



Universidade Federal do Amazonas
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**ATIVIDADE ANTIPROTEOLÍTICA DA EMULSÃO À BASE
DE ÓLEO DE *Copaifera multijuga* HAYNE: EFEITO NAS
METALOPROTEÍNAS.**

ELIANE AVANY MALVEIRA ARAÚJO

Manaus – AM

2019



Universidade Federal do Amazonas

Faculdade de Odontologia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**ATIVIDADE ANTIPROTEOLÍTICA DA EMULSÃO À
BASE DE ÓLEO DE *Copaifera multijuga* HAYNE: EFEITO
NAS METALOPROTEÍNASES.**

ELIANE AVANY MALVEIRA ARAÚJO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira

Coorientadora: Prof^a Dr^a Carina Toda

Manaus – AM

2019

Ficha Catalográfica

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

A663a Araújo, Eliane Avany Malveira
Atividade antiproteolítica da emulsão à base de óleo de Copaifera multijuga Hayne: Efeito nas metaloproteínases. / Eliane Avany Malveira Araújo. 2019
82 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Fulgência Costa Lima Bandeira
Coorientadora: Carina Toda
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Adesivo. 2. Mmp 2. 3. Mmp 9. 4. Fitoterapia. I. Bandeira, Maria Fulgência Costa Lima II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

ELIANE AVANY MALVEIRA ARAÚJO

**ATIVIDADE ANTIPROTEOLÍTICA DA EMULSÃO À BASE DE
ÓLEO DE *Copaifera multijuga* HAYNE: EFEITO NAS
METALOPROTEÍNASSES.**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Odontologia
da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre
em Odontologia.

Banca Examinadora

.....
Prof^a Dr^a Maria Fulgência Costa Lima Bandeira

.....
Prof^a Dr^a Marne Carvalho de Vasconcellos

.....
Prof^a Dr^a Flávia Cohen Carneiro Pontes

Conceito

Manaus, 01 de Julho de 2019

DEDICATÓRIA

À Deus, aos meus queridos pais, por todas as dificuldades que passaram e a dedicação de suas vidas a mim e aos meus estudos, a minha irmã que me ajudou muito nessa trajetória, dedico-lhes essa conquista como gratidão por tudo que vocês fizeram por mim, pelo incondicional apoio e incentivo para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a **DEUS**, pela minha vida, por estar comigo em todos os momentos e pela realização desse trabalho. Agradeço a minha família em si, meu pai, **Eduardo**, que sempre me incentivou e me apoiou nos meus delírios e que me ajudou a realizá-los muitas vezes. A minha querida mãe, **Nilce**, pelo amor incondicional, pela força, paciência e pelas inúmeras renúncias que fez por mim, estando sempre ao meu lado. E a minha querida irmã, **Areane**, por ser mais que uma irmã e quase uma mãe para mim e sempre me apoiar em todos os momentos da minha vida, agradeço ao Bernardo pela renovação que ele provocou na minha vida.

Agradeço a minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a. **Maria Fulgência**, pelo exemplo de pessoa e profissional, pela paciência, disciplina, confiança, pelos conselhos de vida, por me estimular os caminhos a seguir e me ajudar neles. É admirável tamanha generosidade, solidariedade e humildade. Resta-me o enorme orgulho e satisfação em ter sido sua orientanda.

Agradeço imensamente a equipe do **BIOPHAR**, em especial à Leilane Bentes e a Elenn, pela disponibilidade, receptividade e colaboração comigo e o apoio para o desenvolvimento dessa pesquisa. Muita gratidão à todas vocês!

Aos professores da Faculdade de Odontologia da UFAM e do programa de pós-graduação, pela atenção, cuidado e por dividirem seus conhecimentos e contribuírem para o meu crescimento profissional e pessoal ao longo desses anos. **A todos os técnicos, administrativos e funcionários** pelo carinho, ajuda e atenção dispensados.

Agradeço aos Prof^o **Joaquim, Vinicius e Jaqueline** por todos os conselhos, pela disponibilidade e flexibilidade que me era oferecida, e principalmente por todo incentivo dado. Muito obrigada por tudo.

Ao grupo de **Fitoterapia da FAO**, Prof^a Dr^a. **Carina Toda**, por continuar comigo, agora na fase co-orientadora, Prof^a Dr^a. **Ana Regina**, Prof^a Dr^a. **Nikeila Conde**, Prof^a

Msc. **Cristiane Nagai Coelho**, e os outros, pela ajuda, colaboração, sobretudo, pelas experiências, pelos conhecimentos compartilhados e aprendidos.

Aos amigos de graduação **Maria Luísa Lins, Igor Carvalho, Allan Takeda**, e os outros por juntos trocarmos expectativas, incentivos, compartilharmos, vivências, aflições ao longo desse tempo. Agradeço imensamente a **Izabelly Bittencourt**, nesses últimos meses pelas conversas, risadas, apoio e companhia. Agradeço também a **Veronica Oliveira, André, Rafael, Romyne, Bárbara** e os meus amigos de infância por me acompanharem, pela torcida e tornarem essa caminhada mais leve.

Aos amigos que o mestrado me proporcionou e consolidou **Thalita Quadros, Italo Lacerda, Laiana Dias** obrigada por dividirem essa caminhada juntos.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de estudos que contribuiu para a realização da pesquisa.

Aos **integrantes da banca examinadora**, por aceitarem participar e dar sua contribuição a este trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós graduação da Faculdade de Odontologia da UFAM, à UFAM, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior – CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pelo fomento.

A todos que de alguma forma contribuíram nesta história. Gratidão por tudo!

Assim eu vejo a vida:

“A vida tem duas faces:
Positiva e negativa
O passado foi duro
mas deixou o seu legado
Saber viver é a grande sabedoria
Que eu possa dignificar
Minha condição de mulher,
Aceitar suas limitações
E me fazer pedra de segurança
dos valores que vão desmoronando.
Nasci em tempos rudes
Aceitei contradições
lutas e pedras
como lições de vida
e delas me sirvo
Aprendi a viver”.

Cora Coralina

RESUMO:

Resina composta é um dos materiais mais usados para restaurar o dente através do uso dos sistemas adesivos, entretanto, nessas ligações dos sistemas adesivos ao dente ocorrem alguns problemas que prejudicam a longevidade desse tratamento, principalmente na camada híbrida. Na matriz extracelular dentinária encontram-se as proteases endógenas que são responsáveis pela desnaturação e degradação das fibras colágenas da dentina, a inibição dessas enzimas é crucial para a preservação da camada híbrida e sucesso clínico. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito das emulsões à base de óleo de copaíba em diferentes concentrações de conservante na inibição das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9; a citotoxicidade em células da linhagem HT1080 e a atividade antiproteolítica *in situ* usando o sistema adesivo convencional e autocondicionante. Na zimografia *in situ* os trinta dentes foram seccionados a 2 mm abaixo da junção esmalte- dentina, em seguida foi padronizada a *smear layer* e divididos em quatro grupos. Uma gelatina conjugada com fluoresceína foi utilizada e depois levada ao microscópio de fluorescência para avaliação. A citotoxicidade das soluções foi testada utilizando o método do Azul de Tripán nos tempos de 15 segundos, 30 segundos, 10 e 20 minutos. Os grupos testados foram: (G1) controle com água destilada; (G2) Digluconato de clorexidina a 2% (CLX); (G3) emulsão à base de óleo de copaíba (EC) a 10% + X; (G4) EC a 10% + Y; e (G5) EC a 10% alcalina. O ensaio zimográfico foi realizado analisando os mesmos grupos descritos anteriormente, porém nos tempos de 30 segundos, 10 e 20 minutos. As células de HT1080 foram incubadas, e submetidas à eletroforese gel de SDS-PAGE. Após a corrida, o gel foi corado e as imagens das bandas foram analisadas no *software ImageJ*. Na análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para duas medianas e *Kruskal-Wallis* ($p < 0,05$), para mais de duas medianas. No teste de citotoxicidade as ECs apresentaram maior viabilidade celular quando comparadas à CLX em todos os tempos testados, apresentando diferença estatisticamente significativa nos tempos de 10 e 20 minutos. No ensaio zimográfico as EC apresentaram atividade sobre MMP 2 e MMP 9, contudo a que apresentou melhor resultado foi a EC a 10% alcalina em 10 minutos de tratamento, a EC alcalina chegou a reduzir em 67% a atividade da MMP 2 e 44% da MMP 9 quando comparada ao digluconato de clorexidina a 2%. Na zimografia *in situ* não houve diferença estatística entre os grupos testados, entretanto na avaliação qualitativa todos os grupos testados apresentaram inibição da atividade sobre as metaloproteinases. Com isso, as emulsões à base do óleo de copaíba apresentaram atividade na inibição das metaloproteinases nos estudos *in vitro* e *in situ*, mostrando um potencial como biomodificador dentre elas a que apresentou os melhores resultados foi a EC alcalina.

Palavras-Chave: Adesivo. Mmp 2. Mmp 9. Fitoterapia.

ABSTRACT:

Composite resin is one of the most used materials to restore the tooth through the use of adhesive systems, however, in these bonding of adhesive systems to the tooth some problems that affect the longevity of this treatment occur, especially in the hybrid layer. In the dentin extracellular matrix are endogenous proteases that are responsible for denaturing and degradation of dentin collagen fibers, inhibition of these enzymes is crucial for the preservation of the hybrid layer and clinical success. The objective of this work was to evaluate the effect of copaiba oil-based emulsions at different preservative concentrations on the inhibition of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9; cytotoxicity in HT1080 cells and *in situ* antiproteolytic activity using the conventional self-etching adhesive system. *In situ* zymography the thirty teeth were sectioned 2 mm below the enamel-dentin junction, then standardized to the smear layer and divided into four groups. Fluorescein-conjugated gelatin was used and then taken under the fluorescence microscope for evaluation. The cytotoxicity of the solutions was tested using the Trypan Blue method at 15 seconds, 30 seconds, 10 and 20 minutes. The groups tested were: (G1) control with distilled water; (G2) 2% Chlorhexidine Digluconate (CLX); (G3) 10% copaiba oil (EC) based emulsion + X; (G4) 10% EC + Y; and (G5) 10% alkaline EC. The zymographic test was performed by analyzing the same groups described above, but at times of 30 seconds, 10 and 20 minutes. HT1080 cells were incubated, and subjected to SDS-PAGE gel electrophoresis. After the run, the gel was stained and the band images were analyzed using ImageJ software. Statistical analysis used the nonparametric Mann-Whitney test for two medians and Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) for more than two medians. In the cytotoxicity test, the ECs presented higher cell viability when compared to CLX in all tested times, presenting a statistically significant difference at 10 and 20 minutes. In the zymographic assay, EC showed activity on MMP 2 and MMP 9, however the one that presented the best result was 10% alkaline EC in 10 minutes of treatment, alkaline EC reduced by 67% the activity of MMP 2 and 44%. MMP 9 compared to 2% chlorhexidine digluconate. *In situ* zymography there was no statistical difference between the tested groups, however in the qualitative evaluation all tested groups showed inhibition of activity on metalloproteinases. Thus, the emulsions based on the oil of copaiba showed activity in the inhibition of metalloproteinases *in vitro* and *in situ* studies, showing a potential as a biomodifier that presented the best results was the alkaline Ec.

Keywords: Adhesive; Mmp 2; Mmp 9; Herbal medicine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

Figura 01 – Plaquetamento das células.	50
Figura 02 – Contagem das células viáveis e não viáveis na câmara de Neubauer.	51
Figura 03 – Preparo do gel de poliacrilamida para eletroforese.	52
Figura 04 – Fluxograma- Zimografia <i>in situ</i> .	54
Figura 05 – Bandas de degradação enzimática pelas MMPs -2 e -9, em todos os grupos testados, nos tempos de 30 segundo (A), 10 minutos (B) e 20 minutos (C).	59
Figura 06 – Histogramas da atividade das MMPs: A) Digluconato de Clorexidina com Clearfill® e B) Clorexidina com Adper Single Bond 2®.	62
Figura 07 – Histogramas da atividade das MMPs: A) Emulsão alcalina com Clearfill® e B) Emulsão alcalina com Adper Single Bond 2®.	62
Figura 08 – Histogramas da atividade das MMPs: A) EDTA com Clearfill® e B) EDTA com Adper Single Bond 2®.	63

LISTA DE GRÁFICOS:

- Gráfico 1 – Porcentagem de viabilidade celular das substâncias teste no tempo de 15 segundos. 58
- Gráfico 2 – Porcentagem de viabilidade celular das substâncias teste no tempo de 30 segundos. 58
- Gráfico 3 – porcentagem de viabilidade celular das substâncias teste no tempo de 10 minutos. 58
- Gráfico 4 – Porcentagem de viabilidade celular das substâncias teste no tempo de 20 minutos. 58
- Gráfico 5 – Análise da atividade enzimática da mmp-9 frente aos tratamentos com as soluções testadas. 60
- Gráfico 6 – Análise da atividade enzimática da mmp-2 frente aos tratamentos com as soluções testadas. 61

LISTA DE QUADROS E TABELAS:

Quadro 01 – Divisão dos grupos.	53
Tabela 01 – Comparação das medianas de células viáveis em relação aos grupos segundos os tempos.	59
Tabela 02 – Comparação em relação aos grupos experimentais para cada medida do sistema adesivo Clearfill®.	63
Tabela 03 – Comparação em relação aos grupos para cada medida do sistema adesivo Adper Single Bond® 2.	64
Tabela 04 – Comparação em relação aos sistemas adesivos segundo as medidas e grupos.	64

LISTA DE SIGLAS:

%	Porcentagem
®	Marca registrada
4- Meta	4-metacriloxietil trimetliato anidro
AgNO	Nitrato de prata
ANOVA	Análise de variância
Bis-GMA	Bisfenol glicidil metacrilato
C3S	Clearfil Tri-S
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCS	Cisteína-catepsinas
CHX	Digluconato de Clorexidina
CLX	Digluconato de Clorexidina a 2%
CM	Emulsão à base do óleo de copaíba a 10%
Cm	Centímetro
CO	Oléo de Copaíba <i>in natura</i>
CSE	Clearfil SE®
DA	Dentina Afetada
DH	Dentina Hígida
DMSO	Dimetil sufóxido
DNA	Ácido dioxirribonucleico
DP	Pó de dentina
EDC	1Etil- 3- carbodiimida
EP	Extrato etanólico de própolis
G	Gramas
g/L	Gramas/Litro
H	Horas
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
KM	Quilômetros
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
mg/mL	Miligramas por mililitro
Min	Minutos
mL	Mililitro

Mm	Milímetros
Mm ³	Milímetros cubico
MMA-TBB	Metacrilato de metilo/ tributilborano
MMP	Metaloproteinasas endógenas
Mpa	Megapascal
mW/cm ²	Megawatt por centímetros quadrados
N	Newton
Nº	Número
°C	Grau Celsius
OFL	Optibond FL
PCR	Proteína C reativa
pH	Potencial de Hidrogênio
Rpm	Rotações por minuto
S	Segundos
SB1XT	Adper Scotchbond 1 XT [®]
SB2	Adper Single Bond 2 [®]
SE	Adper Single Bond [®]
TM	Techincal machine
TrisHCL	Tri-Cloridrato
Tween	Monolaurato de polioxietilenossorbitano
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
V	Volts
VE	Veículo da emulsão
XPB	XP-Bond [®]
ZnCl ₂	Cloreto de Zinco
A	Alfa
Mg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
Mm	Micrometros

SUMÁRIO:

Introdução	15
1. Objetivo	18
1.1. Objetivo Geral	18
1.2. Objetivos específicos	18
2. Revisão de literatura	19
2.1. Camada híbrida e adesivos	19
2.2. Materiais utilizados para melhora da qualidade da camada hibrida	26
2.3. Zimografia	32
2.4. Fitoterápicos em dentística	44
3. Metodologia	49
3.1. Riscos e benefícios da pesquisa	49
3.2. Formulação da emulsão à base de óleo de copaíba.	49
3.3. Teste de Citotoxicidade	50
3.4. Zimografia em células	51
3.4.1. Obtenção das proteínas coletadas no meio de cultura.	51
3.4.2. Mobilidade eletroforética das proteínas no gel de SDS-PAGE + gelatina	51
3.4.3. Incubação e revelação do gel	52
3.5. Zimografia <i>in situ</i>	52
3.5.1. Seleção dos dentes	52
3.5.1.1. Critérios de inclusão	52
3.5.1.2. Critérios de exclusão	53
3.5.2. Preparo dos dentes	53
3.5.3. Tratamento de superfície	53
3.6. Análise Estatística	57
4. Resultados	58
5. Discussão	65
Conclusão	70
Referências	71
Anexos	74

INTRODUÇÃO

A cárie dentária é um processo ubíquo definido como o resultado de uma dissolução do mineral dos dentes resultante de eventos metabólicos que ocorrem no biofilme cobrindo a área afetada, também tem outras determinantes como fatores socioeconômicos, educacionais e comportamentais. (MALTZ, JARDIM e ALVES, 2010, FEJERSKOV et al., 2015).

O uso dos ácidos nas superfícies dentárias revolucionou a prática restauradora permitindo um tratamento minimamente invasivo. Preconiza-se a retirada da dentina amolecida somente, por ser irrecuperável, preservando o tecido subjacente passível a remineralização (KIDD E FEJERSKOV, 2005; HAJ-ALI et al., 2006; WANG, SPENCER, WALKER, 2007, LENZI et al. 2012).

Existem diferenças estruturais na dentina afetada por cárie da dentina hígida influenciando na união do material restaurador ao substrato dentinário. A estrutura da dentina afetada por cárie é mais sensível ao condicionamento ácido, existe uma desmineralização parcial já presente nesse tipo de dentina devido ao processo cariioso. A grande maioria dos tratamentos restauradores é realizada na dentina afetada que demonstra o seu desempenho adesivo inferior ao da dentina hígida (WANG, SPENCER, WALKER, 2007; LENZI et al, 2012; GUVEN e AKTOREN, 2015).

A adesão do material restaurador ao substrato acontece quando o adesivo infiltra a camada de dentina desmineralizada pelo condicionamento ácido, encapsulando o colágeno exposto e protegendo a interface adesiva da degradação proteolítica e hidrolítica. Essa zona composta por dentina desmineralizada infiltrada pelo sistema adesivo é denominada camada híbrida. Essa camada não é estática e pode falhar ao longo do tempo devido a ação de alguns fatores como: metaloproteinase; catepsinas e infiltração marginal (NAKABAYASHI, NAKAMURA, YASUDA, 1991; MAZZONI et al., 2015).

As metaloproteinases são enzimas cálcio-dependentes e zinco ativadas que mediam a desnaturação da matriz extracelular através das collagenase e gelatinases, e naturalmente encontram-se aprisionadas na dentina mineralizada durante a odontogênese. Uma vez que o processo de adesão se dá a partir do encapsulamento do colágeno pelo sistema adesivo, é necessária a inibição dessas enzimas a fim de preservar

a interface adesiva da degradação proteolítica e hidrolítica da camada híbrida (MAZZONI et al, 2015).

O digluconato de Clorexidina a 2% é o agente de limpeza amplamente utilizado na clínica odontológica devido às propriedades antimicrobianas e atividade inibidora da degradação enzimática da matriz de colágeno da dentina. Através de análises zimográficas, o digluconato de Clorexidina 2% se mostrou eficiente na manutenção da resistência de união dentina-resina, melhorando a qualidade na formação da camada híbrida (CARRILHO et al., 2007; BRESCHI et al., 2009; BRESCHI et al., 2010; RIOS et al., 2015).

Adesivos são monômeros hidrofílicos, que permitem a união do sistema adesivo à estrutura dentária, e monômeros hidrofóbicos, responsáveis pela adesão ao material restaurador. Os sistemas adesivos que interagem com a dentina são os sistemas convencionais, em versões de três e dois passos, e os autocondicionantes, em versões de dois passos e um passo. No sistema adesivo convencional, a desmineralização do substrato dentinário é realizada previamente à infiltração dos monômeros resinosos. Já o sistema adesivo autocondicionante contém monômeros acídicos, que desmineralizam e infiltram a dentina simultaneamente, incorporando a *smear layer* na camada híbrida em vez de eliminá-la como acontece no sistema convencional (HASHIMOTO et al., 2011).

Apesar de todas as vantagens da restauração adesiva, a sua longevidade é afetada pela perda da qualidade da camada híbrida, da capacidade adesiva e da resistência de união do material restaurador ao substrato dentinário, devido ao fato do colágeno, presente na camada híbrida, ser suscetível à hidrólise e à ação proteolítica (BRESCHI et al., 2009).

Considerando tal questão e a política nacional de práticas integrativas e complementares, a Odontologia atual voltou os olhos para a Fitoterapia. A copaíba, cujo óleo tem sido alvo de pesquisas, mostra-se uma solução promissora, expondo resultados significantes na limpeza de cavidade, potencial bactericida e bacteriostático semelhantes à solução de digluconato de clorexidina a 2% (BANDEIRA et al. 2016). Estudos demonstraram sua eficiência na manutenção da resistência adesiva (FREITAS, 2017); apresentando uma camada híbrida homogênea, regular, contínua e com presença de tags

independentes do substrato dentinário (MEIRA, 2014; MOURA, 2016; BANDEIRA et al.,2018).

Assim, essa pesquisa se propôs avaliar a atividade antiproteolítica da emulsão à base de óleo de copaíba em comparação ao digluconato de clorexidina a 2% na união da interface adesiva resina/ dentina formada com o sistema adesivo convencional e autocondicionante.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar *in situ* o efeito da emulsão à base de óleo de copaíba a 10% sobre as metaloproteinases na interface adesiva resina/dentina e *in vitro* em culturas de células.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a citotoxicidade da emulsão em células HT1080.

Avaliar se há inibição da atividade das metaloproteinases frente à emulsão à base de óleo de copaíba a 10% em cultura de célula HT1080.

Avaliar os efeitos da emulsão do óleo de copaíba sobre as metaloproteinases na interface dente restauração adesiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Camada híbrida e Adesivos

Nakabayashi, Nakamura e Yasuda (1991) e uma revisão de literatura avaliaram o mecanismo de ligação com a dentina, adesivos com monômeros 4-META verificaram que tinham muito sucesso no esmalte, entretanto com a dentina isso variava muito devido a diversos pontos como idade do paciente e profundidade do preparo. Já com o sistema adesivo MMA-TBB já apresentava uma melhoria e resultou num achado interessante, nada mais era que um tratamento com ácido fosfórico para criar lacunas mecânicas atacando somente o material interprismático, assim o adesivo fecharia essas lacunas e teria uma retenção mecânica. Com o tempo viram que o ácido acaba desnaturando o colágeno junto com o processo de desmineralização, esse fato acabava diminuindo ou impedindo que o adesivo penetresse completamente na dentina. Concluíram que as percepções tradicionais da ligação dentinária devem ser modificadas para incluir o mecanismo da camada híbrida já que certos monômeros podem infiltrar na dentina e combinar com o colágeno e hidroxiapatita.

Objetivando comparar as interfaces destinárias/adesivas formadas quando em dois estágios, Haj-Ali et al.(2006) utilizaram a técnica de coloração tricrômico de Goldner no sistema adesivo convencional na dentina afetada e hígida. Usaram 7 molares que tiveram o terço oclusal cortado e depois foram divididos ao meio onde uma metade era armazenada numa solução tampão de fosfato e outra numa solução acidificada para induzir a cárie durante 10 dias. A dentina amolecida foi removida e depois realizada uma padronização de *smear layer*. A aplicação do sistema adesivo foi depois de ter feito um condicionamento com ácido fosfórico a 38% durante 15 segundos, lavagem com água pelo dobro do tempo e aplicação de duas camadas de sistema adesivo. Depois cada metade de um dente foi seccionada novamente e cada espécime foi levado ao microscópio. A análise qualitativa do encapsulamento de colágeno foi completada observando diferenças de cores nas zonas interfaciais dos espécimes de dentina afetadas e não afetadas. As larguras médias globais do colágeno exposto foram significativamente maiores na interface adesiva / dentina afetada pela cárie em comparação com dentina hígida / adesivo. Portanto as características morfológicas da dentina / interface afetadas pela cárie sugerem o aumento da zona de

colágeno exposto e diminuição da qualidade da infiltração adesiva quando comparada com dentina hígida.

No estudo de Wang, Spencer, Walker (2007) compararam a estrutura molecular e química nas interfaces entre adesivos na dentina hígida e dentina afetada pela cárie. Três terceiros molares inclusos e três terceiros molares com lesões de cárie coronais foram armazenados em solução salina fosfatada a 0,9% e de azida de sódio a 0,002%, respectivamente. Um terço da coroa dos dentes inclusos foi seccionado com uma máquina de corte com refrigeração e depois os dentes foram polidos com uma lixa de 600g e foi inspecionada para verificação da completa remoção do esmalte oclusal. Os dentes cariados sofreram o mesmo processo até conseguir uma região com dentina cariada e ao redor dentina hígida. Nesse estudo utilizaram o sistema adesivo Adper Single bond[®]2 nos dois grupos seguindo as recomendações do fabricante, aplicou-se 15 segundos de ácido fosfórico a 35%, lavou-se com água por 10 segundos, com um microbrush[®] aplicou duas camadas de adesivo e secou levemente por 5 segundos e em seguida fotopolimerizou por 20 segundos e armazenou-se em água a 37°C durante 24h, em seguida foram seccionados novamente até ter como dimensão 10x2x2mm³ foram mergulhado em água e levados para a análise μ RS usando um espectrômetro Raman Jasco[®] NRS-200. Os espectros tiveram 1 μ m de intervalo da interface adesivo/dentina. Obtiveram como resultado que os índices de minerais (fosfato e carbonato) / colágeno foram significativamente menores para a dentina afetada pela cárie quando comparado com a dentina hígida, mostrando que o colágeno pode sofrer alterações microestruturais durante o processo cariioso. As variações de pico indicaram que o BisGMA resiste a penetrar na dentina desmineralizada sugerindo que o adesivo não se infiltra na profundidade da desmineralização da dentina. O grau de penetração de adesivo foi maior nos primeiros micrômetros dentro da região interfacial da dentina hígida quando comparada com a dentina afetada pela cárie. A desmineralização da dentina hígida foi de 7- 8 μ m já na afetada foi de 14 -16 μ m. Concluíram que a interface entre o adesivo e dentina afetada é mais ampla e complicada do que a dentina hígida devido à irregularidade em sua composição, suspeitando de alterações secundárias envolvendo as fibrilas de colágeno não envoltas pelo adesivo na durabilidade do tratamento.

Maltz; Jardim; Alves (2010) relataram que a prevenção e tratamento da cárie dentária estão relacionadas a fatores comportamentais, incluindo hábitos de higiene

alimentares e orais, que estão relacionados a muitas doenças crônicas. A promoção da saúde deve ser integrada com a promoção de saúde bucal, tais como políticas de alimentação e saúde e higiene em geral (incluindo a higiene oral), entre outros. Durante décadas, tem sido observada uma relação linear entre o consumo de açúcar e cárie. A prevenção da cárie dentária com base em estratégias de fator de risco comuns (alimentação e higiene) deve ser complementado por mais políticas específicas de doenças, tais como o uso racional de flúor e evidências de cuidados de saúde bucal.

Hashimoto et al. (2011) fizeram uma revisão crítica sobre a degradação das ligações resina dentina para todos os tipos de sistemas adesivos. Segundo a revisão, a ligação dentina ocorre através da hibridação mecânica entre fibrilas de resina e colágeno utilizando um sistema de resina contendo monômero funcional. No sistema adesivo convencional usa-se um gel de ácido fosfórico para expor a rede de colágeno, assim o adesivo poderia enclausurar todo o colágeno exposto, entretanto vários estudos afirmaram que pode ter uma infiltração imperfeita que acaba deixando alguns colágenos expostos. Assim, notaram que a presença das metaproteinases, enzimas que degradam às fibrilas de colágeno e afeta a estabilidade da ligação, em longo prazo, do sistema adesivo já que essas enzimas têm ação até em condições *in vitro*. No sistema Autocondicionante não precisa, fazer o condicionamento ácido isso lhe traz vantagem de eliminar uma etapa clínica, assim pensava-se que isso iria superar as deficiências do sistema adesivo convencional, já que numerosos estudos recentes mostraram evidências micromorfológicas de biodegradação de ligações resina-dentina, devido à hidrólise da resina e fibrilas de colágeno dentro das ligações, todavia também foi encontrada microinfiltrações. Portanto forma-se água na região de ligação de ambos os sistemas adesivo após o uso, e de acordo com os resultados essa hidrólise de resina pode ser mais prejudicial do que a das fibrilas colágenas.

A fim de indagar o efeito da impregnação da dentina desmineralizada pelo digluconato de clorexidina a 2%, em solução aquosa, da dentina hígida e da dentina afetada por cárie por um sistema adesivo convencional simplificado, Ricci et al. (2011) coletaram terceiros molares humanos hígidos, onde as superfícies de dentina coronária foram produzidas para obtenção de uma superfície plana composta somente de dentina. Trinta dentes foram colocados em solução cariogênica por 14 dias e após a formação da dentina cariada, a mesma foi removida com lixas de carboneto de silício com

granulação 320 e a dentina hígida dos demais dentes sofreu um desgaste na poltriz (Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA) para compensar a dentina cariada removida. O ângulo de contato foi obtido usando o Goniômetro Optical Contact Angle Measurements[®] OCA20. Os dentes foram divididos aleatoriamente em três grupos, sendo cada grupo com metade de dentina hígida e a outra metade de dentina afetada por cárie, de acordo com o tipo de tratamento do substrato dentinário: dentina coberta por *smear layer*, dentina sem *smear layer* impregnada por água e dentina sem *smear layer* impregnada por Digluconato de clorexidina a 2%. De acordo com os resultados obtidos, a dentina hígida apresentou valores estatisticamente superiores de ângulo de contato quando comparada com a dentina afetada por cárie, independente da condição da superfície. Porém, a superfície coberta por *smear layer*, nos dois tipos de dentina, apresentou valores estatisticamente maiores do ângulo de contato em relação à dentina sem *smear layer*. Os autores concluíram que a melhor capacidade de umidade foi apresentada pela dentina afetada por cárie e a remoção da *smear layer* pelo ácido fosfórico favoreceu a umidade de ambos os substratos. Também foi concluído que a aplicação da solução de Digluconato de clorexidina a 2% não apresentou influência sobre a umectabilidade da dentina condicionada.

Sanabe, Costa e Hebling (2011) realizaram um estudo usando a coloração de Tricrômico de Goldner para detectar a presença de colágeno exposto na interface resina/dentina produzidas na dentina hígida e afetada na presença ou ausência de Digluconato de Clorexidina a 2% após 6 meses de envelhecimento. Coletaram 16 terceiros molares hígidos com coroas intactas sem áreas hipoplásicas. Os dentes foram seccionadas em máquina de corte de precisão 2 mm abaixo do sulco oclusal central, um corte adicional de 0,5 mm de espessura foi feito nos dentes do grupo de dentina hígida para compensar a dentina removida do grupo da dentina afetada. A indução de cárie foi realizada em oito dentes que tiveram suas raízes seladas com resina composta e cobertas na parte externa com resina epóxi e uma camada de esmalte e imersa na solução cariogênica durante 14 dias. Em seguida os dentes (n= 16) foram autoclavados por 20 min a 121°C. Todos os procedimentos foram realizados por um único operador calibrado. O tecido cariado foi removido até que a dentina fosse sentida como mais resistente e no grupo hígido foi realizado um desgaste com baixa rotação por 30 segundos para produzir uma camada de esfregação padronizada. No sistema Adper Single Bond[®] 2 realizaram primeiro um condicionamento ácido durante 15 segundos

com ácido fosfórico a 35% e lavado por 30 segundos e duas aplicações consecutivas do adesivo e fotopolimerizados. Na metade dos dentes atribuídos para o armazenamento de 6 meses em água destilada, depois do condicionamento ácido, o substrato foi impregnado com 20 µL de digluconato de clorexidina a 2% por 60 segundos. Após este período os dentes foram seccionados e obtiveram 3 espécimes de cada dente, esses espécimes foram atribuídos a 3 grupos: G1: água destilada durante 24h (controle, 6 espécimes), G2: água destilada (6 espécimes com clorexidina e 6 sem clorexidina) G3: óleo mineral (6 espécimes) por 6 meses. Os espécimes foram submetidos a processamento histológico e as secções foram coradas com o Tricrômico de Goldner. A espessura da zona do colágeno exposto foi medida por microscopia óptica e os dados foram submetidos à ANOVA de dois sentidos e ao teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre a dentina afetada independentemente da condição de armazenamento. Os grupos tratados com digluconato de clorexidina a 2% a 6 meses de envelhecimento não diferiram significativamente dos grupos de controle. O envelhecimento em meio aquoso resultou na degradação da ligação resina dentina, demonstrado pelo espessamento da zona de colágeno exposto na base da camada híbrida. Entretanto, os efeitos da degradação da exposição do colágeno foram reduzidos na presença do digluconato de clorexidina a 2%.

Lafuente (2012) avaliou a aparência da camada híbrida de dentes tratados com e sem tratamento com digluconato de clorexidina a 2% após o envelhecimento por quatro meses (125 dias) em água. Usaram 12 dentes, sendo 6 molares e 6 pré-molares superiores, neles foram feitas cavidades de Classe II deixando uma parede de esmalte de 1mm de espessura entre as cavidades e a sua profundidade foi de 1mm abaixo da junção dentina esmalte. Os dentes foram separados em dois grupos, um iria receber Adper Single Bond[®] 2 (SB2) e o outro Adper SE Plus[®] (composto pelo Líquido A e B). No grupo do Adper Single Bond[®] 2 foi feito um condicionamento ácido com 37% de ácido fosfórico por 15 segundos e enxaguou-se por 30 segundos, duas camadas do produto foram aplicadas, fotopolimerização por 10 segundos, e mais uma terceira camada de adesivo foi aplicada e depois três incrementos de resina. Na cavidade distal de cada dente fez um condicionamento com ácido fosfórico a 37% por 15 segundos e enxaguada completamente durante 30 segundos. O excesso de água foi eliminado. O Digluconato de Clorexidina a 2% foi aplicado na cavidade durante 30 segundos e o excesso

eliminado antes de SB2. No grupo do Adper SE Plus[®], o líquido A foi aplicado na superfície durante 10 segundos, o líquido B foi esfregado na superfície por 10 segundos e fotopolimerizados, depois uma nova camada do líquido B e depois acrescentou três incrementos de resina e na cavidade distal foi aplicado o digluconato de clorexidina a 2% durante 30 segundos e depois administrou os líquidos do Adper SE[®] Plus. Os dentes foram seccionados e armazenados em água a 37 ° C por quatro meses. Os dentes foram preparados para a observação do microscópio eletrônico de varredura. O aspecto da camada híbrida foi observado e medido por duas variáveis: imagem clara da camada híbrida e presença de tags de resina nos túbulos. Os dados foram analisados com um teste de Kruskal-Wallis calculado a um nível de significância de 0,05. Todos os grupos tratados com clorexidina a 2% apresentaram a presença clara de uma camada híbrida, enquanto que apenas metade dos espécimes sem clorexidina apresentaram uma camada híbrida transparente, entretanto não tiveram diferença estatística. O digluconato de Clorexidina a 2% não afetou a presença de tags de resina e antes da aplicação dos adesivos reduziu a deterioração da camada híbrida quando exposta à água, entretanto não houve diferença estatística sobre a sua presença na interface agente de ligação / dentina ou na presença de tags de resina nos túbulos.

Sartori *et al.* (2013), avaliaram se o condicionamento com o digluconato de Clorexidina 2% antes do sistema adesivo melhoraria os resultados em lesões cervicais não cariosas. Vinte pacientes foram selecionados com lesões em forma de V ou U com a margem incisal/oclusal no esmalte e gengival na dentina. Os pacientes foram distribuídos aleatoriamente, recebendo o mesmo número de restaurações de ambos os grupos, seguindo o *design* da boca dividida. Setenta lesões, 35 por grupo. O mesmo operador calibrado restaurou todas as lesões cervicais, no grupo experimental após o condicionamento ácido foi lavado e depois usou a clorexidina a 2% por 30 segundos removeu o excesso, usou um leve jato de ar e depois aplicou o Adapter Single Bond[®] 2. Na avaliação usaram dois examinadores previamente calibrados e cegos para verificar a retenção, descoloração marginal, sensibilidade pós-operatória vitalidade pulpar, cárie recorrente do tratamento realizado nos tempos de 7 dias, 6, 12 e 36 meses. A análise estatística usaram o teste Qui-quadrado e testes exatos de Fisher. Não apresentaram diferença estatística na taxa de sucesso entre o grupo controle (88%) do experimental (76%) após os 36 meses e também não apresentaram diferença em relação à descoloração marginal, sensibilidade pós-operatória, incidência de cárie etc. Portanto o

grupo experimental não apresentou melhora na durabilidade clínica em relação ao grupo controle com o uso de digluconato de clorexidina a 2% em restaurações não cariosas durante os 36 meses.

Meira (2014) analisou morfometricamente o efeito das emulsões à base de óleo de copaíba a 10% sobre a formação da camada híbrida na dentina hígida e cariada. Foram confeccionados oitenta espécimes de trinta terceiros molares hígidos, que foram divididos em grupos: G1- dentina hígida (DH) + água; G2- dentina afetada (DA) + água; G3- DH + digluconato de clorexidina a 2% (CHX); G4-DA + CHX 2%; G5-DH + CM (emulsão à base de óleo de copaíba a 10%) + Conservante 0,3% (CA); G6-DA + CM + CA; G7-DH + CM+Conservante 0,6% (CB); G8-DA + CM + CB; G9-DH + CM + Conservante 0,9% (CC), G10-DA + CM + CC. Os agentes de limpeza foram aplicados após condicionamento ácido, previamente aplicação do adesivo e os espécimes armazenados nos respectivos materiais de limpeza por 3 meses. Após armazenamento, realizou-se a tramitação histopatológica e os cortes foram corados com Tricrômico de Goldner. As imagens foram obtidas em aumento de 400X, em microscopia óptica. A espessura de colágeno exposto e hibridizado foi medida através do programa UTHSCSA Image Tool. A fim de garantir a reprodutibilidade do examinador foi utilizado o teste de correlação de Pearson. Já na análise da espessura da camada de colágeno foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Como resultado apresentou no G10 (DA + CM+CC) a maior frequência de colágeno exposto, seguidos dos grupos G6 (DA + CM+CA) e G5(DH + CM+CA). Os dados demonstraram que não houve diferença estatística entre os grupos G7 e G9, que apresentaram maior espessura de colágeno hibridizado, no entanto houve diferença estatística quando estes grupos foram comparados aos grupos G1 e G2, que apresentaram menor espessura. Os grupos G3, G4 e G8 não apresentaram diferença estatística significativa entre si e entre os demais citados. Os espécimes tratados com as emulsões à base de copaíba apresentaram maior espessura de colágeno exposto e hibridizado que os grupos tratados com clorexidina e água. Quanto à dentina afetada o grupo tratado com clorexidina apresentou maior proporção de espécimes com colágeno hibridizado. O G7 (DH+CM+CB) apresentou 100% de espécimes com colágeno hibridizado e melhor homogeneidade de camada híbrida. De acordo com o estudo são necessárias novas pesquisas envolvendo resistência mecânica e química com o uso das emulsões-testes.

2.2. Materiais utilizados para melhora da qualidade da camada híbrida.

Carrilho et al (2007) realizaram um estudo *in vitro* avaliando o efeito da inibição da protease na resistência da resina/dentina após 6 meses de envelhecimento. Sete terceiros molares extraídos e com preparo cavitário de Classe I profundo se limitando a dentina, dividindo em 2 metades que foram atribuídas aleatoriamente a um dos 2 grupos de ligação. Todas as preparações sofreram um condicionamento ácido com gel de 35% de ácido fosfórico por 15 segundos, lavadas com água por 30 segundos. No grupo controle (n=7) foram reidratadas com 1,5µL de água destilada e no grupo experimental com 1,5µL de Digluconato de Clorexidina a 2% por 60 segundos. Para ambos os grupos, aplicou-se duas vezes Single Bond[®], fotopolimerizou por 20 segundos e restaurou com 6 incrementos de resina, depois foram armazenados em água destilada durante 7 dias. No teste de microtração os palitos foram armazenados aleatoriamente em saliva artificial com ou sem inibidores de proteases. Avaliaram imediatamente após a preparação dos espécimes e depois de seis meses no MEV, usaram para análise estatística ANOVA e teste T-student com $\alpha = 0,05$. O pré-tratamento com digluconato de clorexidina a 2% não afetou a força de ligação *in vitro* no teste imediato e mostrou uma preservação significativa após os 6 meses, os inibidores no meio não apresentaram efeitos significativos. Notou-se um aumento de falhas significativas no fundo da camada híbrida do grupo controle. Após os seis meses ocorreram falhas significativamente menores na camada híbrida tratada com digluconato de clorexidina a 2%. Sugere-se que a clorexidina pode ser útil com a intensão de preservação das restaurações, contudo devem ser realizados novos estudos a fim de esclarecer as causas da perda de ligação.

Em estudo *in vitro* a fim de investigar se os benefícios do Digluconato de Clorexidina (CHX) em relação às MMP visando observar se existe dependência da concentração de CHX ou da composição de adesivos, Breschi *et al* (2009) selecionaram 108 molares humano que foram armazenados por um mês em solução 0,5% de cloramina. O esmalte oclusal e a dentina superficial foram removidos com ajuda da máquina de corte e depois padronizaram os espécimes. As superfícies dentinárias sofreram um condicionamento com ácido fosfórico 35% durante 15 segundos, lavaram com água e secaram levemente. Os dentes foram distribuídos de maneira aleatória

(N=18) para os seis grupos, G1: CHX 0,2% + Adper Scotchbond[®] 1XT (SB1); G2: CHX 2% + SB1; G3: SB1; G4: CHX 0,2% + XP-Bond[®] (XPB) G5: CHX 2% + XPB; G6: XPB. A microtração foi avaliada em três tempos, 24h, 6 meses e 12 meses classificando em falhas coesas, adesivas ou mistas. No teste de microinfiltração usaram 12 dentes que foram separados em 6 grupos, com SB1 Ou XPB e com ou sem 0,2% ou 2% de CHX levou então para o microscópio eletrônico de transmissão. Com 6 meses nenhum espécime tratado com CHX (0,2% e 2%) apresentou diminuições significativas na microtração, após os 12 meses os grupos tratados com CHX em ambas concentrações apresentaram maior resistência a união comparado aos controles. Contudo não encontraram diferenças as duas concentrações testadas. Quanto à microinfiltração todos apresentaram alguma absorção, as maiores diferenças foram obtidas após os 12 meses, entre os grupos tratados com CHX tiveram os valores menores. Então o digluconato de clorexidina reduziu a perda da força de adesão de maneira significativa, todavia devem realizar novos ensaios para confirmar a durabilidade dessas ligações.

Breschi et al., (2010) testaram a eficácia da galardina na preservação morfológica e mecânica de camadas híbridas envelhecidas. Utilizaram 60 molares humanos não cariados e extraídos, Vinte dentes foram utilizados para a análise zimográfica. O esmalte e o tecido pulpar foram removidos, e realizado uma pulverização para obter o pó da dentina resultando em cinco alíquotas de 1g de pó de dentina atribuídas a cinco grupos, G1: pó de dentina não tratada, G2: pó de dentina parcialmente desmineralizada com 1% de ácido fosfórico, G3: pó de dentina parcialmente desmineralizada com 1% de ácido fosfórico e foi incubada com 0,2mM de galardina durante 30 minutos. G4 e G5: pó de dentina parcialmente desmineralizado com 1% de fósforo durante 10 min, depois tratado, respectivamente, com solução de água CHX 2,2 mM (0,2%) e 22 mM (2%) durante 30 min. Depois disso foram lavados com água e ressuspensos em tampão de extração, em seguida eletroforizadas em gel de SDS-poliacrilamida copolimerizados com 2 g/L de gelatina posteriormente foram incubados por 24h a 37°C e corados de azul brilhante, no grupo controle incubaram em 5 mM de EDTA[®] e 2mM de 1,10 fenatrolina, esses são inibidores das gelatinases. No teste de microtração usaram 28 dentes que foram cortados até a exposição da dentina média/profunda, realizaram o protocolo de condicionamento com ácido Fosfórico a 35% por 15 segundos em seguida enxaguou e secou respeitando a umidade da dentina.

Os espécimes foram divididos aleatoriamente, no G1 0,2 mM + SB1XT[®], no G2 (controle): SB1XT[®]. Na avaliação de microinfiltração usaram os doze dentes foram preparados da mesma forma do teste de microtração, os espécimes tinham 1mm de espessura e foram armazenados em saliva por 24h e 1 ano, depois foram imersos em 50% de AgNO e levados para microscópio de luz. A quantidade de *tag* de prata ao longo da interface foi marcada numa escala de 0 a 4 por dois observadores. Usaram o teste Kappa para a confiabilidade intra-examinador. A análise zimográfica mostrou que os grupos 3, 4 e 5 mostraram inibição completa de MMP. Quanto na microtração não demonstrou diferenças estatísticas entre os grupos. O grupo tratado com galardina apresentou menor expressão de microinfiltração em comparação com o grupo controle. Portanto a galardina é um potencial inibidor das MMPs que pode melhorar e estabilizar a camada híbrida ao longo prazo.

Castelan et al. (2011) avaliaram se o pré tratamento com *cross-linkings* naturais ricos em proantocianidina melhora as propriedades mecânicas e a estabilidade ao longo do tempo do colágeno, conferindo um substrato mais resistente e duradouro para restaurações adesivas. Quinze terceiros molares hígidos tiveram o terço coronário desgastado e as raízes seccionadas 1mm abaixo da junção cimento esmalte. Os dentes foram cortados em discos, posteriormente acabados em formato retangular. Os espécimes foram submergidos em solução contendo ácido fosfórico a 10% por 5h para completa desmineralização. Extratos de proantocianidina obtidos a partir de semente de uva, semente de cacau, *cranberry*, canela e açaí foram aplicados na concentração de 6,5% e pH 7,2 sobre dentina desmineralizada. Para o controle negativo foi utilizado solvente puro e etanol-água. As amostras ficaram imersas nas soluções teste e foram testadas nos tempos de 10m, 30m, 60m, 120m e 240m. A estabilidade foi avaliada imediatamente, após 3, 6 e 12 meses após os tratamentos. Os resultados apresentaram significância estatística entre dois fatores: tratamento e tempo de exposição. Os extratos de semente de uva, semente de cacau e canela, aumentaram o módulo de elasticidade da matriz dentinária, onde os resultados do extrato de semente de uva e de cacau foram dependentes do tempo, ou seja, aumento do tempo de exposição aumentou aparentemente o módulo de elasticidade. Por fim, os autores concluíram que os extratos ricos em proantocianidina são ferramentas importantes para adaptar e manter a estabilidade da matriz colágena com ligações cruzadas por longos períodos de tempo.

Seu efeito depende de sua estrutura química, sistema de solventes utilizado, e tempo de incubação.

Lenzi, et al (2012) fizeram um estudo *in vitro* para avaliar o efeito do digluconato de clorexidina a 2% sobre as forças de ligação imediata na dentina hígida e afetada em dentes decíduos e permanentes. Quarenta dentes humanos hígidos (20 segundo molares decíduos e 20 terceiros molares permanentes) foram selecionados e distribuídos em 8 grupos (n=5) de acordo com o tipo de dente (primário/Pri ou permanente/Perm), condição da dentina (dentina hígida-DH ou dentina afetada- DA) e tratamento (controle-C ou aplicação de digluconato de clorexidina a 2% /CHX). O esmalte oclusal foi removido e as superfícies de dentina oclusais foram polidas para obter padronização da *smear layer*. Metades dos dentes foram induzidas à cárie, onde suas raízes e as porções cervicais foram seladas com resina epóxi e recebeu duas camadas de um esmalte na parte externa. As amostras foram imersas em 10 mL de solução desmineralizante durante 8h e depois numa solução remineralizante no mesmo volume durante 16h. As superfícies da dentina sofreram condicionamento ácido por 15seg com ácido fosfórico a 35% e depois foram lavadas pelo dobro de tempo, em seguida no grupo da CHX a 2% a superfície foi reidratada com 1,5 µL de CHX por 60 segundos e no grupo controle 1,5 µL de água destilada. Aplicou-se duas vezes o sistema adesivo (Adper Single Bond[®] 2) e um incremento de 1,5 mm. Após 24 h de armazenamento de água destilada, os espécimes com área de seção transversal de 0,8 mm foram preparados para serem testados sob teste de microtração. Com isso o resultado mostrou que a aplicação CHX antes do sistema adesivo não influenciou os valores de resistência da ligação. Concluíram, portanto que a CHX não influenciou a força de ligação imediata para a dentina de dentes primários e permanentes. Todavia, a condição da dentina e o tipo de dente influenciaram a resistência da união.

Santos et al. (2014) realizaram uma comparação *in vitro* por microtração usando dois sistemas adesivos convencionais (Adper Single Bond[®] 2 e XP Bond[®]) e um do sistema autocondicionante Adper SE plus[®]. Quinze terceiros molares hígidos foram selecionados, profilaxia realizada e a porção oclusal foi seccionada na máquina de corte sob refrigeração, expondo uma zona de dentina. Os dentes foram lixados para obter padronização da *smear layer* e divididos de forma randomizada em três grupos, sendo o Grupo 1 (controle) tratado com o sistema adesivo convencional Adper Single Bond[®] 2, o Grupo 2 com o sistema autocondicionante Adper SE Plus[®] e o Grupo 3 o sistema

adesivo convencional XP Bond®. Os procedimentos seguiram as orientações dos fabricantes. Após aplicação do sistema adesivo, um bloco de resina composta Z 350 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) de 5mm foi confeccionado a partir de incrementos individuais de aproximadamente 1mm. Em seguida, os dentes foram armazenados em água destilada, em estufa a 37°C durante 24h. Cortes de aproximadamente 1mm foram realizados, conseguindo palitos que em seguida foram acoplados a um dispositivos de tração em uma máquina de teste universal (Kratos, São Paulo, Brasil). Após o teste, os espécimes foram examinados para classificar a fratura em adesiva ou coesiva, onde as fraturas coesivas foram descartadas da análise porque não refletem a eficácia da ligação. A partir dos resultados obtidos, observaram que a maior resistência adesiva foi obtida com o sistema adesivo convencional XP Bond®, seguido por Adper Single Bond® 2 e Adper SE Plus® onde houve diferença estatística significativa ($p < 0.001$). Diante dos dados obtidos, concluíram que em relação à resistência de união à dentina o sistema adesivo convencional apresentou maior desempenho em relação ao autocondicionante.

Buscando investigar o padrão de interação entre os sistemas adesivos atualmente disponíveis e a dentina irradiada a laser Guven e Aktoren (2015) testaram a resistência ao cisalhamento de uma resina composta ligada com três sistemas adesivos diferentes às superfícies dentinárias tratadas com Er: YAG e analisaram a qualidade e estrutura na microscopia eletrônica de varredura (MEV). Selecionaram 132 terceiros molares hígidos extraídos onde suas raízes foram removidas 2 mm abaixo da junção cimentoesmalte, e as coroas sofreram um tratamento de superfície até se observar uma camada uniforme de dentina periférica. Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente para 8 grupos com 15 dentes. Os primeiros cinco grupos foram preparados com um laser Er:YAG (Fidelis Plus III) e os últimos três foram preparados convencionalmente e serviram de controle. G1: preparação com laser Er:YAG + Clearfil Tri-S® (C3S) Bond; G2: preparação laser Er:YAG + Adper SE Plus® (SE) Bond; G3: laser Er:YAG + gravação a laser + Adper Single Bond® 2 (SB2); G4: laser Er:YAG + condicionamento ácido + SB®2; G5: laser Er:YAG, sem gravação + SB2; G6: Diamond Bur + Clearfil Tri-S Bond®; G8: Diamond Bur + Adper SE Plus®. Em seguida as restaurações com 2 mm de altura foram armazenados em água destilada a 37°C por 24h. Os espécimes fraturados foram examinados no estereomicroscópio e foram classificadas em falha adesiva, coesiva ou mista. 12 dentes foram utilizados para a investigação no MEV, cada superfície dentinária foi

dividida em duas áreas iguais e as cavidades Classe I padronizadas em 2mm de largura e 1mm de profundidade e foram divididas 8 grupos conforme descrito anteriormente. Uma semana depois dos espécimes prontos foram feitas fotografias e essas foram avaliadas devido à presença ou ausência de camada híbrida íntegra, espessura, homogeneidade, continuidade ao longo da interface e presença de tags. No teste de cisalhamento a única diferença estatisticamente encontrada foi nos grupos aplicados SE onde teve um maior número em relação aos outros. Não apresentou diferença estatística entre os sistemas adesivos usados. A falha predominante foi a falha mista. No MEV observou-se que as cavidades tratadas com laser apresentavam interfaces mais irregulares e presença de lacunas quando comparadas com as tratadas convencionalmente. Com todos os adesivos testados, observou-se um padrão mais fino e não homogêneo de formação de camada híbrida após a preparação e hibridação a laser. Observaram a presença de Tags em todas as interfaces dentina-resina, contudo elas eram menores nas cavidades tratadas com laser. Em conclusão o SE teve um valor médio de cisalhamento quando comparadas as superfícies de dentina tratadas com laser de Bur e Er:YAG, no MEV as camadas híbridas apresentavam padrão irregular não homogêneo do que a dentina preparada de forma convencional e nos grupos onde aplicaram SE Bond mostraram uma camada híbrida mais espessa do que as cavidades tratadas convencionalmente.

Rios et al (2015) avaliou o efeito da aplicação de Digluconato de clorexidina (CHX) , em diferentes concentrações (2% e 0,004%), na ligação à dentina erosiva através do teste de microtração e análise ao microscópio após seis meses de envelhecimento. Quarenta e dois molares humanos foram tratados com: água destilada (controle), CHX 0,004% e CHX 2%, esses dentes tiveram o esmalte oclusal removido numa máquina de corte, seguidamente foram polidos com lixas d'água. Nesse estudo, foram usados dois tipos de substrato: dentina hígida e dentina erosiva. Na dentina hígida o armazenamento foi em saliva artificial e o da dentina erosiva foi numa bebida de cola além de ser submetido a ciclagem de pH por 5 dias. No processo restaurador usaram o Adper Single Bond® 2 seguindo as recomendações do fabricante. Para os grupos dos dois substratos dentinários um terço dos espécimes foi colocado 1,5µL de cada solução citada. Em seguida, foi confeccionada a restauração com um bloco de 2mm. Os espécimes foram armazenados em água destilada a 37°C por 24 horas. Após isso, foram realizadas secções longitudinais nos espécimes pra produzir palitos de 0,9 mm x 0,9 mm

x 8 mm que foram imediatamente submetidos ao teste de Microtração e Análise em microscópio óptico a laser. Os espécimes correspondentes ao grupo de após 6 meses foram conservados em estufa a 37°C em saliva artificial. As fraturas foram classificadas em: Adesivas, Mistas, Coesivas em dentina e Coesivas em resina. Com isso pode se observar que a união adesiva em dentina erosiva foi 40% menor que em dentina hígida nos grupos testados imediatamente. Essa baixa resistência foi menos evidente nos grupos testados após 6 meses. Nenhuma concentração de CHX apresentou diferença estatística significativa nos grupos testados imediatamente, sejam eles compostos por dentina hígida ou erosiva, todavia após 6 meses de envelhecimento a CHX a 2% impediu a perda de resistência de ligação em ambos os substratos. Houve um predomínio de fraturas adesivas e mistas em relação às coesivas. Nas imagens observadas em Microscópio a laser não apresentou diferença estatística significativa. De acordo com esse estudo a aplicação das soluções de CHX não exerceram efeito imediato significativo, contudo após envelhecimento a CHX 2% impediu perda de força de ligação em ambos os substratos. Portanto, a aplicação de CHX 2% pode ser uma estratégia promissora para a conservação da união adesiva em ambos os substratos estudados.

2.3. Zimografia

Kaji et al (2003) investigaram a atividade das metaloproteinases de matriz de câncer de pulmão. Trinta e nove espécimes foram utilizados para a zimografia *in situ* pelo método de carimbo (FIZ) e da gelatina convencional. A zimografia de gelatina usou o gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Esse extrato foi incubado por 37°C em tampão de amostra SDS sem agente redutor e depois foi levada a eletroforese em géis de poliacrilamida a 8%. Em seguida, foram lavados em 2,5% de Triton X-100 e incubou-se por 16h a 37°C. A amostra foi corada com 0,1% de Coomassie R-250, posteriormente foi realizada a análise no microscópio. A zimografia *in situ* do método de carimbo é realizada usando uma película de gelatina reticulada sobre uma camada de 7 µm, em seguida é incubada por 16 horas a 37°C. A película foi corada com a solução de Ponceau 3R a 0,8% durante 20 segundos. Os resultados da zimografia *in situ* mostrou uma diferença estatística no escore FIZ de acordo com o estadiamento patológico, além do que o tecido pulmonar normal teve um escore consistentemente

baixo. Na zimografia de gelatina a MMP-2 foi significativamente maior nos tumores com metástase dos linfonodos, tumores do estágio II-IV, todavia a MMP-9 não apresentou correlação significativa com nenhum parâmetro. Com isso o método de *zimografia in situ* testado pode ser um diagnóstico auxiliar para a presença de células cancerígenas quando o espécime estiver ressecado, entretanto devem ser feitos mais estudos para melhorar a metodologia aplicada.

A fim de determinar se a acidez dos adesivos autocondicionantes pode ser modulada pela dentina. Iwasa et al. (2011) realizaram um estudo com o objetivo de melhorar a compreensão das alterações de pH de adesivos autocondicionantes numa dentina em pó. Os adesivos usados foram Adper Prompt L-Pop[®]; Bond Force[®]; Clearfil tri-S Bond[®]; Fluoro Bond Shake One[®]; G-Bond[®]. Incisivos bovinos foram moídos até se obter um pó fino de 10 µm. A amostra é de 1,0 mg de pó de dentina e foram feitas medidas de 10, 20, 30, 60, 120 e 180 segundos após a mistura. Três amostras de cada adesivo foram preparadas e a média foi calculada. Os dados foram submetidos no teste de normalidade, ANOVA e seguida do teste *tukey* e de *Dunnnett*. Os valores do pH dos adesivos testados variaram de 0,97 a 2,83, quando misturados com a dentina os valores subiram variando 6,30 a 7,11 a 180 segundos. No MEV foi observado um produto químico da reação do pó e adesivo. Nesse estudo mostrou que a acidez dos adesivos pode ser tamponada pelo pó de dentina por um determinado tempo, logo um equilíbrio entre a acidez e a fórmula do adesivo em a capacidade da dentina responder é de extrema importância na formação de ligações estáveis na interface resina/dentina.

Aranha (2014) identificou os componentes químicos e investigou o potencial anticâncer *in vitro* e a genotoxicidade dos óleos essenciais do gênero *Eugenia* além da zimografia em células. Fez o teste de citotoxicidade do alamar blue e o seu potencial hemolítico em eritrócitos de camundongos. Para a avaliação do efeito anticâncer usaram nove óleos essenciais e dentre eles os que tiveram melhores efeitos foram *E. tapacumensis* e *E. cuspidifolia*. Avaliaram a zimografia através da linhagem HT1080. Nos resultados o melhor efeito foi do *E. tapacumensis* que reduziu a atividade enzimática nos tempos de 14h e 48h e em duas concentrações (15 e 30 µg/mL), no teste de cometa esse mesmo óleo essencial causou dano no DNA. Sendo assim pode se concluir que esses óleos essenciais são citotóxicos nas linhagens tumorais, tem

potencial anticâncer na linhagem testada, entretanto devem ser feitos estudos mais específicos.

Em uma revisão de literatura, Tjaderhane et al (2015) visaram fornecer uma visão geral do conhecimento atual do papel da matriz dentinária e das suas patologias, e discutir a abordagem que poderia ajudar a entender e gerenciar essas condições. As MMPs são enzimas Zn^{2+} e Ca^{2+} dependentes, importantes em diversos processos patológicos como o câncer, por exemplo, pois degradam praticamente todos os componentes da matriz extracelular. O papel fisiológico das enzimas colagenolíticas na dentina ainda não são bem conhecidos, mas estudos mostraram que elas podem estar presentes na dentina peritubular, envolvidas na formação de dentina terciária, e também na liberação de fatores de crescimento dentinários que, por sua vez, regulariam reações defensivas da polpa. As MMPs também estão presentes na saliva, e alguns experimentos mostraram sua eficiência em degradar matriz colágena exposta. Estudos confirmaram sua presença em dentina afetada por cárie. Diversos inibidores sintéticos de MMPs vem sendo estudados com a proposta de eliminar ou reduzir a degradação da matriz colágena dentinária, um desses inibidores é a tetraciclina, muito utilizada no tratamento da periodontite. Outros inibidores sintéticos apresentados na revisão são o EDTA e a CLX. Por fim, a revisão explana que a presença e a identificação da atividade funcional das enzimas colagenolíticas presentes na dentina marcam o início de uma nova era, além de ressaltarem que mais estudos precisam ser realizados, e mais perto do ambiente natural da dentina, afim de precisar as funções enzimáticas.

Zheng et al. (2015) averiguaram a força de ligação microtração após um pré-tratamento com diferentes inibidores de MMPs (Digluconato de Clorexidina, extrato de chá verde, sulfato ferroso, Galardina) usando Optibond[®] FL e Clearfil SE Bond[®] após 9 meses de envelhecimento. Quarenta terceiros molares humanos hígidos foram usados. A superfície oclusal foi segmentada para obter superfície plana de dentina e em seguida houve padronização da *smear layer*. Os dentes foram aleatorizados e distribuídos em grupo teste (n=3) grupo controle (n=5) grupos dos dois adesivos (Optibond[®] FL e Clearfil SE Bond[®]) com ou sem a aplicação adicional de CHX, 0,05% de extrato de chá verde, 1Mm sulfato ferroso ou 0,2mM Galardina. Dois grupos de cada adesivo não foram tratados com as substâncias teste. Nos demais, a aplicação foi feita com auxílio

de microbrush por 60s. Os blocos de Resina Composta foram confeccionados medindo 5mm de altura e mantido por 24h na água destilada em estufa a 37°C, em seguida confeccionaram os palitos medindo aproximadamente 1mm³, onde os controle foram testados imediatamente, e os grupos teste foram armazenados em saliva artificial a 37°C por 9 meses. A força de tração foi testada com auxílio de uma máquina de ensaios universal e cada palito foi observado em microscópio óptico para determinar o tipo de fratura, classificadas em: adesiva, coesiva em dentina, coesiva em resina e mista. De acordo com os resultados a resistência adesiva, os grupos com o sistema adesivo convencional tiveram queda significativa após 9 meses de armazenamento em saliva artificial. Além disso, todos os grupos aplicados as substâncias inibidoras das MMPs com envelhecimento de 9 meses, com exceção do sulfato ferroso, revelaram resultados semelhantes ao teste inicial e significativamente maior em comparação com o grupos sem pré-tratamento. Não houve diferença estatística entre os grupos do sistema. Então concluíram que clorexidina a 2%, chá verde e Galardin preservaram a resistência de união quando utilizado o sistema adesivo convencional, mas não com o autocondicionante quando armazenado por 9 meses.

Pedrosa et al (2016) investigaram o potencial anti-envelhecimento dos extratos de *L. ferrea* da casca e vagem e sua composição química. A caracterização dos compostos foi feita através de uma cromatografia líquida associada a um espectrômetro de massa. Além disso, foram realizados ensaios de inibição da elastase, hialuronidase e colagenase. Nesse estudo foi feita uma cultura de células de melanoma murinho B16F10, em seguida verificou-se a viabilidade celular através do ensaio de exclusão Trypan Blue, verificou-se tirosinase e PCR. A zimografia foi feita através da eletroforese em gel de uma gelatina, usaram $1,5 \times 10^4$ de prepúcio humano de fibroblastos em placas de 24 poços após 24h foi trocado o meio de cultura. Trinta microlitros de proteína foi separada por eletroforese num gel de acrilamida a 10% contendo 0,5mg/mL. O gel foi lavado duas vezes com 2,5% de Triton X-100 durante 15 minutos a 37°C. O gel foi incubado durante 17h a 37°C e depois corado com a solução de coomassie. Esse ensaio foi realizado em quadruplicado. O resultado da cromatografia caracterizou 18 compostos, entre eles, flavanóides, ácido fenólicos e secoridoides. Os extratos apresentaram ação inibitória de hialuronidase a MMP-2 também foi inibida por ambos os extratos e diminuíram o teor de melanina em B16F10. Então os extratos de *L.*

ferrea oferecem alto potencial para cosméticos devido os efeitos apresentados nesse artigo.

Breshi et al. (2010a) testaram o efeito do Digluconato de clorexidina nas concentrações 0,2% e 2% nas interfaces adesivo/dentina criada por um sistema adesivo de dois passos. Usaram 10 molares recém-extraídos humanos e sofreram pulverização para obtenção do pó de dentina para ser divididos em cinco grupos: G1 pó de dentina não tratada, G2 pó de dentina desmineralizado com ác. fosfórico a 1%, G3 pó desmineralizado tratado com 3 mL de Adper Scotchbond® 1XT(SB1XT) e G4 e G5 pó de dentina desmineralizada tratada com clorexidina 0,2% e 2% durante 30 min, respectivamente, posteriormente incubaram com 3 mL de SB1XT e realizaram a análise zimográfica. No teste de microtração usaram 48 molares extraídos não cariados e divididos em 3 grupos: G1 tratada com clorexidina 0,2%; G2 tratada com clorexidina 2% e G3: grupo controle que não teve tratamento prévio somente o adesivo. Os palitos foram divididos em dois grupos iguais e armazenados durante 24h ou 2 anos em saliva artificial. O teste estatístico foi ANOVA, teste Post hoc de Tukey e kruskal-wallis. A zimografia mostrou que os grupos 4 e 5 tiveram uma inibição completa de MMP-2 e MMP-9. No Tempo zero não houve diferença em relação às forças, entretanto depois de 2 anos o grupo controle teve uma diminuição de 67% e os grupos tratados com a clorexidina essa diminuição foi entre 16-30%. Os autores concluíram que a ativação da MMP-2 pelo adesivo SBIXT® e inibição com clorexidina reafirma o potencial do digluconato de clorexidina a 2% em diferentes concentrações para inibição da MMP-2.

Mazzoni, *et al.* (2014) avaliaram por meio de um ensaio zimográfico e uma técnica de zimografia *in situ* a capacidade de 1-etil-3-carbodiimida(EDC) de inibir a metaloproteinases da matriz. A análise zimográfica foi realizada com o pó de dentina obtida a partir de 14 molares humanos e divididos em 7 grupos: G1: mineralizado/controle; G2: desmineralizado com 10% em peso de ácido fosfórico durante 10 minutos.G3: desmineralizado quanto ao G2 e tratados com 0,3 M EDC por 30 min; G4: desmineralizado quanto ao G2 e tratado com Optibond® FL(OFL) G5: desmineralizado quanto ao G2 e tratados com 0,3 M EDC + OFL; G6: desmineralizado quanto ao G2 + Scotchbond 1 XT® G7:desmineralizado quanto ao G2 e tratados com 0,3 M EDC + SB1XT. Zimografia *in situ* usaram 20 terceiros molares inclusos recém-extraídos e foram divididos em 4 grupos: G1: dentina teve um pré-tratamento com EDC

0,3M durante 1 min + OFL; G2: OFL foi aplicado em dentina não tratada; G3: pré-tratada com EDC 0,3 M + SB1XT; G4: SB1XT foi aplicado em dentina não tratada. O OFL e SB1XT seguiram a orientação do fabricante. Usaram uma gelatina conjugada com fluoresceína extinta como substrato. Os resultados revelaram um aumento da expressão da dentina endógena MMP-2 e -9 após a aplicação do adesivo, enquanto com o uso de EDC inibiram. Os resultados de zimografia *in situ* mostraram que as camadas híbridas de adesivos testados apresentaram grande atividade colagenolítica, enquanto que quase nenhum sinal de fluorescência foi detectado quando os espécimes foram pré-tratados com EDC. Os resultados do presente estudo sustentam as hipóteses de que a EDC também pode inativar a atividade dentária da MMP, contudo novos estudos são necessários para validar sua eficácia.

Sabatini e Pashley (2014) realizaram uma revisão com o objetivo de avaliar criticamente os artigos publicados existentes e resumir os dados mais pertinentes sobre a colagenólise mediadas por enzimas no seu efeito na ligação dentinária. A busca foi realizada nas bases de dados PubMed e MEDLINE utilizando como palavras chaves ligação, colágeno, reticulação, cisteína- catepsina, dentina, agentes de ligação dentina, endopeptidases e metaloproteinases da matriz, a busca se restringiu a artigos publicados de janeiro de 1999 a dezembro de 2013 em inglês apenas. Os estudos foram basicamente *in vitro* e *in vivo* e tiveram como critério de exclusão foram estudos sem um grupo controle apropriados e estudos avaliando resistência de união imediata, com isso 51 estudos foram incluídos nesta revisão. A revisão reforçou alguns mecanismos já conhecidos e usados para as MMPs, entretanto mostraram que precisam de mais investigações em busca de um monômero que consiga permear as fibrilas de colágeno totalmente e criar uma ligação resina-dentina mais durável.

A fim de realizar uma revisão de literatura sobre o papel das metaloproteinases (MMP) e cisteína-catepsinas na dentina no processo de cárie, Mazzoni, et al. (2015) mostraram que essas enzimas estão presentes na saliva, dentina mineralizada e no líquido dentinário. As MMP estão em formas inativas dentro da matriz calcificada, entretanto no processo de cárie, que é um processo desmineralizante, elas podem ser ativadas e junto com elas a cisteínas-catepsinas também visto que seu pH ideal é 5,0; as MMP tem o pH ideal de 7,0, entretanto elas também tem ação em pH ácido e por isso tem uma ação mais prolongada no processo de cárie. Nos estudos apresentados mostrou

que há alterações moleculares no colágeno mesmo na dentina afetada quando ainda é remineralizável, isso acontece mesmo em lesões de mancha branca. Nos estudos *in vivo* e *in vitro* apresentados sobre a camada híbrida expôs que a atividade da enzima localiza-se na parte inferior da camada híbrida onde a camada de colágeno desmineralizado contém nanoporosidades, além disso, os monômeros de resina ligeiramente ácidos podem de fato ativar as MMPs inibindo os TIMPs. Diferentes produtos químicos (digluconato de clorexidina, galardina e cloreto de benzalcônio) ou agentes de ligação cruzada de colágeno foram empregados com sucesso na inibição dessas enzimas. Os autores concluíram que os inibidores enzimáticos podem desempenhar um papel crucial em protocolos terapêutico, todavia são necessários mais estudos a fim de melhorar a estabilidade da interface adesiva.

Seseogullari-Dirihan et al. (2016) analisaram a atividade da metaloproteinase (MMP) da matriz de dentina desmineralizada após 1 ou 5 minutos de pré-tratamento por vários reticulantes de colágeno (glutaraldeído, riboflavina / UVA, riboflavina-5-monofosfato / UVA, extrato de sumac-berry, extrato de semente de uva e curcumina). Ensaio genérico de MMP, análise zimográfica, Zimografia *in situ*, medição da proteína total extraível e um imunoenensaio multiplex com base em grânulos. Na zimografia *in situ* usaram 14 terceiros molares intactos recém-extraídos onde o esmalte e a dentina superficial foram removidos com uso de uma máquina de corte refrigerada, até obter disco de 0,5 mm de dentina. Cada disco foi colado numa lâmina de microscópio com cola de cianoacrilato, a superfície foi lixada com lixa nº 600 e depois um condicionamento ácido de 10 s com ácido fosfórico a 10% durante 20 segundos e enxaguada com água pelo dobro de tempo. Cada disco de dentina foi tratado com 50 µL das soluções reticulantes para 1 ou 5 min. Uma gelatina conjugada com fluoresceína foi utilizada como substrato MMP (E-12055). Esse substrato foi preparado a partir de uma solução-mãe de 1 mL de DQ-gelatina, em seguida 50 µL da solução de gelatina foram espalhados em cada amostra e cobertos com uma lamínula e depois foram levadas a uma câmara escura de umidade relativa. Cada amostra com 85µm de espessura foi examinada no microscópio confocal multi-fotões e processadas com o software ZEN 2010. As imagens foram obtidas a 0 e 48h após a incubação. Todos os grupos de pré-tratamento reticulantes mostraram reduções significativas na atividade MMP total em comparação com o controle. O grupo da riboflavina/uva obteve a maior inibição de MMP tanto quando testado em 1 minuto quanto em 5 min. A atividade

gelatinolítica foi observada principalmente nos túbulos dentinários e ligeiramente nas superfícies expostas de colágeno. A atividade gelatinolítica foi mais forte nos túbulos dentinários antes do tratamento com reticulantes do que após o tratamento com reticulante. A análise multiplex dos extratos de dentina tratada com reticulante mostrou redução na liberação de MMP-8, MMP-2 e MMP-9. Com esses resultados pode se concluir que 1 minuto de pré-tratamento pode inativar as MMP-2, -8 e -9, entretanto pesquisas adicionais são necessárias para verificar se essa inativação é permanente.

Yang et al. (2017) avaliaram as atividades antibacterianas e a ligação de um adesivo (AdperTM Single Bond 2) onde foi adicionada quercetina em diferentes concentrações. A quercetina foi incorporada ao adesivo AdperTM Single Bond 2 até obter uma concentração de 100µg/mL (Q100), 500 µg/mL (Q500), 1000 µg/mL (Q1000) e para controle negativo usou um adesivo sem quercetina. Testaram a avaliação antibacteriana frente ao *Streptococcus mutans*, grau de conversão e taxa de polimerização, citotoxicidade, microtração, zimografia *in situ* e microinfiltração, de forma abrangente. Na microtração, 40 molares hígidos foram utilizados e submetidos à profilaxia e remoção da parte oclusal em máquina de corte sob refrigeração, expondo uma zona de dentina. Os dentes foram lixados para obter padronização da *smear layer*, depois utilizaram um gel de ácido fosfórico a 37% por 15 segundos e em seguida aplicou-se um dos quatro adesivos experimentais, fotopolimerizaram por 20 segundos e depois adicionaram 4 mm de resina composta. Em seguida foram divididos em dois grupos um que foi avaliado imediatamente e outro após um mês de envelhecimento numa solução de colagenase. Na zimografia *in situ* utilizaram duas placas de cada tipo de adesivo (controle, Q100, Q500, Q1000) adicionando uma mistura de gelatina conjugada com fluoresceína extinta cobertas com lamínulas e incubada por 14h numa câmara escura umidificadora a 37° C e depois observada no microscópio de fluorescência CLSM. Obtiveram como resultados que na concentração de 500 e 100 os adesivos conseguiram inibir as MMP-2 e MMP-9 ao contrario do grupo controle, além disso, preservou suas propriedades em relação à microtração e microinfiltração sendo às vezes até melhor pela questão hidrofóbica e inibiu o crescimento do *S. mutans* além de ser biocompatível. Assim os resultados apresentaram que o melhor grupo foi o Q500 devido a todas as características testadas nesse estudo, entretanto mais ensaios e estudos clínicos devem ser realizados.

Mazzoni et al. (2017) testaram a capacidade 1-etil-3 carbodiimida (EDC) antes do sistema adesivo a fim de melhorar a força de ligação através de zimografia e microtração. Oitenta terceiros molares saudáveis recém-extraídos foram selecionados. Eles foram cortados com uma máquina de corte e depois lixados a fim de formar uma camada padronizada. Os dentes foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos. G1: Aplicou Clearfil SE[®] (CSE) de acordo com as instruções do fabricante + 0,3M EDC + Clearfil SE Bond[®]; G2: CSE[®]; G3: Condicionamento com ácido fosfórico 35% + 0,3M EDC + XP Bond[®]; G4: XP Bond[®]. Após isso foi restaurada e cortado para obtenção de palitos 0,9x0,9x6 mm³. Eles foram testados em 24h e 1 ano e foram armazenados em saliva artificial a 37°C, e para a análise estatística usaram o teste Kruskal-Wallis e o teste U de Mann-Whitney com $\alpha = 0,05$. Zimografia o usou o método de pó de dentina e foram distribuídos em 6 grupos, G1: Controle, pó de dentina(DP) não tratado G2: DP com 1ml de ác. Fosfórico a 10% por 10 min G3: DP tratado com 100 μ L de EDC 0,3M durante 30 minutos foi seco suavemente e trado com CSE por 30 min G4: DP misturado com 100 μ L de CSE durante 30 min. G5: DP com 1ml de ác. Fosfórico a 10% por 10 min tratado com 0,3 M EDC e depois aplicação XPB por 30 min. G6: DP com 1ml de ác. Fosfórico a 10% por 10 min tratado com 0,3 M EDC e seguido com 100 μ L XPB por 30 min. A atividade proteolítica foi avaliada no scanner de luz UV de longa onda, as bandas zimográficas foram identificadas e quantificadas com Bio-Rad Quantity One Software. A resistência da ligação imediata não alterou com o uso de EDC em ambos os sistemas testados, todavia melhorou a resistência após 1 ano de envelhecimento. O pré-tratamento com EDC seguido do CSE não inibiu completamente as MMPs, entretanto o pré-tratamento com EDC seguido do XPB teve uma inativação das gelatinases quase que completa. Concluíram que o EDC tem eficácia ao longo do tempo e revelaram que ele não afeta os sistemas adesivos testado, precisando de mais estudos *in vivo* para validar clinicamente.

Scaffa et al. (2017) averiguaram a distribuição de CT-B e K na matriz dentinárias e avaliou a ocorrência de cisteína-catepsinas (CCS) e metaloproteinase (MMPs) no mesmo tecido, além de testar se a atividade proteolítica da dentina seria devido à atividade de CCS ou MMPs. Quinze molares hígidos humanos foram usados e processados num procedimento de pré-imunomarcção, após isso as observações foram realizadas usando FEI-SEM (JSM 890, JEOL, Tóquio, Japão) a 7 kV e 1×10^{-12} A. As imagens foram obtidas usando uma combinação de detectores de elétrons

retrodispersos e secundários. Na zimografia *in situ* usaram dois terceiros molares recém-extraídos para obter fatias longitudinais de 200 µm de espessura. Para verificar a especificidade da atividade enzimática as fatias foram incubadas em água deionizada no controle, E-64 inibidor específico de CCS ou 1,10-fenantrolina inibidor de MMPs durante 30 minutos em temperatura ambiente. A zimografia usou uma gelatina conjugada com fluoresceína extinta como substrato. A gelatina foi fluída 1:8 em um tampão com 10 µL de um agente antiaderente, colocou-se 80 µL sobre cada lamina e incubou numa câmara escura a 37°C por 24h. A hidrólise desse substrato foi avaliado num microscópio confocal multi-fotões onde se conseguiu secções de 85 µm de espessura e as imagens foram quantificadas e processadas com o software ZEN 2010. De acordo com os resultados obtidos na superfície de dentina parcialmente desmineralizada apresentaram padrões de imunomarcção positiva para CT-B e CT-K e ambas foram encontradas ao longo das fibrilas de colágeno. As imagens revelaram a coocorrência de CT-B e MMP-2 na matriz dentinária, mas com distribuição diferente. Na zimografia observou-se uma intensa atividade gelatinolítica em dentina mineralizada e o tratamento com E-64 e 1,10-fenantrolina inibiu a atividade gelatinolítica, indicando que essa atividade foi maior nas MMPs do que nas CCS. Os resultados mostraram, portanto, a presença de MMPs e CCS ativos na dentina. Concluíram que as MMPs e CCS são co-distribuídas na dentina, enquanto as enzimas ativas foram extraídas da dentina a atividade das MMPs é predominante em relação às CCS.

Göstemeyer e Schwendicke (2018) produziram uma revisão sistemática sobre o pré-tratamento inibitório de forma qualitativamente e uma metanálise. Nesse estudo foram incluídos ensaios clínicos randomizados investigando humanos comparando o pré-tratamento versus placebo ou nenhum tratamento alternativo antes da aplicação do adesivo. As bases de dados eletrônicas como Embase, Pubmed e Cochrane central foram utilizadas usando um protocolo de busca e dois revisores calibrados e a inclusão era decidida em consenso por ambos. As *meta*-análises realizadas foram de intenção de tratamento, de efeitos fixos ou aleatórios, por protocolo e de cenário. Dez artigos foram incluídos no estudo com 208 pacientes e 695 cavidades, desses estudos sete utilizaram clorexidina, dois etanol-úmido-ligação e um usou compostos de amônio quaternário para a inibição da degradação, todos, exceto um estudo, apresentaram significativo risco de viés. O risco de perda de retenção não teve nenhuma diferença significativa entre os grupos experimental e controle na análise por protocolo. Já na análise de cenário

extremo verificou se que um pré-tratamento reduziu significativamente ou aumentou o risco de perda da restauração, indicando uma incerteza. O tempo mais longo estudado foi de 36 meses e o mínimo de seis meses. Concluíram que não há evidências fortes suficientes para indicar ou não o pré-tratamento da cavidade e ainda não está claro se há outros efeitos como irritação da polpa, desinfecção.

Mazzoni et al. (2018) investigaram a presença, localização e distribuição de MMP-7 em dentina sadia humana. Seis terceiros molares hígidos foram utilizados para a remoção do pó de dentina. Esse material foi desmineralizado com ácido fosfórico a 10% sob constante agitação, para então ser adicionado hidróxido de sódio para tamponar o ácido fosfórico sob centrifugação por 20 minutos. O ensaio zimográfico utilizando 12% de gel SDS-PAGE. Após a corrida, o gel foi lavado e mantido em solução tampão de ativação por 48h, e então fotografado sob iluminação UV. O resultado da zimografia apresentou atividade enzimática correspondente ao peso molecular das formas de pró-enzima e ativa da MMP-7. Os autores ressaltaram que, além da habilidade de degradar componentes da matriz extracelular, a MMP-7 também apresenta a habilidade de ativar outras MMPs, incluindo as MMPs -2, -9 e -8. Logo, a inibição de MMP-7 pode prover uma inibição mais efetiva das gelatinases presentes na dentina. A sua presença foi observada nos extratos de dentina pela primeira vez nesse estudo. Por fim, concluíram que a identificação de MMP-7 na dentina humana representa um passo à frente na identificação de MMPs no substrato dentinária. A inibição da MMP-7 deve ser considerada devido ao fato de que regula a atividade de MMP-2 e -9.

Betancourt, Baldion e Castellanos (2019) realizaram uma revisão de literatura para identificar quais fatores influenciam na degradação na interface adesiva resina-dentina e quais as estratégias a fim de estabilizar a camada híbrida e melhorar a durabilidade das restaurações adesivas. Eles selecionaram os artigos no PubMed, Scielo, Cochrane, Elsevier, EBSCO, LILACS e Web of Science usando como palavras chave: colágeno, reagentes de ligação cruzada, metaloproteinases de matriz, dentina, endopeptidases. Não tiveram restrição quanto ao idioma e a busca foi realizada até novembro de 2018. Durante essa revisão eles falam das dificuldades encontradas na interface dentina-resina devido a instabilidade da camada híbrida. Isso podendo acontecer devido à infiltração incompleta do sistema adesivo, a presença de água,

presença de MMP e cisteínas. Os autores falam das funções das MMP durante o período de odontogênese, no processo de reabsorção da matriz extracelular como fala também das suas funções na fisiopatologia da cárie e doença periodontal. As MMPs encontradas na dentina humana são MMP-2, MMP-9, que são as mais abundantes, MMP-8, MMP-3 e MMP-20. Nesses artigos estudos mostraram que essas degradações pelas MMP podem ocorrer tanto nos adesivos etch-and-rinse (E & R) como nos autocondicionantes. As estratégias citadas para a estabilização da interface foi: Inibidores não seletivos, cujo exemplo foi a Clorexidina; agentes físicos como a luz UV; agentes sintéticos inespecíficos de reticulação de colágeno como o Glutaraldeído ou carbotiimida citotóxica (EDC); os agentes de reticulação naturais como as antocianinas e remineralização biomimética. O grupo da Clorexidina ele é eficaz até certo tempo, os grupos de reticulação e remineralização apresentam um tempo de tratamento muito longo de aproximadamente 1 hora. Entretanto esses biomodificadores são as opções mais promissoras, pois melhora as propriedades físicas da dentina além da inibição das MMP. Com isso mais estudos devem ser feitos para validarem o que foi encontrado nessa revisão tanto em estudo *in vivo* quanto *in vitro*.

Zhou et al., 2019 realizaram uma revisão sobre s métodos de modificação de materiais adesivos para melhorar a longevidade das restaurações. Os atuais adesivos tendem a simplificar os passos de adesão ornando o uso mais fácil, eles já estão na oitava geração, contudo o padrão ouro continua sendo os adesivos de multi-passo. O sistema adesivo autocondicionante tem uma natureza hidrofílica que os torna mais propensos à sorção de água, quebra hidrolítica e perda da integridade estrutural na interface resina-dentina. Além dos tipos de adesivos e suas gerações os autores citam os fatores relacionados com a falha da ligação resina/dentina, esses fatores são as enzimas proteolíticas derivadas pelo hospedeiro (MMPs e catepsinas), interações químicas adversas, envolvendo água, metacrilato e pressão pulpar e o carregamento mecânico onde as forças mastigatórias podem afetar adversamente a interface de união, dobrando as estruturas dentárias, levando à formação de fendas e vazamento marginal em torno de restaurações. Em relação às MMPs os autores reiteram os agentes de ligação cruzada que podem alterar a mobilidade molecular do colágeno ou envolver pH e concentração de Zn^{2+} , eles citam extrato de uva, hesperina (que é um extrato de frutas cítricas), citam alguns artigos que adicionaram ao Clearfill o hesperina e que tiveram uma influencia positiva. Com isso os autores concluíram que a incorporação de agentes com

metaloproteinase anti-matriz, remineralização ou funções antibacterianas em sistemas adesivos pode ser positiva e a adição de vários tipos de agentes funcionais ou combinados em sistemas adesivos é uma forma promissora de fornecer mais de uma função de benefício e mostrar mais eficácia na melhoria da longevidade de restaurações resinosas.

2.4. Fitoterápicos em dentística

Em seu estudo, Lima et al. (2003) realizaram ensaios *in vitro* e *in vivo* para investigar a atividade anticâncer de *Copaifera multijuga* Hayne, e utilizaram o teste de citotoxicidade Azul de Tripán. Células da linhagem melanoma murinho (B16F10) foram utilizadas e incubadas com 0,5 e 1,0 mg/mL de óleo de resina de *Copaifera multijuga* durante 1 e 3h. A viabilidade celular foi quantificada em hemocítmetro pelo ensaio do Azul de Tripán e expressa em porcentagem de células viáveis quando comparadas com grupos controle, que recebeu apenas PBS. Com o aumento do tempo de incubação, observou-se uma redução no número de células viáveis no método de exclusão do azul de Tripán. Diferenças também foram observadas entre as duas doses utilizadas. Com 1 h de incubação, 0,5 e 1 mg/mL reduziram o número de células viáveis de 89,0% - 16,8% (grupo controle) para 49,4% - 6,1% e 30,9% - 10,7%, respectivamente. Às 3h de incubação, as células viáveis no grupo controle foram 110,9% - 16,7% e este número foram reduzidos para 34,0% - 9,1% e 16,8% - 7,9% com as concentrações de 0,5 e 1 mg/mL de óleo de *Copaifera multijuga* reduziu o crescimento da linha celular B16F10, bem como o número de metástases pulmonares, e quando incubado em diferentes doses em diferentes doses em diferentes tempos, foi capaz de reduzir o número de células viáveis avaliadas pela técnica de exclusão do azul de Tripán.

Bandeira, et al. (2016) analisaram por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV) a morfologia da dentina, cortada e tratada com a emulsão de óleo de copaíba (CO), suspensão de extrato etanólico de própolis (EP), digluconato de Clorexidina a 2% e água destilada. Vinte e quatro pré-molares foram utilizados nessa pesquisa, onde todos foram descontaminados com timol a 0,2% por 24 horas, em seguida com auxílio de máquina de corte, a coroa foi separada da raiz na região da junção cimento-esmalte, a smear layer foi padronizada utilizando lixas d'água. Os espécimes foram divididos de maneira randomizada em oito grupos experimentais (n=3) e tratados com as substâncias por 30 segundos. Os espécimes foram examinados através

de fotomicrografias. Três observadores independentes analisaram as micrografias codificadas e misturadas de maneira aleatória para que as imagens fossem analisadas de maneira cega. A presença dos detritos foi avaliada onde o resultado foram dicotomizados em dentina “limpa” e dentina “suja”. De acordo com o ensaio, a micrografia feita a partir do grupo controle (sem tratamento de superfície de dentina) mostrou uma ampla quantidade de detritos e microrganismos. Em amostras com tratamento de pulverização de ar/água a quantidade foi reduzida, porém a presença de detritos foi muito ampla em grande quantidade. Os espécimes tratados com 1% de PS (1% Própolis + Tween 80 + água destilada) tinham menos detritos quando comparados ao grupo sem tratamento da superfície. Para as outras formas de limpeza: Clorexidina a 2%; 10% de óleo de copaíba + Tween 80 + água destilada; 10% de óleo de copaíba + Tween 80 + 1% de produto biotecnológico + água destilada; 30% de óleo de copaíba + Tween 80 + água destilada e 30% de óleo de copaíba + Tween 80 + 1% de produto biotecnológico + água destilada, todas apresentaram efetividade na limpeza. Assim conclui a necessidade de limpar a cavidade para remoção de detritos e que a morfologia da superfície da dentina mostrada no MEV sugere que CO e EP apresentam viabilidade e podem ser utilizadas como agentes de limpeza cavitário, ainda necessitando de maiores estudos *in vitro* e *in vivo*.

Souza (2016) avaliou *in vitro* a citotoxicidade e a genotoxicidade de uma emulsão à base do óleo da copaíba. O teste para viabilidade celular utilizou-se a solução de Alamar Blue® na linhagem normal de MRC-5 (fibroblastos humanos); o teste de hemólise em eritrócitos murinos. Após o cultivo, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em placa de 96 poços, cada poço com 1×10^4 células em 100µL de meio de cultura, em seguida foi incubada por 24 horas a 37°C. As amostras foram dissolvidas em meio de cultura, totalizando um volume de 200µL no poço em uma concentração de 25µL/mL e o tempo de tratamento foi de 72 horas. A avaliação do dano no DNA foi realizada através do teste do Cometa em pH alcalino. As substâncias testadas foram: Emulsão de Copaíba a 10% - CM; adjuvantes farmacotécnicos da emulsão - VE; Digluconato de clorexidina a 2% - CHX e Óleo de copaíba *in natura* - OC. Como controles positivos utilizou-se a CHX, Triton X-100 1% e a doxorubicina (DRX) e como controle negativo utilizou-se o DMSO. Os dados da hemólise foram analisados através da média percentual com desvio padrão para o cálculo da EC50. Para a viabilidade celular e alteração do DNA foram analisados a partir da média e desvio

padrão de 3 experimentos independentes e a verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido do Teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados da viabilidade celular mostraram: ECM = 8,22%, VE = 39,90%, CHX = 5,92% e o OC = 10,24%. O teste de hemólise revelou que o VE e a CHX não hemolisaram os eritrócitos, entretanto o OC e as emulsões testes apresentaram atividade hemolítica causando dano à membrana. No teste do cometa, as emulsões testadas em 25, 50 e 75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ não causaram dano significativo no DNA do fibroblasto humano em relação à doxorrubicina e a CHX estatisticamente, foi a que causou maior dano ($p < 0,001$), entretanto, o óleo de copaíba e o veículo não apresentaram diferença significativa dos seus resultados em relação ao controle negativo (DMSO). De acordo com esse estudo a emulsão de Copaíba a 10% apesar de induzir a citotoxicidade não tem como alvo o DNA das células em comparação com o digluconato de clorexidina a 2%.

Moura (2016) avaliou as características morfológicas da superfície dentinária e da camada híbrida formada com os sistemas adesivos convencional e autocondicionante nas dentinas hígidas e afetada por cárie após o uso da emulsão à base de óleo de copaíba a 10%. Noventa e seis terceiros molares hígidos foram utilizados, metade deles sofreram uma indução artificial de cárie e a outra metade permaneceu hígida. Todos os elementos tiveram suas raízes removidas, obtendo-se discos de dentina que foram divididos conforme a substâncias testes (Digluconato de Clorexidina a 2%, emulsão à base do óleo de copaíba, solução de hidróxido de cálcio e água destilada), o substrato dentinário (hígida ou afetada) e o sistema adesivo (Adper Single Bond 2[®] ou Clearfil SE Bond[®]). A superfície dentinária e a camada híbrida foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV), de acordo com os grupos experimentais. O tratamento da superfície dentinária com a emulsão não apresentou nenhuma empecilho física aparente à penetração do adesivo, já a com digluconato de clorexidina a 2% apresentou sais de fosfatos nos dois tipos de substratos testados. O grupo do hidróxido de cálcio possuiu uma diferença significativa em relação aos demais grupos, já que exibiu um precipitado mineral obstruindo a luz dos túbulos dentinários na dentina hígida. Na superfície não condicionada, a água destilada em dentina hígida apresentou diferença significativa em relação aos demais ($p < 0,05$). O adesivo Adper Single Bond 2[®] não apresentou diferença estatística na camada híbrida formada independente se o substrato era hígido ou cariado com as substâncias testes. A camada híbrida com Clearfil SE Bond[®] na dentina afetada

por cárie tratada com emulsão à base do óleo de copaíba não apresentou diferença estatística em relação às substâncias testes, apresentando diferença somente em relação à solução de hidróxido de cálcio na dentina afetada ($p < 0,05$). Na dentina hígida, não houve diferença estatística na camada híbrida com Clearfil SE Bond[®], independente das substâncias testadas. Portanto a aplicação da emulsão à base do óleo de copaíba apresenta uma camada híbrida uniforme, regular e com grande infiltração monomérica em ambos os substratos testados e independentes do adesivo utilizado.

Freitas (2017) avaliou a interface adesiva resina dentina hígida e afetada por cárie através do teste de microtração. Sessenta e quatro terceiros molares hígidos foram divididos aleatoriamente em 16 grupos ($n=4$). Os dentes dos grupos G2, G4, G6, G8, G10, G12, G16 foi produzido um processo de indução artificial de cárie, após isso se removeu a dentina infectada. Os demais grupos são constituídos por dentes hígidos que receberam um desgaste adicional da dentina para a compensação da remoção do tecido cariado. As superfícies dentinárias foram tratadas de forma padronizada de acordo com os grupos experimentais. As restaurações foram realizadas usando os sistemas adesivo convencional (Adper Single Bond[®] 2) ou autocondicionante (Clearfil SE Bond[®]) seguindo as orientações do fabricante e fotopolimerizados por 15 segundos. Um bloco de resina composta com 3 mm de altura foi confeccionado, em seguida os espécimes foram armazenados em água destilada a 37°C durante 24 horas. Cada grupo foi submetido ao teste de microtração e secções corono-apicais paralelas de aproximadamente 1mm³ e durante todo o processo as eventuais fraturas pré-maturas foram consideradas como valor zero de adesão. As fraturas foram classificadas como Coesivas, Adesivas e Mistas. Os resultados obtidos expressos em Newton (N) foram transformados em MegaPascal (MPa). Na análise estatística, foi verificada a normalidade e a homogeneidade dos dados pelo teste de Lilliefors ($p < 0,05$) e devido à distribuição anormal foi utilizado o teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). O teste de microtração exibiu maior percentual de fraturas adesivas. A resistência da união usando a emulsão à base de óleo de copaíba a 10% e conservante X% com o sistema adesivo Adper Single Bond[®] foi maior independente se hígida ou afetada. O Clearfil SE Bond[®] em dentina afetada não houve diferença significativa entre o óleo de copaíba X%, digluconato de clorexidina a 2% e água destilada. Assim sendo a emulsão a base do óleo de copaíba a 10% com conservante na concentração X% apresentou os melhores

resultados quanto a resistência adesiva, contudo necessitando de mais estudos relacionados.

Em uma revisão sistemática, Diefenbach et al. (2018) investigaram artigos que realizaram análises microbiológicas *in vitro* e de cultura celular. Ao fim da seleção, onze artigos foram selecionados. Nesses trabalhos, diversas espécies de copaíba foram analisadas tais como *Copaifera reticulata*, *C. multijuga*, *C. langsdorffii*, *C. oblongifolia* e *C. officinalis*. Os estudos foram essencialmente realizados *in vitro*, e o teste principal observado foi o de CIM. Dentre todos os estudos, apenas um não utilizou a CLX como controle positivo, e sim o próprio meio de cultura. Nos resultados dessa revisão destaca-se a efetividade da atividade antimicrobiana do óleo de copaíba contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, ambas relacionadas com a cárie e a doença periodontal. Também é importante salientar que os estudos comprovaram a segurança do óleo de copaíba quanto ao seu uso em humanos. O amplo efeito comparado aos controles negativos e a semelhança de resultados com os controles positivos sugerem o grande potencial do óleo de copaíba na cavidade oral. As crenças dos pacientes também foram relatadas a fim de gerar evidências, e há nesse sentido, uma preferência de muitos pelo uso de uma substância natural. Por fim, concluiu-se que, considerando a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba, este apresenta potencial para uso na cavidade bucal como forma de prevenção e tratamento de cáries e doenças periodontais, contribuindo para o equilíbrio da microbiota bucal. Testes clínicos em soluções colutórias, dentifrícios e dispositivos de liberação lenta foram recomendados.

3. METODOLOGIA

O estudo foi do tipo primário, prospectivo, descritivo, qualitativo e experimental *in vitro* controlado.

O projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), com o número CAAE 35573914.0.0000.5020 (Anexo 1).

A pesquisa foi realizada em Manaus, nos Laboratório de Atividades Biológicas de Fitoterápicos na Odontologia – LABFITO do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia, no Laboratório do Departamento de Geociências do Instituto de Ciências Exatas da UFAM e no Laboratório de Atividades Biológica - BIOPHAR da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Para o desenvolvimento da pesquisa, 30 terceiros molares hígidos fornecidos pelo Biobanco da Faculdade de Odontologia da UFAM foram utilizados.

3.1. Riscos e benefícios da pesquisa

A utilização de elementos dentários extraídos não implica em nenhum risco direto ao paciente, uma vez que esses dentes já foram removidos da arcada dentária por razões ortodônticas, protéticas ou cirúrgicas. Existe o risco de quebra de sigilo, todavia não haverá acesso a qualquer informação que possa colocar em risco a confidencialidade do doador.

3.2. Formulação da emulsão à base de óleo de copaíba

O óleo-resina da *Copaifera multijuga* foi extraído da reserva Ducke, no Km 17 da Rodovia Manaus-Itacoatiara, catalogada sob o nº69 pelo Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia –INPA (BARBOSA et al., 2013).

O óleo-resina foi coletado pelo mateiro da reserva, consistindo na confecção de um furo por meio de um trado de 7/8 polegada de diâmetro e 1 metro de comprimento, à altura de aproximadamente 1 metro do chão, até o centro do caule onde se encontram os reservatórios do óleo-resina, com um pequeno declive para escoamento em um recipiente estéril previamente preparado para esse fim. Após a coleta, o orifício foi

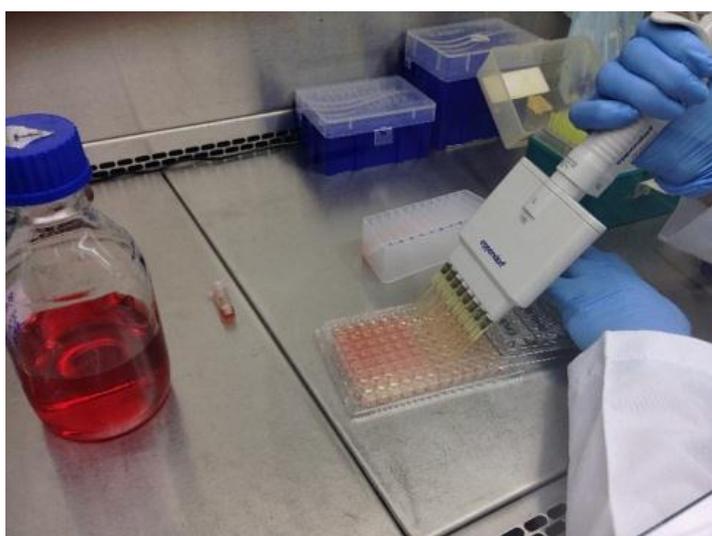
vedado com um tampão de pvc, procedimento de rotina realizado na reserva (BANDEIRA et al.,1999). A exsicata foi depositada no herbário do INPA sob o n° 270709.

Emulsões de limpeza de cavidade contendo óleo-resina da *Copaifera multijuga* a 10%, polissorbato 80 (Vetec®, Duque de Caxias, RJ, Brasil), diazolidinil ureia (Aldrich Chemistry®, St. Louis, MO, Estados Unidos) e água triesterilizada foram formuladas obedecendo às orientações da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). As emulsões de copaíba foram preparadas variando apenas a concentração do conservante: EC + X; EC + Y e EC alcalina.

3.3. Teste de Citotoxicidade

A citotoxicidade das substâncias foi testada frente à linhagem HT1080 através do teste do Azul de Tripán em quadruplicata. A linhagem HT1080 foi cultivada em PBS, suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantida em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram dissolvidas em PBS e plaqueadas (figura 1) para receber os tratamentos, CLX, EC + X, EC + Y, EC alcalina e PBS como controle negativo, nos tempos de 15 segundos, 30 segundos, 10 e 20 minutos. Após o tempo de cada tratamento, as amostras foram retiradas da placa, divididas em microtubos, e depois centrifugadas por 4 minutos.

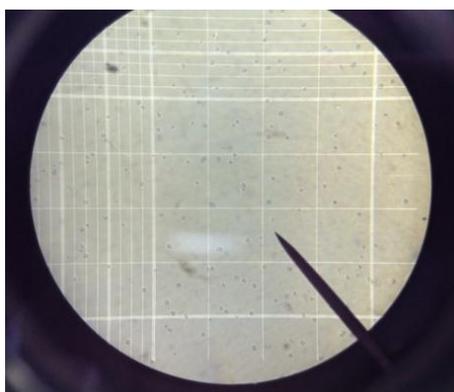
Figura 1- Plaqueamento das células.



Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

Depois de centrifugados, parte do sobrenadante foi dispensada, as células foram ressuspensas e foi adicionado 10 μ L de Azul de Tripan. O corante permaneceu em contato com as células por cerca de 1 minuto, então 10 μ L foram transferidos para a câmara de Neubauer para contagem de células em microscópio (figura 2).

Figura 2 - Contagem das células viáveis e não viáveis na câmara de Neubauer.



Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

3.4. Zimografia em células

A atividade de MMPs (MMP-2 e MMP-9) foi determinada utilizando como substrato a gelatina, através de método zimográfico, de acordo como descrito por Kaji et al. (2003). Essa técnica foi utilizada para avaliar a atividade de MMP-2 e MMP-9 presente na linhagem celular HT1080.

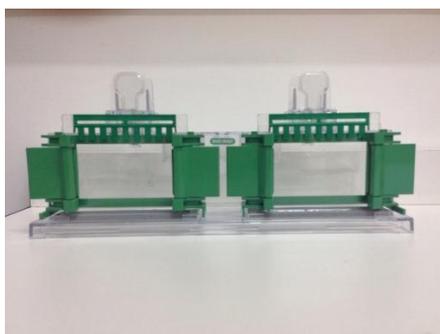
3.4.1. Obtenção das proteínas coletadas no meio de cultura.

Para o ensaio, as células (HT1080) foram transferidas para placas de 24 poços na concentração de 20×10^4 células/ mL e incubadas em estufa. Após 24 horas, as células foram tratadas de acordo com os grupos, grupo 1: água destilada; grupo 2: Digluconato de Clorexidina a 2%; grupo3: Emulsão à base do óleo de copaíba a 10% (EC) + Conservante X; grupo 4: EC à 10% + conservante Y e grupo 5: EC à 10% alcalina, nos tempos de 30 segundos, 10 e 20 minutos. Após cada tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado e centrifugado a 5000 rpm/10minutos.

3.4.2. Mobilidade eletroforética das proteínas no gel de SDS-PAGE + gelatina

Para separação das proteínas, utilizou o gel de SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel Electrophoresis) com 10% de acrilamida e 1% de gelatina, no qual foram adicionados 10 µg de proteínas por canal. O gel foi submetido à eletroforese (120 V por 1 hora e 30 minutos) para separação das proteínas.

Figura 3 - Preparo do gel de poliacrilamida para eletroforese.



Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

3.4.3. Incubação e revelação do gel

Após a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes por 20 minutos com 2,5% Triton X-100, para retirar o SDS. Em seguida, o gel foi incubado com tampão de incubação (0,05 M TrisHCl pH 8, 5 mM CaCl₂, 5 µM ZnCl₂), *overnight*, a 37°C, para a degradação do substrato pelas MMPs. Logo depois, o gel foi corado com 0,5% *coomasie brilliant blue R-250* por 30 minutos, a temperatura ambiente, sob agitação constante, e descorado com metanol 10% e ácido acético 10%. As imagens das bandas foram comparadas e analisadas utilizando o *software* ImageJ.

Após a coleta dos dados, foi realizada a análise descritiva dos resultados.

3.5. Zimografia- *in situ*

3.5.1. Seleção dos dentes

3.5.1.1. Critérios de inclusão

Trinta terceiros molares humanos recém-extraídos foram utilizados, esses dentes foram extraídos por razões ortodônticas, protéticas ou cirúrgicas. Os dentes selecionados foram armazenados e imediatamente congelados até o momento da utilização (Mazzoni et al., 2014).

3.5.1.2. Critérios de exclusão

Os dentes que possuíam alguma fratura, má formação na região coronária, áreas hipoplásicas, trincas, fendas, fluorose, bem como lesões cariosas foram excluídos da pesquisa.

3.5.2. Preparo dos Dentes

Todos os dentes foram seccionados a 2 mm abaixo da região central da superfície oclusal para remoção do esmalte e da raiz com auxílio de disco diamantado de 0,5 mm de espessura adaptado na máquina de corte Mecatome[®] P100 (PRESI, Grenoble, França), sob refrigeração, com velocidade de 300 rpm e 200 g de força. A porção oclusal cortada não foi utilizada na pesquisa (SANABE; COSTA; HEBLING, 2011).

Em seguida, as superfícies dentinárias foram abrasionadas com auxílio de lixas d'água de carboneto de silício (Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, USA) de granulação 320, sob refrigeração constante e velocidade de 600 rpm, adaptadas a uma politriz AROTEC[®] (Aropol 2V, Arotec S.A. Indústria e Comércio, série 040865 Cotia, SP, Brasil), para exposição de uma superfície plana de dentina. (RICCI et al, 2011).

3.5.3. Tratamento de Superfície

O tratamento de superfície de todos os grupos foi padronizado, alterando-se somente o agente utilizado. Os seguintes agentes foram usados de acordo com os grupos descritos no quadro 1, posteriormente os dentes foram restaurado com 1mm de espessura com resina Filtek Z350 XT[®], em seguida os espécimes foram cortados verticalmente em 1 mm de espessura para expor adesivo/dentina e colocados numa lamina, após isso foram realizados novos cortes até se obter 50µm de espessura.

Nesse teste optou-se por escolher a emulsão que tivesse tido os melhores resultados no teste de citotoxicidade e na Zimografia em células, assim utilizou-se a EC alcalina, que tem um pH 8,3.

Quadro 1: Divisão dos grupos.

Grupo 1	Tratamento com a EC alcalina + Sistema adesivo convencional (Adper [™] Single Bond 2)
---------	--

Grupo 2	Tratamento com a EC alcalina + Sistema adesivo autocondicionante (Clearfil™ SE Bond)
Grupo 3	Digluconato de Clorexidina a 2% + Sistema adesivo convencional (Adper™ Single Bond 2)
Grupo 4	Digluconato de Clorexidina a 2% + Sistema adesivo autocondicionante (Clearfil™ SE Bond)

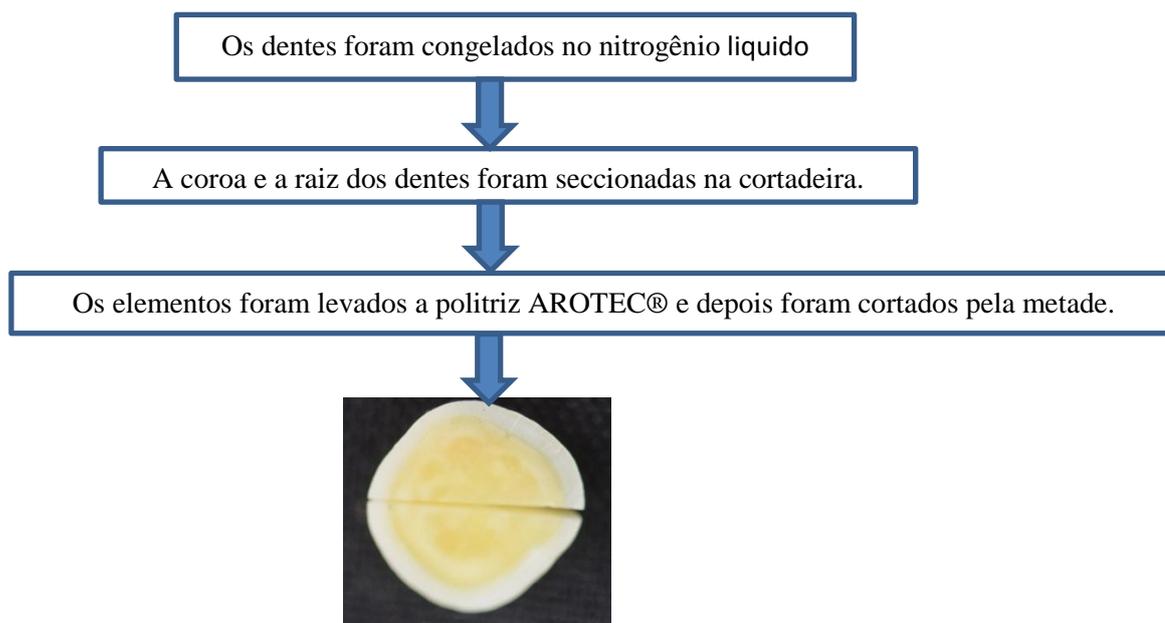
Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

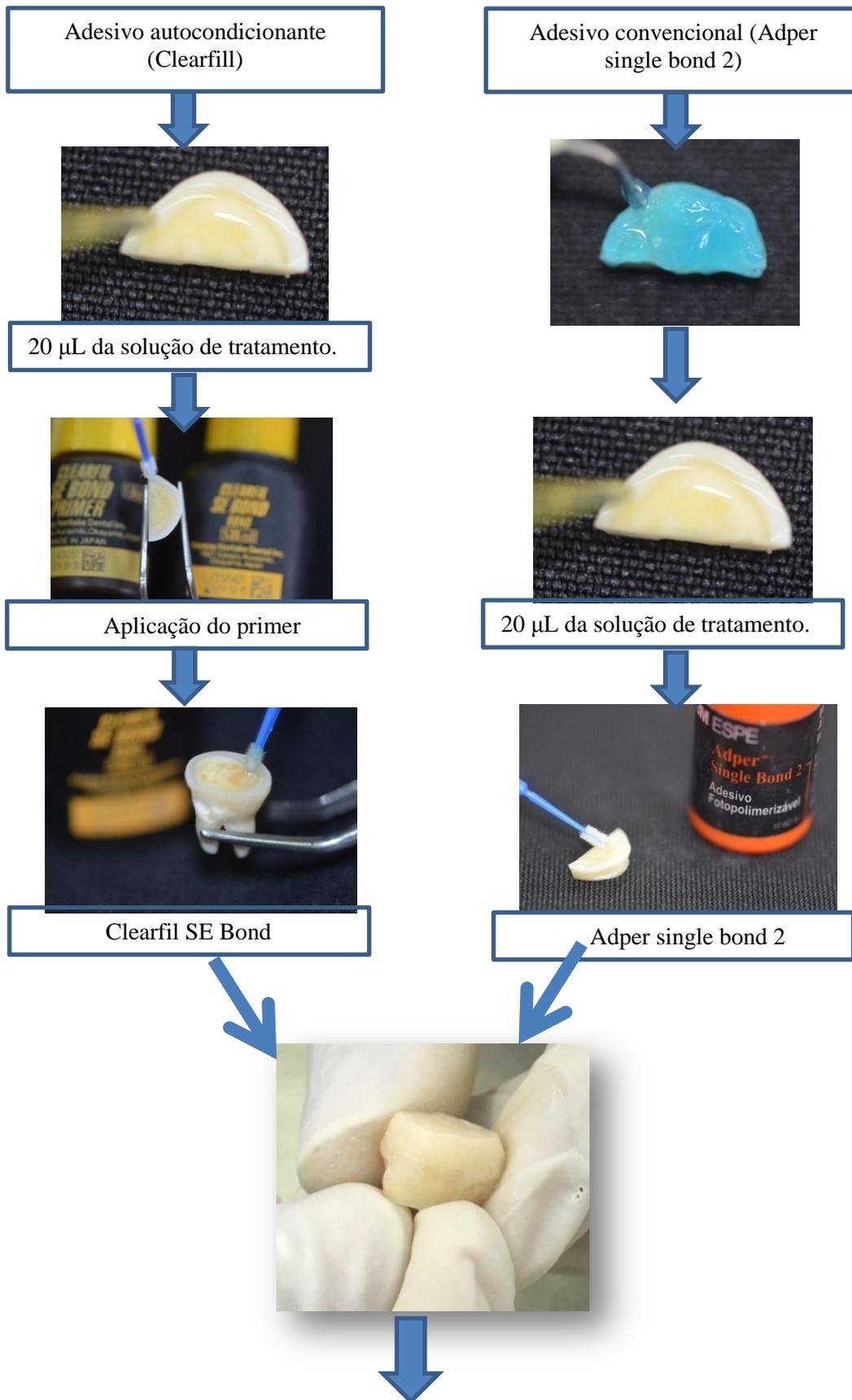
A zimografia *in situ* foi realizada com gelatina conjugada com fluoresceína como substrato de MMP (E-12055, Molecular Probes®, Eugene, OR, EUA) de acordo com Mazzoni et al. (2014), posteriormente a gelatina foi despejada sobre cada lâmina e coberta com uma lamínula e levadas a câmaras umidificadas a 37 ° C durante 24 horas protegidas contra a luz.

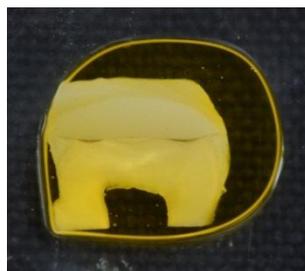
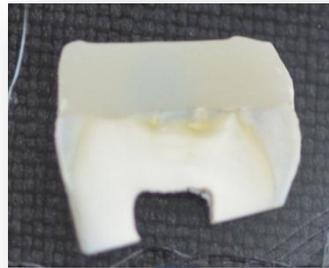
A hidrólise do substrato de gelatina conjugada com fluoresceína extinta indicou atividade enzimática gelatinolítica endógena, e foi avaliada por microscópio de fluorescência. O controle negativo foi incubado da mesma forma, usando o EDTA na outra metade do dente, visto que é um inibidor bem conhecido de MMP.

O EDTA é um quelante, amplamente usado como controle negativo em teste zimográficos pela sua eficácia em inibir as MMP's.

Figura 4: Fluxograma-Zimografia *in situ*.







Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

3.6. Análise Estatística

No teste de citotoxicidade os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas, onde se calculou a mediana e os quartis (Q_i), pois foi rejeitada a hipótese de normalidade dos dados por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Na comparação das medianas foi aplicado o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* para comparação de mais de dois grupos e *Mann-Whitney* para apenas dois grupos (VIEIRA, 2004).

No teste de Zimografia em células as imagens das bandas foram comparadas e analisadas utilizando o *software* ImageJ.

No teste de zimografia *in situ* os dados foram apresentados por meio de tabelas, onde se calculou as medianas e a diferença interquartil (d_i), pois a hipótese de normalidade por meio do teste de *Shapiro-Wilk* foi rejeitada. Na comparação das medianas foi aplicado o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* para duas medianas e *Kruskal-Wallis* para mais de duas medianas (VIEIRA, 2004).

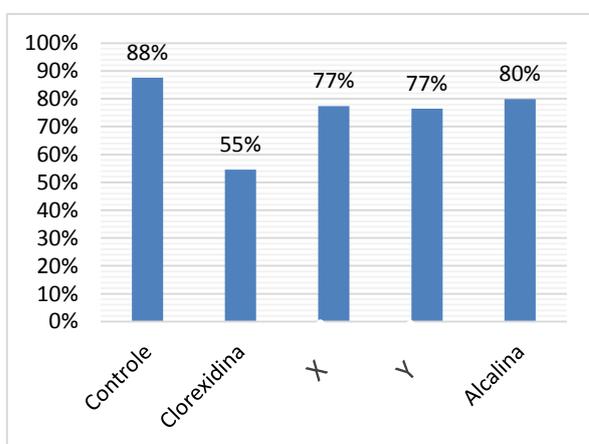
O *software* utilizado na análise dos dados foi o programa *Minitab*® versão 18 para *Windows*® e o nível de significância fixado nos testes estatísticos foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Teste de Citotoxicidade

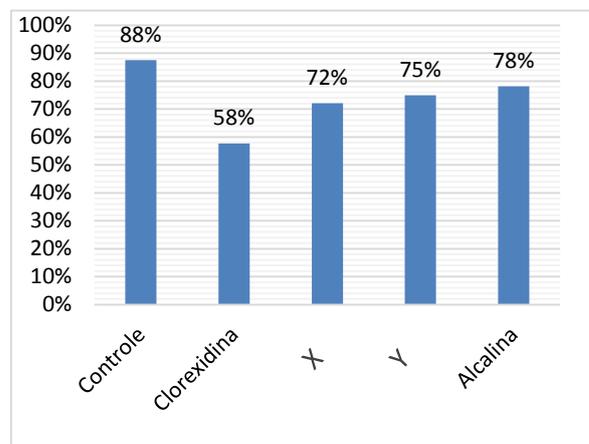
As porcentagens da viabilidade celular obtidas nos resultados do teste de citotoxicidade realizados através do ensaio Azul de Tripán, nos tempos de 15 segundos, 30 segundos, 10 e 20 minutos, estão representados nos gráficos de 1 a 4. As ECs destacaram-se por apresentar maior porcentagem de viabilidade celular quando comparadas à CLX 2% em todos períodos experimentais.

Gráfico 1 – porcentagem de viabilidade celular das substâncias teste no tempo de 15 segundos.



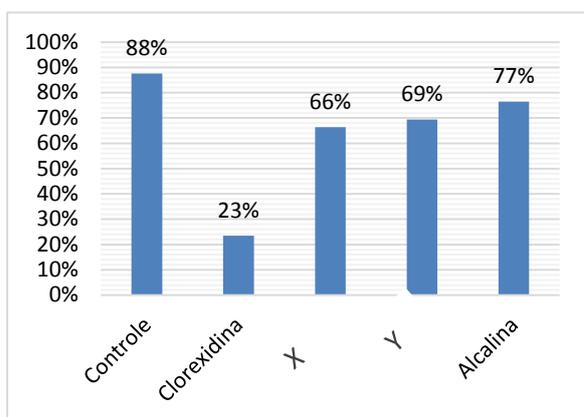
Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

Gráfico 2 – porcentagem de viabilidade celular das substâncias teste no tempo de 30 segundos.



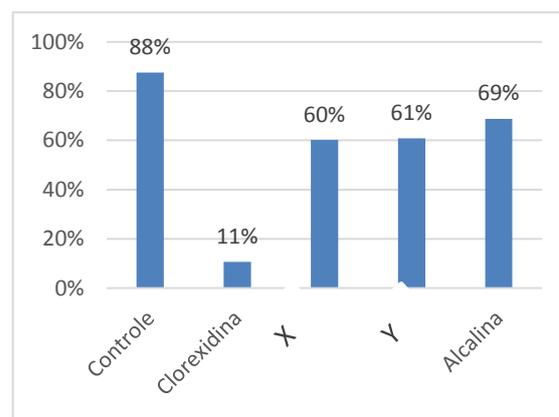
Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

Gráfico 3 – porcentagem de viabilidade celular das substâncias teste no tempo de 10 minutos.



Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

Gráfico 4 – porcentagem de viabilidade celular das substâncias teste no tempo de 20 minutos.



Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

A tabela 1 demonstra que nos tempos de 15 segundos e 30 segundos não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ($p= 0,055$ e $0,424$,

respectivamente), entretanto observa-se que a menor viabilidade celular foi da CLX a 2%. Já nos tempos de 10 e 20 minutos, observou-se diferença significativa nos grupos em função do tempo, sendo que as emulsões testes foram semelhantes ao grupo controle, e a CLX a 2% diferente dos demais.

Tabela 1 – Comparação das medianas de células viáveis em relação aos grupos segundo os tempos.

Grupos	Tempo											
	15s			30s			10m			20m		
	Q ₁	Med	Q ₃	Q ₁	Med	Q ₃	Q ₁	Med	Q ₃	Q ₁	Med	Q ₃
X	69,5	103,5	133,0	71,0	92,0	111,5	54,5	107,0 ^a	153,5	30,5	55,5 ^a	86,5
Y	57,5	66,5	89,0	58,0	83,0	121,5	53,5	73,0 ^a	96,5	24,5	35,5 ^a	51,5
Alcalina	59,5	76,0	83,5	49,5	66,5	82,5	50,5	86,5 ^a	122,5	44,5	62,5 ^a	81,0
Clorexidina	24,5	31,0	44,0	35,5	57,0	85,0	6,5	17,5 ^b	28,5	0,5	3,0 ^b	8,0
Controle	58,0	97,0	139,0	58,0	97,0	139,0	58,0	97,0 ^a	139,0	58,0	97,0 ^a	139,0
p	0,055			0,424			0,041			0,013		

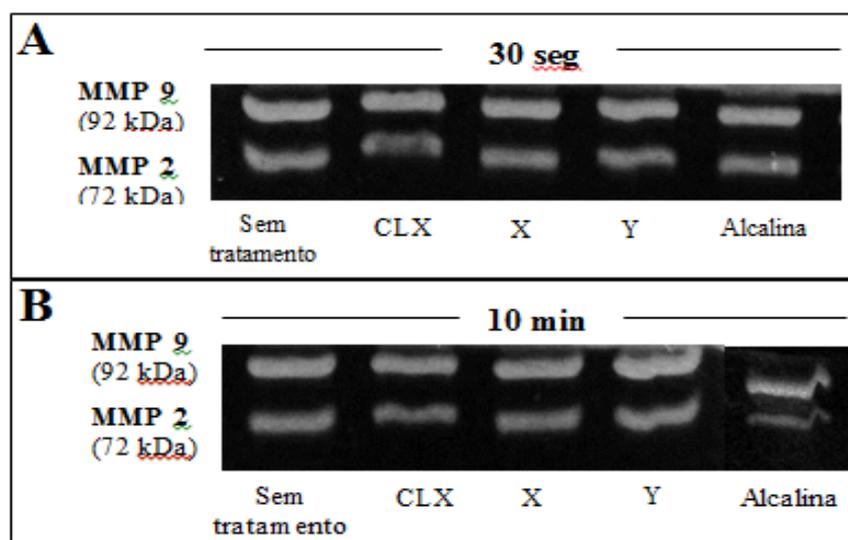
Med = Mediana; Q_i = quartis. Letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância.

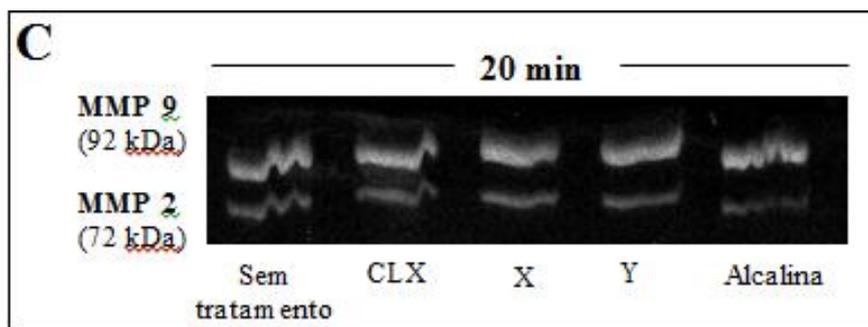
Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

4.2. Zimografia em células

Na análise zimográfica, após coloração, foi possível visualizar as bandas de degradação enzimática nos géis, como visto na figura 05.

Figura 05: Bandas de degradação enzimática pelas MMPs -2 e -9, em todos os grupos testados, nos tempos de 30 segundo (A), 10 minutos (B) e 20 minutos (C).

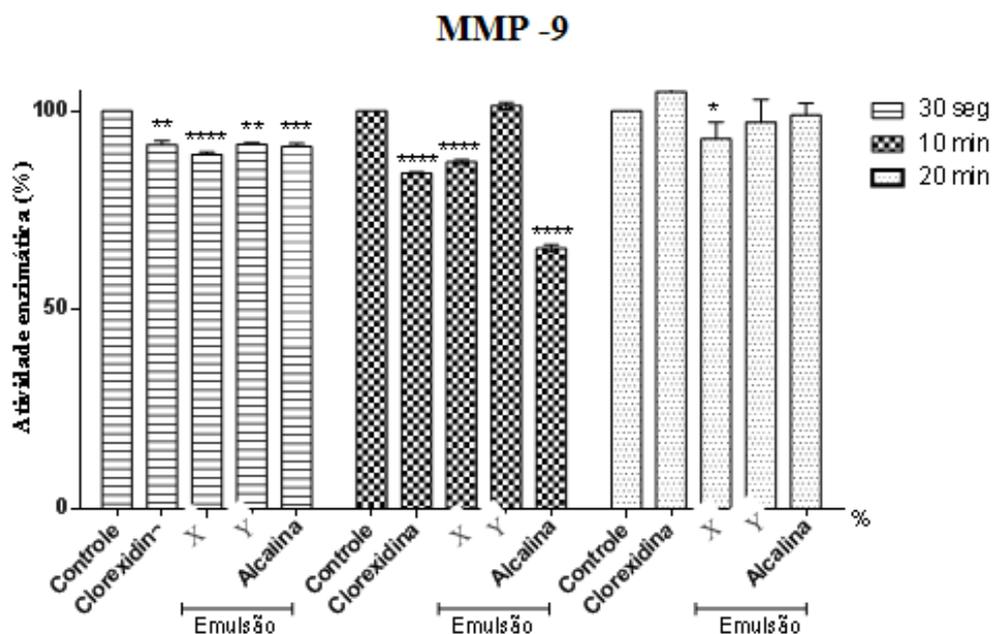




Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

O gráfico 5 apresenta, no tempo de 30 segundos, diferença estatística na diminuição da atividade da MMP-9 entre todas as soluções testadas quando comparadas ao grupo controle sem tratamento. No tempo de 10 minutos, houve diferença estatística apenas entre a CLX, EC + X e EC alcalina. Aos 20 minutos a única solução que apresentou diferença significativa na diminuição da atividade da MMP-9 foi a EC + X. Analisando os dados processados pelo *software ImageJ*, o melhor resultado foi a EC alcalina no tempo de 10 minutos, com cerca de 35% de diminuição da atividade da MMP-9.

Gráfico 5 – Análise da atividade enzimática da mmp-9 frente aos tratamentos com as soluções testadas.

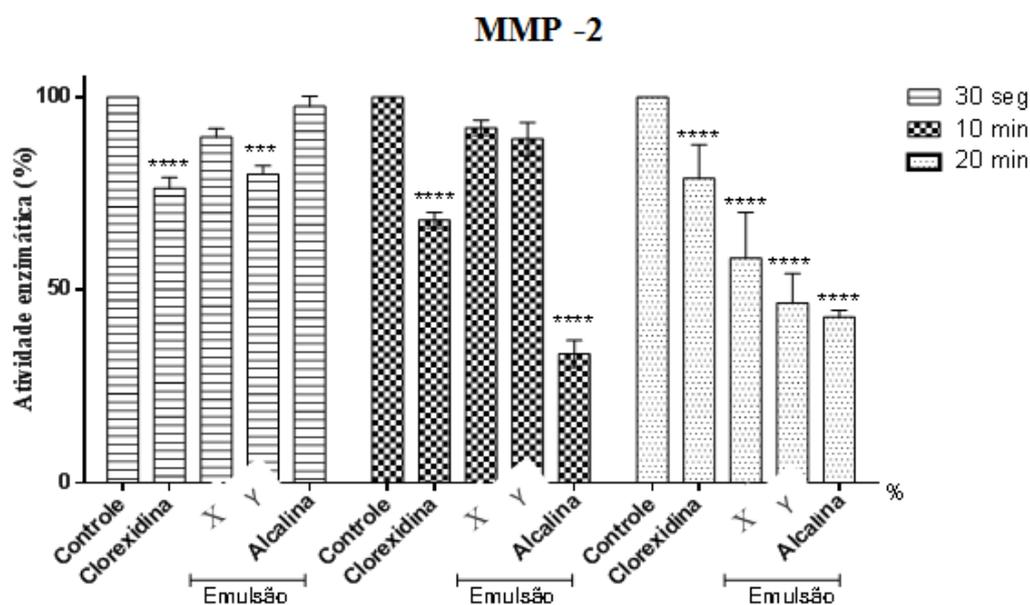


Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

Os asteriscos indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância. Os asteriscos indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância.

O gráfico 6 apresenta a diminuição da atividade enzimática nas MMP-2. No tempo de 30 segundos houve diferença estatística entre a solução de CLX, e a EC + X, quando comparadas ao grupo controle. No tempo de 10 minutos foi observada diferença estatística entre solução de CLX e EC alcalina, cada uma apresentando cerca de 44% e 67% de diminuição da atividade enzimática, respectivamente. Por fim, aos 20 minutos, houve diferença estatística entre solução de CLX, EC + X, EC + Y e na EC a 10% alcalina.

Gráfico 6 – Análise da atividade enzimática da mmp-2 frente aos tratamentos com as soluções testadas.



Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

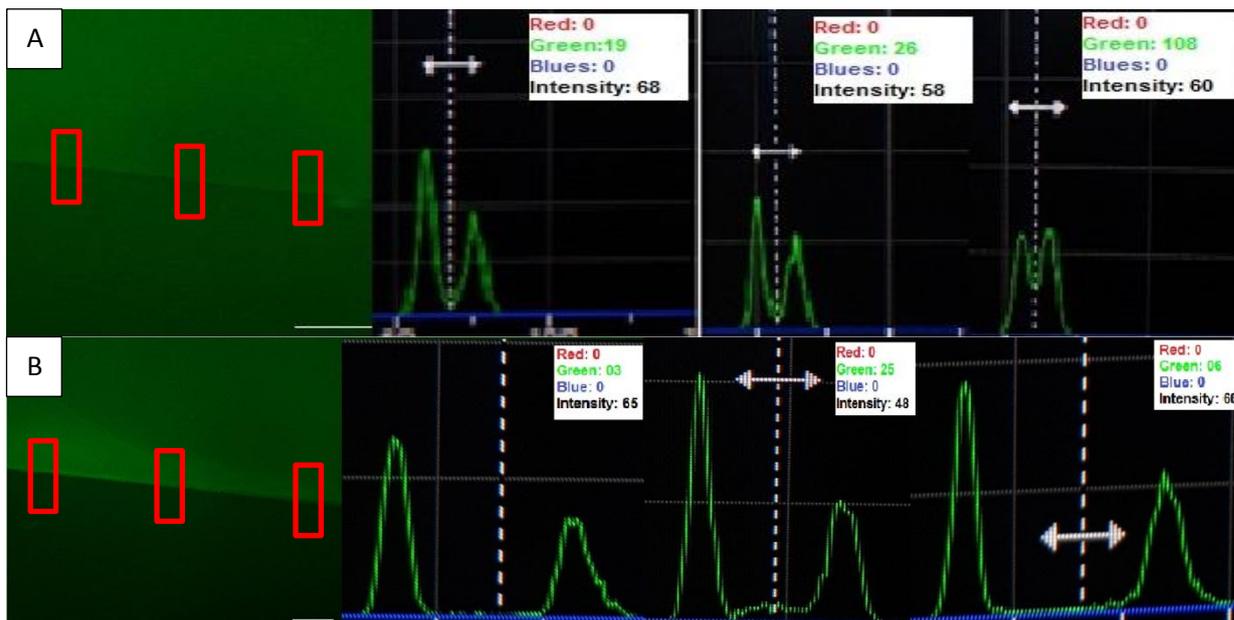
Os asteriscos indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância.

Realizando uma análise comparativa das atividades biológicas das ECs, observou-se que a emulsão a 10% alcalina apresentou melhores respostas biológicas e diminuição da atividade enzimática de MMP-2 e -9.

4.3. Zimografia *in situ*

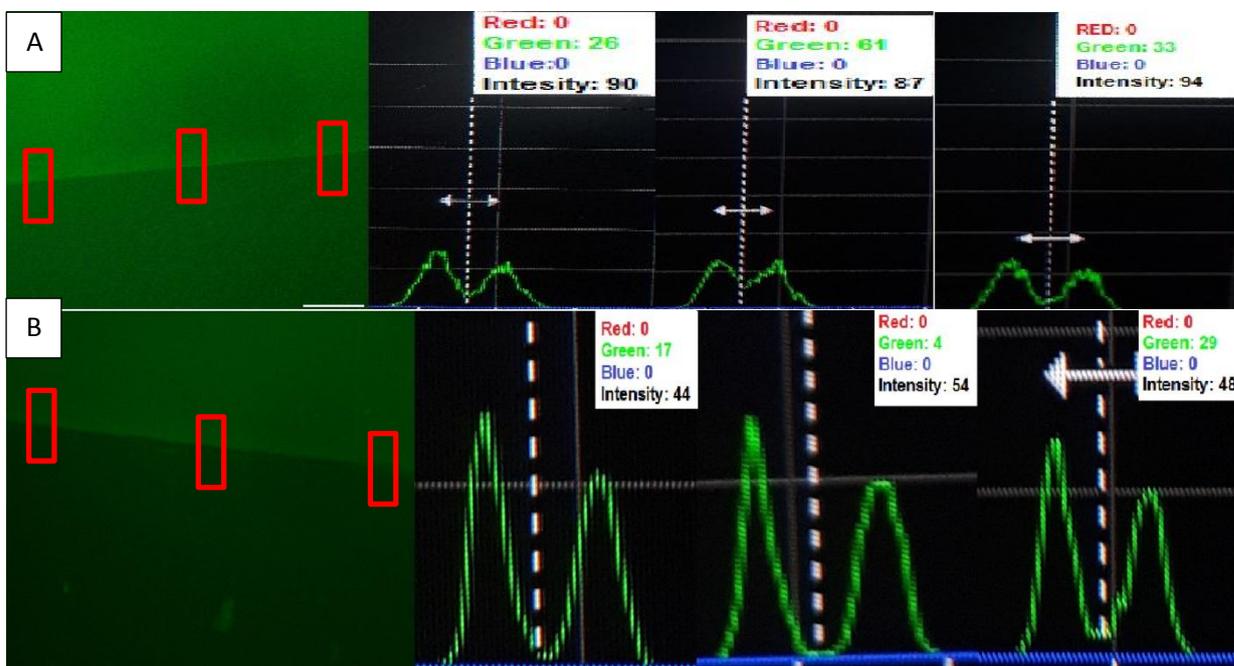
A análise no microscópio de fluorescência evidenciou inibição de MMP ocasionada por degradação da gelatina e o fluoróforo que estava ligado à gelatina é liberado e emite a fluorescência. Fato evidenciado nos histogramas figuras 6 a 8.

Figura 06: Histogramas da atividade das MMPs: A) Digluconato de Clorexidina com Clearfill® e B) Clorexidina com Adper Single Bond 2®.



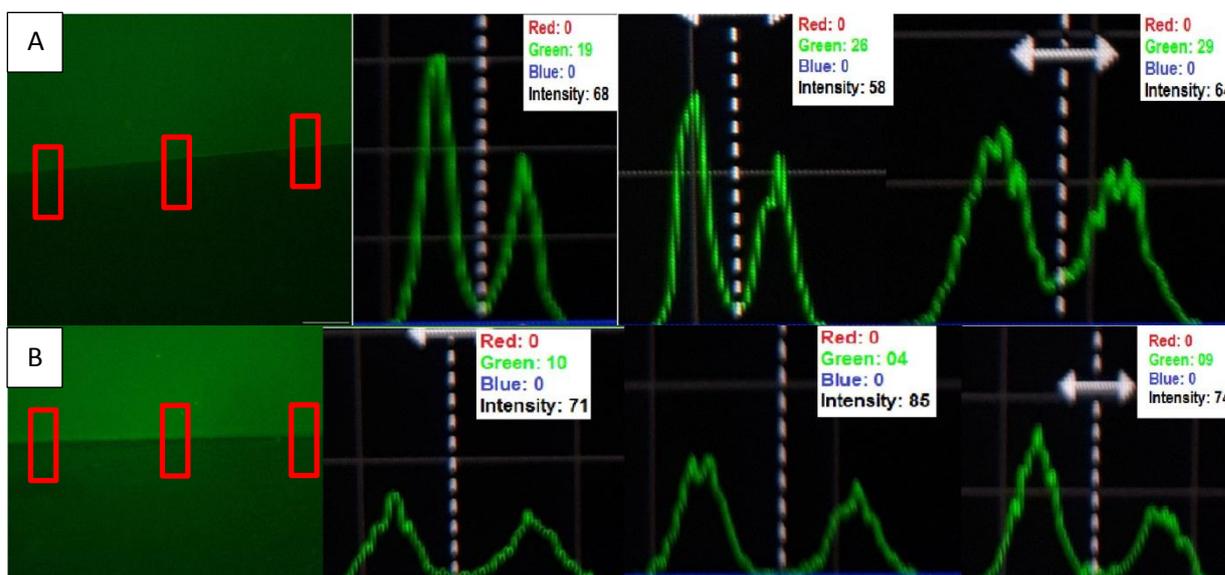
Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

Figura 07: Histogramas da atividade das MMPs: A) Emulsão alcalina com Clearfill® e B) Emulsão alcalina com Adper Single Bond 2®.



Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

Figura 08: Histogramas da atividade das MMPs: A) EDTA com Clearfil® e B) EDTA com Adper Single Bond 2®.



Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

A análise estatística esta representada nas tabelas 2 a 4.

A tabela 2 demonstrou que nenhum dos grupos experimentais apresentou diferença estatística usando o sistema adesivo Clearfil®.

Tabela 2: Comparação em relação aos grupos experimentais para cada medida do sistema adesivo Clearfil®, Manaus - AM.

<i>Grupos</i>	Medida					
	Esquerda		Meio		Direita	
	Med	di	Med	di	Med	di
Controle negativo	57,0	62,0	46,0	41,8	76,0	100,0
D. Clorexidina	37,0	58,5	25,0	19,5	113,0	101,0
Emulsão	37,5	73,5	33,5	79,3	98,5	74,5
p*	0,668		0,467		0,874	

Med = Mediana; d_i = desvio interquartil; * Teste de *Kruska-Wallis*.

Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

A tabela 3 evidenciou que no sistema adesivo Adper Single Bond®2 houve diferença estatística da emulsão em relação ao grupo controle, sendo semelhante ao digluconato de clorexidina a 2%.

Tabela 3: Comparação em relação aos grupos para cada medida do sistema adesivo Adper Single Bond[®]2, Manaus - AM.

Grupos	Medida					
	Esquerda		Meio		Direita	
	Med	di	Med	di	Med	di
Controle negativo	4,5	30,0	5,5	26,2	11,5 ^a	19,2
D. Clorexidina	4,0	39,8	12,0	18,0	23,5 ^{ab}	47,3
Emulsão	53,5	89,3	50,5	99,8	56,5 ^b	75,0
P	0,124		0,272		0,040	

Med = Mediana; di = desvio interquartil; * *Teste de Kruska-Wallis*.

Letras distintas indicam diferença estatística entre as medianas ao nível de 5% de significância.

Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

Na tabela 4 observou-se que comparando os sistemas adesivos e os produtos testes, onde não houve diferença estatística entre os grupos experimentais, exceto no grupo controle.

Tabela 4: Comparação em relação aos sistemas adesivos segundo as medidas e grupos, Manaus - AM.

Medidas/Grupos	Adesivos				
	Clearfil [®]		A.Single Bond [®] 2		p*
	Med	d _i	Med	d _i	
Esquerda					
Controle negativo	57,0	62,0	4,5	30,0	0,083
Clorexidina	37,0	58,5	4,0	39,8	0,081
Emulsão	37,5	73,5	53,5	89,3	0,773
Meio					
Controle negativo	46,0	41,8	5,5	26,2	0,081
Clorexidina	25,0	19,5	12,0	18,0	0,078
Emulsão	33,5	79,3	50,5	99,8	0,884
Direita					
Controle negativo	76,0	100,0	11,5	19,2	0,043
Clorexidina	113,0	101,0	23,5	47,3	0,149
Emulsão	98,5	74,5	56,5	75,0	0,773

Med = Mediana; d_i = desvio interquartil; * *Teste de Mann-Whitney*.

Valor de p em negrito itálico indica diferença estatística entre as medianas ao nível de 5% de significância.

Fonte: Arquivo digital do próprio autor, 2019.

5. DISCUSSÃO

As MMP's são endopeptidases cálcio e zinco dependente cuja função é a degradação da matriz extracelular, remodelação tecidual e angiogênese, elas são secretadas na forma de zimogênios (SABATINI e PASHLEY, 2014). A MMP- 2 e MMP-9 são as mais prevalentes na dentina, sendo a primeira em maior quantidade (TJADERHANE et al, 2015; MAZZONI et al, 2018; BETANCOURT et al, 2019).

As falhas na camada resina/dentina estão relacionadas à degradação que as MMP's promovem, pois durante o procedimento de adesão do material restaurador à estrutura dental, são encontrados colágenos expostos numa região com presença de água onde o adesivo não consegue encapsular esse colágeno devido a sua natureza hidrofóbica. (WANG et al., 2007; CASTELAN, 2011; HASHIMOTO et al., 2011; RICCI et al. 2014; MAZZONI et al., 2015; TJADERHANE et al., 2015; SESEOGULLARI-DIRIHAN et al., 2016 BETANCOURT et al, 2019;).

O digluconato de Clorexidina a 2% se mostra eficiente, em curto prazo, na manutenção da resistência de união dentina-resina, melhorando a qualidade na longevidade da camada híbrida, devido a ação nas MMPs e nas catepsinas-cisteínas, Betancourt et al, 2019 afirmaram que a união da CLX com a dentina é do tipo eletrostático reversível e tendo sua atividade depende da substantividade da CLX, em média isso dura por 180 meses (CARRILHO et al., 2007; BRESCHI et al., 2009; BRESCHI et al., 2010; RIOS et al., 2015), todavia é sabido do seu potencial citotóxico por isso não é aconselhável seu uso em camadas profundas, próximas a polpa dentária.

O teste de citotoxicidade é realizado a fim de esclarecer se o produto teste é citotóxico ou não a uma determinada célula. Inicialmente, neste estudo, realizou-se esse teste para verificar a viabilidade dos materiais frente às células HT1080 para posteriormente realizar o teste zimográfico a fim de avaliar a atividade antiproteolítica.

Nos tempos testados as ECs apresentaram maior porcentagem de viabilidade celular quando comparadas a CLX e semelhante ao controle, contudo estatisticamente só apresentaram diferença com a CLX nos tempos de 10 e 20 min. Corroborando com os estudos de Bari et al (2016) e Souza (2016). Lima et al., (2003), entretanto, apresentou resultados divergentes ao estudar o óleo de copaíba *in natura*, apresentando apenas 30% de células viáveis quando comparados ao grupo controle. Souza (2016)

realizou além do teste de citotoxicidade o teste de genotoxicidade demonstrando que as ECs não atingem o DNA das células nas concentrações testadas, evidenciando que essa emulsão não é citotóxica e nem genotóxica.

Na atividade enzimática, no tempo de 30 segundos, as MMP-2 foram inibidas pelas soluções de CLX e EC + X, com diferença estatística, quando comparadas entre si e ao grupo controle. No tempo de 10 minutos foi observada diferença estatística entre solução de CLX e EC a 10% alcalina, cada uma apresentando cerca de 44% e 67% de diminuição da atividade enzimática, respectivamente. Em 20 minutos, houve diferença estatística entre solução de CLX, EC + X, EC + Y, sendo a EC alcalina com maior inatividade nas MMPs.

No tempo de 30 segundos, todas as soluções testadas apresentaram diminuição da atividade das MMP-9, com diferença estatística, quando comparadas ao grupo controle. No tempo de 10 minutos, houve diferença estatística apenas entre a CLX, EC + X, e EC alcalina. Aos 20 minutos a única solução que apresentou diferença significativa na diminuição da atividade da MMP-9 foi a EC+ X. Analisando os dados o melhor resultado foi a EC alcalina no tempo de 10 minutos, com cerca de 35% de diminuição da ação antiproteolítica da MMP-9.

Mazzoni et al. (2007) e Breschi et al., (2010) observaram que digluconato de clorexidina diminui a atividade das MMP's nos testes zimográficos em cultura de células, sequestrando os íons de cálcio e zinco dificultando a ativação das endopeptidases (CARRILHO et al, 2007; BRESCHI et al, 2009; BRESCHI et al, 2010^a; LAFUENTE, 2012), fato ocorrido neste estudo. Baseados nos resultados da CLX e nos resultados comparativos deste estudo pode-se sugerir que as emulsões testadas, também, diminuem a atividade proteolítica das MMP's.

Visto que esse é um trabalho inédito em relação ao uso da emulsão como um biomodificador, não há relatos na literatura que possam subsidiar os achados de tal estudo.

Neste sentido, alguns estudos estão utilizando as emulsões á base de copaíba como um biomodificador com um potencial semelhante ao da CLX(MOURA, 2016; FREITAS, 2017). Essas emulsões apresentaram também resultados satisfatórios na

atividade antimicrobiana frente às bactérias encontradas na cavidade oral (DE BARI et al, 2016), como um bioativo para limpeza de cavidades (BANDEIRA et al, 2016).

Além disso, Moura (2016) observou a formação de camada híbrida homogênea, contínua e com presença de tags de resina em dentina hígida e afetada por cárie utilizando sistema adesivo convencional e autocondicionante, previamente tratado com EC, comprovado em estudo histopatológico e em microscopia eletrônica de varredura, além disso, foi verificada melhora na resistência adesiva (MEIRA, 2014; FREITAS, 2017; DIEFENBACH et al., 2018).

As ECs poderiam agir como um *crosslinking* natural ou como agente de ligação cruzada natural com o colágeno, assim como os compostos de proantocianidina (PA). Os PA são do grupo de taninos condensados e podem ser encontrados em frutas, vegetais, cascas etc. O extrato de semente de uva, cacau, canela cranberry e açaí vêm sendo estudados e apresentaram boa resistência à tração, módulo de elasticidade, resistência à biodegradação e desmineralização. (CASTELAN, 2011; SESEOGULLARI-DIRIHAN et al., 2016; BETANCOURT et al, 2019).

Com intuito de sanar ou minimizar a ação das MMP, vários produtos vem sendo produzidos como extrato de chá verde, Galardina, 1-etil-3carbodiimida (EDC), extrato de semente de uva, Quercertina (ZHENG et al., 2015, MAZZONI et al., 2015, SESEOGULLARI-DIRIHAN et al., 2016, YANG et al., 2017), visando inibir essas enzimas, atuar como biomodificadores ou como agentes de ligação cruzada de colágeno (CASTELAN, 2011; GÖSTEMEYER e SCHWENDICKE, 2018; ZHOU et al, 2019; BETANCOURT et al, 2019).

Na análise microscópica do presente estudo nenhuma fluorescência intensa foi notada nos grupos testados, tendo resultados semelhantes ao grupo do EDTA, todavia apenas no sistema adesivo Adper Single Bond® 2 houve diferença estatística da emulsão em relação ao grupo controle, sendo semelhante ao digluconato de clorexidina a 2%. O EDTA provoca uma quelação de íons metálicos como o que ocorre com o EDTA que remove os íons de cálcio da estrutura dental, ele é um dos controles negativos mais usados em estudos sobre MMP's (SABATINI E PASHLEY, 2014; MAZZONI et al, 2015; TJADERHANE et al. 2015 BETANCOURT et al, 2019).

O aumento da atividade dessas enzimas ocorre tanto nos sistemas adesivos convencionais quanto nos autocondicionantes podendo ocorrer em menor proporção no autocondicionante, devido a característica da camada híbrida formada (menos espessa) (WANG et al., 2007; HASHIMOTO et al., 2011; RICCI et al. 2014; MAZZONI et al., 2015; TJADERHANE et al., 2015; SESEOGULLARI-DIRIHAN et al., 2016) diferente do que a literatura apresenta somente o grupo que usava o sistema adesivo Adper Single Bond® 2 apresentou, neste estudo, diferença estatística. Os estudos presentes na literatura são de análise qualitativa, pois só avaliam se há presença ou não de inibição das MMPs. Esta pesquisa quantificou por software a atividade antiproteolítica permitindo a análise estatística.

A emulsão alcalina, testada *in situ* foi a emulsão que apresentou melhor resultado no teste de viabilidade e na Zimografia em células, essa emulsão difere das demais por apresentar um pH 8,30, considerado alcalino, visto que as MMP's são ativadas normalmente num pH baixo pelo sistemas adesivos, pelo condicionamento ácido ou mesmo pelo processo cariioso (MAZZONI et al, 2015; TJADERHANE et al. 2015; BETANCOURT et al, 2019).

O pH é um assunto controverso na literatura, Mazzoni et al (2007) relataram que o ácido fosfórico desnatura quimicamente essa enzima. Entretanto, IWASA et al. (2011) relataram que o condicionamento ácido na dentina promove uma reação entre os íons de fosfato do ácido e o cálcio da dentina, formando um precipitado de fosfato de cálcio (CaHPO_4) sobre a dentina, essa camada encobre, temporariamente, a ação das MMP's. No entanto, abaixo desta camada, as MMP's estão ativadas (SABATINI e PASHLEY, 2014).

Existem três suposições da atividade antiproteolítica das Emulsões sobre as MMP's tanto *in vitro* quanto *in situ*: a primeira está relacionada ao alto peso molecular do óleo de copaíba, pois o peso molecular pode diminuir os espaços formados entre as fibras colágenas, visto que os solventes dos adesivos, principalmente o etanol não conseguem ocupar esta região (BETANCOURT et al, 2019); a segunda pela forma de apresentação, por ser óleo, possivelmente pode impermeabilizar as fibras colágenas, favorecendo que o sistema adesivo hidrofóbico penetre entre essas fibras protegendo da ação das MMP's e formando uma camada híbrida impermeabilizada e; por fim o pH como relatado acima.

Os resultados apresentados nesse trabalho indicaram a possibilidade de utilização das emulsões de óleo de copaíba como Biomodificador, todavia outros estudos *in situ* e *in vivo* se fazem necessários para evidenciar a eficácia clínica das emulsões.

CONCLUSÃO

As emulsões foram semelhantes ao grupo controle no teste de citotoxicidade nas diferentes concentrações de conservante e no tempo de tratamento. Todas as concentrações de emulsões apresentaram atividade sobre as mmp 2 e 9, porém a que apresentou a maior inibição foi a EC alcalina no tempo de 10 min.

As ECs apresentaram atividade de inibição das metaloproteinases 2 e 9 na interface adesiva resina/dente no estudo *in situ* com viabilidade celular expressas pelas células da linhagem HT1080, destacando a EC alcalina.

Este estudo agregado às pesquisas anteriores proporciona mais uma evidência da possibilidade, no futuro, do emprego de um produto da biodiversidade amazônica na odontologia, necessitando de estudos clínicos e de longa duração para concretização da efetividade das emulsões do óleo de copaíba nas restaurações adesivas.

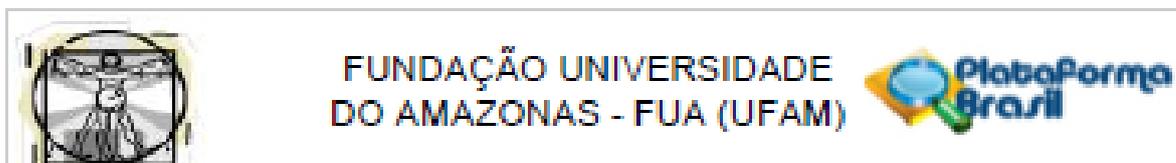
REFERÊNCIAS

1. ARANHA, Elenn Suzany Pereira. **Avaliação do potencial anticancer *in vitro* de óleos essenciais de plantas do gênero *Eugenia***. 2014. 82f. Dissertação (Mestrado em ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.
2. BANDEIRA, M.F.C.L. *et al.* Estudo farmacológico preliminar de copaifeira multijuga (óleo de copaiba) Bras. **Clin Estet Odont**, v. 3, n. 16, p. 39-41. 1999.
3. BANDEIRA, Maria Fulgência Costa Lima. *et al.* Dentin Cleaning Ability of an Amazon Bioactive: Evaluation by Scanning Electron Microscopy. **The Open Dent J**, v. 10, n.1, p. 182-87, jan. 2016.
4. BANDEIRA, MFCL *et al.* Biopharmaceutical products and biomaterials of the Amazon region used in dentistry - Biomaterial-supported tissue reconstruction or regeneration. 1 Ed.2018.
5. BARBOSA, P.C.S. *et al.* Phytochemical Fingerprints of Copaiba Oils (*Copaifera multijuga* Hayne) Determined by Multivariate Analysis. **Chemistry & Biodiversity**, v.10, n.7, p.1350–1360, jul. 2013.
6. BETANCOURT, D.E; BALDION, P.A.; CASTELLANOS, J.E. Resin-Dentin bonding interface: Mechanisms of degradation and strategies for stabilization of the hybrid layer. **Int J Biomater**. v. 2019; pg 11. Fev, 2019.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, Brasília: ANVISA, v. 2, p. 545, 2010.
8. BRESCHI, Lorenzo *et al.* Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. **J. Adhes. Dent**, v. 11, n. 3, p. 191-8, Junho 2009.
9. BRESCHI, Lorenzo, *et al.* Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2 year in vitro study. **Dent Mater**, v.26, n. 4, Abril 2010a.
10. BRESCHI, Lorenzo, *et al.* Use of a specific MMP inhibitor (Galardin) for preservation of hybrid layer. **Dent Mater**, v.26, n. 6, Junho 2010.
11. CARRILHO, M.R.O. *et al.* Chlorhexidine Preserves Dentin Bond in vitro. **J. Dent. Res**. V.81, N.1, p. 90-94. Janeiro 2007.
12. CASTELAN, C. S. *et al.* Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. **J Mech Behav Biomed Mater**. vol. 4; n. 7; p. 1343-50; 2011.
13. DE BARI, C.C. *et al.*; Amazon emulsions as cavity cleansers: antibacterial activity, cytotoxicity and changes in human tooth color. **Rev. bras.farmacogn.**; v.26; n.4; p.497-501; 2016.
14. DIFENBACH, A. L. *et al.* Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* ssp.) on oral pathogens: Systematic review. **Phytother Res**. v. 32; n. 4; p. 586-596; 2018.
15. FEJERSKOV O, Cury JA, Tenuta LM, Marinho VC. Fluorides in caries control. In: Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E Dental caries. The disease and its clinical management 3rd. 2015.
16. FREITAS, Aline Lessa. Adesão dentinária: **Estudo comparativo da emulsão à base de óleo de copaiba na microtração em dentina hígida e cariada**. 2017. 67f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Amazonas, 2017.
17. GÖSTEMEYER, G.; SCHWENDICKE, F.; Inhibition of hybrid layer degradation by cavity pretreatment: Meta- and trial sequential analysis. **J Dent**. n.49, p 14-21. jun, 2016.
18. GUVEN, Yeliz; AKTOREN, Oya. Shear bond strength and ultrastructural interface analysis of different adhesive systems to Er:YAG laser-prepared dentin. **Lasers Med Sci**, v.30, p 769-778, Fev. 2015.
19. HAJ-ALI, Reem. *et al.* Histomorphologic Characterization of Noncarious and Caries-Affected Dentin/Adhesive Interfaces. **J of Prost**, v. 15, n. 2, p. 82-88, Abr 2006.
20. HASHIMOTO, Masanori. *et al.* A review: Biodegradation of resin–dentin bonds. **Jpn Dent Sci Rev**. V.47, p. 5-12, Fev. 2011.
21. IWASA, Mika. *et.al.* pH changes upon mixing of single-step self-etching adhesives with powdered dentin. **J Adhes Dent**. v.13, n. 03, p. 207–212, 2011.
22. KAJI, Masahiro *et al.* Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in lung cancer studied using film in situ zymography stamp method. **Lung cancer**, v.39, n.2, p.125-130. Set. 2003.
23. KIDD, Edwina A. M. FEJERSKOV, Ole Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Livraria Santos Editora, c2005. xv, 352 p.
24. LAFUENTE, D. SEM Analysis of Hybrid Layer and Bonding Interface After Chlorhexidine Use. **Oper Dent**, v. 37, n. 2, p. 172-180, Mar/Abr. 2012.

25. LENZI, Tathiane Larissa et al . Chlorhexidine does not increase immediate bond strength of etch-and-rinse adhesive to caries-affected dentin of primary and permanent teeth. **Braz. Dent. J.** v. 23, n. 4, p. 438-442, 2012.
26. LIMA, S. et al. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytother. Res.** v.17; n. 9; p. 1048-53; 2003.
27. LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
28. MALTZ, Marisa; JARDIM, Juliana Jobim; ALVES, Luana Severo. Health promotion and dental caries. **Braz oral res**, São Paulo , v. 24, supl. 1, p. 18-25, 2010.
29. MAZZONI, A. et al. Biochemical and immunohistochemical identification of MMP-7 in human dentin. **J Dent.** DOI: 10.1016/j.jdent.2018.10.008.2018.
30. MAZZONI, Annalisa *et al.* Carbodiimide inactivation of MMPs and effect on dentin bonding. **J. Dent. Res.**, v.93, n.3, p. 263-8, Nov. 2014.
31. MAZZONI, Annalisa *et al.* Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. **J. Dent. Res.**, v.94, n.2, p. 241-52, Fev. 2015.
32. MAZZONI, Annalisa *et al.*, Cross-linking effect on dentin bond strength and MMPs activity. **Dent Mater J.** Aceito em Novembro de 2017.
33. MEIRA, Joyce de Figueiredo. **Avaliação histomorfométrica do efeito de um bioativo amazônico sobre a camada híbrida da dentina.** 2014. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.
34. MOURA, Luanny Gomes. **Análise morfológica da superfície dentinária hígida e afetada por cárie e da camada híbrida após aplicação de emulsão à base de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne).** 2016.134f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.
35. NAKABAYASHI, Nobuo; NAKAMURA, Mitsuo; YASUDA, Noboru. Hybrid layer as a dentin-bonding mechanism. **J Esthet Dent**, v.3, n.4, p. 133-8, jul./ago. 1991.
36. PEDROSA, Tatiana do Nascimento et al. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. **Arch Dermatol Res**, v.308, n. 9, p. 643-654. Set. 2016.
37. RICCI, Hérica A. et al. Influência da clorexidina na capacidade de umectabilidade da dentina hígida e afetada por cárie por um sistema adesivo. **Rev Odontol Bras Central**, Araraquara, v. 20, n. 53, p. 119-124, out. 2011.
38. RIOS, Luciana Fávaro Francisoni. et al. Chlorhexidine does not improve but preserves bond strength to eroded dentin. **Am J Dent**, v. 28, n. 1, p. 28-32, fev. 2015.
39. SABATINI, Camila e PASHLEY, David. Mechanisms Regulating the Degradation of Dentin Matrices by Endogenous Dentin Proteases and their Role in Dental Adhesion. A Review. **Am J Dent.** v. 27, n. 4, p. 203-14, Ago. 2014.
40. SANABE, Mariane Emi. COSTA, Carlos Alberto de Souza. HEBLING, Josimeri. Exposed Collagen in aged resin-dentin bonds produced on sound and caries-affected dentin in the presence on chlorhexidine. **J Adhes Dent**, v. 13, n. 2, p. 117-124, set. /nov. 2011.
41. SANTOS, Ricardo Alves dos et al . Bond strength to dentin of total-etch and self-etch adhesive systems. **RGO, Rev. Gaúch. Odontol.**, Campinas , v. 62, n. 4, p. 365-370, Dez. 2014 .
42. SARTORI, Neimar *et al.* Influence of chlorhexidine digluconate on the clinical performance of adhesive restorations: A 3-year follow-up. **J Dent**, v. 41, n. 12, p. 1188-1195, Fevereiro 2013.
43. SCAFFA, Polliana Mendes Candia et al. Co-distribution of cysteine cathepsins and matrix metalloproteases in human dentin. **Arch Oral Biol**, v.74, p 101-7, Fev. 2017.
44. SESEOGULLARI-DIRIHAN, R. *et al.* Use of crosslinkers to inactivate dentin MMPs. **Dent. Mater**, v.32, n.3, p.423-32, Mar. 2016.
45. SOUZA, Juliana Pinto. Adesão dentinária: **Citotoxicidade e genotoxicidade da emulsão à base de óleo de copaíba como coadjuvante na adesão dentinária.** 2016. 66f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Amazonas, 2016.
46. TJADERHANE, L. et al. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of ‘dentin degradomics’. **Caries Res**; v. 49; n. 3; p. 193-208; 2015.
47. Vieira, Sonia – Bioestatística, Tópicos Avançados – Rio de Janeiro. 2.ed. – RJ: Elsevier, 2004.
48. WANG, Yong, SPENCER, Paulette, WALKER, Mary P. Perfil químico das interfaces adesivas/afetadas pela cárie usando microspectroscopia Raman. **J. Biomed Mater Res A.** V.81, N.2, p. 279-286. 2007.
49. YANG, Hongye et al. High-performance therapeutic quercetin-doped adhesive for adhesive–dentin interfaces. **Sci. Rep**, v.7, Ago, 2017.

50. ZHENG, Pei *et al.* Effect of Different Matrix Metalloproteinase Inhibitors on Microtensile Bond Strength of an Etch-and-Rinse and a Self-etching Adhesive to Dentin. **Oper Dent**, V. 40, n.1, p 80-6, Fev. 2015.
51. ZHOU, Wen *et al.* Modifying Adhesive Materials to Improve the Longevity of Resinous Restorations. **Int J Mol Sci**. v.20, n. 3, p. 723-8, Fev. 2019.

1. ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS À BASE DE BIOATIVOS AMAZÔNICOS NA ODONTOLOGIA: ESTUDOS *in vitro* e *in vivo*

Pesquisador: MARIA FULGÊNCIA COSTA LIMA BANDEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35573914.0.0000.5020

Instituição Proponente: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 786.697

Data da Relatoria: 10/09/2014

Apresentação do Projeto:

O Brasil, detentor de cerca de um terço da flora mundial não se destaca no desenvolvimento de fitoterápicos na área da saúde, especialmente na Odontologia. O reconhecimento oficial de sua utilização veio acompanhado de diversas lacunas na pesquisa científica sobre plantas medicinais, especificamente para espécies vegetais com aplicação nas doenças da cavidade oral. No aprimoramento dos 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. Neste sentido, a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas vem realizando estudos para o emprego do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*), Própolis (*Apis mellifera*) e Jucá (*Libidibia ferrea*) como agentes antibacterianos frente aos microrganismos da cavidade oral, com intuito de atuar tanto como agentes preventivos como no tratamento de doenças bucais. Entretanto, observa-se a necessidade de ensaios pré-clínicos na farmacotécnica, nas propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas, verificando a influência das emulsões-teses na interface dente/restauração e, ainda, analisar o efeito das emulsões na degradação do colágeno e na inibição de metaloproteinases da matriz dentária utilizando emulsões à base de óleo de copaíba. Sendo assim, propomo-nos a otimizar um produto à base de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*).

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (02)3305-5130

Fax: (02)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 736.067

para limpeza de cavidades com vistas às propriedades biológicas, mecânicas, físico-químicas e de controle de qualidade. As formulações das emulsões de óleo de copaíba serão otimizadas, e seu controle de qualidade realizado obedecendo às orientações da Farmacopéia Brasileira, do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira e das normalizações preconizadas

pela ANVISA. Dentre as plantas utilizadas em Odontologia, a *Libidibia ferrea*, conhecida como jucá ou pau ferro, é bastante utilizada na medicina popular por apresentar propriedades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antitérmica. Considerando as principais doenças da cavidade bucal, a segunda parte do estudo tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de extratos da casca do caule, da vagem e de formulações à base de *Libidibia ferrea* (228.022- INPA) frente a microrganismos da cavidade bucal formadores de biofilme, bem como seu comportamento como agente cicatrizante em úlceras induzidas em mucosa de ratos

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Subprojeto 1. Otimizar um produto à base de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) para limpeza de cavidades com vistas às propriedades biológicas, mecânicas, físico-química e de controle de qualidade. Subprojeto 2. Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos da casca do caule, da vagem e de formulações à base de *Libidibia ferrea* (228.022- INPA) frente a microrganismos da cavidade bucal formadores de biofilme, bem como o comportamento como agente cicatrizante em úlceras induzidas em mucosa de ratos.

Objetivo Secundário:

Subprojeto 1: 1.Otimizar as formulações das emulsões de óleo de copaíba e realizar o controle de qualidade físico-químico e microbiológico;2.Avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana das emulsões frente às bactérias presentes no biofilme dental;3.Realizar estudos biológicos das emulsões formuladas em relação à citotoxicidade;4.Avaliar o efeito das emulsões à base de óleo de copaíba e clorexidina a 2% quanto à inibição de metaloproteinases da

matriz dentinária em dentina afetada por cárie e dentina hígida associadas ao sistema adesivo;5. Identificar o comportamento das emulsões de limpeza cavitária na infiltração marginal e na adesão das restaurações com resina composta;6.Analisar o efeito das emulsões formuladas com o óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) na morfologia da superfície dentária. Subprojeto 2: 1.Avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana de extratos da casca e

da vagem da *Libidibia ferrea* frente a microrganismos da cavidade bucal determinando a concentração inibitória mínima; 2.Propor uma formulação de enxaguatório bucal para o controle de biofilme dental;3.Determinar a atividade antimicrobiana do enxaguatório pela técnica de

Endereço: Rua Teresina, 4050

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (02)3305-5130

Fax: (02)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 790.697

microdiluição – Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a bactérias cariogênicas;4.Avaliar in vitro a estabilidade farmacológica de um enxaguatório bucal fitoterápico à base do extrato de *Libidibia ferrea*, com caracterização físico-química, organoléptica e microbiológica;5.Avaliar a citotoxicidade e a biocompatibilidade do enxaguatório de *L. ferrea*;6.Mensurar o possível potencial erosivo do enxaguatório bucal com e sem o extrato de *L. ferrea* sobre o esmalte dental através do teste de microdureza;7.Propor uma formulação em orabase de *Libidibia ferrea* para o tratamento de úlceras traumáticas em cavidade bucal;8.Avaliar a ação cicatrizante da formulação em orabase de *Libidibia ferrea* em úlceras traumáticas induzidas em mucosa jugal de ratos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os elementos dentários a serem utilizados na pesquisa, extraídos por razões ortodônticas ou cirúrgicas, serão obtidos através do Bloco de Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas. A utilização de elementos dentários extraídos não implicará em nenhum risco ao paciente, uma vez que esses dentes já foram removidos da arcada dentária por razões ortodônticas ou cirúrgicas. Não haverá acesso a qualquer informação que possa colocar em risco a confidencialidade do doador.

Benefícios:

A complexidade da floresta amazônica, a qual é um dos biomas mais ricos do mundo, mantendo ainda uma razoável diversidade após cinco séculos de devastação, reflete na utilização de princípios bioativos das plantas medicinais existentes na Amazônia brasileira. Este fato vem sendo demonstrado nos resultados das pesquisas realizadas com esses produtos, podendo citar como exemplo a composição química inédita de própolis da região amazônica (Ishida et al, 2011) e explicar a eficácia antibacteriana das amostras dos extratos etanólicos estudados, bem como as inúmeras propriedades medicinais já identificadas do óleo de copaíba (BANDEIRA et al, 1999) e de outros bioativos. A produção de emulsões de óleo de copaíba para lavagem de cavidades baseada em evidências científicas para sua aplicação em preparos cavitários associada ao controle de qualidade do produto, seguindo as normalizações vigentes no país, viabilizará sua aplicação previamente à inserção do material restaurador, pois, devido às propriedades antimicrobiana e antiinflamatória do óleo de copaíba, acredita-se que essa solução poderá contribuir na diminuição da incidência de cárie recorrente. Ressalta-se que o Brasil, apesar da diversificada flora vegetal, não apresenta posição de destaque no desenvolvimento de medicamentos oriundos de fitoterápicos.

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

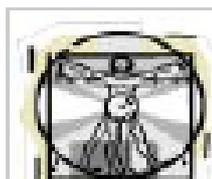
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 706.697

Neste sentido, é de extrema importância o desenvolvimento inovador de formas farmacêuticas que possam ser utilizadas com eficácia e segurança nos preparos cavitários. Esta proposta proporcionará, ainda, recursos humanos qualificados para atuar na Odontologia e produção de artigos científicos para difusão do conhecimento

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Metodologia Proposta:

Este projeto faz parte de uma pesquisa mais ampla, onde somente o subproduto 1 se enquadra na Resolução 466/2012 e o subprojeto 2 não se enquadra. O projeto completo encontra-se em anexo com a metodologia detalhada. O Subprojeto 1 divide-se em três etapas, sendo a primeira um estudo das propriedades físico-químicas e de controle de qualidade das formulações de óleo de copaíba, visando cumprir os requisitos de padronização e das boas práticas de fabricação das emulsões, seguindo a legislação preconizada pela ANVISA. Considerando que as formulações

receberão conservantes em diferentes concentrações, será necessário verificar a atividade antibacteriana das formulações sobre microrganismos formadores do biofilme dental (ESTUDO 1). A segunda etapa será o estudo das propriedades biológicas em relação à citotoxicidade das emulsões formuladas através de cultura de células na linhagem normal de fibroblasto humano MRC-5 (teste do Alamar Blue) e teste de hemólise. Nesta fase será ainda avaliada histologicamente a zona de colágeno exposta na base da união resina/dentina afetada por cárie e dentina rígida, produzida após a utilização de emulsões de óleo de copaíba e dioxidina e, a ação das emulsões de óleo de copaíba sobre as metaloproteinases da matriz dentária afetada por cárie e rígida através da análise zimográfica (ESTUDO 2). A terceira etapa trata-se da análise das propriedades mecânicas para identificar o comportamento

das emulsões de limpeza cavitária na infiltração marginal e na adesão das restaurações com resina composta utilizando testes de microinfiltração e microtração, respectivamente, e o efeito das emulsões formuladas com o óleo de copaíba (Copalfera multijuga) na morfologia da superfície dentária será analisado através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) – ESTUDO 3.

Metodologia de Análise de Dados:

Subprojeto 1: Para a leitura no microscópio eletrônico de varredura - MEV, a média das leituras será computada para cada espécime. Para análise da reprodutibilidade do examinador será utilizado o teste Kappa. Aos dados de espessura da camada de colágeno será aplicado o teste estatístico de Análise de Variância a dois critérios fixos (substrato vs. condição de armazenagem), complementado pelo teste para comparações múltiplas de Tukey. Todos os testes serão considerados ao nível de significância de 5% e serão realizados no programa estatístico SPSS 20

Endereço: Rua Teresina, 4050

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

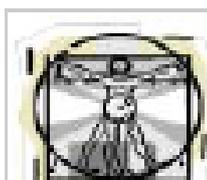
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (02)3305-5130

Fax: (02)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 730.697

(SPSS Inc.

Chicago, IL, EUA). No teste de microinfiltração, os dados serão apresentados por meio de gráficos e tabelas, onde serão calculados a média e o desvio-padrão (DP) dos escores em relação aos grupos. Na análise dos dados será utilizada a Análise de Variância (ANOVA), pois os dados serão encontrados normalmente distribuídos e o nível de significância será de 5%. Será utilizado o Índice Kappa na análise da concordância Interobservador

(VIEIRA, 2004). Nos testes de microtração, os dados serão analisados utilizando-se o software SPSS 14.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Depois de verificada a normalidade (Kolmogorov-Smirnov test, $p > 0.05$) e a homogeneidade (Levene's test, $p > 0.05$) dos dados, e constatada a não significância estatística do "dente de origem" para a força de adesão (regression analysis, $p > 0.05$), estar-se-á apto à aplicação do teste Two-Way ANOVA para examinar o efeito dos materiais (protocolo adesivo), do tempo de armazenamento (24h x 6 meses) e a Interação destes dois fatores na variável dependente "força de adesão". Havendo diferença estatística entre os grupos, o Teste de Tukey será utilizado para comparações múltiplas. Em todas as análises, o nível de significância será de $p < 0.05$.

Cronograma de Execução

Revisão de Literatura 01/10/2014 30/09/2017

Obtenção da matéria prima vegetal e preparação dos extratos e emulsões 01/10/2014 31/03/2015

Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de *Libidibia ferrea* e *Copaifera multijuga* in vitro 01/04/2015 30/09/2015

Otimizar as formulações das emulsões de óleo de copaiba (*Copaifera multijuga*) e realizar o controle de qualidade físico-químico e microbiológico 01/04/2015 30/09/2015

Formulação do enxaguatório e da pomada orabase de *Libidibia ferrea* 01/04/2015 31/03/2016

Testes de citotoxicidade e de hemólise das emulsões à base de óleo de copaiba 01/04/2015 31/03/2016

Análise zimográfica das emulsões à base do óleo de copaiba sobre as metaloproteinases da matriz dentária afetada por cárie e rigida 01/04/2015 31/03/2016

Caracterização da formulação de enxaguatório bucal à base de *Libidibia ferrea* 01/10/2015 30/09/2016

Analisar o efeito das emulsões formuladas com o óleo de copaiba na morfologia da superfície dentária através da Microscopia Eletrônica de Varredura 01/10/2015 30/09/2016

Testes de microtração e microinfiltração para avaliar o efeito das emulsões de óleo de copaiba na

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.067-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 700.697

Interface dente/restauração 01/04/2016 31/03/2017

Testes de citotoxicidade, microdureza e mandamento dental do enxaguatório de Libidibla ferrea 01/04/2016 31/03/2017

Avaliação da atividade cicatricial da pomada orabase em mucosa de ratos 01/04/2016 31/03/2017

Tabulação e análise dos Dados 01/10/2016 30/09/2017

Redação dos artigos científicos 01/04/2017 30/09/2017

Orçamento Financeiro Total - R\$ 552.092,00

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto em tela é multicentrico e contém todos os elementos de um estudo científico: Introdução, Objetivos, Metodologia, Cronograma, Orçamento Financeiro.

Folha de Rosto - Contemplado

Termo e Anuência - Contemplado

TCLE - Não se aplica

Recomendações:

Não se Aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto somo de parecer pela Aprovação.SMJ.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Teresina, 4050

Bairro: Adriadópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (02)3305-5130

Fax: (02)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 706.697

MANAUS, 10 de Setembro de 2014

Assinado por:
MARIA EMILIA DE OLIVEIRA PEREIRA ABBUD
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4050

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (02)3305-5130

Fax: (02)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br