foram notadas células

vacuolizadas e a presença de fundo granuloso devido à presença de imunoglobulinas. Em um dos elementos, observou-se o início da formação de matriz mineralizada. Com pouca freqüência, foram observadas áreas com células de aspecto mais alongado, hipercromático, permeando o tecido. Aos 15 dias (figuras 47, 48, 49), observou-se a presença de infiltrado inflamatório leve a moderado, com predomínio de polimorfonucleares (neutrófilos), raspas de dentina e restos necróticos, focos moderados de calcificação, vasos congestos e trombosados e presença de fibras colágenas. Notou-se também a presença de macrófagos espumosos e fragmentos de dentina sendo envolvidos discretamente por foco mineralizado. Aos 30 dias (figuras 50, 51 e 52), observou-se formação de barreira mineralizada no teto e assoalho da câmara pulpar, fragmentos de dentina, áreas com algumas células vacuolizadas e ausência de infiltrado inflamatório. Verificou-se a presença de fibras colágenas (deposição colagênica) com formação de matriz mineralizada, compatível com processo de reparação tecidual.

No período de 07 dias (figura 53), nos elementos dentários do grupo II (própolis II), visualizou-se, histologicamente, presença de infiltrado inflamatório de moderado a intenso, do tipo mononuclear e inúmeros vasos congestos e trombosados, fibroblastos jovens (células com aspecto alongado e estrelado), áreas contendo material acastanhado compatível com substância exógena e fundo granuloso devido à presença de imunoglobulinas. Um dos elementos apresentou tecido mineralizado contendo raspas de dentina em seu interior. Em outro espécime, observou-se a presença de células vacuolizadas (macrófagos espumosos). Aos 15 dias (figuras 54 e 55), presença de infiltrado inflamatório de moderado a intenso com a presença de polimorfonuclear e mononuclear, sobretudo mononuclear, contendo grande quantidade de raspas de dentina e resíduos necróticos, focos de mineralização, macrófagos espumosos, células vacuolizadas, inúmeros vasos congestos trombosados e fibroblastos. Aos 30 dias (figuras 56 e 57), área de exposição pulpar mostrando restos de dentina e restos necróticos, formação de barreira mineralizada e fibras colágenas. Em um dos elementos,

verificou-se a presença de infiltrado inflamatório mononuclear discreto no corno pulpar distal, apresentando tecido conjuntivo frouxo.

No período de 07 dias (figuras 58, 59), no grupo III (controle), observou-se um infiltrado inflamatório leve a moderado, com leve predomínio de polimorfonucleares (neutrófilos), presença de células jovens e vasos congestos, restos de dentina e áreas apresentando discreta calcificação, parecendo envolver tecido dentinário, discreta formação de barreira mineralizada. Aos 30 dias (figura 60), observou-se formação de barreira mineralizada madura e em formação (jovem), ausência de inflamação e fragmentos de dentina envolvidos por matriz mineralizada.

Cordeiro, Gonzales Vono e Lia (1985) afirmaram que, apesar do hidróxido de cálcio em forma de pó possuir ótimas qualidades biológicas, suas propriedades físicas não são ideais devido não apresentar resistência à compressão, ser permeável, solúvel ao meio bucal e não ser radiopaco. O hidróxido de cálcio é considerado o material de escolha em capeamento pulpar direto.

Comparando os resultados independentemente dos períodos ou grupos, observou-se a presença de raspas de dentina próximas à área da exposição e resíduos necróticos. Mello, Holland e Berbert (1983), correlataram casos de insucesso e a presença de fragmentos de dentina na intimidade da barreira de tecido duro. Dependendo da quantidade, dimensão e localização desses fragmentos, eles podem impedir a formação da barreira de tecido duro ou introduzir defeitos que comprometeriam o êxito do tratamento. Corroboram essas afirmativas Holland et al (1978) que afirmaram que esses fragmentos podem impedir a evolução do processo de reparo da polpa. Os autores sugeriram também a possibilidade de contaminação dos fragmentos, o efeito tóxico dos produtos da decomposição dos elementos orgânicos intratubulares e a condição de seqüestro, passível de reabsorção.

Os resultados demonstram que nos grupos I, II, no período de 07 dias, os elementos estudados apresentaram inflamação de moderada a intensa, enquanto que no grupo III (controle), no período de 7 dias, a inflamação foi leve a moderada. Alem do que, no período de 7 dias o grupo I apresentou formação de barreira mineralizada, enquanto que o grupo II, não apresentou essa característica, sugerindo melhor resposta biológica no grupo I. Um dos fatores que sugerem essa resposta inflamatória no período de 7 dias, pode esta associado a agressão ao tecido pulpar causado durante o preparo cavitário. Segundo Mondelli (1998), o trauma e a geração de calor durante a realização do preparo cavitário é o maior dano que se pode causar durante o procedimento restaurador. Outro fator que pode está associado a essa inflamação decorre do alto grau de citotoxicidade presente no extrato da própolis como demonstrado nesse trabalho, através do teste de Artemia, o qual demonstrou taxa de letalidade de 100% frente ao EEP. Grumberger et al (1988) descreveram o cafeato de feniletila (CAPE) como um composto responsável pelas propriedades citotóxicas da própolis.

No período de 15 dias, o grupo I apresentou infiltrado leve a moderado, enquanto que o grupo II permaneceu com inflamação moderada a intensa, demonstrando que houve no grupo I, a regressão da resposta inflamatória, evoluindo gradativamente para um reparo, com focos moderados de calcificação e fibras colágenas, comprovando maior bicompatibilidade no grupo I.

Em 30 dias, os três grupos apresentaram formação de barreira mineralizada, sendo que no grupo III, essa barreira apresentou-se mais uniforme.

Os resultados desta pesquisa corroboram com aqueles obtidos por Esmeraldo (2006) que avaliou histologicamente a polpa de molares de ratos após proteção pulpar direta com extrato etanólico de própolis e relatou ter havido um aumento na intensidade do infiltrado inflamatório e na camada de necrose no período de 07 dias. Resultados semelhantes também

foram obtidos por Scheller et al (1978), em que realizaram estudos nos quais verificaram que o extrato etanólico de própolis após 28 dias induz a formação de colágeno e ponte de dentina.

Os resultados obtidos nesse estudo são contrários aos encontrados por Bretz et al (1999) no qual realizaram estudos com ratos através de capeamento pulpar com dois grupos experimentais: própolis e hidróxido de cálcio e os comparam em relação à reorganização e vascularização normal da polpa, onde a própolis demonstrou melhor resposta em todas as categorias comparadas após 07 dias, exceto para deposição de dentina reparadora. Também contrariando os resultados obtidos no presente estudo, Sabir et al (2005) observaram que polpas de molares de ratos capeadas com própolis que apresentava flavonóides não se observou inflamação e houve o aparecimento de dentina reparadora. Os autores relatam que a formação da ponte de dentina ocorreu em apenas um elemento, o qual pertencia ao período teste de 04 semanas e os autores sugerem que os flavonóides da própolis podem estimular uma dentinogênese reparativa. Em polpas que haviam sido capeadas com própolis sem componentes flavonóides e em polpas capeadas com óxido de zinco, a inflamação estava presente e não houve formação de ponte de dentina.

Analisando de maneira geral os resultados, observou-se que em todos os períodos avaliados (07, 15 e 30 dias) houve evolução dos eventos inflamatórios, ocorrendo proliferação fibroblástica, áreas de calcificação e formação de barreira mineralizada, caracterizando evolução do reparo tecidual. Grégio et al (2005) corroboraram com esses resultados ao avaliarem o efeito da própolis *Apis mellifera* sobre o processo de reparo de lesões ulceradas (induzidas com hidróxido de sódio a 40%) e obtiveram resultado mais significativo nos animais tratados com extrato alcoólico de própolis aos 21 dias, onde não foi observado sinal flogístico em nenhum animal deste grupo, enquanto que nos animais do grupo controle, três dos seis ratos ainda exibiam infiltrado inflamatório moderado no tecido conjuntivo subjacente à área em que existia a lesão ulcerada. Resultados semelhantes foram obtidos por Bandeira

(1998), em que realizou estudos em molares de ratos, verificando a compatibilidade biológica do hidróxido de cálcio associado à *Copaifera multijuga*, hidróxido de cálcio + polietileno glicol 400 e hidróxido de cálcio + resina da *Copaifera multijuga* e verificou que todas as pastas apresentaram-se inicialmente irritantes ao tecido pulpar do molar do rato, com desenvolvimento normal do processo inflamatório, permitindo no decorrer dos períodos a evolução por reparação.

Concordando com os resultados favoráveis obtidos com a própolis I, Almeida et al (2008) analisaram histopatologicamente em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, solução de própolis utilizando 15 ratos, distribuídos em três períodos experimentais (07, 30 e 45 dias), sendo que cada animal recebeu os 04 grupos em forma de rodízio: GI-própolis I; GII-própolis II; GIII-água de hidróxido de cálcio e GIV-clorexidina a 2%, as laterais do tubo foram o grupo controle. Os resultados mostraram em relação à biocompatibilidade que todos os materiais apresentaram uma redução significativa do infiltrado inflamatório e um aumento no espessamento das fibras colágenas. Com isso, os autores sugeriram ordem decrescente dos eventos histopatológicos: água de hidróxido de cálcio, clorexidina 2%, própolis I e própolis II.

Resultados semelhantes àqueles obtidos com a grupo III (controle), foram obtidos por Cordeiro et al (1985), em que observaram que 72 horas após o capeamento pulpar em molares de ratos ocorreu necrose superficial, infiltrado inflamatório e proliferação fibroblástica capilar, assemelhando-se a uma tentativa de isolamento da área de exposição.

Concordando com esses resultados estão aqueles apresentados por Dias et al (1988), que avaliaram histologicamente a polpa de dentes de cães expostas experimentalmente e capeadas com produtos à base de hidróxido de cálcio (Life, Calvital e Renew), sendo comparados ao hidróxido de cálcio p.a em períodos de 30, 60 e 120 dias. Concluíram que todos os materiais estudados caracterizam-se como irritantes pulpares, sendo que a

diminuição da inflamação ocorreu com o decorrer do tempo e os melhores resultados obtidos em relação à formação de barreira mineralizada ocorreu com o hidróxido de cálcio p.a.

Entretanto, discordam deste estudo Bretz et al (1999) que realizaram estudos com ratos através de capeamento pulpar utilizando dois grupos experimentais: própolis e hidróxido de cálcio e os compararam em relação à reorganização e vascularização normal da polpa, onde a própolis demonstrou melhor resposta em todas as categorias comparadas após 07 dias, exceto para deposição de dentina reparadora.

Sugere-se nesse estudo que a bicompatibilidade do EEP pode ocorrer em decorrência dos componentes químicos encontrados na própolis dos apiários localizados no município de Presidente Figueiredo (estado do Amazonas). Esses componentes foram estudados por Ishida (2006) que avaliou o perfil químico de amostras da própolis amazonense através de análises como reações de identificação para hidróxidos fenólicos, espectrofotometria U.V., espectrofotometria infravermelho, cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa (CG/EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados obtidos demonstraram a presença de substâncias aromáticas do tipo compostos fenólicos. Os espectros infravermelhos apresentaram variação entre amostras, demonstrando que algumas apresentavam maior quantidade de substâncias fenólicas, podendo-se sugerir que este composto químico possa está relacionado às atividades biológicas positivas encontradas nessa pesquisa. As análises realizadas através do CG/EM e HPLC mostraram que os principais constituintes são benzofenonas preniladas, divergindo dos compostos normalmente encontrados na própolis brasileira. Triterpenóides pentacíclicos, tais como a alfa e beta-amirinas, também foram encontradas, sugerindo que a própolis da região amazônica pode ser proveniente de espécie do gênero *Clusia*.

Baseados nos resultados obtidos no estudo de biocompatibilidade, observou-se que a própolis I e II apresentaram biocompatibilidade em tecido pulpar de molares de ratos, sendo o hidróxido de cálcio o de melhor resultado.

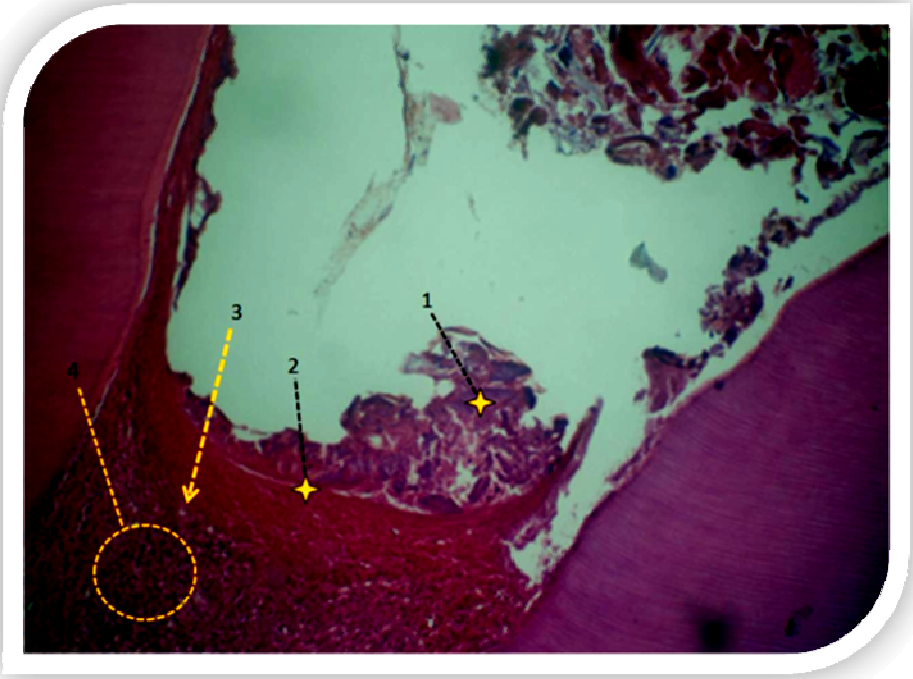


Figura 44 - Grupo I (07 dias): 1) raspas de dentina; 2); 3) células vacuolizadas; 4) infiltrado inflamatório moderado a intenso, apresentando células polimorfonucleares e mononucleares, sobretudo, mononucleares. H.E. (200x)

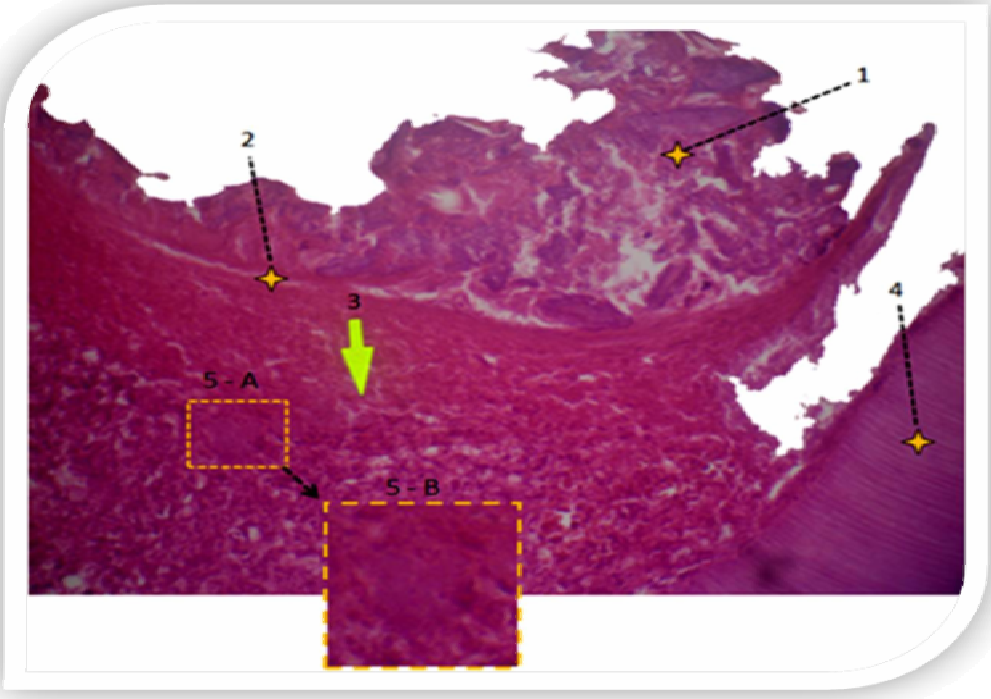


Figura 45 – Grupo I (07 dias): 1) raspas de dentina; 2) barreira mineralizada; 3) células vacuolizadas; 4) dentina; 5) (A) área de calcificação, com maior detalhe em (B). H.E. (400x)

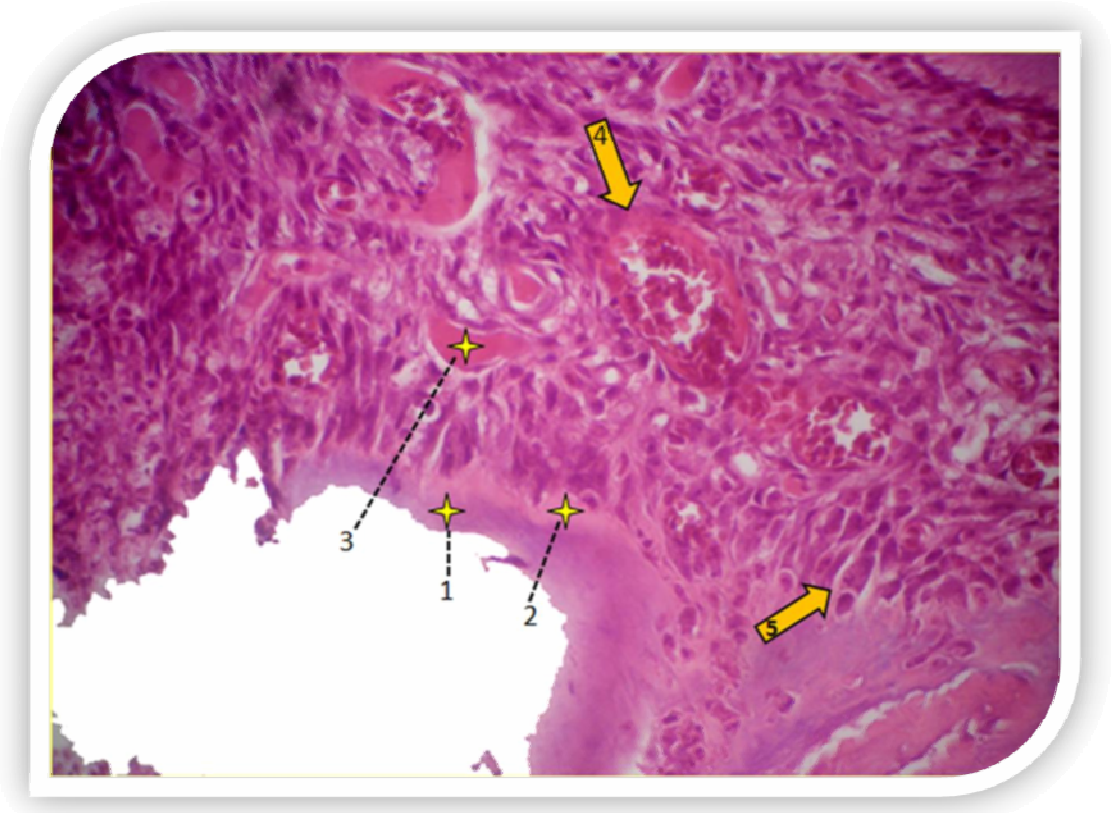


Figura 46 - Grupo I (07 dias): 1) barreira mineralizada; 2) barreira mineralizada jovem; 3) vasos trombosados; 4) vasos congestos; 5) células alongadas e\ou cubóides. H.E (400x)

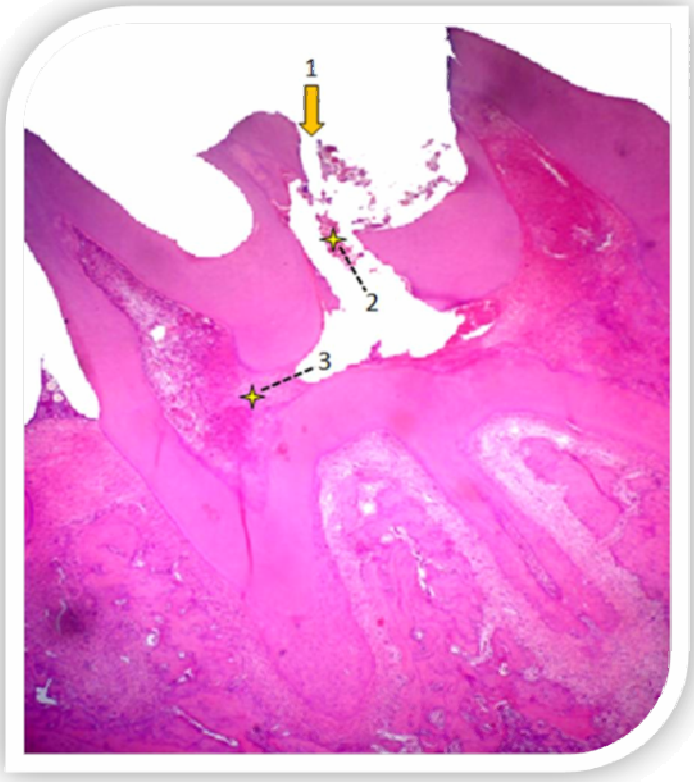


Figura 47 – Grupo I (15 dias): Aspecto panorâmico: 1)abertura da cavidade; 2)raspas de dentina; 3)infiltrado inflamatório leve a moderado. H.E.(40x)

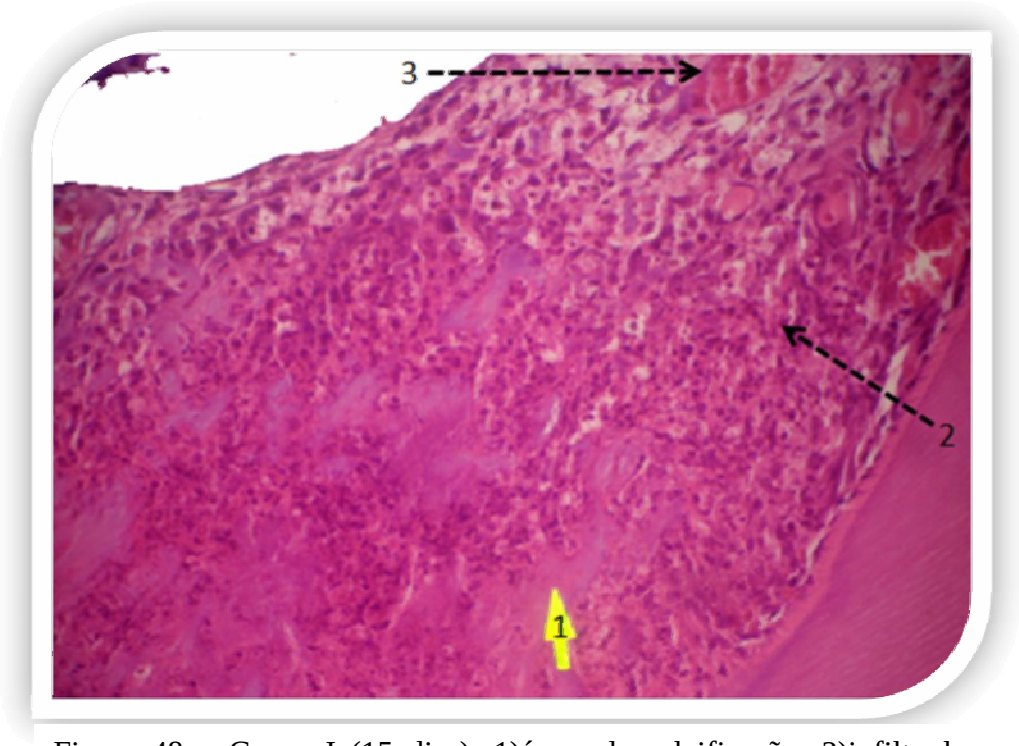


Figura 48 – Grupo I (15 dias): 1)áreas de calcificação; 2)infiltrado inflamatório de leve a moderado; 3)vasos congestos. H.E. (400x)

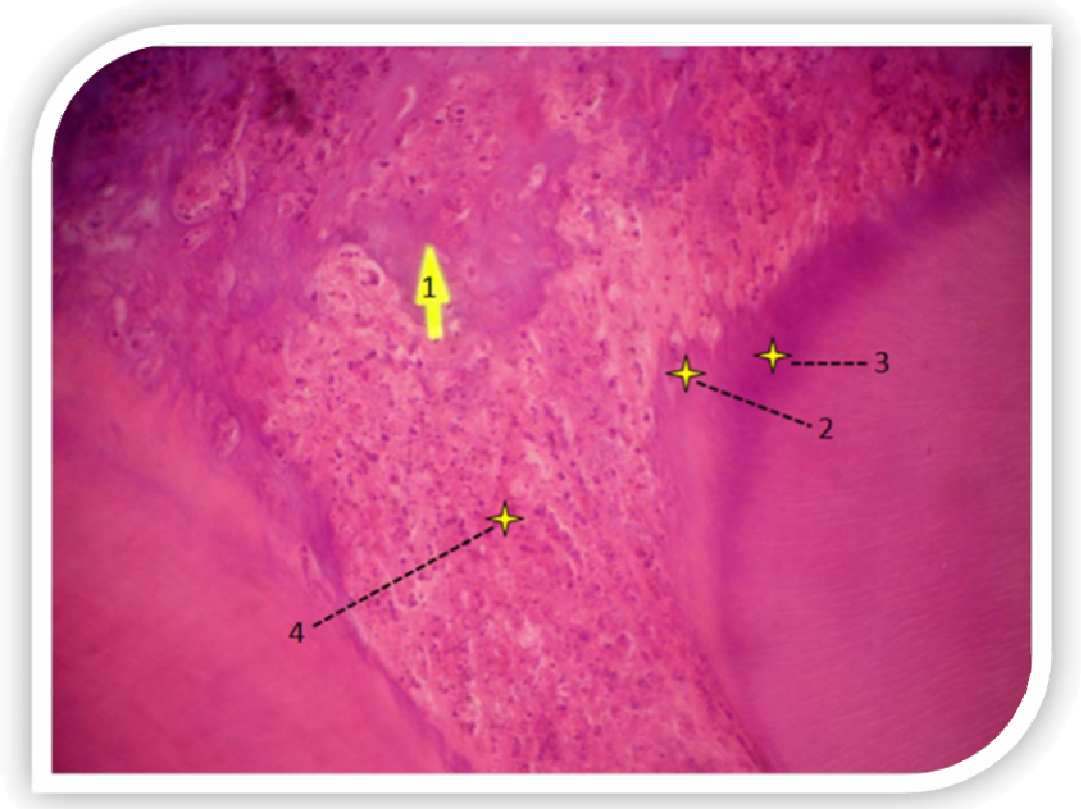


Figura 49 - Grupo I (15 dias): 1)áreas de calcificação; 2) barreira mineralizada jovem; 3)barreira mineralizada madura; 4)células polimorfonucleares e mononucleares. H.E.(200x)

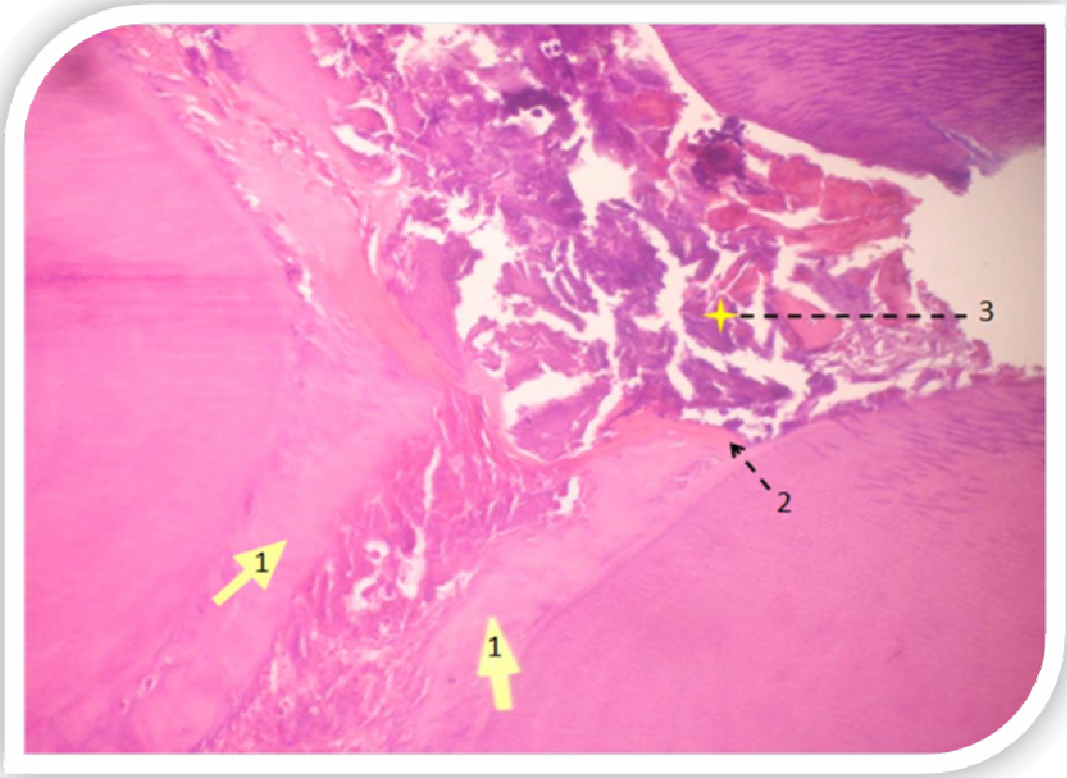


Figura 50 - Grupo I (30dias): 1)barreira mineralizada no assoalho e teto da camara pulpar; 2)barreira mineralizada jovem; 3)raspas de dentina. H.E.(200x)

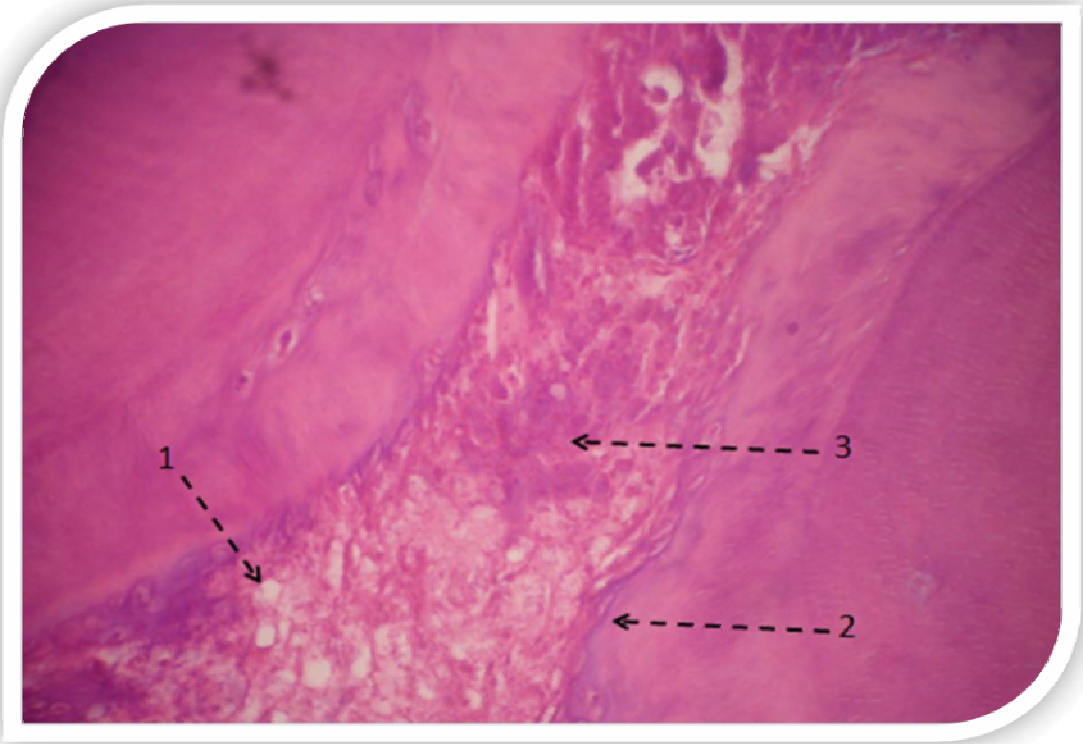


Figura 51 – Grupo I (30 dias): 1)células vacuolizadas; 2)barreira mineralizada; 3) áreas de calcificação. H.E.(400x)

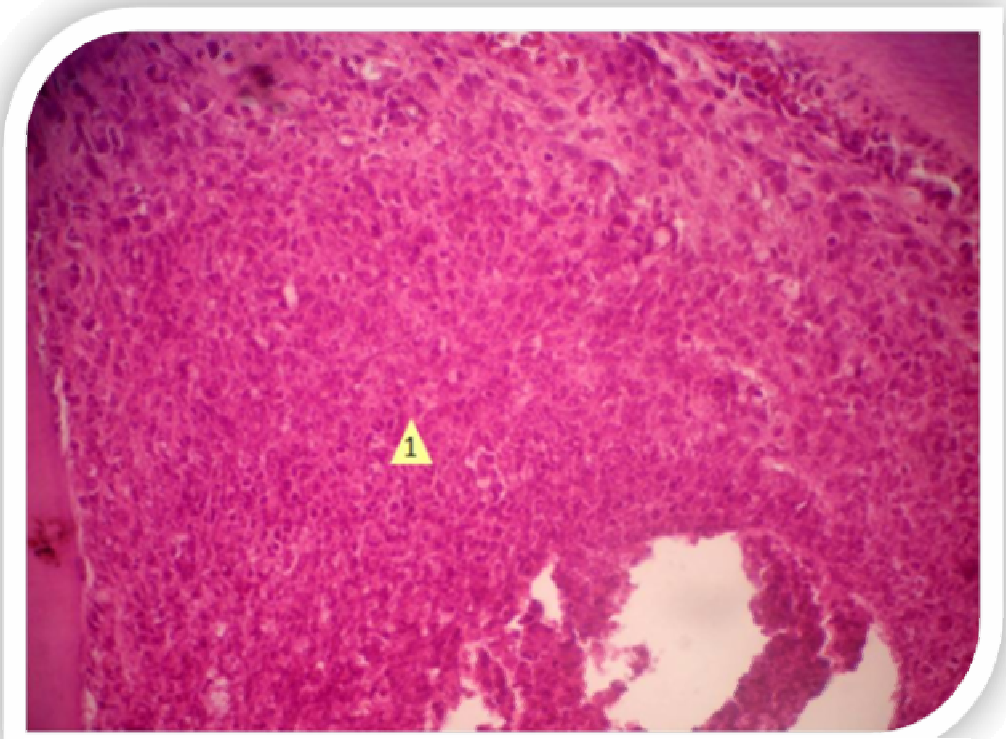


Figura 53 – Grupo II (7 dias):1) infiltrado inflamatório intenso, difuso, com presença de polimorfonucleares e mononucleares, sobretudo, mononucleares. H.E. (400x)

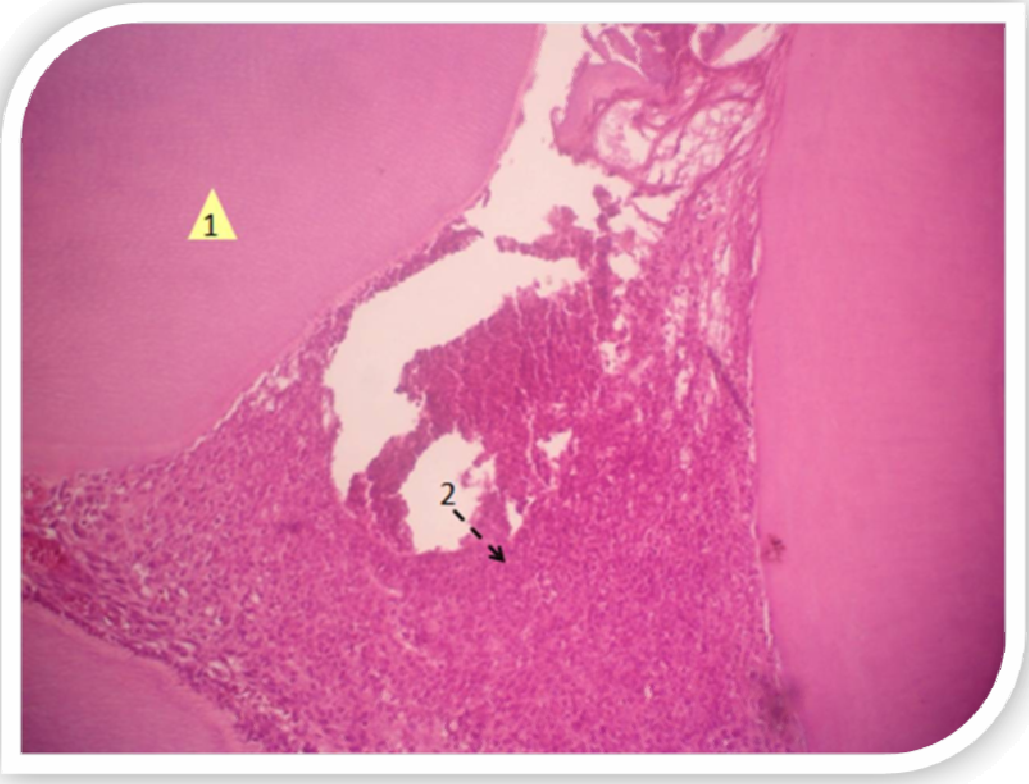


Figura 54 - Grupo II (15dias): 1)dentina; 2)infiltrado inflamatório moderado a intenso. H.E.(100x)

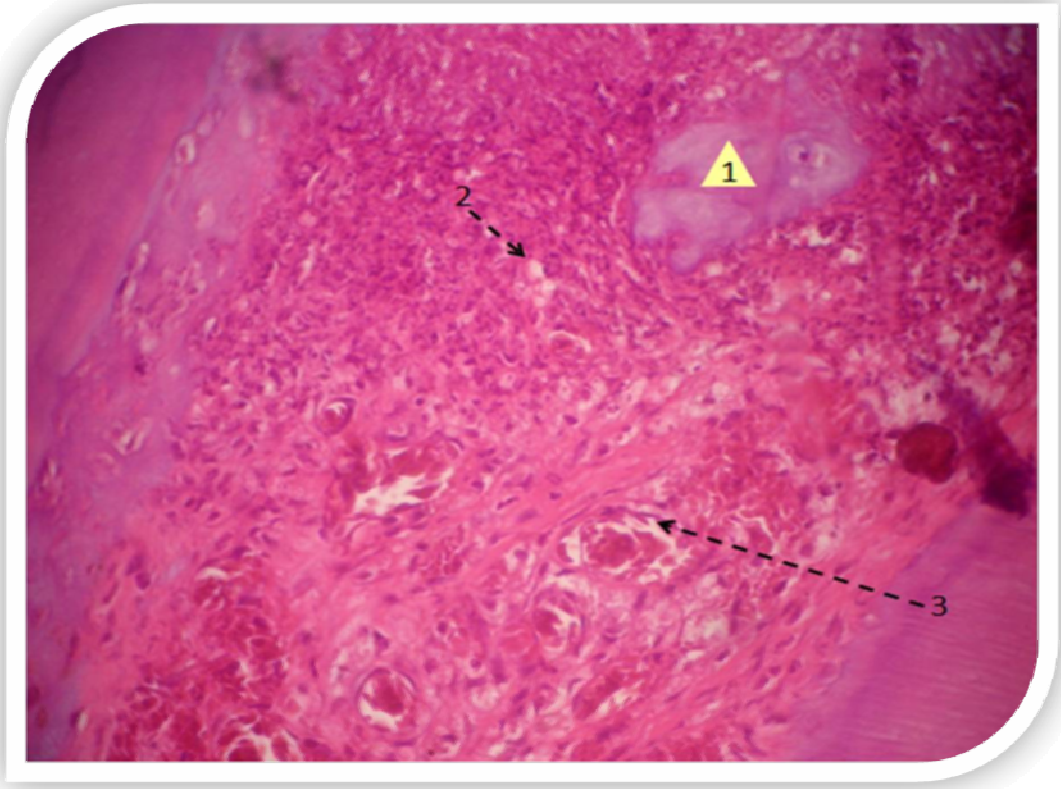


Figura 55 - Grupo II (15dias): 1)áreas de calcificação; 2)células vacuolizadas; 3)vasos congestos. H.E.(400x)

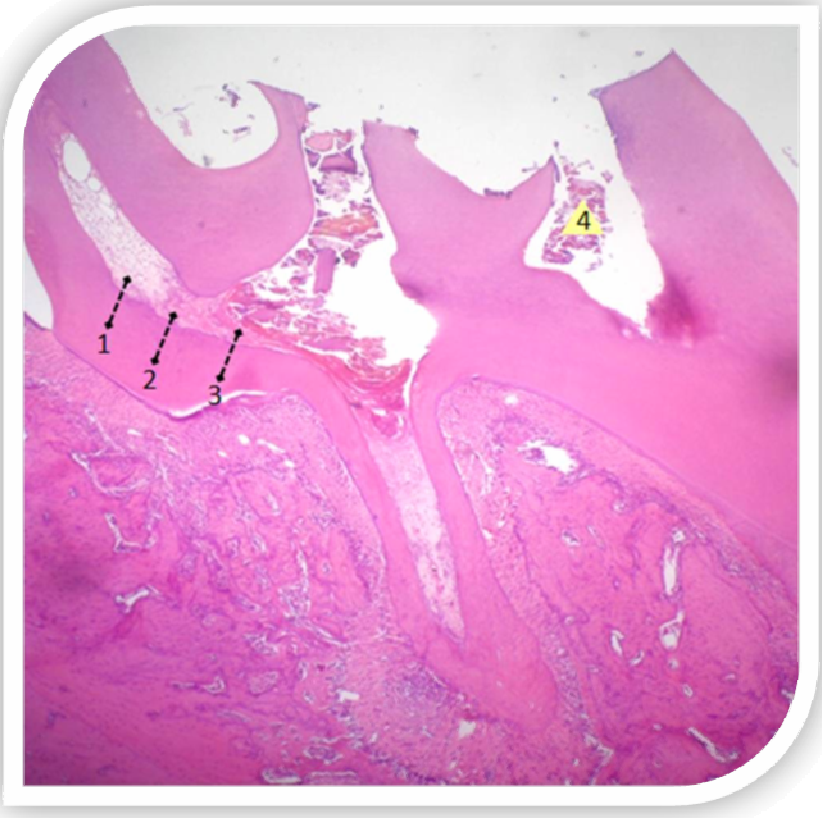


Figura 56 - Grupo II (30dias): Aspecto panorâmico: 1)tecido conjuntivo frouxo; 2)infiltrado inflamatório discreto; 3)barreira mineralizada; 4)raspas de dentina. H.E. (40x)

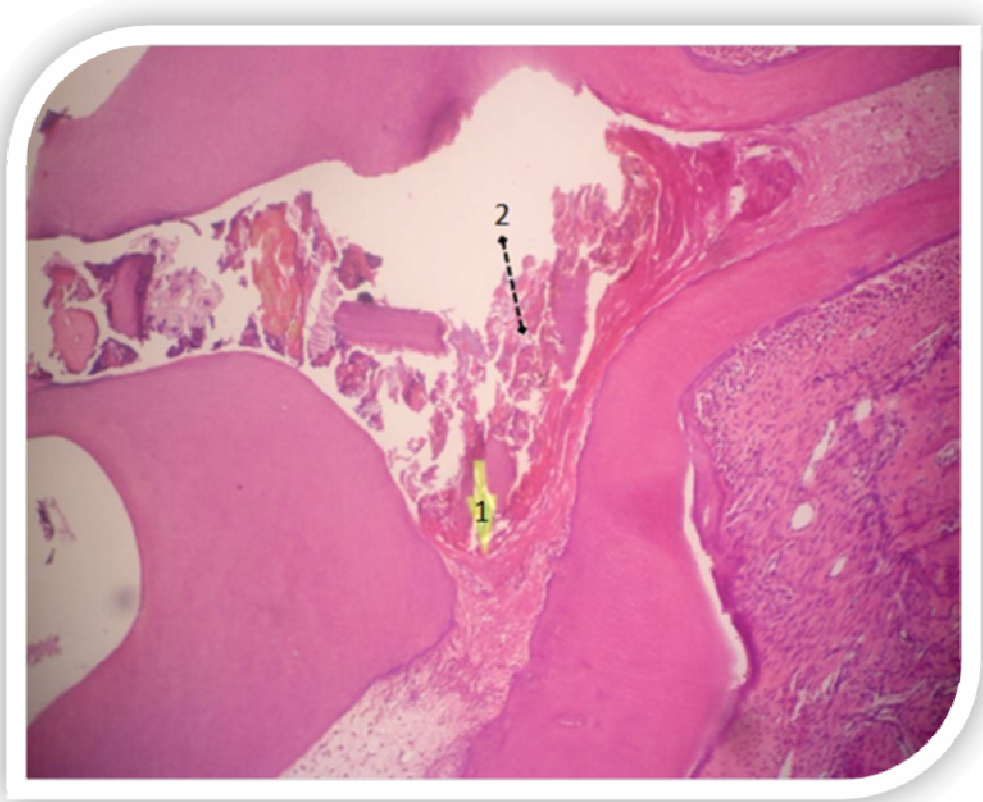


Figura 57 – Grupo II (30dias): 1)discreta formação de barreira mineralizada; 2)raspas de dentina e restos necróticos. H.E.(200x)

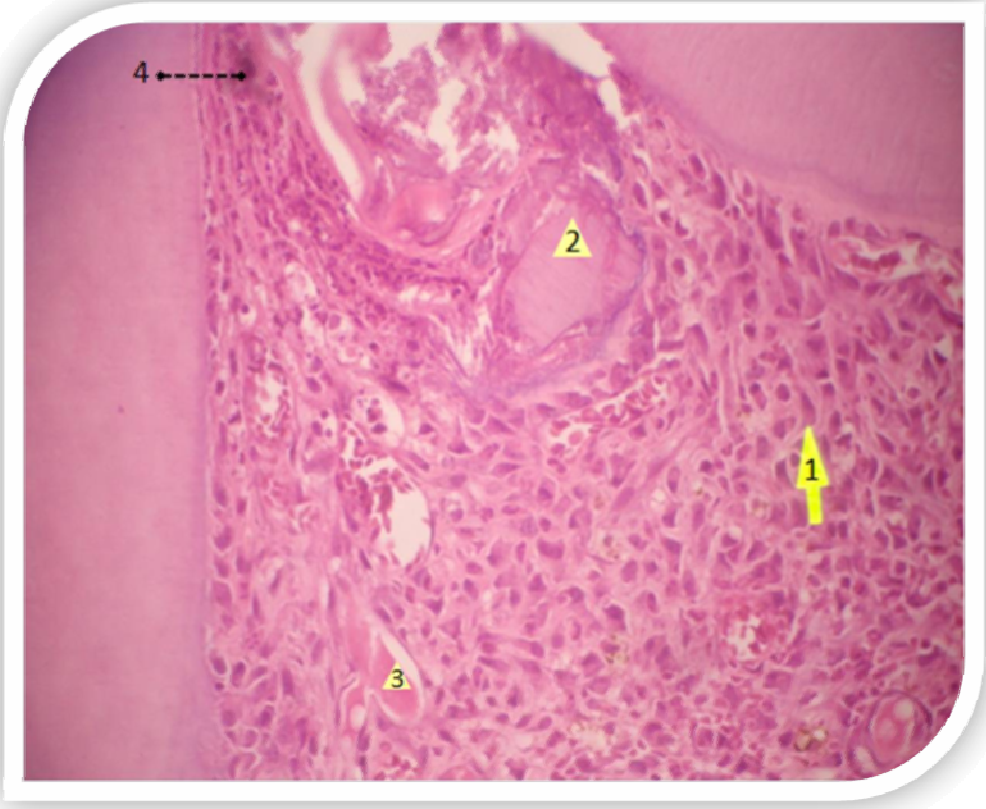


Figura 58 – Grupo III (7dias): 1) tecido mineralizado; 2) fibroblastos jovens com células de aspecto cuboidal ou fusiforme; 3)vasos trombosados. H.E.(400x)

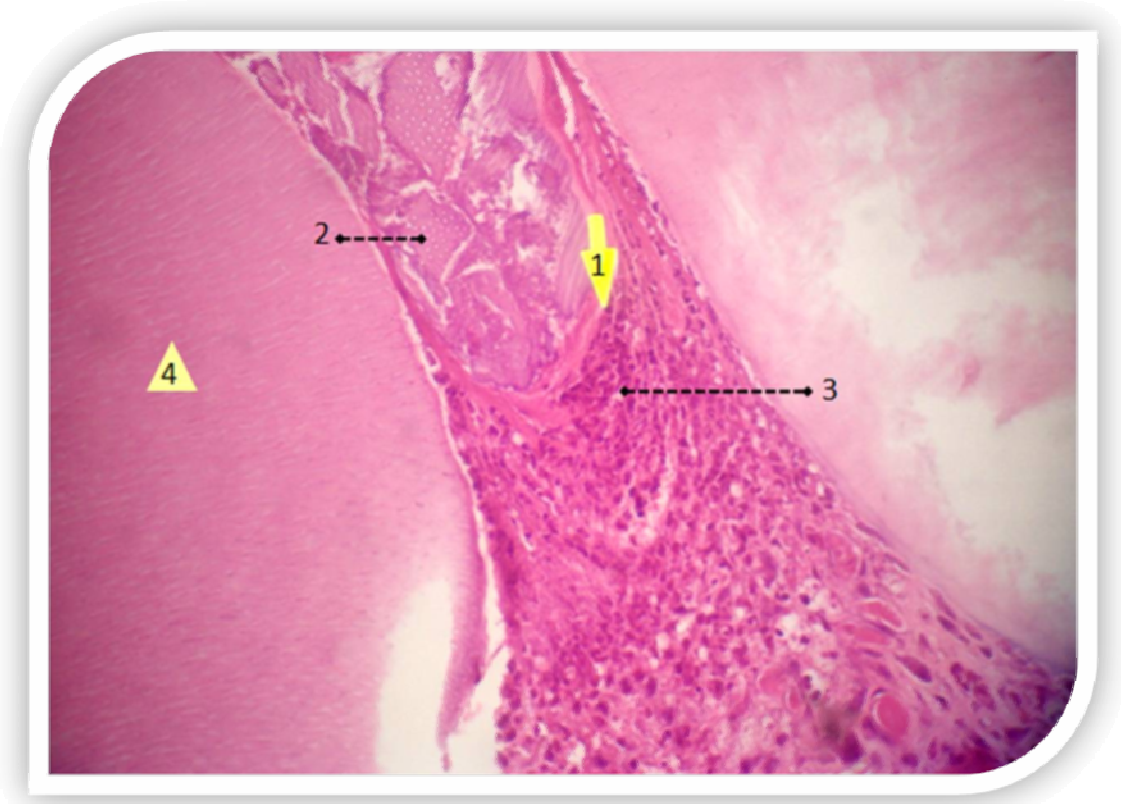


Figura 59 – Grupo III (7dias): 1)barreira mineralizada; 2)raspas de dentina; 3)infiltrado inflamatório leve a moderado; 4)dentina. H.E.(100x)

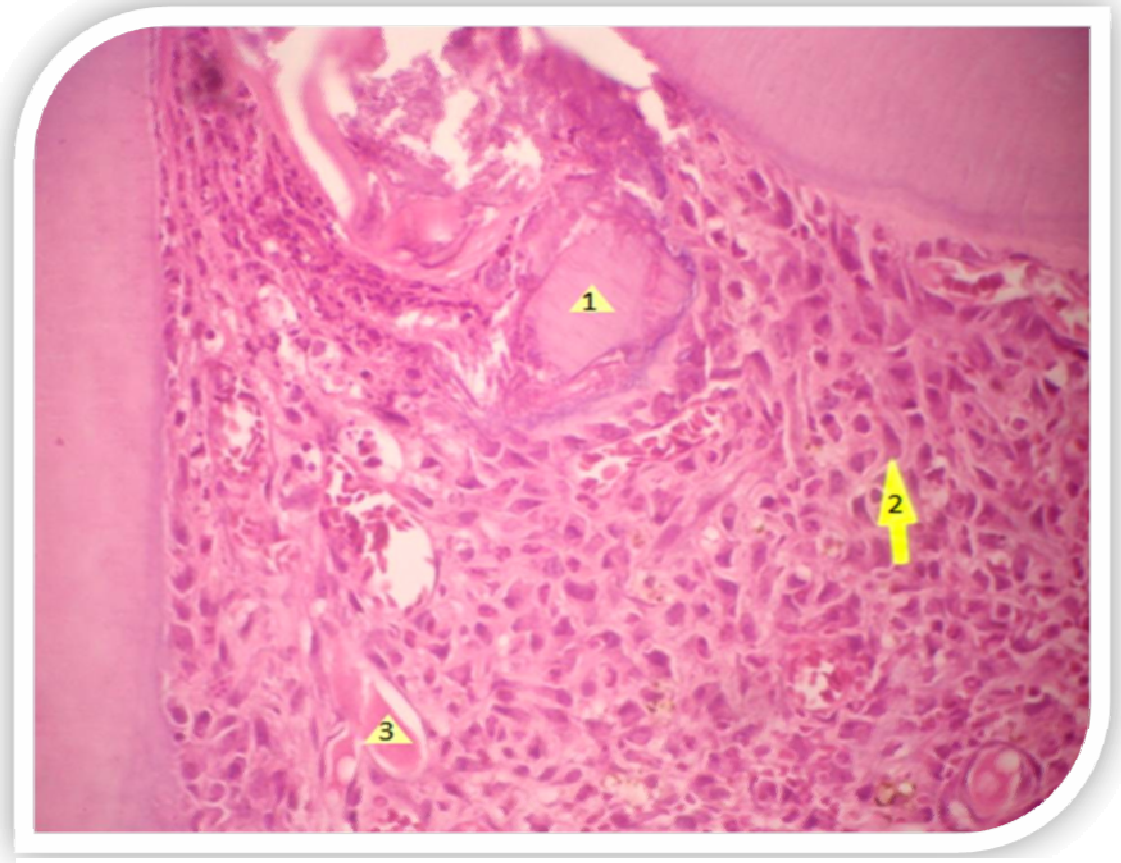


Figura 60 - GIII (7dias): 1)raspas de dentina; 3)infiltrado inflamatório leve, com presença de células alongadas. H.E. (200x)

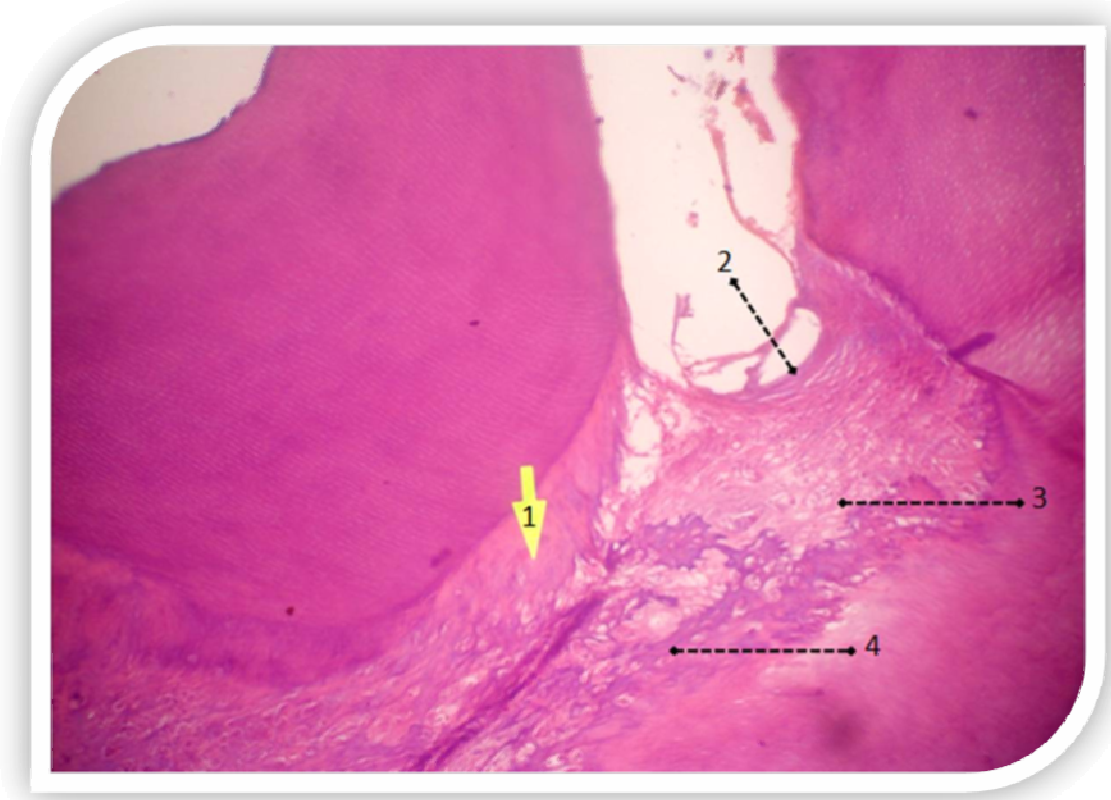


Figura 61 – Grupo III (30 dias): 1 e 2)barreira mineralizada; 3)fibras colágenas; 4)áreas de mineralização e ausência de infiltrado inflamatório. H.E. (200x)

CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada e a partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- As amostras de extrato de própolis demonstraram estabilidade microbiológica em todos os locais de armazenamento e períodos experimentais;
- As soluções propostas apresentaram alteração de cor, sendo que nos períodos de 15 e 30 segundos, tempo normalmente empregado durante o processo de limpeza de cavidades, apresentaram viabilidade de aplicação clínica;
- Uma solução destinada à limpeza de cavidades permanece em contato com o tecido dentário por no máximo 15 segundos, o que torna o resultado do tempo experimental T15 o mais relevante. A própolis I foi a solução que apresentou a maior média de alteração. A própolis II teve um comportamento semelhante ao da clorexidina que é a solução de escolha para limpeza de cavidades rasas e médias;
- No teste citotoxicidade utilizando *Artemia franciscana* a própolis mostrou-se altamente tóxica comprovando sua ação biológica;
- Em conseqüência de sua ação biológica, foi observado que o EEP é biocompatível ao ser utilizado em capeamento pulpar direto em molares de ratos.
- Analisando comparativamente o EEP frente aos estudos realizados pode-se inferir a possibilidade de utilização deste produto para limpeza de cavidades necessitando, ainda, de mais estudos para encontrar as características ideais de aplicação tópica do produto, em cavidades profundas e com exposição pulpar, tendo em vista os resultados quando comparados com a clorexidina 2%.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, T. Fast chromatography study of propolis crudes. **Food Chemistry**, v.42, p.135-138, 1991.

ACCORINTE, M.L.R. et al. Avaliação histomorfológica de polpas humanas capeadas com $Ca(OH)_2$: efeitos do controle da hemostasia. **Braz Oral Res**, v. 20, Supplement. In: 24ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2007.

ALENCAR, S.M. et al. Composição química de *Baccharis drancunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais, **Cienc. Rural**, v.35, p.909-915, n.4, 2005.

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

ALMEIDA, M.C. et al. Solução de própolis (*Apis mellifera*) para limpeza de cavidades: biocompatibilidade em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. XVIII Encontro do GBPD, Anais, 2009.

ANDRÉA, M.V.; COSTA, C.N; CLARTON, L. Própolis na cura e prevenção de doenças? Pode ser uma boa alternativa! **Bahia Agric.**, v.7, p.19-21, n.1, 2005.

ARAÚJO, M.A. 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, 1998.

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 em molares de ratos.** Araraquara, p.279, Dissertação (Mestrado em Dentística), Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista-Unesp, São Paulo, 1998.

BANKOKA, V.; POPOV, S.; MAREKOV, N.L. Isopentenyl cinnamates from polar buds and propolis. **Phytochemistry**, v.28, p.871-873, 1989.

BANKOVA, A.H.; TEZUCA, Y.; KADOTA S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytoterapy Research**, v.15, p.561-571, 2001.

BANKOVA, V., et al. Determination of fenolic from propolis by capillary gas chromatograpy. **J. Chromatogr.**, v.607, p.150-153, 1992.

BANKOVA, V.S., CASTRO, S.L., MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.

BANKOVA, V.; MAREKOV, N.; POPOV, S. A study of flavonoids of propolis. **J. Nat. Prod.**, v.46, p.471-474, 1983.

BAUER, J.; AL-RUBAYI, A. Tissue response to direct filling materials. **J. Prosthet. Dent.**, v. 31, p. 584-589, 1987.

BIACHINI, L.; BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitogênicas. **Scientia Agricola**, v.55, p.48-52, n.1, 1998.

BLACK, G.V. Operative Dentistry. Chicago: Medical Dental, 1908.

BOSIO, K. et al. *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes***. Letters in Applied Microbiology,** v.31, p. 174-177, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n°3, de 19 de janeiro de 2001. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1798, acessado em 31 de maio de 2009.

BRETZ, W.A. et al. Preliminary report on the effects of propolis on wound healing in the dental pulp. **Z. Naturforsh.** v.53, p.1045-1048, 1999.

BREYER, E. U. Abelhas e Saúde. **União da Vitória**, Paraná, Uniporto, p.1-41, 1980.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p.347-363, 1998.

BUSSADORI, K.S. et al. Avaliação da biocompatibilidade *in vitro* de um novo material para a remoção química e mecânica da cárie. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr,** v.5, n.3, p.253-259, 2005.

CARBALLO, J.L. et al. A comparision between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnol**., v.2, n.1, p.1-5, 2002.

CAVALCANTE, M. F. et al. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. **Quím. Nova**, v.23, p.20-22, n.1, 2000.

CONAPIS. **Própolis poderoso antibiótico natural têm vários efeitos terapêuticos.** Disponível em: < http://www.conapis.com.br >. Acesso em: 07 de março de 2007.

CONCEIÇÃO, E., et al. **Dentística Saúde e Estética**, 1ª Ed., Editora Artmed, Porto Alegre, 2000, p.105-114.

COSTA-E-SILVA, D., PARENTE, R.C., BANDEIRA, M.F.C.L. **Estudo da estabilidade de cor de resinas compostas de última geração em contato com açaí, guaraná energético e café**. 17˚ CONIC – Congresso de Iniciação Científica da Ufam, 2007.

COSTA, E.M.M.B. Avaliação da ação antimicrobiana da própolis e de substâncias utilizadas em Endodontia sobre o *Enterococcus faecalis.* **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v.8, n. 1, p. 21-25, 2008.

DANIEL, R.L.D.P. **Análise comparativa da citoxicidade *in vitro* do iodofórmio e do hidróxido de cálcio empregando-se dois veículos diferentes**. São Paulo. 200p. Dissertação (Mestrado em Endodontia), Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 2001.

DA SILVA, W.J. **Avaliação dos efeitos do uso de extrato etanólico de própolis de *Apis mellifera* sobre a superfície de resina acrílica**. Campinas, p.___ Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

DAUGSCH, A. et al. **Própolis vermelha e sua origem botânica**. Disponível em: < www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo/htm>. Acesso em: 29 de junho de 2007.

DIAS, D.B. et al Efeito de materiais à base hidróxido de calcio em polpas de dentes de cães expostas experimentalmente. **Rev. Odont. UNESP,** v.1, p.27-42, 1988.

DOZIC, A. et al. Relation in color of three regions of vital human incisors. **Dental Materials**, v.20, p. 832-838, 2004.

ESMERALDO, M.B.A. **Aplicação do extrato de própolis verde em polpa dental de ratos: estudo histológico comparativo**. Natal, p.95, Dissertação (Mestrado em Odontologia), Curso de Mestrado em Odontologia, Universidade Potiguar, Rio Grande do Norte, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, editora Atheneu, 4°ed. , Parte I, 1988-1996, São Paulo.

FAVILLA, M. et al. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents two different (*Artemia salina ande, Daphnia magna*) invertebrate biossays. **Food and Chermical Toxicology**, v.44, p.1922-1931, 2006.

FERNANDES JR., A, et al. The antibacterial activity of propolis produced by A*pis mellifera* and brazilian stingless bees. **J Venom Anim Toxins**, v.7, p.173-182, n.2, 2001.

FIGUEIREDO, J. A. P. et al. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. **Int. Endod. J., Oxford**, v. 34, n. 5, p.377-385, 2001.

FONDRIEST, J. Shade Matching in Restorative Dentistry: The Science and Strategies **Journal of Prosthetic Dentistry,** v.91, cap.6, p.553, 2003.

FONTENELE, A. F. et al. Avaliaçäo da toxicidade de extratos de plantas medicinais através de bioensaio com *Artemia salina* Leach. **Rev Ciênc Cult**, v.11, p.1109-1011, n.40, 1988.

FORGIARINI, E. **Degradação de corantes e afluentes têxteis pela enzima horseradish peroxidase.** Florianópolis, p.___. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

FURLANETO, L.; MENDES, S. Análise microbiológica de especiarias comercializadas em feira livre e em hipermercados. **Alim Nutr.**, v. 15, n. 2, p. 87-91, 2004.

FUSHIDA, C. E.; CURY, J. A. Estudo *in situ* do efeito da freqüência de ingestão de *Coca-Cola* na erosão do esmalte-dentina e reversão pela saliva. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v. 13, n. 2, p. 127-134, 1999

HOLLAND, R; SOUZA, V.; MELLO, W. Influência dos fragmentos de dentina no resultado do tratamento conservador da polpa dental exposta ou inflamada. **Rev.Gaucha Odont.**, v.26, p.98-102, 1978.

GEBARA E. C. E., LIMA L. A., MAYER M. P. A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 365-369, 2002.

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

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

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

GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.83, p.159-160, 1990.

GRÉGIO, et al. Efeito da própolis mellifera sobre o processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos. **Estud. Biolog.**, v.27, n.58, p.43-47, 2005.

ISHIDA, V. F. C. **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos etanólicos de própolis frente a culturas de *Streptococcus mutans, Streptococcus mitis* e *Streptococcus salivarius*.**,. Manaus, 103p. (Mestrado em Patologia Tropical) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2006.

JENDRESEN, M. et al. Annual review of selected dental literature: Report of the committee on scientific investigation of the American academy of restorative dentistry. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 80, p.81-120, 1998.

JOINER, A. Tooth colour: a review of the literature. **J Dent.,** v.32, p. 3-12, 2004.

KOO, H., et al. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n.5, p. 1302–1309, 2002.

KUGEL, G. et al. Clinical evaluation of chemical and light-activated tooth whitening systems. **Compend Contin Educ Dent.**, v. 27, p. 54-62, 2006.

LEÃO, A.C. **Gerenciamento de cores para imagens digital.** Belo Horizonte, p135. Dissertação de Mestrado em Artes Visuais da Escola de Belas Artes da Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

LEITES, A.C.B.R. et al. Avaliação histológica da polpa dental em capeamento direto com MTA ou cimento de hidróxido de cálcio. **Braz Oral Res**, v. 20. In: 24ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2007.

LEVYA, D.J.C. **Los propoleos: sus aplicaciones en la medicina humana: experiência cubana.** Cuba: s/n, 44 p. (apostila), 1989.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade de *Artemia salina.* **Rev Bras de Farmacognosia**, v. 16, n.2, p. 158-163, 2006.

MAIXNER, A.O.; SUSIN, A.H. Avaliação da alteração de cor de resina composta submetida à ação de corantes de gêneros alimentícios. **Rev Dentist *on-line***, n.2, jan-fev.2001.

MANDARINO, F. **Princípios gerais do preparo cavitário**. Disponível em: <www.forp.usp.br/restauradora/dentistica>. Acesso em: 20 de julho de 2007.

MARCUCCI, M.C. et al., Phenolics compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities**. J Ethnopharmacol**, v. 74, p.105-112, 2001.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, p.83-99, 1995.

MATSUNO, T. O efeito terapêutico da própolis. Trad. Y.Od. São Paulo: Nair Tazue Itice, p.133, 1997.

MAYEKAR, S.M. Shades of a color- Illusion or reality? **Dent. Clin. North. Am**., v. 45, n.1, p. 155 -172, 2001.

MEDEIROS, A.C.D. et al. Análise de contaminantes microbiológicos em produtos comercializados em farmácia de manipulação. **Rev de Biol e Farmac**., v.1, p.1-12, n.1, 2007.

MELLO, W.; HOLLAND, R.; BERBERT, A. Estudo histopatológico da polpa dental inflamada de dentes de cães após pulpotomia ou curetagem pulpar e proteção com hidróxido de cálcio: efeito de um agente antiflogístico. **Rev. Odontol., UNESP**, v.12, p.7-19, 1983.

MEYER, B.N., et al. Brine shrimp: a convernient general biossay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIGLIATO, K.F. et al. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Rev. Bras. Farmacogn.,** v. 17, n.1, p.94-101, , 2007.

MONDELLI, J. **Proteção do Complexo Dentinopulpar**. 1ª Ed. Editora Artes Médicas, 316p., São Paulo, 1998,

MOREIRA, F. P.D. et al. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina.* **Quím Nova**, v.26 , n.3 , p.309-311, 2003.

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.

NAGEM FILHO, H. Materiais para limpeza de cavidades. **Grupo Brasileiro de Materiais Dentários**, p.13, 1985.

NUNES, B. S. et al. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, n.144, p.453-462, 2006.

OHARA, M.T; SAITO, T. Contaminação Microbiana em Soluções para Uso Oral**. Rev Bras Farmac e Bioquim,**. v.20, n.1, p. 17-27, 1984.

OLGUIN, C. F. A. et al. Avaliação do potencial biológico alelopático dos extratos fracionados da raiz da *Vernonia tweediana baker*. **Rev Multidiscip Unioeste**, v.5, n.10, p.137-143, 2005.

OTTA, C. et al. Antifungal activity of propolis on different species of Candida. **Mycoses.** v.44, p. 375-378, 2001.

PARAVINA, R.D.; ONTIVEIROS, J.C.; POWERS, J.M. Curing-dependent changes in color and translucency parameters of composite bleach shades. **J Oral Rehabilitation**, v.31, n.1, p.62, 2002.

PARK, Y.K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.18, p.313-318, n.3, Campinas, 1998.

PARK, Y.K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PARK, Y.K. et al. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arq. Biol. Tecnol**., v.38, p.1253-1259, 1995.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; CONTADO, J.L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arq. Biol. Tecnol.**, v.40, p.97-106, 1997.

PARK, Y. **"Yong Park extrai mais esperança da própolis"**. Disponível em: <www.unicamp.br/unicamp_hoje/ju/novembro2003/ju236pag05.html>. Acesso em: 18 de maio de 2007.

PARRA, A., et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and estimative of the medium lethal dose (LD 50 value) in mice, to determine oral acute of plant extracts. **Phytomedicine**, v.8, n.5, p.395-400, 2001.

PELKA, M. et al. A new screening test for toxicity testing of dental materials. **Journal of Dentistry**, v.28, p.341-345, 2000.

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

PRADO JUNIOR, R.R.; PORTO NETO, S.T. Estudo comparativo da estabilidade de cor de materiais estéticos: efeito de materiais e tempo. **Rev Odont Unesp**, v.28, n.1/2, p.31-41, 2000.

REDA, S.H. et al. Estudo *in vivo* da biocompatibilidade do MTA e do cimento Portland em subcutâneo de ratos. **Braz Oral Res**, v. 20, Supplement. In: 24a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2007.

REIS, M. V. Pastas à base de hidróxido de cálcio: Avaliação da biocompatibilidade, pH e liberação de íons cálcio. Araraquara, p.___. Tese (Doutorado em Endodontia), Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2005.

RICE, S. A.; MANESS, I. B. Brine Shrimp bioensays a useful technique in biological investigations. **The American Biology Teacher**, v.66, n.3, p.208-14, 2004.

ROSA, J.M. **A caminho do reino da Suazilândia**. Disponível em: www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/dez2001/unihoje_ju169pag08.html. Acesso em: 30 de maio de 2009.

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

SABIR, A. et al. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with própolis. **J Oral Sci**. v.47, n.3, p.135-138, 2005.

SANCHES-AYALA, A.; SILVEIRA, C.M.M; SANTIS, E.B. Adição de própolis ao hidróxido de cálcio e sua influência na ação antibacteriana. **Cienc Odontol Bras,** v.11, n.3, p. 81-86, 2008.

SALLENAVE-NAMONT, C. et al. Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. **Mycopathologia**, v.149, n.1, p.21–25, 2000.

SANTOS, P. R. V.; OLIVEIRA, A. C. X.; TOMASSINI, T. C. B. Controle Microbiológico de produtos Fitoterápicos. **Rev Bras de Farmac Bioq**., v.3, n.1, p.35-38, 1995.

SCHELLER, L.S. et al. Biological properties and clinical applications of propolis. IX Experimental observation on the influence of ethanol extract of propolis on dental pulp regeneration. **Arzneimetellforshhung**, v. 28, p. 289-291, 1978.

SHOUQIN, Z., JUN, X., CHANGHENG, W. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. **J Chemic Technol**, v.80, p.50-54, 2004.

SILICI, S., et al. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. **J Pharmacol Sci**., v.99, n.1, p.39-44. 2005.

SIMÕES, C. A. C. G. **Formulação de um gel de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga)* e avaliação de sua atividade antibacteriana sobre *Streptococcus sp.* isoladas da placa dental.** Manaus, p.___. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Universidade Federal do Amazonas, 2005.

SMITH R. N., et al. The in vitro and in vivo validation of a mobile non contact camera based digital imaging system for tooth colour measurement. **Journal of Dentistry**, v.36, p.15-20, 2008.

SPERANÇA, P.A. et al. Verificação da atividade antimicrobiana de soluções à base de própolis sobre microbiota oriunda de bolsas periodontais: Estudo *in vitro*. **Rev Period,** v.17, p.54-59, n.4, 2007.

STANLEY, H.R.et al. Repative dentine following cavity preparation and filling in the rat molar. **Oral Surg. Oral.Med.Oral.Pathol.**, v.9, p.221-32, 1956.

THYLSTRUP, A; FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica.** Editora Santos, 2ª Ed. p.421, São Paulo, 1995.

TUNG, F.F. et al. The repeatability of an intraoral dental colorimeter. **J.Prosthet Dent.**, v.88, n.6, p.585-590, 2002.

VOLPATO, D. E. et al. Use of antibiotics without medical prescription. **Braz J Infec Diseases**, v.9, n.4, p.268-271, 2005.

VOLPATO, C.A.M; BARATIERI, L. N; MONTEIRO JR, S. Análise instrumental da cor em Odontologia: considerações básicas. **Rev Dental Press**, v.2, n.1, p.21-31, 2005.

VARGAS, A. C. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato alcoólico de própolis. **Ciênc. Rural**, v.34,159-163, n.1, 2004.

VICHI, A.; FERRARI, M.; DAVIDSON, C.L. Color and opacity variation in three different resin-based composite products after water aging. **Dental materials**, v.20, n.6, p.530-534, 2004.

WHEHTLEN, JR., A.E. Evaluation of techniques and material used in pulpal therapy base on a review the literatura: part II. **J.Americ.Dent.Assoc**., v.96, p.107-12, 1978.

YAGHOUBI, S.M.J. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition, **DARU**, v.15, n.1, p.45-48, 2006.

YAMAMOTO, C.H., et al. **Controle de Qualidade Microbiológico de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Fitoterápicos Produzidos na Zona da Mata**. Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária Belo Horizonte – 12 a 15 de setembro de 2004.

ANEXOS

Termo de Compromisso dos Pesquisadores

Declaramos para fins desta pesquisa que teremos compromisso com o desenvolvimento científico e tecnológico desse estudo, em benefício do ser humano.

Nossa disposição,

Lorena Cristina Raposo da Câmara Gondim

Rua Cametá, casa 03, quadra 01, Conjunto Débora - Dom Pedro

Cep.69040-410

Telefone: Res: 3238-1558 - Cel: 8803-7939 - Comercial: 3634-5054

e-mail: lolo_gondim@yahoo.com.br

Maria Fulgência Costa Lima Bandeira

Avenida Professor Nilton Lins, 877, Residencial Plaza Del Rei, Torre Sevilla, apartamento 703, Flores número apartamento 702, Parque das Laranjeiras-Flores - Cep.69.058-400

Telefone: Res: 3228-5569 - Cel: 8114-2527

Endereço: fulgencia@ufam.edu.br

SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Lorena Cristina Raposo da Câmara Gondim, pesquisadora responsável pelo projeto “Formulação e Avaliação da Compatibilidade Biológica de uma solução à base de própolis para limpeza de cavidades”, solicito perante este Comitê de Ética em Pesquisa a dispensa da utilização do TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO para realização deste projeto, tendo em vista que o mesmo utilizará somente elementos secundários (material coletado-dentes humanos extraídos cirurgicamente).

Nestes termos, comprometo-me a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº196 de 10 de novembro de 1996 e Resolução nº251 de 05 de agosto de 1997, referentes às informações obtidas com o Projeto.

Manaus, 08 de agosto de 2007.

_____

Lorena Cristina Raposo da Câmara Gondim

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo