



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO  
CLÍNICA ODONTOLÓGICA INTEGRADA

HELINGTON CASTRO KRÜGER

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, MENSURAÇÃO  
DA LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO E VARIAÇÃO DE PH DE  
UMA MEDICAÇÃO A BASE DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO  
ASSOCIADO AO EXTRATO DE AROEIRA-DO-SERTÃO  
(*Myracrodruon urundeuva* Allemão): ESTUDO *IN VITRO*.**

Curitiba

2019

HELINGTON CASTRO KRÜGER

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, MENSURAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO E VARIAÇÃO DE PH DE UMA MEDICAÇÃO A BASE DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADO AO EXTRATO DE AROEIRA-DO-SERTÃO (*Myracrodruon urundeuva* Allemão): ESTUDO *IN VITRO*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada (Ênfase em Endodontia).

Orientador: Prof. Dr. Everdan Carneiro

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Curitiba

2019

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

K94a 2019	<p data-bbox="395 1373 703 1413">Krüger, Helington Castro</p> <p data-bbox="395 1420 1367 1608">Avaliação da citotoxicidade, mensuração da liberação de íons cálcio e variação de PH de uma medicação a base de hidróxido de cálcio associado ao extrato de aroeira-do-sertão (<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão) : estudo <i>in vitro</i> / Helington Castro Krüger ; orientador: Everdan Carneiro ; coorientador: Rodrigo Cardoso de Oliveira. – 2019. 27 f. : il. ; 30 cm</p> <p data-bbox="395 1644 1286 1711">Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2019</p> <p data-bbox="432 1715 659 1749">Inclui bibliografias</p> <p data-bbox="395 1785 1347 1888">1. Endodontia. 2. Hidróxido de cálcio. 3. Sobrevivência celular. I. Carneiro, Everdan. II. Oliveira, Rodrigo Cardoso de. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.</p> <p data-bbox="1023 1921 1326 1951">CDD 20. ed. – 617.6342</p>
--------------	--



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola de Ciências da Vida  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

## TERMO DE APROVAÇÃO

HELINGTON CASTRO KRUGER

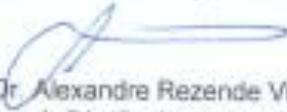
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, MENSURAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO E VARIAÇÃO DE PH DE UMA MEDICAÇÃO A BASE DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADO AO EXTRATO DE AROEIRA-DO-SERTÃO (*MYRACRODRUON URUNDEUVA* ALLEMÃO): ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada com Ênfase em Endodontia**.

Orientador(a):

  
Prof. Dr. Evêrdan Carneiro

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Prof. Dr. João Armando Brancher

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UPPR

Curitiba, 27 de Fevereiro de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Não posso começar diferente. Primeiramente agradeço a Deus pela vida e alegria para chegar até aqui, um dos momentos mais importantes da minha trajetória. O mestrado diz muito sobre minha luta desde pequeno com a educação. Deus é maravilhoso por ter me proporcionado esta oportunidade. Minha infinita gratidão.

Agradeço a minha mãe, Maristela Castro Silva, que esteve ao meu lado em todos os momentos, nas minhas conquistas, e também nas minhas derrotas, que sempre me acalmava com os seus abraços e amor. Eu não tenho palavras para agradecer tudo o que essa mulher fantástica faz por mim.

À minha irmã, Hestela Castro Krüger, que desde pequeno tenho uma admiração enorme, e que me serviu e serve de inspiração em muitos momentos da minha vida.

Aos meus amigos, que felizmente não conseguirei citar nomes, pois são vários os que participaram desta jornada comigo, sempre me apoiando e incentivando a seguir os meus passos, na carreira que sempre sonhei.

Aos meus avós e minha madrinha, que me auxiliaram em vários momentos da minha formação, e que nunca me desestimularam na jornada de estudos.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Everdan Carneiro, por cada palavra durante os anos de orientação. Palavras que foram luz no meio da escuridão. Mais uma vez fui abençoado, por ter tido como orientador, pois me orientou não somente para o mestrado, mas em muitos momentos na vida pessoal também. Minha eterna gratidão.

Agradecimento a todos os professores de Endodontia PUCPR, que nos receberam, como uma família. Todos nossos encontros eram tranquilos e sem muito nervosismo, pois faziam com que nos sentíssemos em casa.

Agradeço aos estudantes de iniciação científica, Jordano Quearis e Arthur Sorgatto, primeiro por me suportarem como “coorientador” e proporcionar com que eu aprendesse juntamente com vocês. Foi uma experiência incrível. Obrigado.

À equipe do laboratório de bioquímica, Larissa e Ana, que gentilmente me receberam, tentavam traduzir as minhas ideias, e aguentavam minhas visitas frequentes e com meu humor instável durante as coletas de dados. Obrigado pela amizade e cafés das tardes e noites.

À equipe do laboratório de bioquímica da USP, que prontamente me receberam e compartilharam todo o conhecimento comigo, em especial a doutoranda Gabriela Silva Neubern de Oliveira e ao Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira. Agradeço também ao Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte, por ter me recebido em sua sala, e sanado todas as minhas dúvidas sobre os testes que realizaria na pesquisa, uma vez que era minha principal referência.

Aos meus colegas de turma, pelos inúmeros encontros para realização de revisões sistemáticas, redação de artigos, discussão de casos e montagem de

seminários. Apesar do cansaço e estresse, isso era sempre minimizado pela ótima energia de todos.

Agradecimento especial a minha amiga “top” de mestrado, Nicole Baumeier, pelas várias vezes que me recebeu em sua casa, consultório, carro, em qualquer lugar em que pudéssemos conversar e liberar nossos estresses do dia-a-dia. Como foi bom ter você do meu lado, afinal você entendia exatamente o que eu estava passando.

Agradeço ao Prof. Dr. João Armando Brancher, por toda contribuição e cuidado com meu trabalho. Sua didática é fantástica e me deixava mais tranquilo para executar todos os procedimentos no laboratório. Foi muito apaixonante trabalhar com bioquímica sendo orientado pelo senhor.

Agradecimento a todos os alunos da graduação e ao Prof. Dr. Alexandre Kowalczyk, por todos os ensinamentos durante as clínicas. As quintas-feiras eram sempre de muito aprendizado.

## SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	1
Resumo.....	2
Introdução.....	3
Materiais e Métodos.....	4
Resultados.....	7
Discussão.....	11
Conclusão.....	14
Referências.....	15
Anexos.....	19

1 **ARTIGO EM PORTUGUÊS**

2

3

4

5 **Avaliação da citotoxicidade, mensuração da liberação de íons cálcio e**  
6 **variação de pH de uma medicação a base de hidróxido de cálcio associado**  
7 **ao extrato de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão): estudo**  
8 ***in vitro*.**

9

10

11

12 Helington Castro Krüger<sup>a</sup> DDS

13 Gabriela Silva Neubern de Oliveira<sup>c</sup> MsD

14 Arthur Sorgatto da Silva<sup>a</sup>

15 Jordano Quearis de Almeida<sup>a</sup>

16 João Armando Brancher<sup>b</sup> DDS, PhD

17 Rodrigo Cardoso de Oliveira<sup>c</sup> DDS, PhD

18 Everdan Carneiro<sup>a</sup> DDS, PhD

19

20

21 <sup>a</sup>Departamento de Endodontia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
22 Escola de Ciências da Vida, Curitiba (PR), Brasil.

23 <sup>b</sup>Departamento de Bioquímica, Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
24 Escola de Ciências da Vida, Curitiba (PR), Brasil.

25 <sup>c</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo,  
26 Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru (SP), Brasil.

27

28

29 Endereço para correspondências: Dr. Everdan Carneiro, Departamento de  
30 Endodontia, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do  
31 Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho, 80215-901 Curitiba, Brasil  
32 (e-mail: everdan.carneiro@pucpr.br).

## 1 **Resumo**

2       **Introdução:** A busca por fármacos para potencializar a capacidade  
3 terapêutica do hidróxido de cálcio em Endodontia, atuando de modo sinérgico,  
4 sem inativar suas ações biológicas e propriedades físico-químicas, tem sido  
5 constante. **Objetivo:** Avaliar o efeito *in vitro* do hidróxido de cálcio associado ao  
6 extrato de aroeira-do-sertão na viabilidade celular, liberação de íons cálcio e  
7 variação de pH. **Materiais e Métodos:** A medicação intracanal foi manipulada  
8 com diferentes diluições, formando uma pasta para cada diluição. Como  
9 controle, foi utilizado o hidróxido de cálcio e propilenoglicol. Para a mensuração  
10 de íons cálcio e variação de pH, foram utilizados incisivos centrais superiores  
11 artificiais (n=75), sendo alocados em 5 grupos (HEA100, HEA20, HEA2, HEA0,4  
12 e controle A), e incisivos centrais superiores humanos extraídos (n=15), controle  
13 B. Após o preenchimento dos canais com as pastas, foram inseridos em  
14 recipientes de plástico contendo 10 ml de água deionizada, tamponada em pH  
15 6.9, mantida em estufa à 37 °C. Na sequência, foi executado a mensuração do  
16 pH com 3h, 24h, 72h, 168h, 240h, 360h e 720h. A leitura de íons cálcio foi  
17 realizada por espectrofotometria, com 7, 15 e 30 dias, utilizando um kit comercial.  
18 O teste de viabilidade realizado utilizando células NIH3T3, pelo método de MTT e  
19 cristal violeta, manipulando diluições das pastas em diferentes concentrações  
20 (10%, 1%, 0,1% e 0,01%), após 24h, 48h e 72h de tratamento. **Resultados:** O  
21 pH demonstrou diferença estatisticamente significativa somente entre o grupo  
22 controle B e os outros grupos, nos períodos de 168h e 240h, e na liberação de  
23 íons cálcio somente quando comparado com o controle B, em todos os períodos  
24 de avaliação. Os valores da viabilidade celular nos grupos experimentais se  
25 mantiveram próximos aos valores do controle positivo em ambos os testes,  
26 exceto na concentração de 10%. **Considerações Finais:** A medicação de  
27 hidróxido de cálcio formulada junto ao extrato de aroeira-do-sertão é capaz de  
28 manter a viabilidade das células NIH/3T3, e não alterar a liberação de íons cálcio  
29 e variação de pH.

30

31

32

33       **Palavras-chave:** Hidróxido de Cálcio, Medicação intracanal, Viabilidade  
34 Celular.

## 1 Introdução

2 A pasta de hidróxido de cálcio  $\text{Ca(OH)}_2$  corresponde a medicação  
3 intracanal mais indicada para tratamentos endodônticos, e por isso, várias  
4 substâncias tem sido constantemente pesquisadas para associar a pasta no  
5 intuito de melhorar suas propriedades (1). O objetivo do seu uso consiste em  
6 produzir efeitos, quando em contato com os tecidos, como difusão iônica,  
7 alterando o pH do meio com o objetivo de inibir e inativar suas toxinas, que são  
8 responsáveis pela grande patogenicidade (2), além de ativar a enzima tecidual  
9 fosfatase alcalina, indutora da formação de tecido ósseo mineralizado e, dessa  
10 forma contribuir com o processo de reparo (3).

11 Os microrganismos podem resistir aos procedimentos de limpeza e  
12 desinfecção dos canais radiculares devido às complexidades anatômicas e  
13 consequente acesso restrito dos instrumentos e irrigantes endodônticos, ou  
14 podendo infiltrar nesses canais em casos de selamento insuficiente (4). Sendo  
15 assim, há vários estudos com  $\text{Ca(OH)}_2$  em combinação com diferentes  
16 substâncias, como água destilada, soro fisiológico, paramonoclorofenol  
17 canforado, clorexidina, propilenoglicol e otosporin na tentativa de promover maior  
18 atividade antibacteriana, biocompatibilidade e dissociação iônica (5, 6, 7). A  
19 grande parte de insucesso dos tratamentos endodônticos é devido a persistência  
20 de microrganismos no canal já obturado (8) e o microrganismo *Enterococcus*  
21 *faecalis*, está presente em mais de 80% das lesões endodônticas, e apresenta  
22 resistência ao  $\text{Ca(OH)}_2$  (9,10). Dessa forma a associação de drogas e  $\text{Ca(OH)}_2$   
23 tem sido avaliadas.

24 A introdução de extrato de plantas medicinais no biofilme oral e seu  
25 impacto na microbiota bucal (11,12,13) tem se mostrado interessante. Um destes  
26 que tem se destacado pelas propriedades de potencializar a analgesia, ação anti-  
27 inflamatória e antimicrobiana, favorecendo o processo de reparo e cicatrização  
28 (14) é o extrato de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão).

29 A aroeira-do-sertão pertence à família Anacardiaceae, nativa da África do  
30 Sul (15) e nordeste do Brasil (16), seu extrato tem sido utilizado como  
31 fitoterápico. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da associação da pasta  
32 de hidróxido de cálcio com o extrato da aroeira-do-sertão por meio da  
33 mensuração da liberação de íons cálcio, variação de pH e viabilidade celular. A

1 hipótese nula é que a associação do extrato aroeira-do-sertão não interfere na  
2 liberação de íons cálcio, variação de pH e mantem a viabilidade celular.

### 3 **Material e Métodos**

4 O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da  
5 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, com o parecer nº 2.348.478. Os  
6 dentes humanos extraídos foram fornecidos pelo banco de dentes da mesma  
7 instituição. Para os testes de liberação de íons cálcio e variação de pH, foram  
8 utilizados 75 incisivos centrais artificiais confeccionados de resina acrílica  
9 (HEA10, HEA50, HEA500, HEA5000, e controle A), e 15 dentes humanos  
10 extraídos, incisivos centrais superiores (controle B).

11

12 **Tabela 1.** Grupos testados para a liberação de íons cálcio e variação de pH.

Grupos	Composição
HEA100	Ca(OH) <sub>2</sub> + aroeira [100] + propilenoglicol
HEA20	Ca(OH) <sub>2</sub> + aroeira [20] + propilenoglicol
HEA2	Ca(OH) <sub>2</sub> + aroeira [2] + propilenoglicol
HEA04	Ca(OH) <sub>2</sub> + aroeira [0,4] + propilenoglicol
Controle A	Ca(OH) <sub>2</sub> + propilenoglicol (dente acrílico)
Controle B	Ca(OH) <sub>2</sub> + propilenoglicol (dente humano)

13 \*HEA100 = Hidróxido de cálcio + extrato de aroeira [100mg/ml] + veículo;

14 \*HEA20 = Hidróxido de cálcio + extrato de aroeira [20mg/ml] + veículo;

15 \*HEA2 = Hidróxido de cálcio + extrato de aroeira [2mg/ml] + veículo;

16 \*HEA04 = Hidróxido de cálcio + extrato de aroeira [0,4mg/ml] + veículo;

17

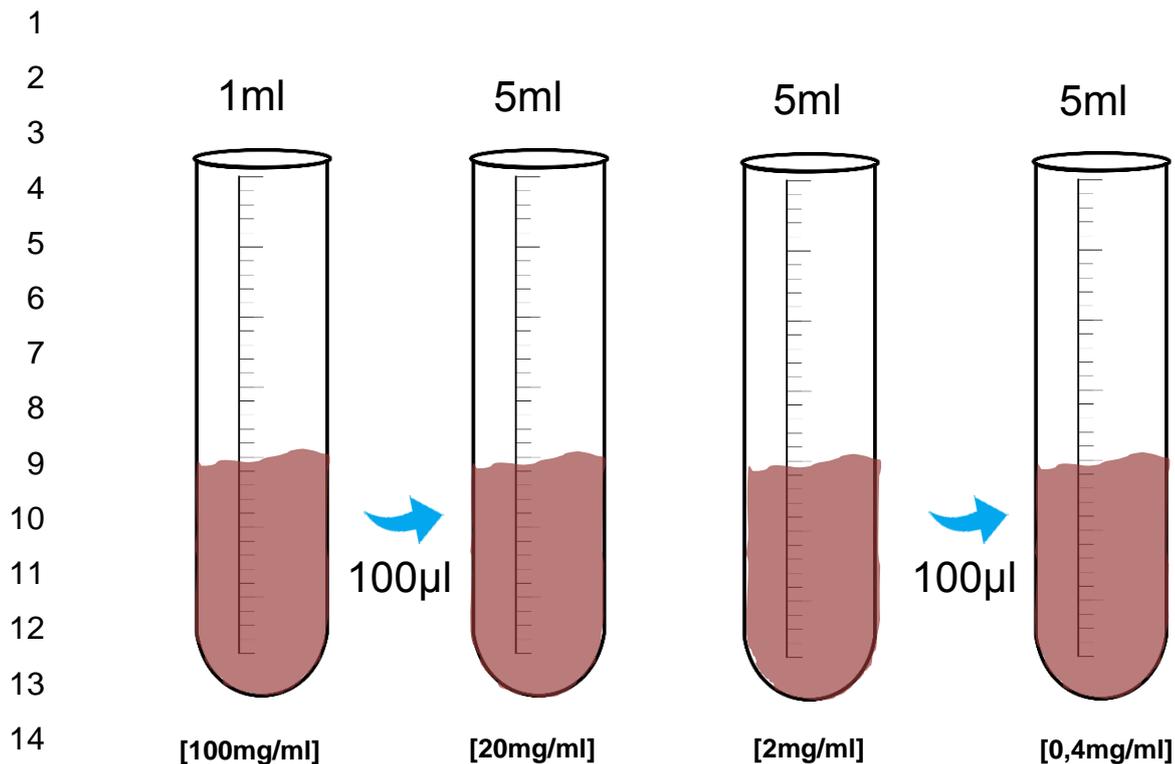
### 18 **Seleção e preparo das amostras**

19 Os dentes tiveram seus forames padronizados em 400 µm, e irrigados com  
20 EDTA Dissódico 17% (2 mL). Na sequência foi realizado a irrigação final com 10  
21 mL de água deionizada em cada dente de acrílico, e 10 mL de Hipoclorito de  
22 Sódio 2,5% em cada dente humano extraído. A secagem dos condutos foi  
23 executada com pontas de papel absorvente. Os dentes foram preenchidos com  
24 as pastas, de acordo com a metodologia proposta por Duarte et al. (17). Na  
25 sequência foram inseridos em recipiente de plástico contendo 10 mL de água  
26 deionizada, tamponada em pH 6.9, mantida em estufa à 37 °C.

27

28

### 29 **Preparação das pastas dos grupos experimentais**



**Figura 1.** Ilustração da diluição do extrato seco em água deionizada para preparação das pastas.

O extrato seco foi diluído previamente para preparação das pastas. A figura 1 ilustra a dissolução e diluição do extrato, nas diferentes concentrações [100mg/ml] = HEA100, [20mg/ml] = HEA20, [2mg/ml] = HEA2, [0,4mg/ml] = HEA04. As pastas foram manipuladas, acrescentando as concentrações da composição de cada grupo experimental.

Grupo HEA100, 200 mg  $\text{Ca(OH)}_2$  + 100  $\mu\text{L}$  propilenoglicol + 100  $\mu\text{L}$  extrato de aroeira [100mg/ml]. Grupo HEA20, 200 mg  $\text{Ca(OH)}_2$  + 100  $\mu\text{L}$  propilenoglicol + 100  $\mu\text{L}$  extrato de aroeira [20mg/ml]. Grupo HEA2, 200 mg  $\text{Ca(OH)}_2$  + 100  $\mu\text{L}$  propilenoglicol + 100  $\mu\text{L}$  extrato de aroeira [2mg/ml]. Grupo HEA04, 200 mg  $\text{Ca(OH)}_2$  + 100  $\mu\text{L}$  propilenoglicol + 100  $\mu\text{L}$  extrato de aroeira [0,4mg/ml]. E os grupos controles, 200 mg  $\text{Ca(OH)}_2$  + 200  $\mu\text{L}$  propilenoglicol.

### **Liberação de íons cálcio**

1 A medição foi realizada por espectrofotometria utilizando kit comercial  
2 (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) de determinação de cálcio, segundo as  
3 instruções do fabricante. Foi acrescentado 1 mL de reagente em uma  
4 microcubeta, 20 µL da amostra, e feito a leitura no espectrofotômetro.

### 5 6 **Mensuração da variação de pH**

7 Após os tempos experimentais de 3, 24, 72, 168, 240, 360 e 720 horas, foi  
8 realizado as mensurações do pH das águas deionizadas, sendo avaliado com um  
9 pHmetro digital (Digimed, D20, São Paulo, SP, Brasil). O pHmetro foi calibrado  
10 com soluções tampões já de terminadas (4,7 e 7), sempre antes do início das  
11 mensurações.

### 12 13 **Ensaio de Viabilidade Celular**

14 Os testes de viabilidade celular, redução do MTT (brometo de 3-(4,5-  
15 dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio) e incorporação do cristal violeta), utilizando-  
16 se células NIH/3T3, foram realizados em placas de 96 poços, após incubação de  
17 24, 48 e 72h com os tratamentos. Para os testes de viabilidade celular, os grupos  
18 de controle positivo e negativo foram as células tratadas, respectivamente, com:  
19 meio de cultura (DMEM) e 10% SFB, e água deionizada.

### 20 21 **Preparação do tratamento para as células**

22 As pastas foram manipuladas acrescentando as concentrações do extrato  
23 de aroeira, 1:10, 1:50, 1:500 e 1:5000, e 0,8 g de cada pasta com o extrato de  
24 aroeira-do-sertão foi aplicada ao fundo de uma placa de petri (35 mm x 10 mm)  
25 obtendo-se uma área de superfície da amostra livre de 55 mm<sup>2</sup>, de acordo com a  
26 normativa da ISO 10993-5. Posteriormente, cada espécime foi coberto com 8 mL  
27 de meio de cultura DMEM (Sigma-Biosciences) a 37 °C por um período total de  
28 24h, os sobrenadantes foram filtrados através de uma membrana de 0,22 µm  
29 (Millipore Expresso PLUS Membrane, Millipore Inc., Billerica, MA, EUA), e  
30 considerado como extrato 100%. Foi realizado diluições em série a partir das  
31 soluções previamente preparadas, para obtenção de diluições de 10%, 1%, 0,1%,  
32 0,01%, e suplementado em meio de cultura DMEM. As células foram plaqueadas  
33 em placas de 96 poços a uma densidade de células de 3 x 10<sup>3</sup> células/ poço.  
34 Após 24h, foi adicionado os extratos para cada diluição em série a cada poço e

1 incubado durante 24, 48 e 72h à 37 °C numa atmosfera humidificada contendo  
2 5% de CO<sub>2</sub>.

3

#### 4 **Redução do MTT**

5 A viabilidade celular foi verificada pelo método de redução do MTT. O  
6 formazan formado foi solubilizado, e a absorbância foi determinada em leitor de  
7 microplacas (FluoStar OPTIMA) a 570 nm.

8

#### 9 **Cristal Violeta**

10 Após a incubação com os tratamentos, os poços foram lavados com PBS  
11 (*phosphate-buffered saline*) e fixados em etanol-glacial absoluto e ácido acético  
12 (3:1, v/v) por dez minutos a temperatura ambiente, e foi deixando secar a 25 °C.  
13 As células foram coradas com cristal violeta a 0,1% (p/v) por dez minutos a 25 °C,  
14 encubando à 37 °C, envolvida em papel alumínio. O excesso do corante foi  
15 removido e lavado duas vezes com água deionizada. O corante foi extraído em  
16 ácido acético a 10% (v/v) e a absorbância foi avaliada a 550 nm em leitor de  
17 microplacas (FluoStar OPTIMA).

18

#### 19 **Análise estatística**

20 Os dados obtidos nos testes de viabilidade celular, mensuração da  
21 liberação de íons cálcio e variação do pH, foram analisados quanto à  
22 normalidade e homogeneidade de variância. Para os casos com distribuição  
23 normal, diferenças entre os grupos foram determinadas estatisticamente por meio  
24 do teste Anova com o post-hoc de Tukey. Para os casos com distribuição não  
25 normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com o post-hoc de Dunn. Todas as  
26 hipóteses foram testadas com um nível de significância de 5%.

27

### 28 **Resultados**

#### 29 **Variação do pH e liberação de íons cálcio**

30 A tabela 2 indica que o pH demonstrou diferenças estatisticamente  
31 significantes nos períodos de 168 horas e 240 horas. Na liberação de íons cálcio  
32 houve diferenças estatisticamente significante entre os grupos com dentes de  
33 acrílico e o grupo com dentes humanos (p<0,05).

1

2 **Tabela 2:** Média e desvio padrão da variação de pH e liberação de íons cálcio  
 3 (mg/dL) dos grupos experimentais em diferentes períodos.

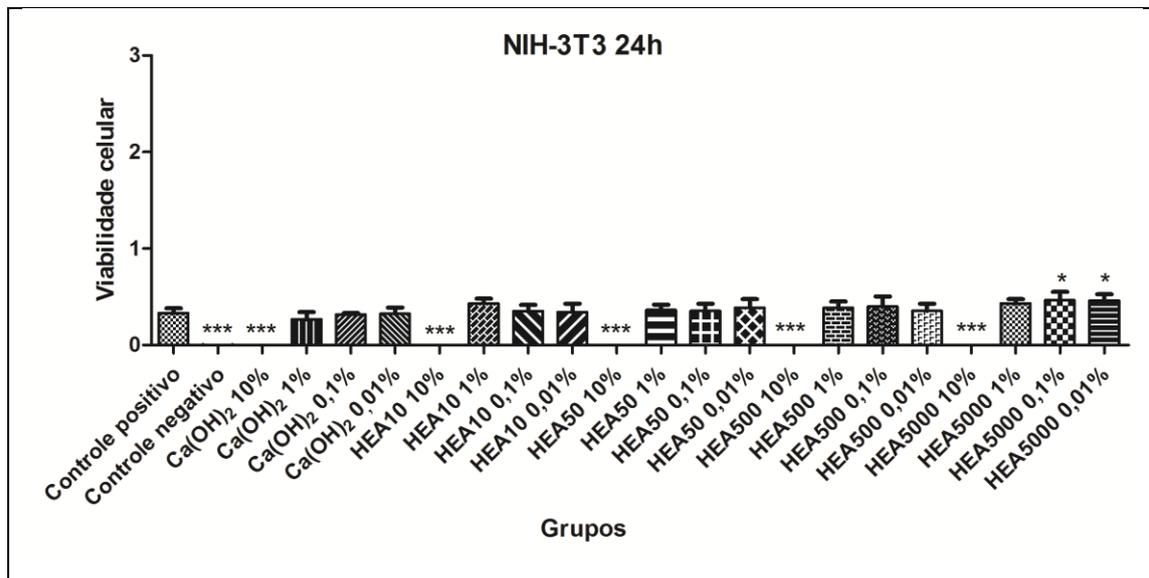
Período	Liberação de						
	pH e Cálcio	HEA1:10	HEA1:50	HEA1:500	HEA1:5000	Controle A	Controle B
3hrs	pH	9.33 <sup>a</sup> (1.20)	9.74 <sup>a</sup> (0.74)	9.36 <sup>a</sup> (0.76)	9.65 <sup>a</sup> (0.53)	10.04 <sup>a</sup> (0.97)	9.89 <sup>a</sup> (0.73)
24hrs	pH	8.34 <sup>a</sup> (0.62)	8.35 <sup>a</sup> (0.50)	8.22 <sup>a</sup> (0.54)	8.10 <sup>a</sup> (0.38)	8.03 <sup>a</sup> (0.58)	8.39 <sup>a</sup> (0.61)
72hrs	pH	7.95 <sup>a</sup> (0.57)	8.02 <sup>a</sup> (0.39)	7.93 <sup>a</sup> (0.34)	8.08 <sup>a</sup> (0.31)	8.08 <sup>a</sup> (0.48)	8.35 <sup>a</sup> (0.44)
168hrs	pH	8.08 <sup>ab</sup> (0.51)	8.07 <sup>ab</sup> (0.39)	7.85 <sup>b</sup> (0.31)	8.07 <sup>b</sup> (0.31)	8.09 <sup>ab</sup> (0.44)	8.51 <sup>a</sup> (0.48)
	Cálcio	2.29 <sup>a</sup> (0.93)	1.84 <sup>a</sup> (0.58)	1.86 <sup>a</sup> (0.61)	1.77 <sup>a</sup> (0.72)	2.38 <sup>a</sup> (1.28)	0.75 <sup>b</sup> (0.69)
240hrs	pH	7.88 <sup>a</sup> (0.44)	7.96 <sup>a</sup> (0.13)	7.98 <sup>a</sup> (0.12)	8.00 <sup>ab</sup> (0.27)	7.86 <sup>ab</sup> (0.40)	8.26 <sup>b</sup> (0.36)
360hrs	pH	7.75 <sup>a</sup> (0.40)	7.85 <sup>a</sup> (0.26)	7.90 <sup>a</sup> (0.22)	7.97 <sup>a</sup> (0.26)	7.93 <sup>a</sup> (0.26)	8.02 <sup>a</sup> (0.52)
	Cálcio	2.81 <sup>a</sup> (1.28)	2.16 <sup>a</sup> (0.80)	2.33 <sup>a</sup> (1.01)	2.33 <sup>a</sup> (0.99)	2.94 <sup>a</sup> (1.08)	0.55 <sup>b</sup> (0.54)
720hrs	pH	8.21 <sup>a</sup> (0.42)	8.25 <sup>a</sup> (0.19)	8.33 <sup>a</sup> (0.20)	8.37 <sup>a</sup> (0.23)	8.30 <sup>a</sup> (0.19)	8.27 <sup>a</sup> (0.59)
	Cálcio	6.22 <sup>a</sup> (1.48)	5.49 <sup>a</sup> (1.46)	5.92 <sup>a</sup> (2.10)	5.49 <sup>a</sup> (3.48)	5.64 <sup>a</sup> (2.72)	1.34 <sup>b</sup> (1.43)

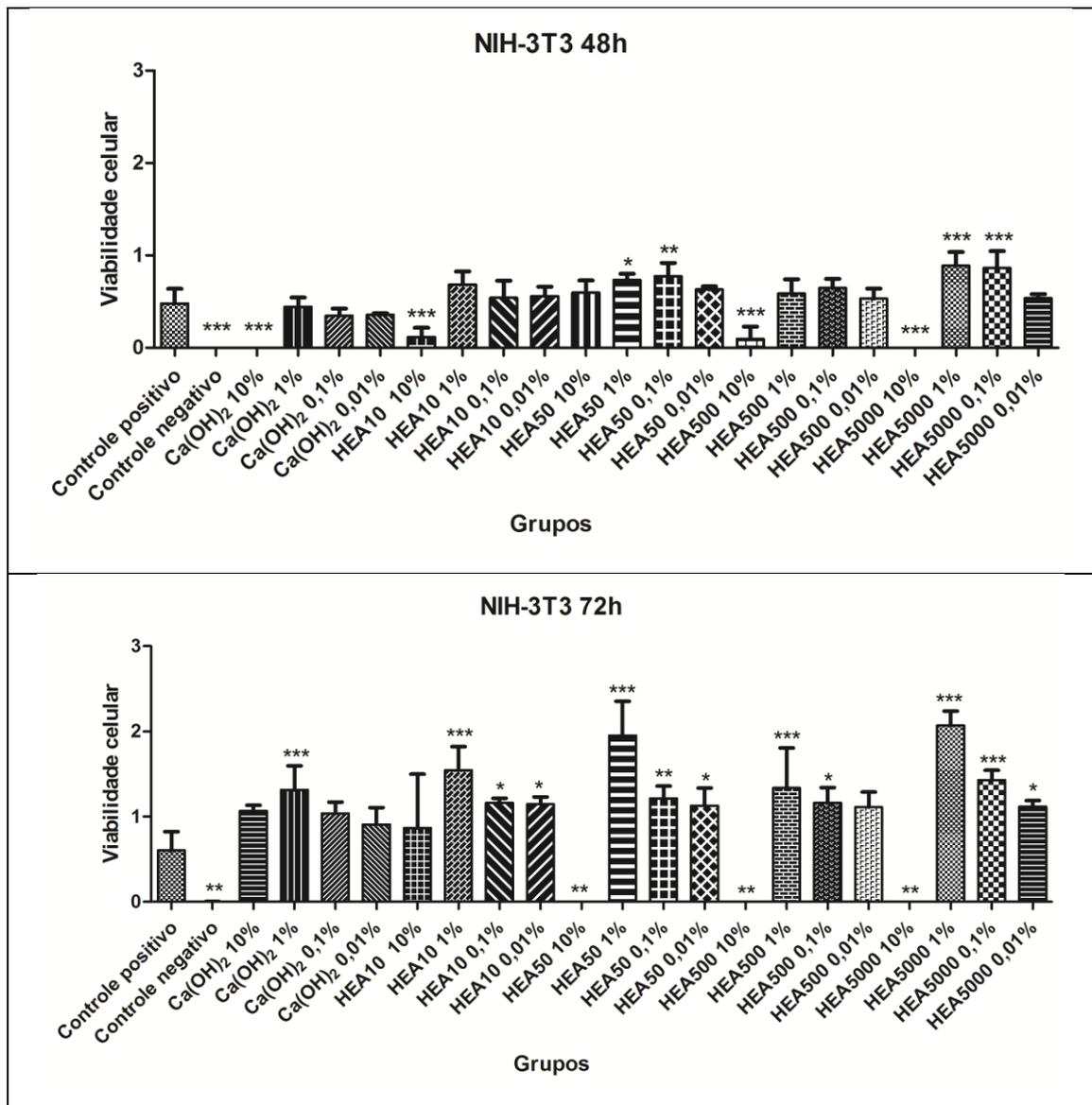
4 Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de variação de  
 5 pH e liberação de Ca<sup>++</sup> para cada período (p<0.05).

6

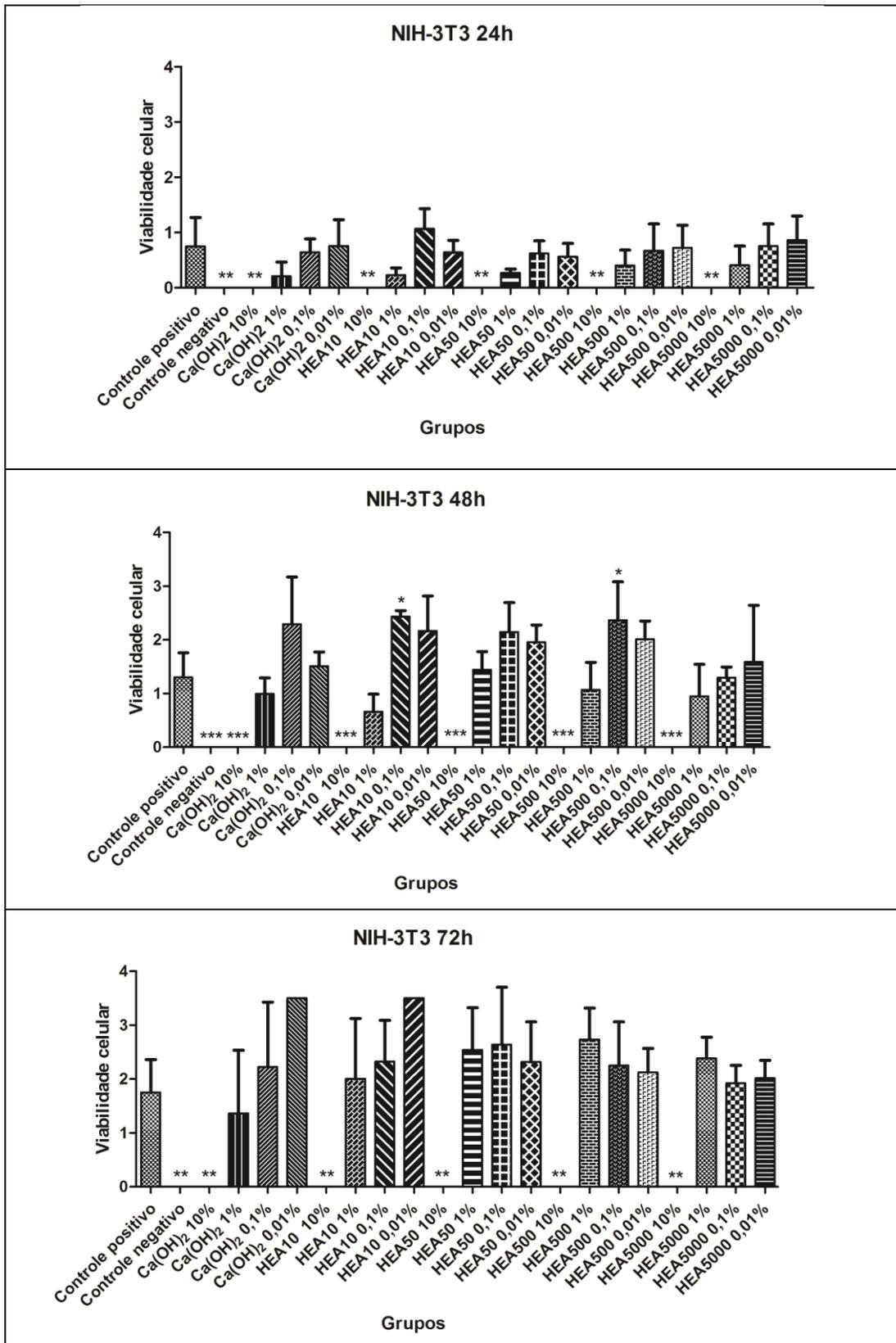
7 **Viabilidade Celular**

8 A viabilidade celular nos tratamentos das concentrações de 10%  
 9 apresentou resultados próximos a zero em ambos os métodos, indicando assim  
 10 ausência de células viáveis/funcionais. Para os outros grupos, os valores  
 11 oscilaram durante os períodos experimentais (24, 48 e 72h), mas ficaram sempre  
 12 próximos aos valores do controle positivo em ambos testes (MTT e Cristal  
 13 Violeta).





1 **FIGURA 2.** Ensaio de MTT nos diferentes períodos (24, 48 e 72 horas). Controle  
 2 positivo (DMEM + 10% SFB) e controle negativo (H<sub>2</sub>O).  
 3



1 **FIGURA 3.** Incorporação do cristal violeta (CV) nos períodos experimentais de  
 2 24, 48 e 72 horas. Controle positivo (DMEM + 10% SFB) e controle negativo  
 3 (H<sub>2</sub>O).

## 1 **Discussão**

2 A hipótese testada nesse estudo foi aceita, pois se observou que o extrato  
3 de aroeira-do-sertão associado a pasta de hidróxido de cálcio, não se apresentou  
4 citotóxico e não alterou a liberação de cálcio e variação do pH.

5 O extrato de aroeira-do-sertão tem sido utilizado para tratar hemorragias e  
6 outras condições (18, 19). O extrato já foi descrito pela literatura tendo  
7 propriedades analgésicas, anti-ulcerogênica e antiinflamatória (20). Baseado  
8 nessas propriedades, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da associação  
9 da pasta de hidróxido de cálcio com o extrato da aroeira-do-sertão por meio da  
10 mensuração da liberação de íons cálcio, variação de pH e viabilidade celular.

11 O extrato de aroeira-do-sertão seco foi previamente caracterizado na  
12 Universidade de São Paulo por meio do processo de triagem cromatográfica (21),  
13 e na sequência foi realizado o teste de citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de  
14 aroeira-do-sertão na linhagem de Fibroblastos gengivais humanos (FGH). A  
15 viabilidade celular foi realizada com diferentes concentrações nos períodos  
16 experimentais de 24, 48, 72 e 96 horas, por meio do MTT, captação do vermelho  
17 neutro e cristal violeta. Como resultado, obtiveram oscilações entre a absorbância  
18 em todos os grupos nos períodos experimentais. Para o teste de MTT os grupos  
19 controles e diluições de 1:100, 1:1000 e 1:10000 apresentaram maiores valores.  
20 Já para o vermelho neutro e cristal violeta, os resultados seguiram o mesmo  
21 padrão, valores de absorbância menores nos grupos do extrato bruto e 1:10. O  
22 extrato de aroeira-do-sertão foi capaz de modular a viabilidade de FGH de  
23 maneira dose-dependente.

24 Baseado nos resultados obtidos por Machado em 2016 (21), e conhecendo  
25 as dificuldades de desinfecção do sistema de canais radiculares, foi hipotetizado  
26 a associação do extrato de aroeira-do-sertão com a medicação mais utilizada em  
27 Endodontia, o hidróxido de cálcio. Para que esta associação fosse validada, o  
28 extrato puro foi dissolvido em várias concentrações, 2 dissoluções (1:10 e 1:50) e  
29 2 diluições (1:500 e 1:5000).

30 Clinicamente, a resposta da pasta de hidróxido de cálcio sem associação  
31 já é esperada porque, como medicação intracanal, possui um efeito cáustico  
32 quando em contato com tecido pulpar vivo (22) produzindo uma zona de necrose,

1 a qual estimula o tecido pulpar subjacente a responder com o potencial de reparo  
2 para formação da ponte dentinária (23).

3 O extrato seco foi dissolvido em água deionizada para a viabilidade da  
4 formulação da nova pasta de hidróxido de cálcio associado ao extrato de aroeira-  
5 do-sertão. Para esse estudo o propilenoglicol foi utilizado como veículo em todas  
6 as pastas, com ou sem associação ao extrato. O propilenoglicol é usado como  
7 veículo e solvente farmacológico em vários produtos, e sua aplicação como  
8 veículo na pasta de hidróxido de cálcio favorece a liberação de hidroxilas e íons  
9 cálcio quando comparado com veículos incluindo água destilada (6).

10 Estudos anteriores já demonstraram o objetivo de potencializar as  
11 propriedades da pasta de hidróxido de cálcio. Duarte em 2009 (6), avaliou o pH e  
12 a liberação de íons cálcio de pastas de hidróxido de cálcio contendo diferentes  
13 substâncias (solução de clorexidina 1%, gel de clorexidina 2%, extrato de  
14 Casearia sylvestris Sw, e propilenoglicol). O pH e a liberação de íons cálcio foi  
15 analisada nos períodos de 10 minutos, 24 e 48 horas, e 7, 15 e 30 dias. Por fim  
16 concluíram que todas as pastas tiveram comportamento semelhantes em relação  
17 ao pH e liberação de íons cálcio.

18 Para a variação de pH e liberação de íons cálcio, foram selecionados  
19 dentes de acrílicos e humanos extraídos. Para ambos os testes o forame de  
20 todos os dentes foram padronizado em 400 µm. Os resultados da liberação de  
21 íons cálcio em dentes de acrílico demonstraram uma maior confiabilidade dos  
22 dados, uma vez que não possuímos nenhum tipo de substância que possa  
23 interferir nos resultados, como houve no grupo que foi utilizado os dentes  
24 humanos, em que obtivemos diferenças estatisticamente significantes com todos  
25 os outros grupos experimentais. A liberação de íons cálcio foi maior no período  
26 de 30 dias para todos os grupos experimentais, exceto nos dentes humanos  
27 extraídos. Íons cálcio tem um papel importante na mineralização de tecidos  
28 estimulando a expressão gênica da fibronectina (6).

29 A variação de pH neste estudo mostra algumas diferenças  
30 estatisticamente significantes, porém a análise das médias e desvios padrões,  
31 mostra que clinicamente poderia reproduzir pouca diferença durante a terapia  
32 endodôntica. O pH entre 8.6 e 10.3 é suficiente para ativar a ação biológica da  
33 pasta de hidróxido de cálcio, favorecendo a ativação da enzima fosfatase

1 alcalina. A enzima permite a reação do fosfato com o cálcio, relacionando-se com  
2 o processo de mineralização (3).

3 A utilização de teste *in vitro* por meio de ensaios de viabilidade celular  
4 constitui o primeiro passo para a avaliação da compatibilidade biológica de uma  
5 substância e pode fornecer elementos importantes para a análise da  
6 biocompatibilidade de diferentes materiais (24). Para o teste de viabilidade *in*  
7 *vitro*, um produto não deve ocasionar a morte celular, nem afetar suas funções  
8 celulares. Sendo assim, com o uso de cultura de células, os testes podem  
9 detectar a ocorrência de redução da viabilidade celular, inibição do crescimento  
10 celular, e de outros efeitos que possam ser desencadeados nas células (25). Os  
11 ensaios de MTT e cristal violeta possuem a vantagem de várias amostras serem  
12 processadas ao mesmo tempo, além do substrato não interferir na leitura (26). A  
13 reprodutividade dos testes *in vitro*, como a cultura celular apresenta como  
14 benefício também a redução do uso de animais para testes.

15 Quanto aos testes de viabilidade celular utilizado neste estudo, MTT e  
16 cristal violeta, ambos demonstraram que medicação de hidróxido de cálcio  
17 associada ao extrato de aroeira pode ser favorável em todas as diluições, exceto  
18 quando associado a concentração de 10%. Além disso, pode-se observar que  
19 uma concentração de hidróxido de cálcio a 10% sem associação não permitiu a  
20 viabilidade celular, dado que permite sugerir sua participação efetiva no  
21 resultado. Por outro lado, os resultados sugerem que o extrato de aroeira pode  
22 aumentar a viabilidade celular, principalmente em 72 horas, com maior número  
23 de células viáveis quando comparada ao controle positivo.

24 O extrato de aroeira associado a pasta de hidróxido de cálcio não  
25 demonstrou interferência ao grupo controle em relação ao pH, liberação de íons  
26 cálcio e viabilidade celular. Novos estudos, tanto *in vitro* como *in vivo* devem ser  
27 realizados a fim de validar esta possível associação.

28

29

30

31

32

33

34 **Conclusão**

1 Baseado em nossa metodologia e resultados, concluímos que a  
2 medicação intracanal formulada em associação do hidróxido de cálcio com o  
3 extrato de aroeira-do-sertão não alterou o pH e a liberação de íons cálcio, e  
4 manteve a viabilidade celular, nos sugerindo uma nova alternativa de medicação  
5 intracanal para pesquisas futuras.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

## 1 Referências

- 2 1. De Freitas RP, Greatti VR, Alcalde MP, Cavenago BC, Vivan RR, Duarte  
3 MAH, et al. Effect of the association of nonsteroidal anti-inflammatory and  
4 antibiotic drugs on antibiofilm activity and ph of calcium hydroxide pastes.  
5 J Endod. 2017;43(1):131-134.
- 6 2. Zampronio CF, Sivieri-Araújo G, Bonetti-Filho I, Berbert FLCV. pH  
7 changes after manual or ultrasonic instrumentation and smear layer  
8 removal with EDTA or ultrasonic. Dent Traumatol. 2008;24(5):542–5.
- 9 3. Estrela C, Pécora JD, Souza-Neto MD, Estrela CRA, Bammann LL. Effect  
10 of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. Braz  
11 Dent J. 1999;10(2):63–72.
- 12 4. El karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal  
13 irrigation and medication. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol  
14 Endodontology. 2007;103(4):560–9.
- 15 5. Farhad AR, Barekatin B, Allameh M, Narimani T. Evaluation of the  
16 antibacterial effect of calcium hydroxide in combination with three different  
17 vehicles: an in vitro study. Dent Res J. 2012;9(2):167-72.
- 18 6. Duarte MAH, Midea RZ, Zeferino MA, Vivan RR, Weckwerth PH, Santos  
19 F, et al. Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide  
20 pastes containing diferente substances. J Endod. 2009;35(9):1274-77.

- 1 7. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of  
2 camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium  
3 hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.*  
4 1985;1(5):170-5.
- 5 8. Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg K-E, Sundqvist G. Intraradicular  
6 bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-  
7 resistant periapical lesions: A long-term light and electron microscopic  
8 follow-up study. *J Endod.* 1990;16(12):580–8.
- 9 9. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis*  
10 with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004;30(5):315-20.
- 11 10. Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AO. *Enterococcus faecalis*:  
12 considerações clínicas e microbiológicas. *Rev Odontol UNESP.*  
13 2007;36(2):163-8.
- 14 11. Gaetti-Jardim Junior E, Landucci LF, Arafat OK, Ranieri RV, Ramos MM,  
15 Ciesielski FI et al. Antimicrobial activity of six plant extracts from the  
16 Brazilian savanna on periodontal pathogens. *Int J Odontostomatol.*  
17 2011;5(3):249-56.
- 18 12. Machado AC, Ruvierre DB, Novais RZ, Bueno CRE, Jardim Junior EG,  
19 Oliveira RC, Dezan Junior E. The dynamics of subcutaneous tissue  
20 response to microorganisms associated with the extract of araçá (*Psidium*  
21 *cattleianum*): an edemogenic and microscopic analysis. *Braz Dent Sci.*  
22 2017;20(2):93-101.
- 23 13. Brighenti FL, Luppens SB, Delbem AC, Deng DM, Hoogenkamp MA,  
24 Gaetti-Jardim E Jr et al. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on  
25 *Streptococcus mutans* viability, protein expression and acid production.  
26 *Caries Res.* 2008;42(2):148-54.
- 27 14. Botelho MA, Rao VS, Carvalho CBM, Bezerra-Filho JG, Fonseca SGC,  
28 Vale ML, et al. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents  
29 alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J*  
30 *Ethnopharmacol.* 2007;113(3):471–8.

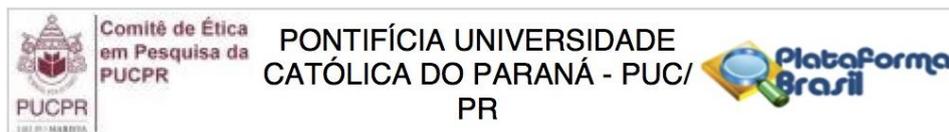
- 1        15. Leite EJ. State-of-knowledge on Myracrodruon urundeuva Fr. Allemão  
2            (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. *Perspect Plant Ecol*  
3            *Evol Syst.* 2002;5(3):193-206.
- 4        16. Deharo E, Baelmans R, Gimenez A, Quenevo C, Bourdy G. *In vitro*  
5            immunomodulatory activity of plants used by the Tacana ethnic group in  
6            Bolívia. *Phytomedicine.* 2004; 11:516-522.

- 1 17. Duarte MA, Demarchi ACCO, Giaxa MH, Kuga MC, Fraga SC, Souza  
2 LCD. Evaluation of pH and calcium ion release of three root canal sealers.  
3 Journal of Endodontics. 2000;26(7)389-390.
- 4 18. Viana GS, Bandeira MA, Matos FJ A. Analgesic and antiinflammatory  
5 effects of chalcones isolated from Myracrodruon urundeuva Allemao.  
6 Phytomedicine. 2003;10, 189-195.
- 7 19. Monteiro JM, de Albuquerque UP, Lins-Neto EM., de Araújo EL. de  
8 Amorin, E.L. Use patterns and knowledge of medicinal species among two  
9 rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. Journal of  
10 Ethnopharmacology. 2006;105, 173-186.
- 11 20. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas.  
12 Nova Odessa, Instituto Plantarum. Luz MT. Cultura contemporânea e  
13 medicinais alternativas. Novos paradigmas em saúde no fim do século XX.  
14 Ver Saúde Coletiva. 2005;15, 145-176.
- 15 21. Machado, A.C., Souza, L.P., Saldanha, L., Pieroni, L.G., Matos, A.A., de  
16 Oliveira, F.A., Vilegas, W., Damante, C.A., Dokkedal, A.L., de Oliveira,  
17 R.C. "Aroeira" (Myracrodruon urundeuva) metanol: extract the relationship  
18 between chemical compounds and cellular effects. Pharmaceutical Biology  
19 2016;54, 2737-2741.
- 20 22. Schroder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agentes  
21 on pulp cell migration, proliferation and differentiation. Journal of Dental  
22 Research. 1985;64 (Spec.) 541-548.
- 23 23. Accorinte MLR, Loguercio AD, Reis A, Carneiro E, Grande RHM, Murata  
24 SS, Holland R. Response of human Dental Pulp with MTA and Calcium  
25 hydroxide power. Operative Dentistry, 2008;33(5), 488-495.

- 1 24. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz ÁS. Teste in vitro de citotoxicidade:  
2 estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*,  
3 2003;6(3): 317–320.
- 4 25. Daguano JKMF, Santos C, Rogero SO. Avaliação da citotoxicidade de  
5 biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. *Revista*  
6 *Matéria*, 2007;12: 134–139.
- 7 26. Abernathy CO, Liu YP, Longfellow D, Aposhian HV, Beck B, Fowler B, et  
8 al. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues.  
9 *Environmental Health Perspectives*, 1999;107(7): 593–597.
- 10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

# 1 ANEXOS

## 2 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, EFEITO ANTIMICROBIANO, LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO E MENSURAÇÃO DO PH DE UMA MEDICAÇÃO A BASE DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADO AO EXTRATO DE AROEIRA (MYRACRODRUON URUNDEUVA).

**Pesquisador:** Everdan Carneiro

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 79045717.4.0000.0020

**Instituição Proponente:** Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

**Patrocinador Principal:** Fundação Araucária

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.348.478

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo experimental utilizando dentes do banco de dentes de uma IES do Paraná. Serão formados seis grupos para utilização de soluções testes diferentes, incluindo os grupos controles.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a viabilidade da formulação de uma nova medicação a base de hidróxido de cálcio associado ao extrato de aroeira-do-sertão (Myracrodrun urundeuva).

Formular uma nova medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio associado ao extrato de aroeira.

Avaliar citotoxicidade celular, efeito antimicrobiano da nova medicação intracanal.

Avaliar o pH e liberação de íons cálcio da nova medicação.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não existem riscos. Não prevê benefício.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante com objetivos claros e metodologia adequada.

**Endereço:** Rua Imaculada Conceição 1155  
**Bairro:** Prado Velho **CEP:** 80.215-901  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br

1            2. Análise estatística  
 2            2.1 pH

<b>Testes de Normalidade</b>				
Variável	Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
		Estatística	df	Valor p
PH 3 hrs	G1	0,257	15	0,00887
	G2	0,146	15	,200*
	G3	0,252	15	0,01134
	G4	0,221	15	0,04742
	G5	0,126	15	,200*
	G6	0,206	15	0,08676
PH 24 hrs	G1	0,117	15	,200*
	G2	0,199	15	0,11337
	G3	0,247	15	0,01434
	G4	0,264	15	0,00616
	G5	0,343	15	0,00004
	G6	0,133	15	,200*
PH 72 hrs	G1	0,191	15	0,14579
	G2	0,108	15	,200*
	G3	0,221	15	0,04729
	G4	0,186	15	0,17428
	G5	0,116	15	,200*
	G6	0,155	15	,200*
PH 168 hrs	G1	0,139	15	,200*
	G2	0,170	15	,200*
	G3	0,145	15	,200*
	G4	0,199	15	0,11334
	G5	0,197	15	0,12303
	G6	0,176	15	,200*
PH 240 hrs	G1	0,208	15	0,07981
	G2	0,255	15	0,00976
	G3	0,134	15	,200*
	G4	0,128	15	,200*
	G5	0,154	15	,200*
	G6	0,143	15	,200*
PH 360 hrs	G1	0,163	15	,200*
	G2	0,223	15	0,04245
	G3	0,187	15	0,16915
	G4	0,152	15	,200*
	G5	0,132	15	,200*
	G6	0,140	15	,200*
PH 720 hrs	G1	0,208	15	0,08105
	G2	0,187	15	0,16807
	G3	0,152	15	,200*
	G4	0,272	15	0,00390
	G5	0,225	15	0,03956
	G6	0,258	15	0,00822

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

3  
4

**Descritivos**

Variável	Grupo	N	Média	Erro Desvio	Erro Erro	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
PH 3 hrs	G1	15	9,3313	1,20413	0,31090	8,6645	9,9982	6,93	10,95
	G2	15	9,7413	0,74301	0,19185	9,3299	10,1528	8,47	11,05
	G3	15	9,3647	0,76596	0,19777	8,9405	9,7888	7,58	10,45
	G4	15	9,6500	0,53809	0,13893	9,3520	9,9480	8,92	10,38
	G5	15	10,0400	0,97546	0,25186	9,4998	10,5802	8,00	11,40
	G6	15	9,8980	0,73035	0,18858	9,4935	10,3025	8,39	10,88
	Total	90	9,6709	0,86842	0,09154	9,4890	9,8528	6,93	11,40
PH 24 hrs	G1	15	8,3460	0,62133	0,16043	8,0019	8,6901	7,41	9,82
	G2	15	8,3540	0,50273	0,12980	8,0756	8,6324	7,29	9,11
	G3	15	8,2247	0,54649	0,14110	7,9220	8,5273	7,46	9,87
	G4	15	8,1047	0,38864	0,10035	7,8894	8,3199	7,29	8,70
	G5	15	8,0380	0,58431	0,15087	7,7144	8,3616	6,96	8,56
	G6	15	8,3907	0,61891	0,15980	8,0479	8,7334	7,14	9,23
	Total	90	8,2430	0,55053	0,05803	8,1277	8,3583	6,96	9,87
PH 72 hrs	G1	15	7,9513	0,57054	0,14731	7,6354	8,2673	7,09	9,17
	G2	15	8,0287	0,39948	0,10315	7,8074	8,2499	7,36	8,70
	G3	15	7,9307	0,34796	0,08984	7,7380	8,1234	7,30	8,43
	G4	15	8,0880	0,31392	0,08105	7,9142	8,2618	7,47	8,60
	G5	15	8,0827	0,48563	0,12539	7,8137	8,3516	7,23	8,82
	G6	15	8,3500	0,44851	0,11580	8,1016	8,5984	7,74	9,07
	Total	90	8,0719	0,44589	0,04700	7,9785	8,1653	7,09	9,17
PH 168 hrs	G1	15	8,0807	0,51354	0,13259	7,7963	8,3651	7,08	8,91
	G2	15	8,0760	0,39857	0,10291	7,8553	8,2967	7,29	8,57
	G3	15	7,8533	0,31075	0,08024	7,6812	8,0254	7,47	8,40
	G4	15	8,0740	0,31507	0,08135	7,8995	8,2485	7,51	8,57
	G5	15	8,0907	0,44711	0,11544	7,8431	8,3383	7,17	8,62
	G6	15	8,5113	0,48896	0,12625	8,2406	8,7821	7,95	9,39
	Total	90	8,1143	0,45297	0,04775	8,0195	8,2092	7,08	9,39
PH 240 hrs	G1	15	7,8813	0,44376	0,11458	7,6356	8,1271	6,59	8,62
	G2	15	7,9627	0,13688	0,03534	7,8869	8,0385	7,55	8,12
	G3	15	7,9893	0,12981	0,03352	7,9174	8,0612	7,77	8,31
	G4	15	8,0067	0,27691	0,07150	7,8533	8,1600	7,48	8,45
	G5	15	7,8647	0,40694	0,10507	7,6393	8,0900	6,93	8,30
	G6	15	8,2607	0,36149	0,09334	8,0605	8,4609	7,50	8,87
	Total	90	7,9942	0,33523	0,03534	7,9240	8,0644	6,59	8,87
PH 360 hrs	G1	15	7,7540	0,40026	0,10335	7,5323	7,9757	6,69	8,35
	G2	15	7,8533	0,26792	0,06918	7,7050	8,0017	7,53	8,30
	G3	15	7,9000	0,22841	0,05898	7,7735	8,0265	7,55	8,36
	G4	15	7,9707	0,26040	0,06723	7,8265	8,1149	7,63	8,37
	G5	15	7,9333	0,26901	0,06946	7,7844	8,0823	7,54	8,34
	G6	15	8,0247	0,52127	0,13459	7,7360	8,3133	7,18	8,81
	Total	90	7,9060	0,34215	0,03607	7,8343	7,9777	6,69	8,81
PH 720 hrs	G1	15	8,2167	0,42076	0,10864	7,9837	8,4497	7,27	8,64
	G2	15	8,2573	0,19466	0,05026	8,1495	8,3651	7,77	8,46
	G3	15	8,3393	0,20631	0,05327	8,2251	8,4536	8,01	8,70
	G4	15	8,3773	0,23359	0,06031	8,2480	8,5067	7,99	8,72
	G5	15	8,3007	0,19977	0,05158	8,1900	8,4113	7,89	8,61
	G6	15	8,2787	0,59276	0,15305	7,9504	8,6069	7,07	8,84
	Total	90	8,2950	0,33680	0,03550	8,2245	8,3655	7,07	8,84

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7

Teste Kruskal-Wallis

## Postos

Variável	Grupo	N	Posto Médio
PH 3 hrs	G1	15	39,93
	G2	15	46,27
	G3	15	34,37
	G4	15	41,80
	G5	15	56,80
	G6	15	53,83
	Total		90
PH 24 hrs	G1	15	48,43
	G2	15	55,20
	G3	15	41,43
	G4	15	37,53
	G5	15	39,53
	G6	15	50,87
	Total		90
PH 72 hrs	G1	15	37,67
	G2	15	43,73
	G3	15	37,33
	G4	15	47,30
	G5	15	47,33
	G6	15	59,63
	Total		90
PH 168 hrs	G1	15	45,37
	G2	15	44,97
	G3	15	28,63
	G4	15	43,40
	G5	15	46,43
	G6	15	64,20
	Total		90
PH 240 hrs	G1	15	36,70
	G2	15	41,27
	G3	15	41,80
	G4	15	47,23
	G5	15	40,87
	G6	15	65,13
	Total		90
PH 360 hrs	G1	15	35,33
	G2	15	39,07
	G3	15	45,53
	G4	15	51,57
	G5	15	48,30
	G6	15	53,20
	Total		90
PH 720 hrs	G1	15	42,80
	G2	15	35,83
	G3	15	46,40
	G4	15	51,70
	G5	15	41,20
	G6	15	55,07
	Total		90

**Estadísticas de teste<sup>a,b</sup>**

Kruskal-Wallis	PH 3 hrs	PH 24 hrs	PH 72 hrs	PH 168 hrs	PH 240 hrs	PH 360 hrs	PH 720 hrs
H de Kruskal-Wallis	8,053	5,433	7,419	14,065	11,413	5,468	5,497
gl	5	5	5	5	5	5	5
Valor p	0,153	0,365	0,191	0,015	0,044	0,361	0,358

a. Teste Kruskal Wallis

b. Variável de Agrupamento: Grupo

1

2

PH 168 hrs entre Grupo		

3

**Comparações múltiplas não paramétricas de Dunn**

Sample 1-Sample 2	Diferença de Posto médio	Estatística do teste	Valor p
G3-G4	-14,767	-1,548	0,122
G3-G2	16,333	1,712	0,087
G3-G1	16,733	1,754	0,079
G3-G5	-17,800	-1,866	0,062
G3-G6	-35,567	-3,729	0,000
G4-G2	1,567	0,164	0,870
G4-G1	1,967	0,206	0,837
G4-G5	-3,033	-0,318	0,750
G4-G6	-20,800	-2,181	0,029
G2-G1	0,400	0,042	0,967
G2-G5	-1,467	-0,154	0,878
G2-G6	-19,233	-2,016	0,054
G1-G5	-1,067	-0,112	0,911
G1-G6	-18,833	-1,975	0,058
G5-G6	-17,767	-1,863	0,063

Cada linha testa a hipótese nula em que as distribuições da Amostra 1 e Amostra 2 são iguais.

As significâncias assintóticas (teste de dois lados) são exibidas. O nível de significância é ,05.

PH 240 hrs entre Grupo

**Comparações múltiplas não paramétricas de Dunn**

Sample 1-Sample 2	Diferença de Posto médio	Estatística do teste	Valor p
G1-G5	-4,167	-0,437	0,6622
G1-G2	-4,567	-0,479	0,6320
G1-G3	-5,100	-0,535	0,5928
G1-G4	-10,533	-1,105	0,2694
G1-G6	-28,433	-2,982	0,0430
G5-G2	0,400	0,042	0,9665
G5-G3	0,933	0,098	0,9220
G5-G4	6,367	0,668	0,5044
G5-G6	-24,267	-2,545	0,0109
G2-G3	-0,533	-0,056	0,9554
G2-G4	-5,967	-0,626	0,5315
G2-G6	-23,867	-2,503	0,0123
G3-G4	-5,433	-0,570	0,5689
G3-G6	-23,333	-2,447	0,0144
G4-G6	-17,900	-1,877	0,0605

Cada linha testa a hipótese nula em que as distribuições da Amostra 1 e Amostra 2 são iguais.  
As significâncias assintóticas (teste de dois lados) são exibidas. O nível de significância é ,05.

1

2

## 2.3 Cálcio

3

### ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE GRUPOS DENTRO DE CADA TEMPO

4

#### Testes de Normalidade

Variável	Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
		Estatística	df	Valor p
Liberação de Cálcio 7 dias	G1	0,128	15	,200*
	G2	0,177	15	,200*
	G3	0,156	15	,200*
	G4	0,129	15	,200*
	G5	0,125	15	,200*
	G6	0,165	15	,200*
Liberação de Cálcio 15 dias	G1	0,213	15	0,0660
	G2	0,118	15	,200*
	G3	0,137	15	,200*
	G4	0,146	15	,200*
	G5	0,100	15	,200*
	G6	0,201	15	0,1060
Liberação de Cálcio 30 dias	G1	0,173	15	,200*
	G2	0,189	15	0,1562
	G3	0,125	15	,200*
	G4	0,207	15	0,0847
	G5	0,178	15	,200*
	G6	0,204	15	0,0936

5

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

6

Valor p > 0,05 indica distribuição normal

7

### Descritivos

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
Liberação de Cálcio 7 dias	G1	15	2,29655	0,935256	0,241482	1,77862	2,81448	0,900	4,160
	G2	15	1,84380	0,585547	0,151188	1,51954	2,16807	0,679	2,691
	G3	15	1,86078	0,615337	0,158879	1,52002	2,20154	1,087	3,115
	G4	15	1,77306	0,721839	0,186378	1,37332	2,17280	0,560	3,039
	G5	15	2,38710	1,286984	0,332298	1,67439	3,09980	0,764	4,958
	G6	15	0,75325	0,694862	0,179413	0,36845	1,13806	0,000	2,046
Liberação de Cálcio 15 dias	G1	15	2,81834	1,289920	0,333056	2,10400	3,53267	1,350	5,000
	G2	15	2,16299	0,805776	0,208050	1,71676	2,60921	0,696	3,472
	G3	15	2,33333	1,013030	0,261563	1,77234	2,89433	0,883	3,939
	G4	15	2,33050	0,994570	0,256797	1,77973	2,88128	0,424	4,287
	G5	15	2,94624	1,082941	0,279614	2,34652	3,54595	1,112	4,754
	G6	15	0,55631	0,548291	0,141568	0,25268	0,85994	0,000	1,689
Liberação de Cálcio 30 dias	G1	15	6,22411	1,489936	0,384700	5,39901	7,04921	2,827	8,913
	G2	15	5,49406	1,460095	0,376995	4,68548	6,30263	1,698	8,336
	G3	15	5,92134	2,102195	0,542784	4,75718	7,08549	2,598	9,847
	G4	15	5,49745	3,488108	0,900626	3,56580	7,42910	0,000	13,480
	G5	15	5,64460	2,723549	0,703217	4,13634	7,15285	0,000	8,710
	G6	15	1,34295	1,430342	0,369313	0,55086	2,13505	0,000	3,744

1  
2

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

	Estadística de Levene	df1	df2	Valor p
Liberação de Cálcio 7 dias	3,516	5	84	0,006
Liberação de Cálcio 15 dias	2,361	5	84	0,047
Liberação de Cálcio 30 dias	2,360	5	84	0,047

3 Valor p < 0,05 indica variâncias heterogêneas entre Grupos

Comparações múltiplas

Games-Howell

Variável dependente	Grupo (i)	Grupo (j)	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança 95%	
						Limite inferior	Limite superior
Liberação de Cálcio 7 dias	G1	G2	0,452745	0,284906	0,613	-0,42966	1,33515
		G3	0,435767	0,289061	0,663	-0,45736	1,32889
		G4	0,523486	0,305042	0,534	-0,41290	1,45987
		G5	-0,090549	0,410774	1,000	-1,35427	1,17318
		G6	1,543294	0,300836	0,000	0,61857	2,46802
	G2	G1	-0,452745	0,284906	0,613	-1,33515	0,42966
		G3	-0,016978	0,219318	1,000	-0,68730	0,65335
		G4	0,070741	0,239988	1,000	-0,66483	0,80631
		G5	-0,543294	0,365075	0,675	-1,69339	0,60680
		G6	1,090549	0,234620	0,001	0,37213	1,80897
	G3	G1	-0,435767	0,289061	0,663	-1,32889	0,45736
		G2	0,016978	0,219318	1,000	-0,65335	0,68730
		G4	0,087719	0,244907	0,999	-0,66201	0,83744
		G5	-0,526316	0,368327	0,710	-1,68359	0,63096
		G6	1,107527	0,239649	0,001	0,37444	1,84062
	G4	G1	-0,523486	0,305042	0,534	-1,45987	0,41290
		G2	-0,070741	0,239988	1,000	-0,80631	0,66483
		G3	-0,087719	0,244907	0,999	-0,83744	0,66201
		G5	-0,614035	0,380997	0,600	-1,80082	0,57275
		G6	1,019808	0,258700	0,006	0,22917	1,81044
	G5	G1	0,090549	0,410774	1,000	-1,17318	1,35427
		G2	0,543294	0,365075	0,675	-0,60680	1,69339
		G3	0,526316	0,368327	0,710	-0,63096	1,68359
		G4	0,614035	0,380997	0,600	-0,57275	1,80082
		G6	1,633843	0,377638	0,003	0,45510	2,81258
	G6	G1	-1,543294	0,300836	0,000	-2,46802	-0,61857
		G2	-1,090549	0,234620	0,001	-1,80897	-0,37213
		G3	-1,107527	0,239649	0,001	-1,84062	-0,37444
		G4	-1,019808	0,258700	0,006	-1,81044	-0,22917
		G5	-1,633843	0,377638	0,003	-2,81258	-0,45510
Liberação de Cálcio 15 dias	G1	G2	0,655348	0,392697	0,564	-0,56105	1,87174
		G3	0,485003	0,423487	0,858	-0,81425	1,78425
		G4	0,487832	0,420560	0,851	-0,80321	1,77887
		G5	-0,127900	0,434868	1,000	-1,45961	1,20381
		G6	2,262026	0,361895	0,000	1,11792	3,40613
		G2	G1	-0,655348	0,392697	0,564	-1,87174
	G3		-0,170345	0,334216	0,995	-1,19531	0,85462
	G4		-0,167515	0,330499	0,995	-1,18054	0,84551
	G5		-0,783248	0,348524	0,251	-1,85450	0,28800
	G6		1,606678	0,251648	0,000	0,83035	2,38301
	G3		G1	-0,485003	0,423487	0,858	-1,78425
		G2	0,170345	0,334216	0,995	-0,85462	1,19531
		G4	0,002830	0,366552	1,000	-1,11733	1,12299
		G5	-0,612903	0,382883	0,605	-1,78331	0,55751
		G6	1,777023	0,297417	0,000	0,84881	2,70524
		G4	G1	-0,487832	0,420560	0,851	-1,77887
	G2		0,167515	0,330499	0,995	-0,84551	1,18054
	G3		-0,002830	0,366552	1,000	-1,12299	1,11733
	G5		-0,615733	0,379643	0,592	-1,77646	0,54500
	G6		1,774193	0,293234	0,000	0,85994	2,68845
	G5		G1	0,127900	0,434868	1,000	-1,20381
		G2	0,783248	0,348524	0,251	-0,28800	1,85450
		G3	0,612903	0,382883	0,605	-0,55751	1,78331
		G4	0,615733	0,379643	0,592	-0,54500	1,77646
		G6	2,389926	0,313410	0,000	1,40825	3,37161
		G6	G1	-2,262026	0,361895	0,000	-3,40613
	G2		-1,606678	0,251648	0,000	-2,38301	-0,83035
	G3		-1,777023	0,297417	0,000	-2,70524	-0,84881
	G4		-1,774193	0,293234	0,000	-2,68845	-0,85994
	G5		-2,389926	0,313410	0,000	-3,37161	-1,40825

1  
2

Liberação de Cálcio 30 dias	G1	G2	0,730051	0,538627	0,752	-0,91597	2,37608
		G3	0,302773	0,665288	0,997	-1,74602	2,35157
		G4	0,726655	0,979347	0,974	-2,36871	3,82202
		G5	0,579513	0,801566	0,977	-1,92067	3,07970
		G6	4,881155*	0,533278	0,000	3,25133	6,51098
		G1	-0,730051	0,538627	0,752	-2,37608	0,91597
	G2	G3	-0,427278	0,660863	0,986	-2,46419	1,60963
		G4	-0,003396	0,976346	1,000	-3,09245	3,08566
		G5	-0,150538	0,797897	1,000	-2,64201	2,34093
		G6	4,151103*	0,527747	0,000	-2,53833	5,76388
		G1	-0,302773	0,665288	0,997	-2,35157	1,74602
		G2	0,427278	0,660863	0,986	-1,60963	2,46419
	G3	G4	0,423882	1,051542	0,998	-2,83924	3,68701
		G5	0,276740	0,888330	1,000	-2,45016	3,00364
		G6	4,578381*	0,656511	0,000	2,55305	6,60371
		G1	-0,726655	0,979347	0,974	-3,82202	2,36871
		G2	0,003396	0,976346	1,000	-3,08566	3,09245
		G3	-0,423882	1,051542	0,998	-3,68701	2,83924
	G4	G5	-0,147142	1,142647	1,000	-3,65340	3,35912
		G6	4,154499*	0,973406	0,005	1,07158	7,23742
		G1	-0,579513	0,801566	0,977	-3,07970	1,92067
		G2	0,150538	0,797897	1,000	-2,34093	2,64201
		G3	-0,276740	0,888330	1,000	-3,00364	2,45016
		G4	0,147142	1,142647	1,000	-3,35912	3,65340
G5	G6	4,301641*	0,794296	0,000	1,81864	6,78464	
	G1	-4,881155*	0,533278	0,000	-6,51098	-3,25133	
	G2	-4,151103*	0,527747	0,000	-5,76388	-2,53833	
	G3	-4,578381*	0,656511	0,000	-6,60371	-2,55305	
	G4	-4,154499*	0,973406	0,005	-7,23742	-1,07158	
	G5	-4,301641*	0,794296	0,000	-6,78464	-1,81864	

\*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

1

Valor  $p < 0,05$  indica diferenças entre os valores médios segundo os dois Grupos comparados

2

3

4