



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO EFEITO DE
UM BIOATIVO AMAZÔNICO SOBRE A CAMADA
HÍBRIDA DA DENTINA**

MESTRANDA: JOYCE DE FIGUEIREDO MEIRA

**MANAUS - AM
2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO EFEITO DE
UM BIOATIVO AMAZÔNICO SOBRE A CAMADA
HÍBRIDA DA DENTINA**

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.

MESTRANDA: JOYCE DE FIGUEIREDO MEIRA

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MARIA FULGÊNCIA COSTA LIMA BANDEIRA

COORIENTADORA: PROF^a. DR^a. NIKEILA CHACON DE OLIVEIRA CONDE

**MANAUS - AM
2014**

A Deus, meus pais,
minha irmã e meu marido
que foram minha maior fonte
de apoio, força e incentivo
para a realização desse
trabalho

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e por me conduzir pelo caminho certo, me protegendo, envolvendo e apoiando em todos os momentos da minha vida.

A **minha família**, em especial ao **meu pai, minha mãe e minha irmã**, por sempre estarem ao meu lado incentivando meu crescimento pessoal e profissional. Sou o que sou hoje graças a vocês, por vocês e pra vocês!

Ao meu marido **Rafael Saulo**, pelo apoio diário e incondicional em todos os momentos que precisei. Por entender a minha ausência, devido a dedicação ao mestrado, por me ajudar a acreditar quando até mesmo eu achei que não conseguiria, por ser meu ombro amigo e parceiro incondicional. Te amo!

Aos meus sogros, **Lícia e Evandro** e cunhados **Danilo e Bruhna** por serem minha segunda família, apoiando e incentivando sempre que precisei.

Aos amigos **Carolina Rocha, Lidiane Gomes, Aletheia e Cesar Paranhos, Juliana Barreto, Sybilla Torres, Camila e Eduardo Guedes e Raika** pelo incentivo constante, amizade e orações.

Às amigas **Marielle Pereira, Francis Caroline, Larice Morgado, Janayna Heideriqui e Giselly Zan**, que mesmo distantes, sempre se fazem presentes apoiando quando preciso.

Aos amigos de trabalho, em especial a **Patrícia Dias, Pedro Henriques, Tatiane Magluf, Vinícius Lima, Gustavo Zoletti, Andrea Abraham, Cecília Garcez, Paloma Correa, Cintia Meirelles, Rebeca Simões, Marília Guenca, Ana e Ronaldo, Karen Yared, Rosangela Torres e João Felipe**, pelo “ouvido amigo, empurrões e cobertura” sempre que precisei.

À amiga **Sandra Premoli** por todo tempo de convívio enquanto trabalhamos juntas, sempre disposta a me ouvir, me incentivar e aconselhar.

A minha orientadora, professora **Dra. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira**, por ter aceitado me orientar, por toda atenção e carinho. Por sempre manter o brilho no olhar quando falamos em pesquisa e sempre mostrar persistência diante das dificuldades.

A minha coorientadora **Dra. Nikeila Chacon de Oliveira Conde**, pela forma serena e tranquila de apoiar.

Aos professores **Dr. Emílio Carlos Sponchiado Júnior e Dra. Maria Augusta Bessa Rebelo**, pela enorme contribuição na coordenação do Mestrado.

Ao professor **Jeconias Câmara**, por ter abraçado esta pesquisa e nos dado todo apoio para o desenvolvimento de grande parte do trabalho, disponibilizando técnicos, residentes e professores do Departamento de Patologia e Medicina Legal para me auxiliar no desenvolvimento da pesquisa.

À professora **Dra. Tatiana Nayara Libório-Kimura** pela generosidade, atenção e serenidade ajudando a direcionar nosso estudo.

À professora **Msc. Lucileide Moreira de Oliveira**, por ter me ajudado nos primeiros passos dado no laboratório de patologia e no desenvolvimento do trabalho.

À professora **Dra. Luciana Bontinelly Mendonça Fujimoto** por seu desprendimento ao ceder sua câmera fotográfica própria para microscopia e contribuir de forma ímpar na adequação da metodologia da pesquisa.

À professora **Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos**, pela gênero atenção, disponibilizando os laboratórios de pesquisa da Faculdade de Farmácia e seus alunos, **Elenn Suzany, Joselia Cavalcante, Zalina Rodrigues e Hygor Halyson**, para me ajudarem no desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores **Msc. Lígia Vasconcelos, Dr. Jonas Oliveira, Dr. José Antônio Nunes de Mello, Dr. Cíntia Carvalhal, Msc. Francisco Pantoja e Dr. Lioney Nobre Cabral** por serem professores admiráveis, referência durante minha formação profissional e os primeiros incentivadores para a vida acadêmica e de pesquisa.

Às residentes em Patologia Bucal, **Sílvia Brandão e Naiza Abrahim** por todo apoio e incentivo no laboratório de patologia, aceitando dividir comigo o espaço e atenção dos técnicos e professores.

Aos queridos técnicos do Departamento de Patologia e Medicina Legal **Fátima, Creuzimar, Iolanda e Kleibe e todos os funcionários** por terem sido tão atenciosos, por serem meus braços, quando, por problemas de saúde precisei me afastar do laboratório, pelas mensagens carinhosas e conversas que sempre me incentivavam a seguir a diante. Muito obrigada!

À **Patrícia Vilar**, por me ajudar a encontrar o equilíbrio necessário durante essa fase agitada da minha vida.

À **Cristiane Nagai, Carina Toda, Patrícia Sâmea, Luisa Rissoni e todos do grupo de pesquisa** que sempre estiveram disponíveis a me ajudar no laboratório.

Aos meus amigos do mestrado: **Gisely Naura e Thiago Mendes**, por sere, grandes amigos, confidentes, que me acompanham desde a especialização, com os quais eu sei que posso contar, a qualquer dia e hora. Obrigada pela amizade pura e verdadeira; **Mateus Souza**, pela amizade e por compartilharmos tantos momentos em busca desse sonho que é o mestrado, **Catarina Araújo**, por sempre ser tão alto astral e mãezona de todos da turma; **Maíra Carvalho**, por ser exemplo de espontaneidade, alegria e capacidade; **Glauber Palma**, por toda a ajuda, brincadeiras e momentos compartilhados; **Samir Noronha**, pela humildade e cavalheirismo; **Danielly Meireles**, pela competência e por sempre ajudar a turma; e **Alessandra Salino**, pelo jeito sereno e tranquilo de ser.

. A todos os amigos que me incentivaram a seguir em frente para alcançar meus objetivos, e a cada pessoa que contribuiu direta ou indiretamente para a realização de mais esta etapa da minha vida. Tudo que consegui nestes dois anos de curso devo a vocês

*“É preciso força pra sonhar e
perceber que a estrada vai além do
que se vê”.*

Marcelo Campelo

AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO EFEITO DE UM BIOATIVO AMAZÔNICO SOBRE A CAMADA HÍBRIDA

MESTRANDA: Joyce de Figueiredo Meira / ORIENTADORA: PROF^a. Dr^a. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira / COORIENTADORA: PROF^a. Dr^a. Nikeila Chacon de Oliveira Conde

RESUMO

A adesão de materiais poliméricos à dentina ainda é considerada um grande desafio por ser este um substrato histologicamente complexo, predominantemente tubular e intrinsecamente úmido. Processos patológicos como esclerose e cárie, assim como a desmineralização da dentina, resultam em alterações nas propriedades do substrato dentinário. Dentre essas transformações está a ativação de metaloproteinases (MMPs) presentes na matriz dentinária após condicionamento ácido. O uso de agentes de limpeza cavitária tornou-se uma alternativa para reduzir esses efeitos. Apesar da grande eficácia, a clorexidina 2% (CLX) pode trazer efeitos colaterais, como o manchamento dentário. Assim, essa pesquisa se propõe a analisar morfometricamente o efeito das emulsões a base de óleo de copaíba a 10% sobre a formação da camada híbrida. Na análise da exposição de fibras colágenas foram confeccionados 80 espécimes a partir de 3^o terceiros molares hígidos que foram imersos em soluções testes durante 3 meses de envelhecimento: G1 - dentina hígida (DH) + água, G2 - dentina cariada (DC) + água, G3 - DH+CLX, G4-DC+CLX, G5-DH+CM+conservante A (CM+A), G6-DC+CM+A, G7-DH+CM + conservante B (CM+B), G8-DC+CM+B, G9-DH+CM+conservante C (CM+C), G10-DC+CM+C. Os espécimes foram preparados histologicamente, corados em Tricrômico de Goldner e analisados, onde foram feitas imagens, utilizando um aumento de 400x, com a câmera Dino-Eye. A espessura de colágeno exposto e hibridizado foi medida através do programa UTHSCSA Image Tool. A reprodutibilidade do examinador foi pelo teste de correlação de Pearson. Aos dados de espessura da camada de colágeno foi aplicado o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* ($p < 0,05$). Maior frequência de colágeno exposto foi observada em G10 (DC + CM+C), seguidos dos grupos G6 (DC + CM+A) e G5 (DH + CM+A). Os dados demonstraram que não houve diferença estatística entre os grupos G7 e G9, que apresentaram maior espessura de colágeno hibridizado, havendo diferença quando 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 supracitados. A análise histológica foi feita de maneira qualitativa por três patologistas, simultaneamente. 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 o à dentina cariada o grupo tratado com clorexidina apresentou maior proporção de corpos de prova com colágeno hibridizado. G7 apresentou 100% de espécimes com colágeno hibridizado e melhor homogeneidade de camada híbrida.

PALAVRAS-CHAVES: clorexidina 2%, copaíba, matriz dentinária, colágeno, camada híbrida.

ABSTRACT

The adhesion of polymeric materials to dentin is still considered a big challenge because it is a complex histological substrate, predominantly tubular and intrinsically moist. Sclerosis and pathological processes such as caries, as well as the dentin demineralization, result in dentin properties changes. Among these transformations there is the activation of matrix metalloproteinases (MMPs) in the dentin matrix after etching. The solvents and monomers effects on the demineralized dentin have an important role in the whole concept of bonding. The use of disinfectant solutions has become an alternative to reduce these effects. Despite the great efficacy, the 2% chlorhexidine (CHX) can bring side effects. Thus, this research aims to morphometrically analyze the effect of copaiba oil emulsion 10% (COE) on the collagen of sound and carious dentin. In the analysis of the exposure of collagen fibers 80 specimens were fabricated. In the collagen fibers exposure analysis 80 specimens were fabricated from sound third molars that were immersed in test solutions for 3 months aging: G1- sound dentin (SD) + water, G2 - carious dentin (CD) + water, G3 - SD + 2% CHX, G4 - CD + CHX, G5 - SD + COE with preservative A (COE+PA), G6 - CD+COE+PA, G7 - SD + COE with preservative B (COE+PB), G8 - CD + COE+PB, G9 - SD + COE with preservative (COE+PC), G10 - CD + COE+PC. The specimens were histologically prepared, stained with Goldner's trichrome and analyzed. To analyze the examiner's reproducibility the Pearson correlation test was used. To the data of thickness collagen layer was applied the non-parametric Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Increased frequency of exposed collagen was observed in G10 (CD+COE+PC), followed by groups G6 (CD+COE+PA) and G5 (SD+COE+PA). The data showed no statistical difference between the groups G7 and G9, which had the thickest hybridized collagen, no difference when compared to G1 and G2, which showed less thickness. The G3, G4 and G8 groups showed no statistically significant difference between themselves and the other above. Qualitative analysis of histological samples for the study was taken by three pathologists simultaneously. Specimens treated with COE had the thickest exposed and hybridized collagen than the groups treated with CHX and water. Regarding the CD, the CHX group treated showed higher proportion of specimens with hybridized collagen. G7 showed 100% of specimens with hybridized collagen and better homogeneity of the hybrid layer.

KEYWORDS: Chlorhexidine 2%, copal, dentin matrix, collagen layer, hybrid.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotomicrografia do grupo sem tratamento superficial dentinário (A) e com tratamento “spray” ar/água (B)
- Figura 2 – Fotomicrografia do grupo com tratamento com CLX (A) e CM(B)
- Figura 3 – Posicionamento do dente na cortadeira.
- Figura 4 – Utilização da politriz visando a produção de uma superfície uniforme.
- Figura 5 – Selamento apical (A) e impermeabilização dos dentes (B).
- Figura 6 – Superfície dentinária exposta.
- Figura 7 – Dentes preparados para indução de cárie.
- Figura 8 – Dentes imersos em solução cariogênica durante 14 dias.
- Figura 9 (A e B) – Remoção de tecido cariado.
- Figura 10 – Disco de dentina em posição para corte para obtenção dos espécimes.
- Figura 11 – Espécimes cortados com dimensões 2x2x5mm.
- Figura 12 – Espécime de dentina hígida corado com Tricômico de Goldner.
Solução teste: água destilada (grupo 1).
- Figura 13 – Espécime de dentina cariada corado com Tricômico de Goldner.
Solução teste: água destilada (grupo 2).
- Figura 14 – Espécime de dentina hígida corado com Tricômico de Goldner.
Solução teste: CLX (grupo 3).
- Figura 15 – Espécime de dentina cariada corado com Tricômico de Goldner.
Solução teste: CLX (grupo 4).
- Figura 16 – Espécime de dentina hígida corado com Tricômico de Goldner.
Solução teste: CM+A (grupo 5).
- Figura 17 – Espécime de dentina cariada corado com Tricômico de Goldner.
Solução teste: CM+A (grupo 6).
- Figura 18 – Espécime de dentina hígida corado com Tricômico de Goldner.
Solução teste: CM+B (grupo 7).
- Figura 19 – Espécime de dentina cariada corado com Tricômico de Goldner.
Solução teste: CM+ B (grupo 8).
- Figura 20 – Espécime de dentina hígida corado com Tricômico de Goldner.
Solução teste: CM+C (grupo 9).

- Figura 21 – Espécime de dentina cariada corado com Tricrômico de Goldner.
Solução teste: CM+C (grupo 10).
- Figura 22 – Espécime de dentina hígida corado com Tricrômico de Goldner.
Solução teste: CM+B.
- Figura 23 – Espécime de dentina cariada corado com Tricrômico de Goldner.
Solução teste: CM+C.
- Figura 24– Espécime de dentina cariada corado com Tricrômico de Goldner.
Solução teste: CM+A.
- Figura 25 – Espécime de dentina hígida corado com Tricrômico de Goldner.
Solução teste: CM+A.
- Figura 26 – Homogeneidade da camada híbrida em espécimes de dentina hígida tratados com CM+B (A e B).

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

MMPs: metaloproteinases

CLX: clorexidina 2%

%: Porcentagem

CM: emulsões a base de copaíba 10%

CM+A: CM e conservante A (0,3%)

CM+B: CM e conservante B (0,6%)

CM+C: CM e conservante C (0,9%)

MEV: microscópio eletrônico de varredura

PNPIC: Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

SUS: Sistema Único de Saúde

DES-RE: desmineralização e remineralização

AC: alteração de cor

CP corpos de prova

PB: produto biotecnológico

MO: micro-organismos

µm: micrômetros

mm²: Milímetro quadrado

TIMPs: inibidores teciduais de metaloproteinases

CFO: Conselho Federal de Odontologia

UFAM: Universidade Federal do Amazonas

DPML: Departamento de Patologia e Medicina Legal

Km: quilômetro

mL: mililitros

g: grama

rpm: rotação por minuto

°C: graus Celsius

ATCC: American Type Culture Collection

µL: microlitros

X: vezes

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 Cárie e Dentina.....	19
3.2 Morfologia Dentinária.....	20
3.3 O preparo cavitário e a formação da camada híbrida.....	22
3.4 Metaloproteinases.....	25
3.5 Agentes de limpeza cavitária.....	27
3.6 Plantas medicinais, Fitoterapia e <i>Copaífera multijuga</i>	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Modelo de Estudo.....	37
4.2 Considerações éticas.....	37
4.3. Método de coleta do óleo-resina da copaíba (<i>Copaifera multijuga</i>).....	37
4.4. Preparo das emulsões do óleo-resina da copaíba (<i>Copaifera multijuga</i>).....	38
4.5 Avaliação de exposição de fibras colágenas.....	39
4.5.1 Confecção dos corpos de prova.....	40
4.5.2 Indução de cárie.....	41
4.5.3 Procedimentos adesivos e obtenção dos espécimes.....	43
4.5.4 Processamento histológico.....	47
4.5.5 Análise Estatística.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
Conclusão.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS.....	81
Anexo A - Aprovação do Comitê.....	81
Anexo B - Declaração do Banco de Dentes da FAO.....	85
APÊNDICE.....	86
Apêndice A – Análise dos patologistas.....	86

1 INTRODUÇÃO

A adesão de materiais poliméricos à dentina ainda é considerada um grande desafio por ser este um substrato histologicamente complexo, predominantemente tubular e intrinsecamente úmido (RICCI *et al*, 2011).

Processos patológicos como esclerose e cárie, assim como a desmineralização da dentina, resultam em alterações nas propriedades do substrato dentinário. Dentre essas transformações existe como exemplo a ativação de MMPs presentes na matriz dentinária após condicionamento ácido. Os efeitos dos solventes e monômeros sobre a dentina desmineralizada têm um importante papel em todo o conceito de adesão (MANSO, 2009).

As MMPs são enzimas capazes de degradar a maioria das proteínas da matriz extracelular. A participação das MMPs nos insucessos de restaurações adesivas, bem como progressão de lesão cáriosa tem sido baseado no processo de degradação do colágeno presente na dentina (DOI *et al*, 2011).

A incompleta infiltração e polimerização de resina dentro dentina desmineralizada permite o estabelecimento de canais nanométricos na interface dentina/material restaurador, o que tem sido chamado de nanoinfiltração. Essas vias de nanoinfiltração permitem a penetração de fluidos dentro de camadas híbridas, que pode afetar a durabilidade das interfaces de resina - dentina em relação à hidrólise de resina (NAKAJIMA *et al*, 1995). Esta degradação reduz a resistência de união do material restaurador ao substrato dentinário. (LOPES *et al*, 2009).

Durante o preparo cavitário, o corte do tecido dentinário resulta na produção de uma camada composta por resíduos/debris denominada de *smear layer*, composto por raspas de dentina e esmalte, bactérias, pequenos fragmentos ou partículas abrasivas dos instrumentos rotatórios, óleos provenientes dos aparelhos de alta e baixa velocidade, a qual permanece agregada aos túbulos dentinários. A limpeza cavitária tem a finalidade de remover esta camada (NAKABAYASHI, 1992).

A limpeza cavitária consiste na última etapa do preparo cavitário. Os agentes de limpeza cavitária são classificados como desmineralizantes e não desmineralizantes (MONDELLI, 1998). Estes agentes devem apresentar características e ações físico-químico-biológicas, tais como: limpar as paredes cavitárias, removendo os microfragmentos orgânicos e dentinários, contaminados ou não, acumulados durante a instrumentação do preparo, não ser tóxico, facilitar a ação dos agentes protetores e combater ou eliminar possíveis microrganismos patogênicos no interior da cavidade e ser inócuos nos procedimentos restauradores (FRANCO *et al.*, 2007).

Dentre os agentes não desmineralizantes, o uso de soluções desinfetantes tornou-se uma alternativa para reduzir ou eliminar os microrganismos presentes nas cavidades dentinárias (CAMPOS *et al.*, 2009). Entre essas substâncias, o digluconato de clorexidinaa 2% (CLX) e a água de hidróxido de cálcio são as mais utilizadas, sendo que a primeira deve ser utilizada em cavidades rasas e médias com restrições para cavidades profundas, sendo bactericida, e a segunda além da biocompatibilidade em cavidades profundas, é bacteriostática (MONDELLI, 1998; BUSATO, 2002; FRANCO *et al.*, 2007).

Apesar da grande eficácia, a clorexidina pode trazer efeitos colaterais como manchamento dos dentes, restaurações, prótese e língua, disgeusia e descamação da mucosa bucal (MAEKAWA *et al*, 2010).

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) permitiu a prática de tratamento médico por meio da utilização de plantas medicinais e fitoterápicos, propiciando dessa forma a abertura de novos mercados e superando barreiras que antes eram intransponíveis, permitindo a valorização da medicina popular, com aumento no interesse em pesquisas com fitoterápicos, objetivando a produção de fármacos mais baratos e com efeitos semelhantes aos dos medicamentos tradicionais (CAVALCANTI NETO *et al*, 2005).

O reconhecimento oficial da fitoterapia na odontologia no Brasil veio acompanhado de diversas lacunas na pesquisa científica e na utilização de plantas medicinais, especificamente para espécies vegetais com aplicação nas doenças da cavidade oral. Apesar da PNPIC, as plantas medicinais comercializadas no país e especificamente na cidade de Manaus são utilizadas de maneira empírica e novas políticas públicas de saúde devem inserir plantas medicinais e fitoterápicos de uso oral na rede pública de saúde, visando cumprir as normatizações vigentes e avanço científico e tecnológico na área da saúde (EVANGELISTA *et al*, 2013).

Pesquisas realizadas evidenciaram atividade antibacteriana, compatibilidade biológica, aceitabilidade nos testes de alteração de cor em dentes humanos de produtos à base de copaíba (BANDEIRA *et al*, 1999; CAVALCANTI NETO *et al*, 2005; VALDEVITE, 2007; VASCONCELOS, 2008; COELHO, 2010).

Estudo de MEV demonstrou a importância da utilização de agentes de limpeza cavitária na remoção dos detritos presentes nas cavidades, o que, possivelmente, melhora a adesão dentinária dos procedimentos restauradores utilizando, inclusive as emulsões proposta no presente estudo (LIMA, 2011).

Assim, essa pesquisa se propõe a avaliar morfometricamente o efeito das emulsões a base de óleo de copaíba a 10% sobre o colágeno da dentina hígida e cariada, buscando identificar a presença de colágeno exposto ou hibridizado.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar morfometricamente o efeito das emulsões a base de óleo de copaíba a 10% sobre a formação da camada híbrida.

2.2 Específicos

- Identificar a presença de colágeno exposto ou hibridizado nos substratos dentinários.
- Avaliar a zona de colágeno exposto e hibridizado na base da união resina dentina afetada por cárie, dentina hígida, produzida após a utilização de emulsão de óleo de copaíba e clorexidina.
- Analisar qualitativamente a homogeneidade da camada híbrida nos diferentes grupos do presente estudo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cárie e Dentina

A cárie dental é reconhecida como uma doença infecto-contagiosa, de caráter multifatorial, necessitando para seu desenvolvimento do hospedeiro, da dieta cariogênica, da microbiota local e do fator tempo (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Neste sentido, Fejerskov (2004) contribuiu cientificamente com os estudos de prevenção da doença propondo a representação através de diagrama dos fatores envolvidos no desenvolvimento da doença cárie e a complexidade desta inter-relação entre a saliva, hábitos alimentares e os vários fatores biológicos que determinam a composição e o metabolismo do biofilme, incluindo os fatores comportamentais e sócioeconômicos que influem na suscetibilidade do desenvolvimento da lesão de cárie em um indivíduo.

A literatura demonstra que a doença cárie ocorre por um desequilíbrio entre o processo de desmineralização e remineralização (DES-RE) nos tecidos mineralizados do dente. (ISMAIL *et al.* 2009). O processo de DES-RE, sob o ponto de vista fisiológico e bioquímico, está permanentemente ativado e representa um mecanismo natural de proteção dos dentes contra as perdas minerais provocadas pela ingestão alimentar diária. Seu equilíbrio depende fundamentalmente do pH presente na superfície do dente. Em condições habituais, o pH do biofilme apresenta-se entre 6,4 e 7,2. A produção de compostos ácidos promovem a queda do pH do biofilme (abaixo de 5,5 – pH crítico para esmalte e 4,5 para dentina), que ultrapassa o coeficiente de

solubilidade do tecido mineralizado, ativando o processo de desmineralização (BEZERRA; LIMA, 1998).

Duas zonas distintas compõe a lesão de cárie estabelecida em dentina. A zona externa da lesão, denominada dentina infectada a qual constitui-se de tecido dentinário necrótico, com perda praticamente completa de conteúdo mineral, rede de colágeno irreversivelmente degradada e presença de um grande número de microrganismos essencialmente proteolíticos. A zona interna, denominada de dentina afetada ou contaminada, apresenta-se endurecida em relação à primeira, embora ainda com menor conteúdo mineral e maior número de porosidades na zona de dentina intertubular, quando comparada a dentina hígida (RICCI *et al*, 2011).

A dentina afetada por cárie apresenta deposição de cristais de fosfato de cálcio na dentina intratubular sendo susceptível de ser impermeável por água. De fato, tem sido relatado que a resistência de união de sistemas adesivos em dentina afetada por cárie é menor que em dentina hígida (ERHARDT *et al*, 2008).

3.2 Morfologia Dentinária

A dentina é um tecido mineralizado de natureza conjuntiva que constitui a maior parte da estrutura do dente, sendo recoberta pelo esmalte na porção coronária e pelo cemento na porção radicular. Aloja em seu interior um tecido não mineralizado, a polpa dentária, constituindo-se o complexo dentina-polpa (ARANA, KATCBURIAN, 1999). Constitui o maior volume do elemento dentário e compõem-se de 70% de substância inorgânica (hidroxiapatita), 20%

de substância orgânica composta de colágeno, principalmente tipo I e 10% de água, por peso (SANTOS *et al*, 2010).

No interior da dentina encontram-se os túbulos dentinários que são pequenos canalículos com diâmetro de 2 a 4 μ m, por onde passam os prolongamentos citoplasmáticos das células odontoblásticas situadas junto à polpa (BARATIERI *et al*, 2001).

A forma tubular, com ligeira conicidade, possui abertura de maior diâmetro voltado para a superfície pulpar com cerca de 3 μ m, enquanto os diâmetros dos túbulos dentinários na superfície externa possuem em média 1 μ m. Tais túbulos encontram-se interligados por ramificações laterais em toda a dentina as quais denominam-se canalículos e possuem, cerca de 1 μ m de diâmetro e estão dispostos em ângulos retos com os túbulos dentinários (TEN CATE, 1988).

Segundo Carrigan *et al* (1984), a quantidade e diâmetro dos túbulos dentinários depende da região da dentina analisada, como também da idade fisiológica do dente. Garberoglio e Brännstrom (1976) relataram existir na parede pulpar, entre 30000 a 52000 túbulos/mm² e na dentina analisada a uma profundidade de 3,5mm da polpa esse número de túbulos variou de 10000 a 25000. Quanto às médias de túbulos/mm², os autores encontraram 45000 túbulos/mm² próximos à polpa e 19000 túbulos/mm² do esmalte.

A matriz orgânica da dentina compõe-se de fibrilas colágenas e substância fundamental interfibrilar (ARANA, KATCHBURIAN, 1999). Nos dentes humanos o colágeno intratubular revela-se como característica importante da dentina, preenchendo quase integralmente o túbulo o que pode

fundamentar a idéia da variabilidade da extensão do processo odontoblástico (TEN CATE, 1999).

3.3 O preparo cavitário e a formação da camada híbrida

Durante o preparo cavitário, o corte do tecido dentinário resulta na produção de uma camada composta por resíduos/debris, denominada de *smear layer*, a qual deposita-se sobre o fundo da cavidade (*smear in*) e à entrada dos túbulos dentinários (*smear plug*), obliterando a abertura dos túbulos dentinários, podendo interferir no processo de adesão. Além disso, a composição dessa camada reflete a composição do tecido a partir do qual é formada e, conseqüentemente, podem conter microrganismos, restos celulares e contaminantes diversos, como sangue (PERDIGÃO *et al* , 1996).

Segundo Lopes *et al* (2009), durante os procedimentos restauradores a dentina é condicionada prévia e/ou simultaneamente à aplicação do sistema adesivo, expondo uma rede de fibrilas de colágeno, onde os monômeros resinosos se difundem formando a camada híbrida. No entanto, se o sistema adesivo não for capaz de preencher completamente os espaços presentes ao redor da rede de fibrilas colágenas desmineralizadas forma-se uma zona fragilizada dentro da camada híbrida, responsável pelo início da nanoinfiltração, ocasionando a hidrólise das fibrilas colágenas concomitantemente com a degradação hidrolítica do adesivo.

Embora a maioria dos testes de resistência de união sejam feitos em dentina hígida por conveniência, clinicamente a maioria dos substratos são dentina afetada por cárie ou dentina esclerosada. Nakajima *et al* (1995) desenvolveram um estudo com o objetivo de testar a hipótese que a adesão na

dentina afetada por cárie é inferior a da dentina normal e que, a qualidade da camada híbrida desempenha um papel importante na criação de uma boa aderência. Os resultados indicaram que a força de adesão à dentina depende tanto do tipo de sistema adesivo utilizado quanto do tipo de dentina. Além disso, a qualidade da camada híbrida pode nem sempre contribuir significativamente para a resistência de união.

Pereira *et al* (2006) desenvolveram um estudo para avaliar a resistência de união de um sistema adesivo auto condicionante e sistema de condicionamento ácido total variando o substrato entre dentina hígida e dentina cariada. A espessura da camada de colágeno hibridizado foi observada em microscópio eletrônico de varredura. Os resultados indicaram que a resistência de união do adesivo autocondicionante Adper Prompt L-Pop® foi significativamente superior em dentina normal do que em dentina afetada por cárie ($p < 0,05$) e que a resistência de união de Single Bond®, adesivo usando na técnica de condicionamento ácido total, em dentina hígida e dentina afetada por cárie não foi significativamente diferente ($p > 0,05$). Além disso, a espessura das camadas híbridas produzidas por ambos os sistemas adesivos foi mais espessa na dentina afetada por cárie.

Hebling *et al* (2006) demonstraram preocupação ao observar a deteriorização acentuada da camada híbrida em restaurações classe I, em dentes decíduos, que permaneceram na cavidade bucal por 6 meses, seguidos de exodontia. Foram selecionados indivíduos com molares decíduos cariados. O condicionamento ácido total foi aplicado, seguido do adesivo Single bond®. Em um dos dentes foi aplicado CLX, pós condicionamento ácido e o outro elemento dentário foi denominado controle (sem utilização de solução de

limpeza). Observou-se após 6 meses o quase completo desaparecimento da camada híbrida nos grupos controles mesmo que, clinicamente não fossem observadas desadaptação marginal das restaurações, ao contrário dos dentes tratados com CLX, onde se observou uma melhor integridade da camada híbrida quando comparados ao grupo controle.

A incompleta infiltração e polimerização de resina dentro dentina desmineralizada permite o estabelecimento de canais nanométricos na interface dentina/material restaurador, o que tem sido chamado de nanoinfiltração. Essas vias nanoinfiltração permitem a penetração de fluidos dentro de camadas híbridas, que pode afetar a durabilidade das interfaces de resina - dentina em relação à hidrólise de resina (NAKAJIMA *et al*, 1995).

A degradação da interface adesiva implica em redução da resistência de união entre substrato e sistema restaurador, comprometendo o selamento da cavidade, resultando em manchamento marginal, cárie secundária, ocasionando a perda prematura de restaurações diretas e indiretas (LOPES *et al*, 2009). A durabilidade da camada híbrida pode ser influenciada negativamente pela degradação das fibras colágenas pelas MMPs. Estas estão presentes na matriz orgânica dentinária e podem contribuir para desorganização tecidual, possibilitando infiltração marginal em restaurações adesivas (PEREIRA, PINHEIRO; 2011).

3.4 Metaloproteinases

As MMPs são classificadas como endopeptidases zinco cálcio dependentes e são capazes de degradar os componentes da matriz extracelular. Há cinco grandes grupos de MMPs: colagenases, gelatinases, estromelinas e matrilisinas. As características principais das MMPs incluem: degradação de colágeno do tipo I, II e III e matriz extracelular. A ativação das MMPs depende da queda do pH para valores abaixo de 5,5, que acarretam em perda mineral e conversão das MMPs latentes em forma ativa (PEREIRA, PINHEIRO; 2011).

Nos seres humanos, foram identificadas aproximadamente 23 tipos de MMPs, as quais atuam em diferentes processos fisiológicos, tais como: embriogênese, remodelamento, reparação tecidual e óssea, bem como em processos patológicos envolvendo as injúrias teciduais. O limite entre a atividade fisiológica e patológica das MMPs é regulado por meio de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Quando ocorre um desequilíbrio entre os processos fisiológicos e patológicos, as TIMPs são inativadas, e o processo de degradação das proteínas da matriz orgânica torna-se exacerbado. Sabe-se que MMP-2 e MMP-9 (gelatinases) estão presentes nas lesões cariosas e diretamente relacionadas a degradação de colágeno (DOI, *et al.* 2011).

Ao utilizar procedimentos adesivos, a desmineralização superficial da dentina é essencial para a formação da camada híbrida. Os mecanismos de degradação da interface adesiva envolvem a deteriorização tanto dos constituintes poliméricos como das fibrilas de colágeno desprovidas de proteção, presentes na união resina-dentina. Essas são susceptíveis à hidrólise e degradação enzimática via endopeptidases presentes no próprio substrato

dentínario e liberadas durante sua dissolução (MMPs), ou via colagenases produzidas por microrganismos participantes do processo cariioso (PASHLEY *et al.*, 2004).

A presença dessa zona de fibrilas de colágeno expostas favorece a nanoinfiltração (SANO *et al.*, 1995), a qual permite o ingresso constante de fluidos diversos, produtos do metabolismo bacteriano, e MMPs provenientes da saliva. Em conjunto, todos esses fatores culminam com a degradação hidrolítica e enzimática das fibrilas de colágeno expostas na interface de união (TJADERHANE *et al.*, 1998).

Uma maneira de prevenir a ação das metaloproteinases sobre o colágeno e prevenir a degradação da interface adesiva seria por meio do emprego de inibidores que impedissem a ativação dessas enzimas, tornando-a inócuas ao colágeno exposto. Breschi *et al.* (2010) relataram que, em estudos *in vivo* e *in vitro*, a integridade da camada híbrida pode ser preservada pela aplicação de CLX após o condicionamento ácido e antes do sistema adesivo.

Sanabe *et al.* (2009) desenvolveram estudo com objetivo de identificar a presença de colágeno na união resina-dentina hígida e afetada por cárie após envelhecimento, na presença e ausência de CLX. Concluíram que o envelhecimento em solução aquosa resultou em degradação da união resina-dentina, identificada pelo aumento de zona de colágeno exposto na base da camada híbrida. Entretanto, na presença de clorexidina, os efeitos da degradação sobre a exposição de colágeno foram reduzidos.

3.5 Agentes de limpeza cavitária

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

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

De acordo com Kim *et al* (2011), a CLX é usada como o mais eficaz agente de tratamento periodontal no combate do biofilme dental e gengivite, sendo usado como um eficaz anti-séptico do canal radicular quando utilizado com solução de irrigação em tratamentos endodônticos. Há relatos de que a clorexidina não só inibe a atividade proteolítica de enzimas das bactérias como

também é uma solução eficaz para redução a degradação de colágeno, derivado de proteases em dentina desmineralizada.

Muitos estudos têm relatado que a aplicação de CLX na cavidade dentária melhora a estabilidade da camada híbrida. Acredita-se que essa melhora na durabilidade de união resina-dentina ocorre porque a CLX inibe a atividade das MMPs da matriz, a qual é responsável pela auto-degradação do colágeno (CAVALCANTI NETO *et al*, 2005; FRANCO *et al*, 2007; CAMPOS *et al*, 2009; KIM *et al*, 2011; PEREIRA, PINHEIRO, 2011).

Apesar da grande eficácia, a clorexidina pode trazer efeitos colaterais como manchamento dos dentes, restaurações, prótese e língua, disgeusia e descamação da mucosa bucal. O manchamento dos dentes é a principal queixa dentre os pacientes dentados, mas o manchamento das próteses também pode ser tornar um problema para pacientes acometidos com estomatite protética, pois Maekawa *et al* (2010) demonstrou que a imersão diária em CLX por 15 segundos produziu alteração da cor no epitélio da língua e causou manchamento nas próteses totais desses pacientes.

O manchamento dental acomete entre 30 a 50% dos usuários de clorexidina, sendo sua maior ocorrência no terço cervical e nas áreas proximais. Diversas hipóteses foram investigadas acerca dos mecanismos associados ao manchamento. A capacidade da CLX em promover desnaturação proteica, e, na sequência, estas promoverem o manchamento dental pela formação do sulfito férrico e estanhoso, compõem outra teoria do manchamento dentário decorrente da clorexidina (ZANATTA, ROSING; 2007).

3.6 Plantas medicinais, Fitoterapia e *Copaífera multijuga*

No Brasil, em 2006 foi estabelecido a política para o uso de plantas medicinais no serviço público através da Portaria nº. 971, Decreto nº 5813, em 03 de maio de 2006, que aprovou a PNPIC no SUS, permitindo a prática de tratamento médico por meio da utilização de plantas medicinais e fitoterápicos, propiciando dessa forma a abertura de novos mercados e superando barreiras que antes eram intransponíveis.

No entanto, o uso da Fitoterapia, pelo Cirurgião-Dentista, somente foi reconhecida e regulamentada como prática integrativa e complementar à saúde bucal pelo Conselho Federal de Odontologia, no dia 19 de novembro de 2008, através da Resolução nº 082/2008-CFO.

Entende-se como planta medicinal aquela que, nativa ou cultivada, é utilizada com fins medicinais. Estas devem sua ação farmacológica a princípios ativos conhecidos, fornecendo eventualmente matéria-prima para a indústria farmacêutica (TAUFNER, *et al.* 2006).

A diferença entre planta medicinal e fitoterapia reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico (Veiga Junior, *et al.* 2007). Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, em sua Portaria nº 06 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico com benefício para o usuário (BRASIL, 1995).

O uso dos fitoterápicos tem como finalidade prevenir, curar ou minimizar os sintomas das doenças, com um custo mais acessível à população e aos serviços públicos de saúde, comparativamente àqueles obtidos por síntese química, que são em geral mais caros, devido às patentes tecnológicas envolvidas (TOLEDO *et al.* 2003; DI STASI *et al.* 1994).

Na região Amazônica, existe grande biodiversidade de plantas medicinais utilizadas de maneira empírica, porém com indicações consolidadas por séculos de interação cultural (BORRÁS *et al.*,2003). Essas indicações vêm sendo evidenciadas através do desenvolvimento científico e tecnológico das pesquisas envolvendo plantas medicinais, na tentativa de abrir novos caminhos terapêuticos e possibilitar seu uso diário na prática ambulatorial.

Segundo Oliveira *et al* (2007) as plantas têm sido, desde a antiguidade, um recurso ao alcance do ser humano. O homem encontrou nas chamadas plantas medicinais, efeitos que foram transmitidas de geração a geração. Essas plantas têm significado um marco na história do desenvolvimento de nações. Até nas sociedades mais industrializadas, o uso de vegetais *in natura* pela população vem cada vez mais se intensificando. Com base no uso e conhecimento popular, o importante crescimento mundial da fitoterapia dentro de programas preventivos e curativos tem estimulado a avaliação da atividade de diferentes extratos de plantas para o controle do biofilme dental, bem como de outras afecções bucais

As árvores do gênero *Copaifera*, pertencente à família *Leguminosae* Juss. Subfamília *Caesalpinoideae* Kunth, são nativas da região da América Latina, e são encontradas na região que se estende do México ao norte da

Argentina, e na África Ocidental. No Brasil são encontradas facilmente nas regiões Amazônica, que compreende uma grande diversidade de espécies, e Centro-oeste. O gênero *Copaifera* possui 72 espécies catalogadas, e destas 16 são endêmicas do Brasil. A copaíba, *Copaifera* sp., é uma árvore de grande porte, podendo alcançar 40 metros de altura, 4 metros de diâmetro e pode viver até 400 anos (HECK *et al*, 2012).

Vasconcelos *et al* (2008) relataram que a espécie *Copaifera multijuga* Hayne pertence à família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae. Em uma área de plantação desta espécie na Reserva Adolfo Ducke, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Manaus, árvores de grande porte atingem até 36 m de altura com diâmetro de até 80 cm. Muitos dos trabalhos realizados com o gênero *Copaifera* estão relacionados com o óleo-resina que é obtido do tronco destas árvores. Esse óleo é produto da desintoxicação do organismo vegetal e funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias.

A utilização de plantas medicinais é descrita desde os primórdios da civilização para fins terapêuticos (DI STASI, 1996). Os trabalhos realizados sobre o Gênero da *Copaifera*, em sua maioria, estão relacionados com as propriedades químicas e farmacológicas do óleo-resina secretado do tronco dessas árvores (VALDEVITE, 2007). Este óleo é utilizado há muito tempo pelos índios para o tratamento de feridas, por sua ação antiinflamatória, antiséptica, antibacteriana e antifúngica. Devido à atividade biológica do óleo da copaíba especialmente a ação antibacteriana sobre microrganismos da doença cárie, associou-se a utilização do óleo da copaíba com o processo restaurador (VASCONCELOS, 2008).

Heck *et al* (2012) descreveu o óleo de Copaíba como líquido transparente, cuja coloração varia do amarelo até o marrom, apresenta cheiro forte, sabor acre e amargo. Estudos fitoquímicos demonstraram que os óleos de copaíba são misturas de sesquiterpenos e diterpenos, sendo o ácido copálico e os sesquiterpenos β -cariofileno e α -copaeno, os componentes majoritários do óleo (VEIGA JUNIOR, 2007)

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

Vasconcelos *et al* (2008) formularam um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne, avaliando sua atividade antibacteriana frente a cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus sanguinis* (ATCC 15300), visando sua posterior utilização para adequação do meio bucal em odontologia. Concluíram que o óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne e o cimento produzido apresentaram atividade antibacteriana frente ao *S. mutans* e ao *S. sanguinis* no teste de diluição em meio líquido, portanto o óleo de copaíba apresentou-se com potencial para o uso como veículo ao cimento.

Lima (2011) avaliou a alteração de cor (AC) e a morfologia dentinária frente a suspensões óleo de copaíba (CM) e extrato aquoso de própolis (SAP

1%) através de MEV em dentes humanos. No teste de alteração de cor, foram utilizados 180 corpos de prova (CP), assim distribuídos: G1- CM 10%; G2- CM 30%; G3- CM 10% + Produto biotecnológico (PB); G4- CM 30% + PB; G5- SAP 1%; G6- clorexidina a 2%. No MEV foi acrescentado 2 grupos: G7-sem tratamento e G8-lavagem com spray de ar/água (Figura 1A e B). As fotomicrografias foram analisadas por três avaliadores calibrados e nos escores: 1 –Ausência de debris/ ausência de microrganismos (MO); 2 – Ausência de debris/contáveis MO(1-50 colônias); 3 –0-50 debris/contáveis MO(50-100 colônias); 4 – 50-100 debris/incontáveis MO; 5 – incontáveis debris/incontáveis MO. Os dados AC foram analisados no Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($p \leq 0,05$). Os resultados demonstraram que em 10 s e 30s a copaíba a 10% e a SAP1% apresentaram menor AC (ΔE) e em 10 minutos a menor AC foi verificada na clorexidina, copaíba a 10% +PB, copaíba a 30% + PB e na SAP1%. No MEV o G7 foi classificado com o escore 5; o G8 e G5, com escore 4; e G1, G2, G3, G4 e G6, com escore 3. Os testes de alteração de cor e o MEV demonstraram que os agentes de limpeza cavitária apresentaram viabilidade de uso na odontologia, necessitando, ainda, de mais estudos.

O mesmo resultado foi obtido no estudo de Bengston et al. (2008), observado em microscopia eletrônica de varredura em que o Digluconato de Clorexidina 2% foi capaz de remover superficialmente a camada de lama dentinária. As emulsões a base de óleo de copaíba 10% obtiveram o mesmo escore que o Digluconato de Clorexidina a 2%, esta considerada como padrão ouro, por apresentar substantividade, ser bacteriostático e bactericida (Figura 2A e B) (ZANATTA, ROSING; 2007).

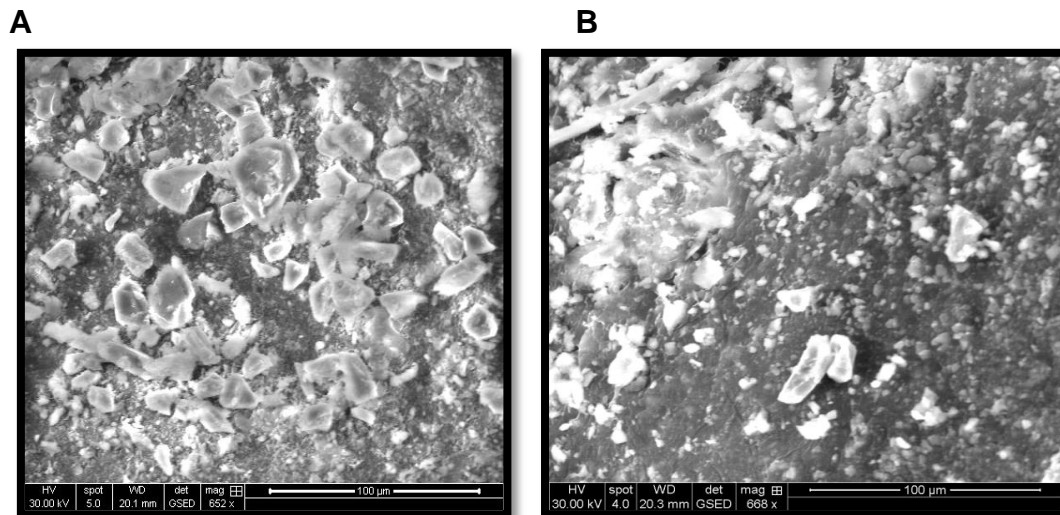


Figura 1 – Fotomicrografia do grupo sem tratamento superficial dentinário (A) e com tratamento “spray” ar/água (B) (LIMA, 2011).

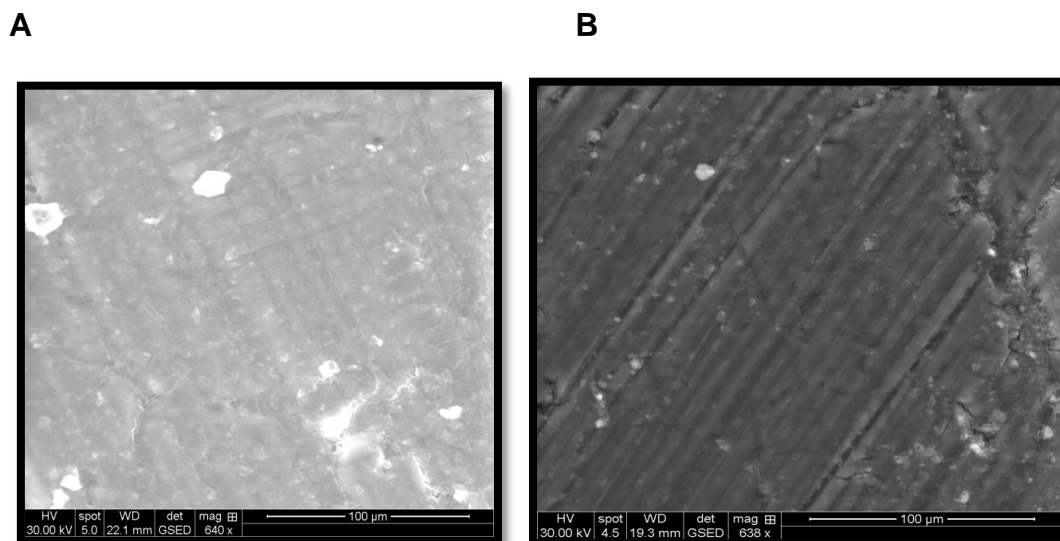


Figura 2 – Fotomicrografia do grupo com tratamento com CLX (A) e CM (B) (LIMA, 2011).

Coelho (2011) avaliou a atividade antimicrobiana e a compatibilidade biológica, em molares de ratos, de emulsões de limpeza de cavidade formulada à base do CM. Baseada na metodologia empregada concluíram que as emulsões do óleo-resina da copaíba a 10% e 30% associado ou não a um produto biotecnológico (PB), demonstraram resultados promissores para a

utilização na odontologia, com destaque para a CM com PB na atividade hemolítica, na alteração de cor e na compatibilidade biológica, necessitando de ensaios pré-clínicos e clínicos na farmacotécnica; nas propriedades físicas, mecânicas e biológicas; e ainda verificar da influência das emulsões testes na interface dente restauração para que os produtos possam ser considerados como aceitáveis tanto como emulsão de limpeza de cavidades e/ou pasta para capeamento pulpar.

Pieri *et al* (2012) avaliaram a atividade inibitória do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) contra o microorganismo cariogênico, *Streptococcus mutans*. Para tanto, foi realizado um teste de concentração inibitória mínima de óleo de copaíba contra *S. mutans*, usando a técnica de diluição em série, com um controle negativo, um controle positivo (0,12 % de clorexidina) e uma solução de 10 % de óleo de copaíba como um teste. O óleo de copaíba a 10% mostrou inibição do crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas até 0,78 mL / mL. O controle negativo tinham nenhuma inibição, e a solução de clorexidina 0,12 % foi eficaz até para 6,25 mL / mL no caldo. O óleo de copaíba mostrou uma atividade bacteriostática contra *S. mutans* em baixas concentrações, e poderia ser uma opção de substância pesquisada para ser usado contra bactérias cariogênicas na prevenção da cárie.

Santos *et al* (2013) avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de emulsão de limpeza de cavidade restauradora formulada a base do óleo da copaíba (*Copaifera multijuga*) na linhagem normal de fibroblasto humano MRC-5 através do teste do Alamar blue. As soluções testadas apresentaram

viabilidade celular alta nas concentrações testadas, principalmente nas formulações associadas ao Tween a 1%.

Em estudo comparativo de microinfiltração marginal e microtração em restaurações adesiva, Menezes *et al* (2013) utilizaram como soluções de limpeza de cavidade: CM+A (G1), CM+ B (G2), CM+ C (G3), CLX(G4), Água destilada (G5) em dentes humanos. Concluíram que os agentes de limpeza cavitária a base de óleo de copaíba interferiram positivamente no teste de microinfiltração enquanto no teste de microtração, não tiveram diferenças significantes entre os grupos testados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo do tipo laboratorial *in vitro* que visa analisar o efeito CM na exposição do colágeno na camada híbrida da matriz dentinária

4.2 Considerações éticas

A pesquisa, aprovada no Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) com número CAAE 13329213.9.0000.5020 (anexo 1) foi realizada em Manaus, na Faculdade de Odontologia, no Laboratório de Pesquisa do Curso de Odontologia, no Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Faculdade de Medicina e na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

4.3. Método de coleta do óleo-resina da copaíba (*Copaifera multijuga*)

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

A coleta foi realizada pelo mateiro da reserva, consistindo na confecção de um furo por meio de um trado 7/8 polegada diâmetro e 1,00 metro de comprimento, à altura de aproximadamente 1 metro do chão, até o centro do caule onde se encontram os reservatórios do óleo-resina, com um pequeno declive para escoamento. Após esse procedimento, o óleo-resina começou a escorrer lentamente pelo conduto, sendo coletado em um

recipiente estéril previamente preparado para esse fim. Após a coleta, o orifício foi vedado com argila, procedimento de rotina realizado na reserva (BANDEIRA *et al*,1999).

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

Foram formuladas emulsões de limpeza de cavidade a base do óleo-resina da *Copaifera multijuga* obedecendo as orientações da Farmacopéia Brasileira (2010). Foram realizados três diferentes CM com diferentes concentrações de conservantes.

Na confecção da emulsão foram utilizados 1mL do óleo-resina da copaíba *in natura*, 0,1 mL de Tween 80 (MERCK - Germany), homogeneizados no vortex (MARCONI – MA-162 – Piracicaba,SP - BR) e 8,9 mL de água destilada triesterilizada (COELHO, 2011).

SOLUÇÃO A	SOLUÇÃO B	SOLUÇÃO C
8,87 mL de água destilada	8,84 mL de água destilada	8,81 mL de água destilada
0,1mL de Tween 80	0,1mL de Tween 80	0,1mL de Tween 80
1 mL de CM	1 mL de CM	1 mL de CM
0,03mL Ureia diazolidinil a 0,3%	0,06mLUreia diazolidinil a 0,6%	0,09mL Ureia diazolidinil a 0,9%

Tabela 1 – Formulação das emulsões a base de copaíba.

A preparação de todas as emulsões foi realizada em capela de fluxo laminar (MARCONI – Piracicaba, SP – BR), utilizando uma balança de precisão 0,0001g (SARTORIUS - Germany) para pesagem dos componentes sólidos e uma micropipeta de variação de 100 – 1000µL para medir o volume dos líquidos. As emulsões foram mantidas em temperatura refrigerada, em frascos de vidro, na cor âmbar, com tampas rosqueáveis, seladas com parafilme e triesterilizadas.

4.5 Avaliação de exposição de fibras colágenas

Foram necessários 30 terceiros molares hígidos selecionados aleatoriamente, fornecidos pelo banco de dentes da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (anexo 2).

Os dentes utilizados foram extraídos por razões cirúrgica, livres de cáries, restaurações, que apresentassem coroas sem áreas hipoplásicas, trincas e/ou fraturas. Imediatamente após a extração, os dentes receberam profilaxia utilizando escova de Robinson, montada em contra-ângulo, contendo pasta de pedra pomes e água.

Decorrida a profilaxia, os dentes foram examinados em lupa estereoscópica ZEISS (10x de aumento), com a finalidade de detectar trincas ou possíveis falhas estruturais que poderiam causar alguma alteração nos resultados experimentais. Posteriormente os dentes foram armazenados em soro fisiológico, a temperatura ambiente, até o momento de serem preparadas as cavidades para prevenir a desidratação.

O desenvolvimento laboratorial deste estudo seguiu a metodologia de Sanabe (2009).

4.5.1 Confeção dos corpos de prova

Com auxílio de máquina de corte Mecatome P100 (PRESI, Grenoble - France), utilizando um disco diamantado dupla face (Extec Water Brake 4'x 0,12x ½ , cód 1010-584, Extec Corp. Enfield - Connecticut, USA), sob lubrificação constante (300 rpm e 200gf) foram removidas as porções oclusais dos dentes e produzidas superfícies planas em dentina. A porção oclusal não foi utilizada na pesquisa (Figura 3).

A superfície dentinária foi abrasionada, na face oclusal, utilizando a politriz AROTEC (Aropol 2V, Arotec S.A. Indústria e Comércio, série 040865 Cotia, SP, Brasil) com lixas de carboneto de silício de granulações crescentes 180 - 240 - 320, respectivamente, sob refrigeração à água, com o objetivo de produzir uma lama dentinária padronizada (Figura 4). Após o polimento, as superfícies dentinárias foram visualizadas através de lupa estereoscópica ZEISS, com 40X de aumento, para ser certificado de que nenhum remanescente de esmalte estava presente sobre esta superfície.

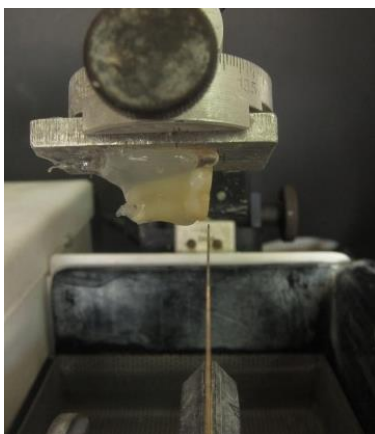


Figura 3 – Posicionamento do dente na cortadeira.

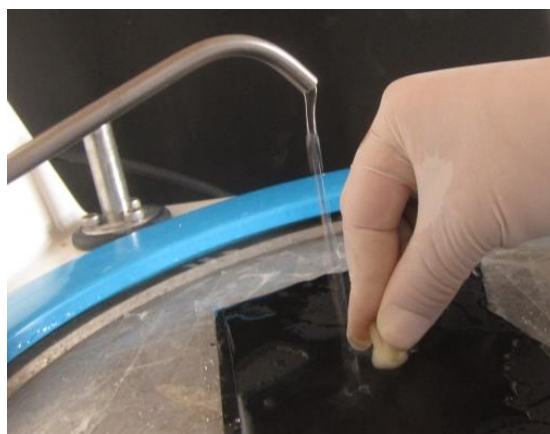


Figura 4 – Utilização da politriz visando a produção de uma superfície uniforme.

4.5.2 Indução de cárie

Os trinta dentes inicialmente selecionados tiveram suas raízes seladas com resina composta (Figura 5A). Em seguida, foram impermeabilizados com uma camada de adesivo epoxi (ARALDITE, Ciba Especialidades Químicas Ltda., Sao Paulo, Brasil) e outra de esmalte ácido resistente (Colorama, CEIL Com. Exp. Ind. Ltda, Sao Paulo, Brasil) (Figura 5B) deixando apenas a superfície dentinária exposta (Figuras 6).

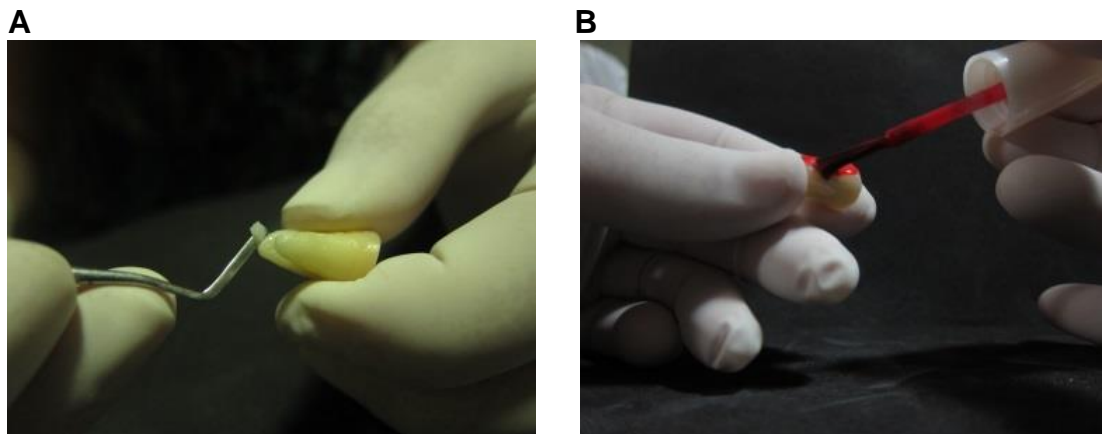


Figura 5 – Selamento apical (A) e impermeabilização dos dentes (B).



Figura 6 – Superfície dentinária exposta.

Quinze dentes foram suspensos com auxílio de um fio ortodôntico em um Becker contendo água destilada para esterilização em autoclave por 20 minutos a 121°C.

A solução cariogênica consistiu de 3,7 g de BHI caldo (Brain Heart Infusion, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), 2 g de sacarose (Synth; LabSynth, Sao Paulo, SP, Brazil), 1 g glicose (Synth; LabSynth, Sao Paulo, SP, Brazil) e 0,5 g de extrato de levedura (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) para cada 100 mL de água destilada. Essa solução foi esterilizada (autoclave por 20 minutos a 121 °C) previamente a inoculação de 2% de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC25175 , fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ). Os quinze dentes foram suspensos no meio cariogênico, com auxílio de um fio de barbante, e o conjunto levado em jarra de microaerofilia por 14 dias (Figura 7 e 8).



Figura 7 – Dentes preparados para indução de cárie.



Figura 8 – Dentes imersos em solução cariogênica durante 14 dias.

Durante esse período, a solução cariogênica foi substituída a cada 48 horas, porém sem a inoculação de novos microrganismos. Após o período de incubação, os dentes foram novamente autoclavados. O biofilme foi removido com gaze e os materiais isolantes (adesivo epóxi e esmalte) removidos manualmente com lâminas de bisturi. Os dentes foram abundantemente lavados em água deionizada, possibilitando a constatação de uma superfície de dentina escurecida e amolecida ao toque com sonda exploradora.

4.5.3 Procedimentos adesivos e obtenção dos espécimes

A superfície cariada foi removida com auxílio de broca esférica de aço nº 4 (KG Sorensen, Barueri - SP, BR) em baixa rotação, e foi trocada por uma nova a cada 4 dentes (Figura 9 A). A dentina cariada amolecida foi removida até a obtenção de uma dentina mais endurecida e resistente ao toque com sonda

exploradora sem pressão (Figura 9B). Esse, assim como os demais procedimentos, foi realizado por um único operador previamente calibrado.

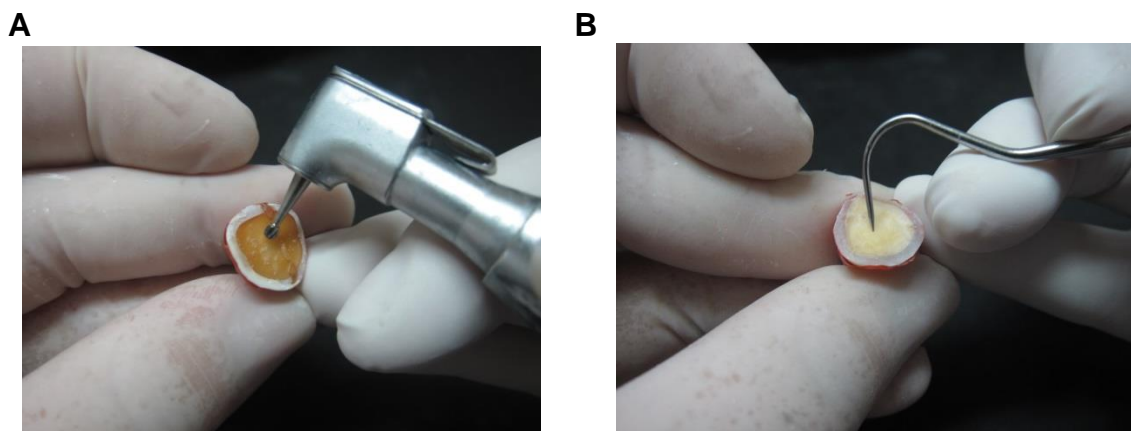


Figura 9 (A e B) – Remoção de tecido cariado.

Sobre a dentina hígida, brocas esféricas também foram utilizadas por 30s para que a *smear layer* fosse produzida pelo mesmo tipo de instrumento de corte.

Os dentes foram divididos aleatoriamente segundo o substrato (hígido e cariado) e a solução de limpeza cavitária (quadro 1). O sistema adesivo Single Bond® (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi aplicado segundo a recomendação do fabricante. Desta forma, a dentina foi condicionada por 15 s com ácido fosfórico a 35% (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), lavagem por 15s, secagem com papel absorvente para obtenção de uma superfície úmida. Após o condicionamento ácido foram aplicadas 20 μ L de solução de limpeza cavitária, por 60s, seguidos da remoção dos excessos com papel absorvente previamente a aplicação do sistema adesivo.

Duas camadas consecutivas do adesivo foram aplicadas, sendo cada uma delas individualmente submetida a leves jatos de ar para remoção do solvente. Ao final, as camadas foram conjuntamente fotoativadas com o aparelho de luz (Dabi atlante – DB686, Ribeirão Preto, SP, BRA), cuja irradiância foi monitorada com radiometro (490 ± 10 mW/cm²). Em seguida, quatro camadas adicionais do adesivo foram aplicadas e fotoativadas ao final da última camada para possibilitar a microtomia dos espécimes. Os dentes foram mantidos em ambiente com 100% de umidade relativa à 37°C por 24 horas.

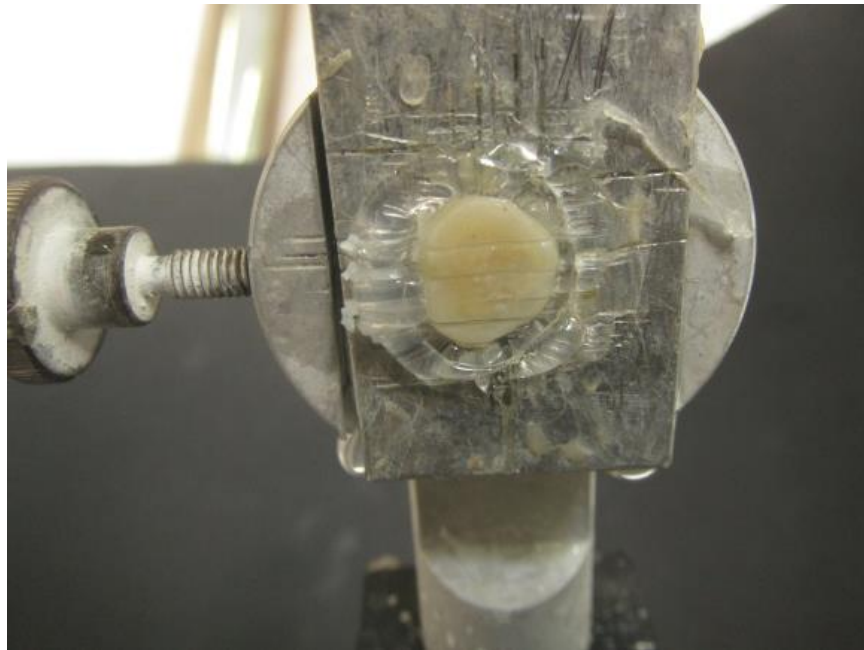
O Quadro I demonstra a distribuição dos grupos experimentais, contendo oito espécimes em cada grupo:

GRUPOS	TIPO DE SUBSTRATO	MATERIAL DE LIMPEZA	QUANTIDADE DE ESPÉCIMES
G1	Dentina Hígida (DH)	Água destilada	8
G2	Dentina Cariada (DC)	Água destilada	8
G3	DH	CLX a 2%	8
G4	DC	CLX a 2%	8
G5	DH	CM 10 + A	8
G6	DC	CM 10 + A	8
G7	DH	CM 10 + B	8
G8	DC	CM 10 + B	8
G9	DH	CM 10 + C	8
G10	DC	CM 10 + C	8
TOTAL DE ESPÉCIMES			80

Quadro I- Distribuição dos grupos experimentais.

Os dentes foram seccionados na cortadeira metalográfica para obtenção de três espécimes com dimensões de 2 mm de espessura, 2 mm de altura e 5 mm de comprimento para cada dente. Assim cada dente forneceu 3 espécimes, totalizando 90 espécimes onde 10 foram desprezados, sendo assim 80 espécimes selecionados (Figuras 10 e 11).

Os espécimes, segundo o substrato, foram aleatoriamente divididos (n=8) e imersos nas soluções testes por 3 meses mantendo a temperatura constante em 37°C.



Figuras 10 – Disco de dentina em posição para corte para obtenção dos espécimes.



Figuras 11 – Espécimes cortados com dimensões 2x2x5mm.

4.5.4 Processamento histológico

Decorrido o período de armazenamento, os espécimes foram fixados em solução de formol a 10% por 48 horas e desmineralizados em solução de Morse a 10% por 2 semana sem agitação. Em seguida, foram lavados, neutralizados em solução de sulfato de sódio a 5% por 24 horas, novamente lavados em água corrente por 24 horas, para posterior desidratação em soluções crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização e inclusão a vácuo em parafina.

Cortes de aproximadamente 4 μ m de espessura (820 Spencer Microtome - American Optical Corp, Buffalo, NY – USA) foram corados pelo Tricromico de Goldner. Nessa coloração, o colágeno não completamente

envolvido pelo adesivo ficou disponível para reagir com o corante sendo identificados pela coloração avermelhada. A dentina mineralizada foi corada em verde, a camada de adesivo em bege, o colágeno hibridizado pelo adesivo em laranja. Foi preparada 1 lâmina de cada corpo de prova, com 10 cortes em cada lâmina. Destes, um corte de cada espécime foi aleatoriamente selecionado e analisado em aumento de 400X (Olympus BX51– Olympus Corp, Tokio, JP).

A análise qualitativa foi realizada simultaneamente por três patologistas experientes estabelecendo um parecer consensual quanto a disposição dos túbulos dentinários, presença de adesivo e camada híbrida, especificando ainda se a camada estava hibridizada total, parcialmente ou não hibridizada (ERHARDT *et al*, 2008).

A partir dessa análise, foram coletadas três imagens de cada corte (Dino-Eye Microscope Eye-Piece Camera – ANMO Eletronics Corporation, Taiwan). Três medidas da espessura da zona de colágeno exposto e hibridizado (quando existentes) foram realizadas para cada imagem com auxílio do programa UTHSCSA Image Tool (The University of Texas Health Science Center, Santo Antonio, TX, EUA). As leituras foram realizadas em duplicata por um mesmo examinador, com intervalo de duas semana entre elas.

4.5.5 Análise Estatística

A média das duas leituras foi computada para cada espécime. Para análise da reprodutibilidade do examinador foi utilizado o teste de correlação de Pearson (ARANGO, 2001)

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas, onde se calculou a mediana e quartis (Q_i) dos dados quantitativos. Na análise dos dados foi aplicado o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*, pois foi rejeitada a hipótese de normalidade ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$) por meio do teste de *Shapiro-Wilk* (VIEIRA, 2004).

O software utilizado na análise foi o programa Epi-Info versão 7 para o Windows que é desenvolvido e distribuído gratuitamente pelo CDC (www.cdc.org/epiinfo). O nível de significância fixado para aplicação dos teste estatísticos foi 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dentina é um tecido mineralizado composto por 70% de hidroxiapatita, 20% de material orgânico e 10% de água. No interior da dentina encontram-se os túbulos dentinários por onde passam prolongamentos de odontoblastos situados na polpa (ARANA; KATCBURIAN, 1999; TEN CATE, 1999; BARATIERI *et al*, 2001).

A cárie é um doença infectocontagiosa, de etiologia multifatorial que ocorre por um desequilíbrio no processo de desmineralização e remineralização da estrutura dentinária (BEZERRA; LIMA, 1998; FEJERSKOV; KIDD, 2005; ISMAIL *et al*. 2009).

Na lesão cariosa é possível observar duas zonas distintas: a zona externa, dentina infectada, e a zona interna, denominada dentina afetada, que apresenta-se mais endurecida que a primeira, embora apresente um menor conteúdo mineral e uma maior porosidade (ERHARDT *et al*, 2008; RICCI *et al*, 2011).

Embora a maioria dos estudos de adesão sejam realizados em dentina hígida, a maioria dos substratos dentinários no atendimento clínico é dentina afetada por cárie ou esclerosada. Dessa forma esse estudo foi desenvolvido com 10 grupos sendo 5 de dentina hígida e 5 de dentina cariada.

A análise qualitativa e descritiva das lâminas foi realizada por três patologistas, de maneira simultânea estabelecendo um diagnóstico consensual (ERHARDT *et al* , 2008) (ANEXO 3) .

Nos critérios pré-estabelecidos analisou-se a presença ou ausência de adesivo, camada de colágeno hibridizado e colágeno exposto, homogeneidade da camada híbrida e disposição dos túbulos dentinários. Dos 80 corpos de prova preparados, 18 foram excluídos da análise pela ausência de uma ou mais das estruturas supra-citadas, afim de se obter uma análise mais homogênea dos corpos de prova.

Quanto a camada híbrida considerou-se o colágeno como sendo hibridizado total, parcialmente hibridizado ou não hibridizado. Segundo Sanabe (2009) ao utilizar o método de coloração de Tricômico de Goldner, a dentina mineralizada é corada em verde, a camada de adesivo em bege, o colágeno hibridizado em laranja e o colágeno exposto em vermelho (figuras 12 a 21).

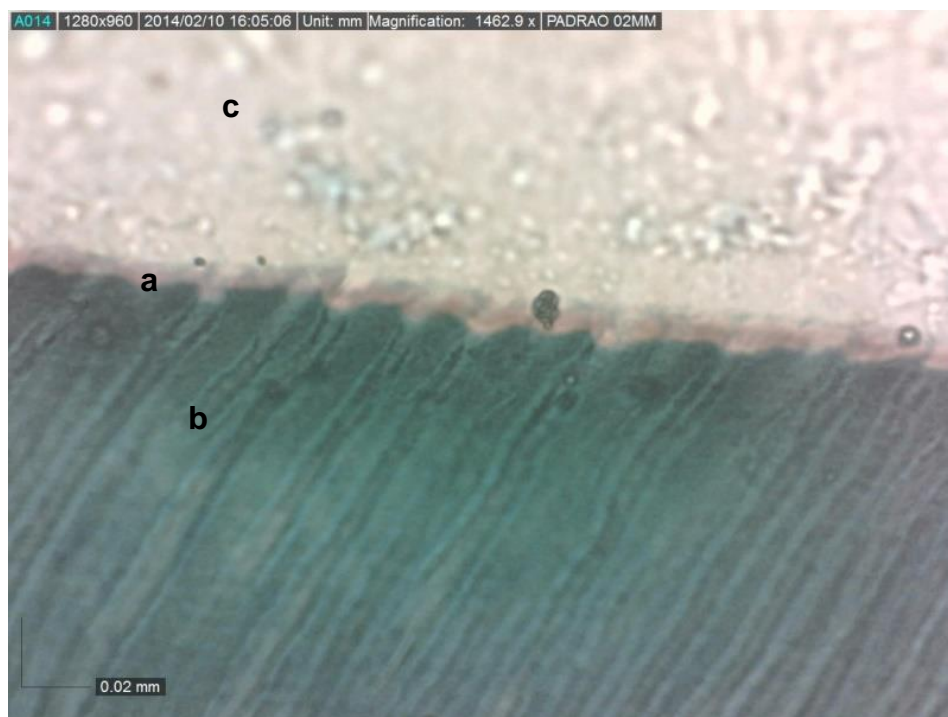


Figura 12 – Espécime de dentina hígida corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: água destilada (**Grupo 1**), (a) colágeno exposto, (b) dentina mineralizada, (c) adesivo.

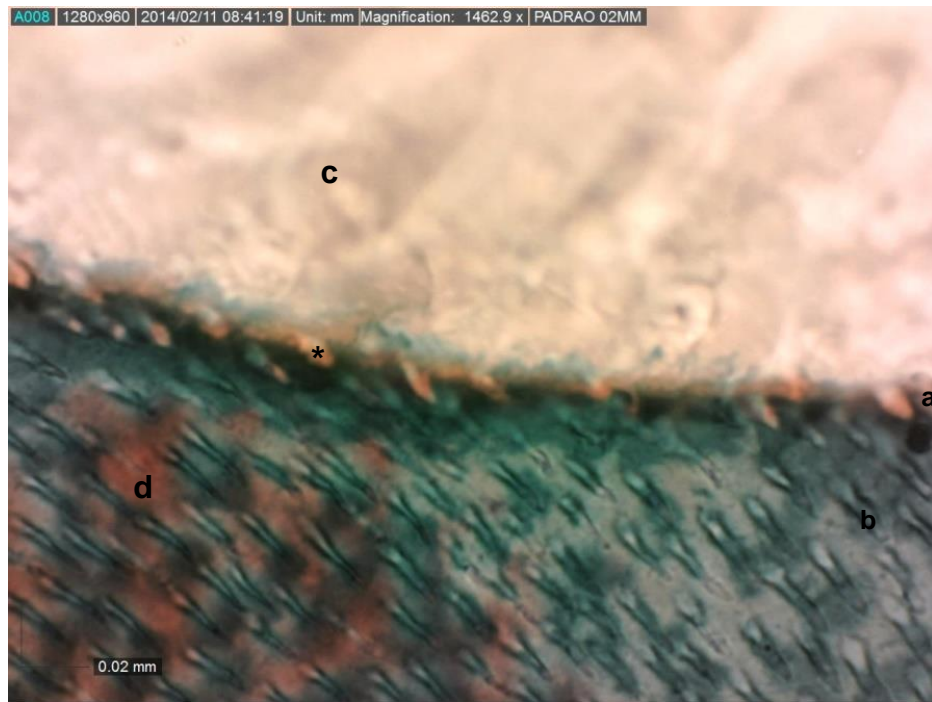


Figura 13 – Espécime de dentina cariada corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: água destilada (**Grupo 2**). (*) colágeno hibridizado, (a) colágeno exposto, (b) dentina mineralizada, (c) adesivo, (d) dentina desmineralizada.

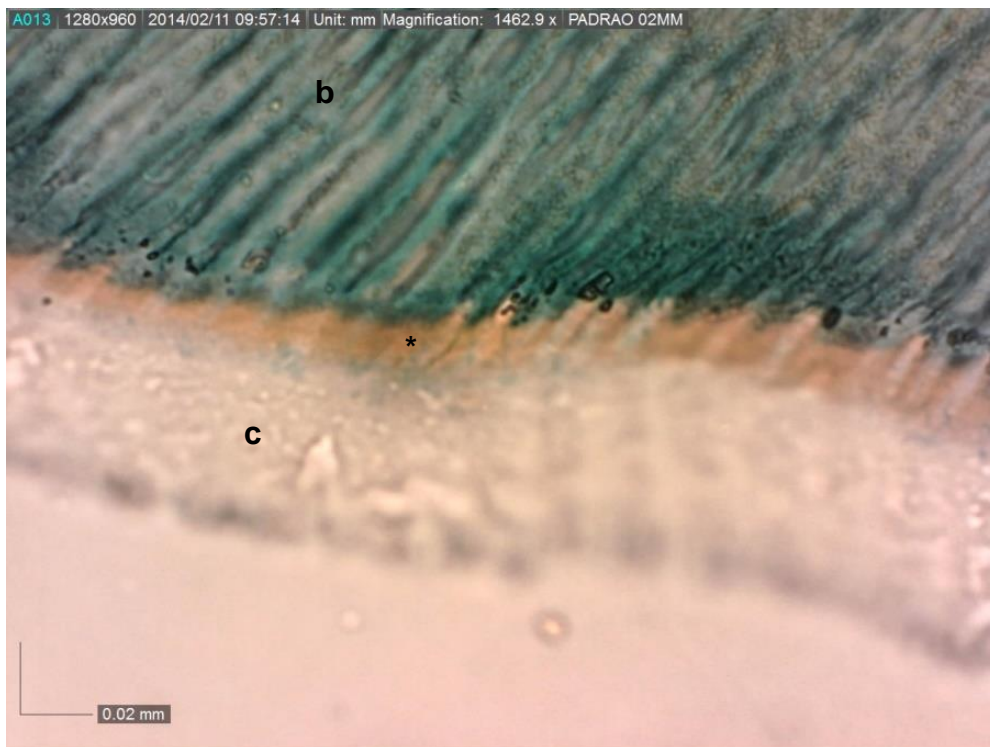


Figura 14 – Espécime de dentina hígida corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: CLX (**Grupo 3**). (*) colágeno hibridizado, (b) dentina mineralizada, (c) adesivo.

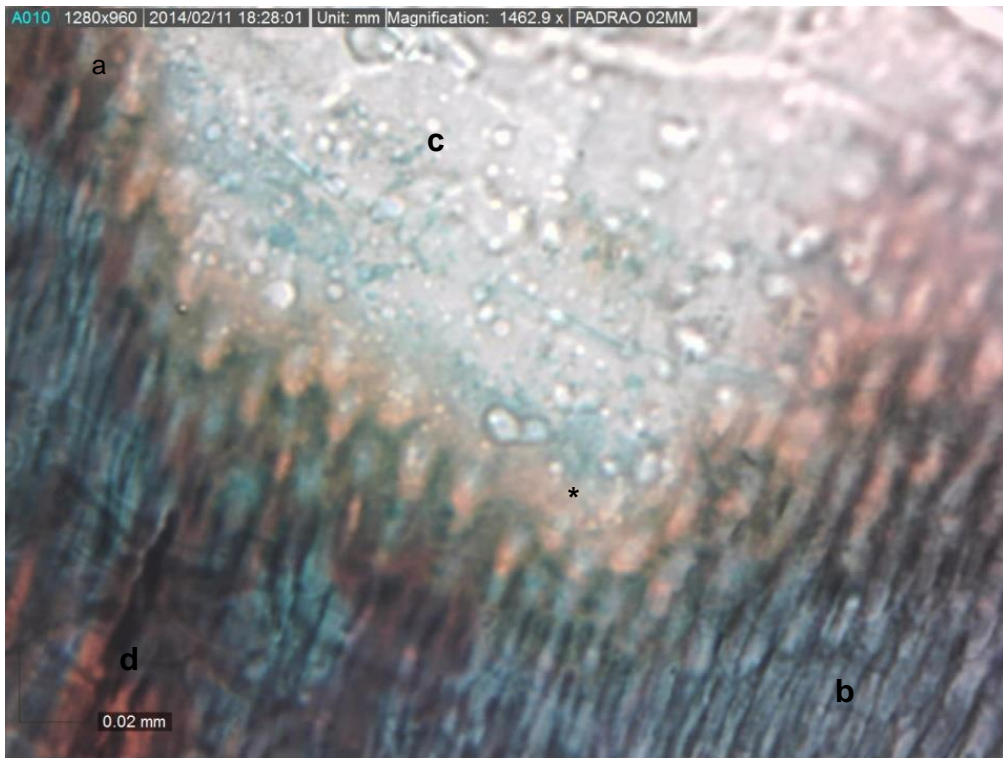


Figura 15 – Espécime de dentina cariada corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: CLX (**Grupo 4**). (*) colágeno hibridizado, (a) colágeno exposto, (b) dentina mineralizada, (c) adesivo, (d) dentina desmineralizada.

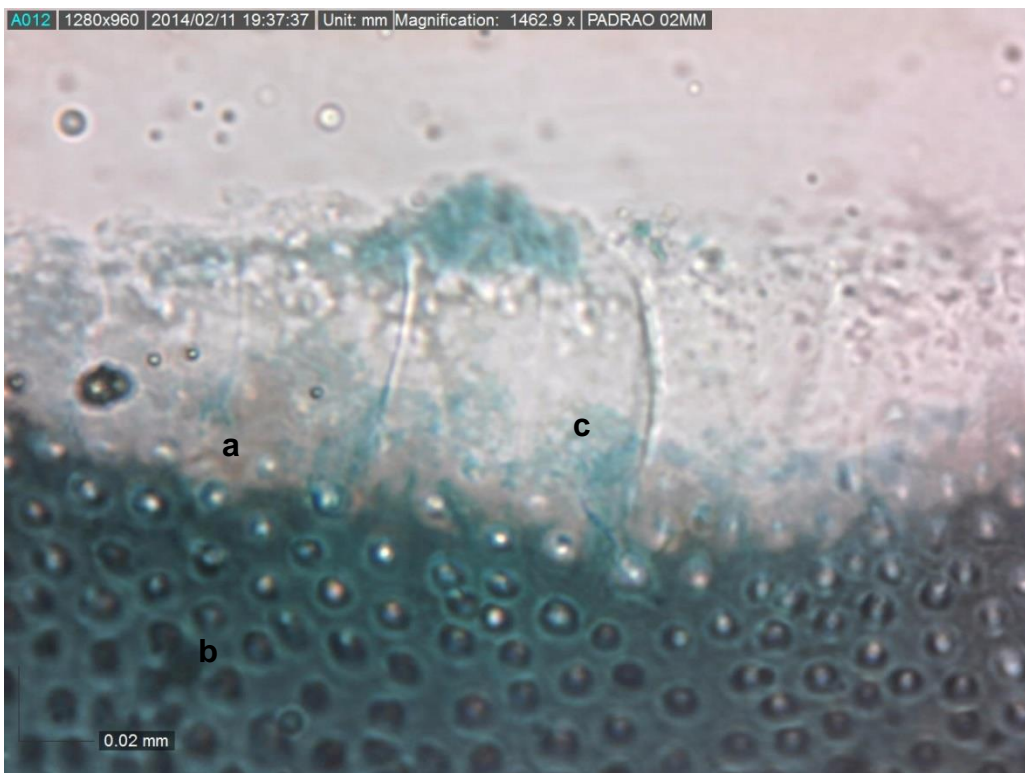


Figura 16 – Espécime de dentina hígida corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: CM+A (**Grupo 5**). (a) colágeno exposta (b) dentina mineralizada, (c) adesivo.

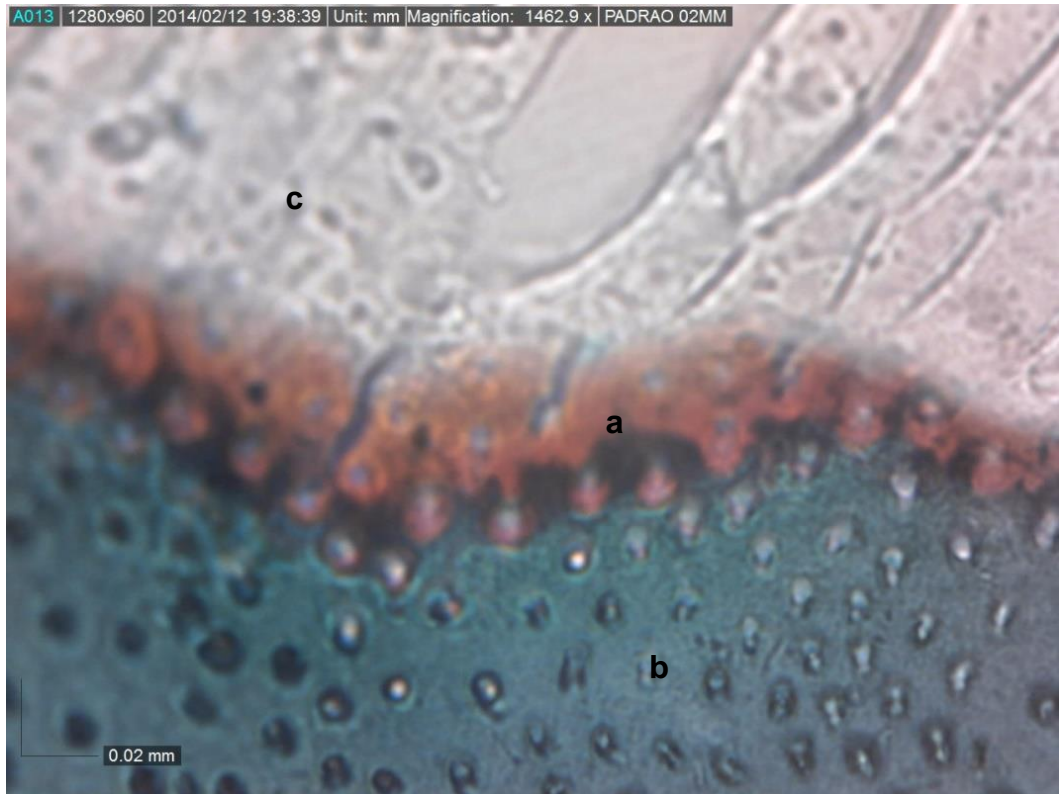


Figura 17 – Espécime de dentina cariada corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: CM+A (**Grupo 6**). (a) colágeno exposto, (b) dentina mineralizada, (c) adesivo.

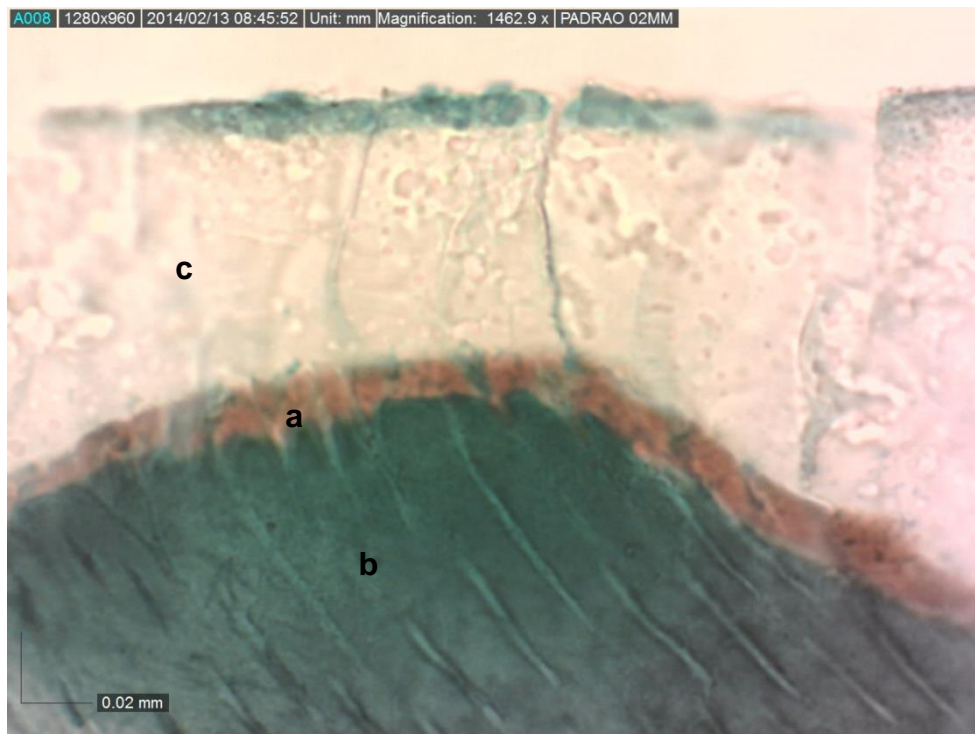


Figura 18 – Espécime de dentina hígida corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: CM+B (**Grupo 7**). (a) colágeno exposto, (b) dentina mineralizada, (c) adesivo.

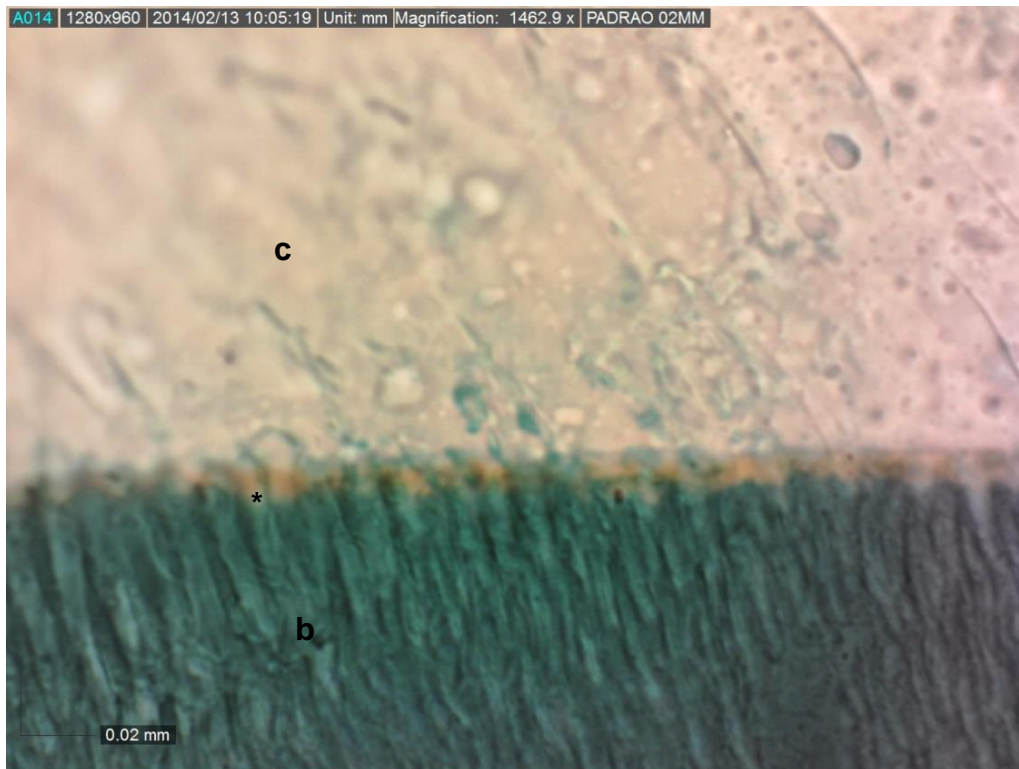


Figura 19 – Espécime de dentina cariada corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: CM+ B (**Grupo 8**) . (*) colágeno hibridizado, (b) dentina mineralizada, (c) adesivo.

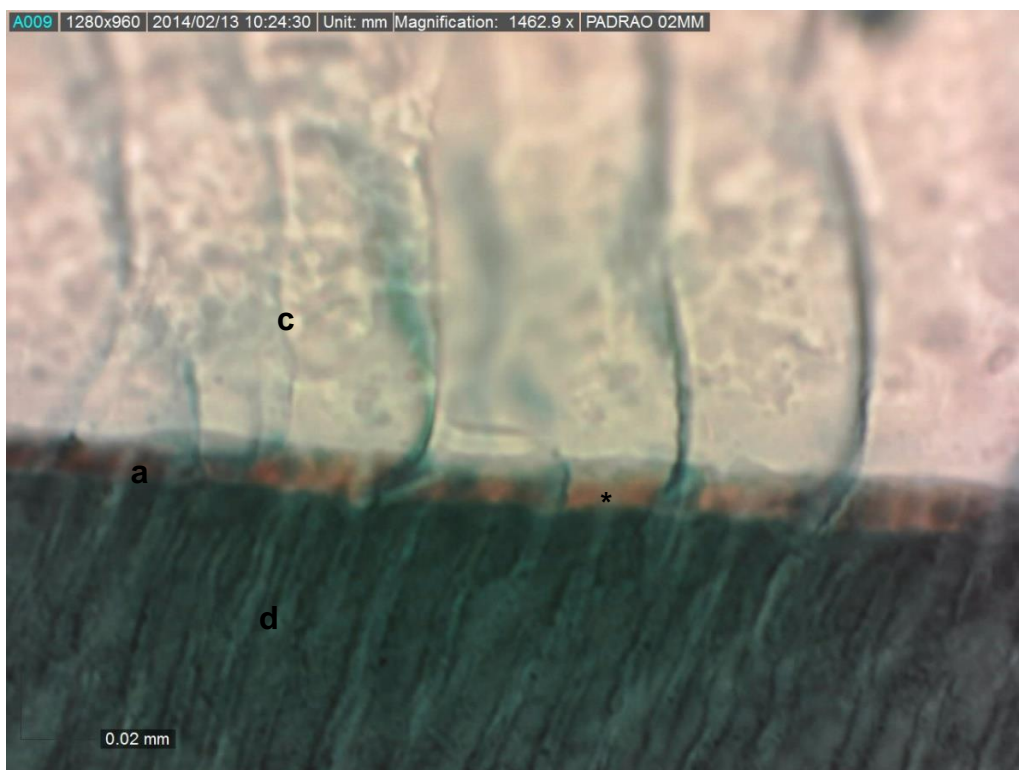


Figura 20 – Espécime de dentina hígida corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: CM+C (**Grupo 9**) . (*) colágeno hibridizado, (a) colágeno exposto, (b) dentina mineralizada, (c) adesivo.

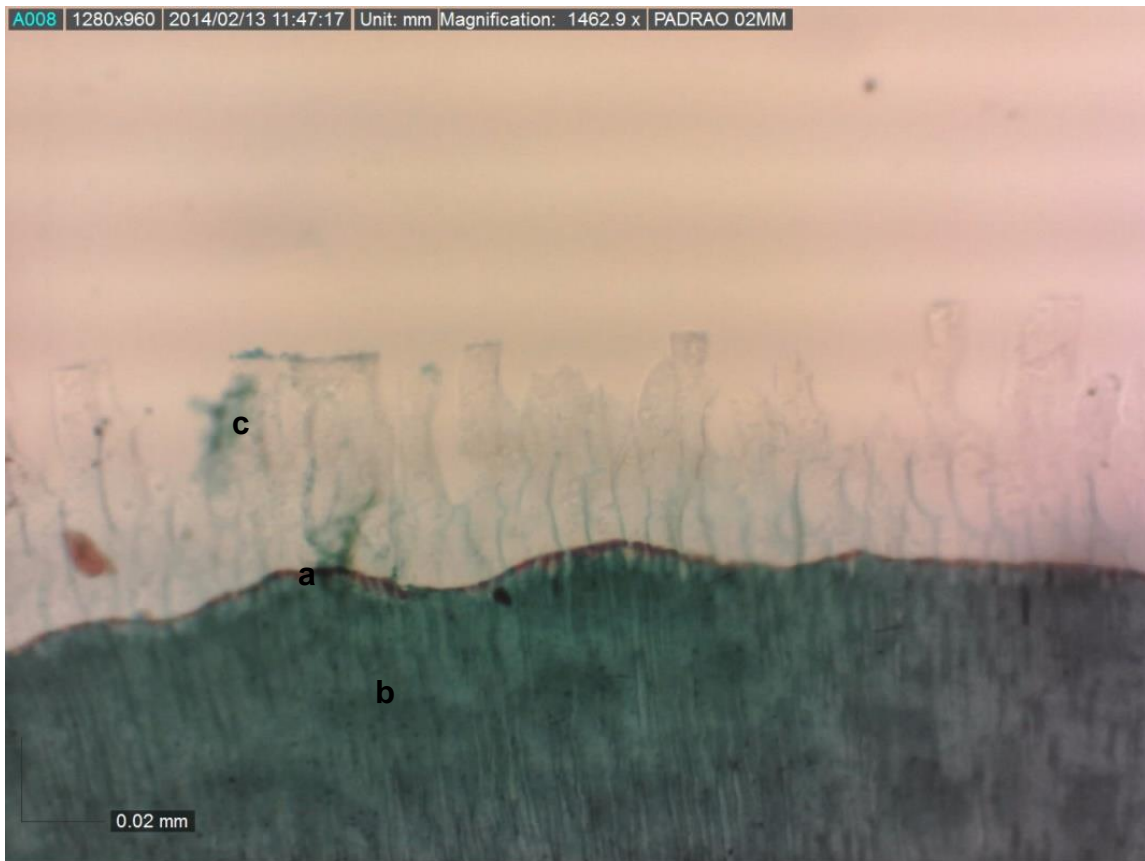


Figura 21 – Espécime de dentina cariada corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: CM+C (**Grupo 10**). (a) colágeno exposto, (b) dentina mineralizada, (c) adesivo.

A melhor condição de hibridização para ambos os substratos, foi identificada para os espécimes armazenados em CM+B (G7) (Figura 22). Resultados semelhantes foram encontrados por Sanabe (2009), onde os grupos que a zona de hibridização, corada em laranja era melhor visualizada no grupo controle, de espécimes armazenados em óleo mineral, ressaltando que a CM também é oleosa. Quanto ao óleo de copaíba ainda não há na literatura evidências para suportar esses achados. Entretanto, para Sanabe (2009), esse meio de armazenagem teve por objetivo impedir que os mecanismos de degradação enzimática e hidrolítica se manifestassem sobre a interface adesiva, o que foi confirmado quando comparados os resultados dos grupos cuja solução para armazenamento foi a água. Devido a presença de

uma solução hidrófoba, a água presente na união adesiva é gradualmente removida, impedindo a degradação hidrolítica.

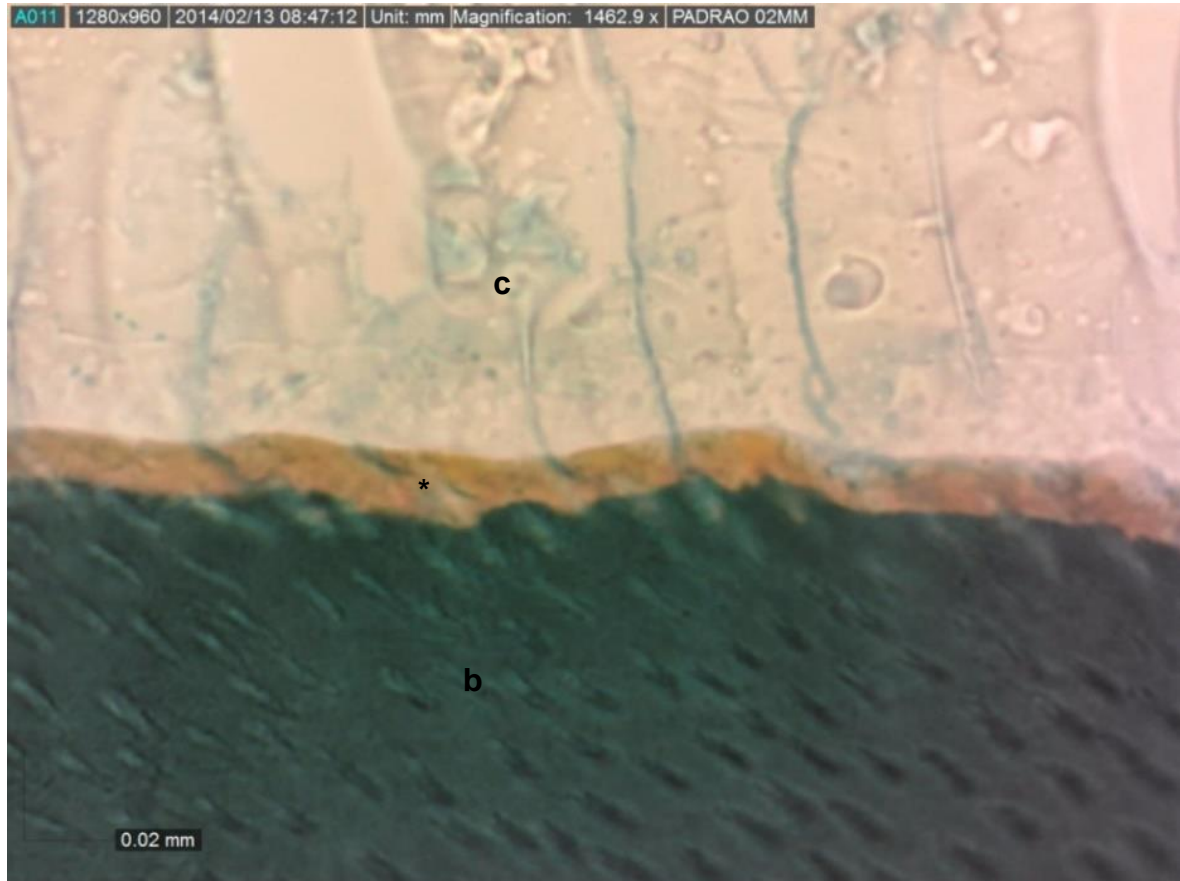


Figura 22 – Espécime de dentina hígida corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: CM+B. (*) colágeno hibridizado, (b) dentina mineralizada, (c) adesivo.

Áreas coradas avermelhadas foram observadas com mais frequência e intensidade nos grupos G10 (dentina cariada + CM+C), seguidos dos grupos G6 (dentina cariada + CM+A), G5 (dentina hígida + CM+A) (figuras 23 a 25).

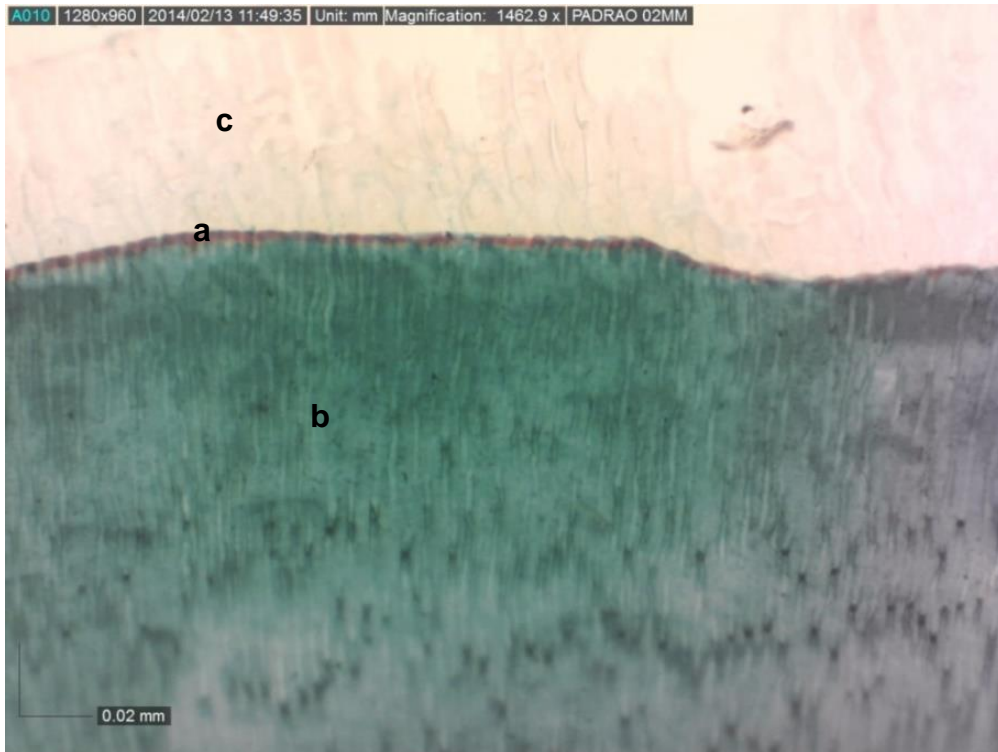


Figura 23 – Espécime de dentina cariada corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: CM+C. (a) colágeno exposto, (b) dentina mineralizada, (c) adesivo.

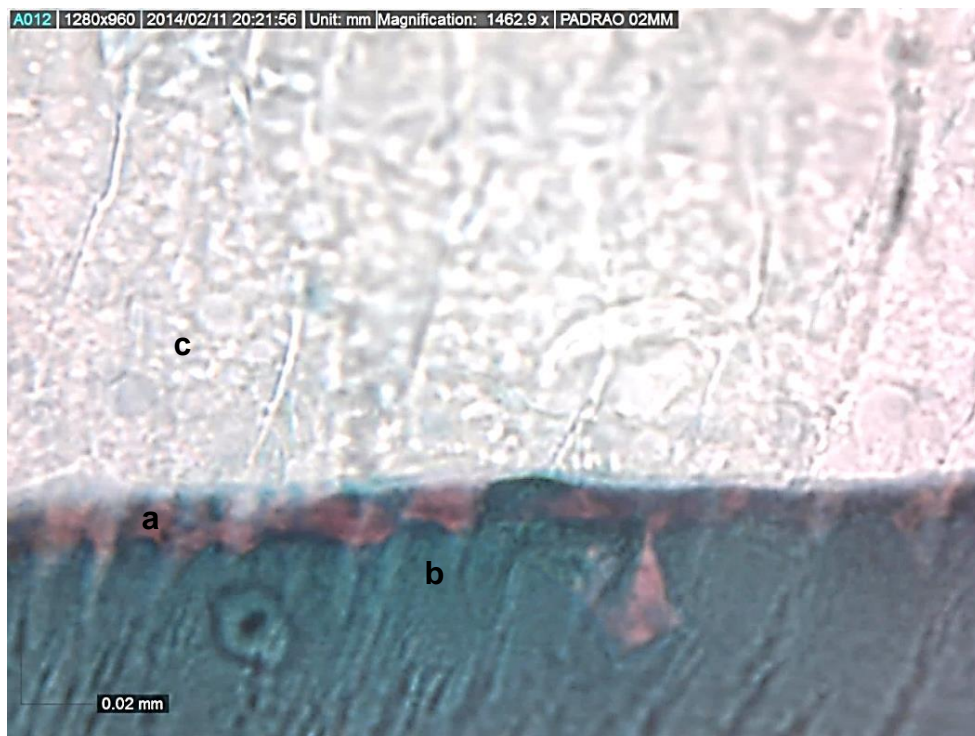


Figura 24 – Espécime de dentina cariada corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: CM+A. (a) colágeno exposto, (b) dentina mineralizada, (c) adesivo, (d) dentina desmineralizada

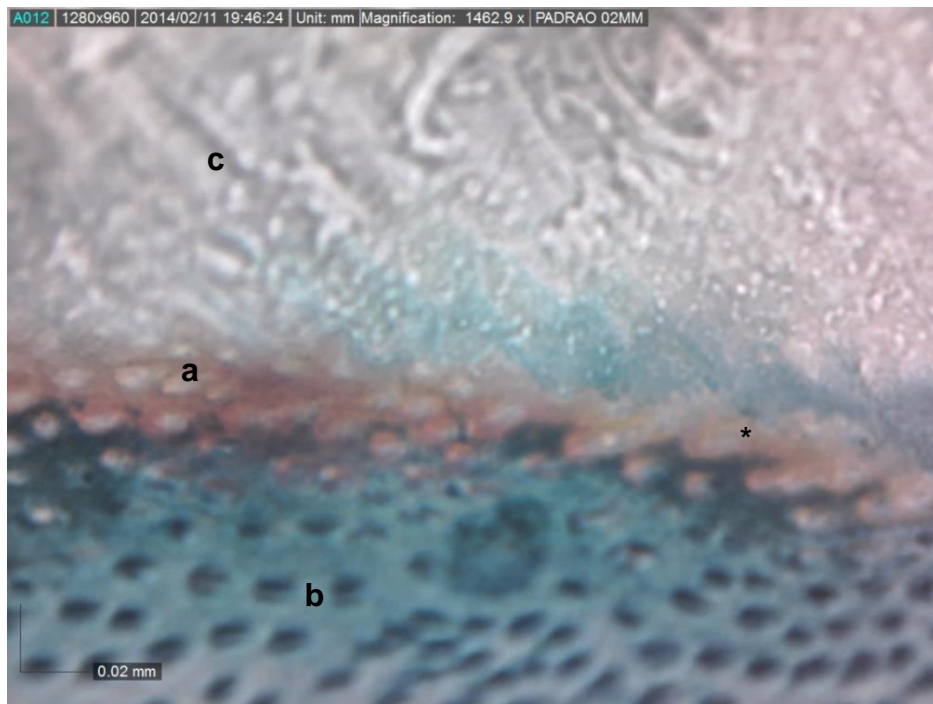


Figura 25 – Espécime de dentina hígida corado com Tricômico de Goldner. Solução teste: CM+A. (*) colágeno hibridizado, (a) colágeno exposto, (b) dentina mineralizada, (c) adesivo.

A tabela 1 e o gráfico 1 demonstram a disposição dos túbulos dentinários.

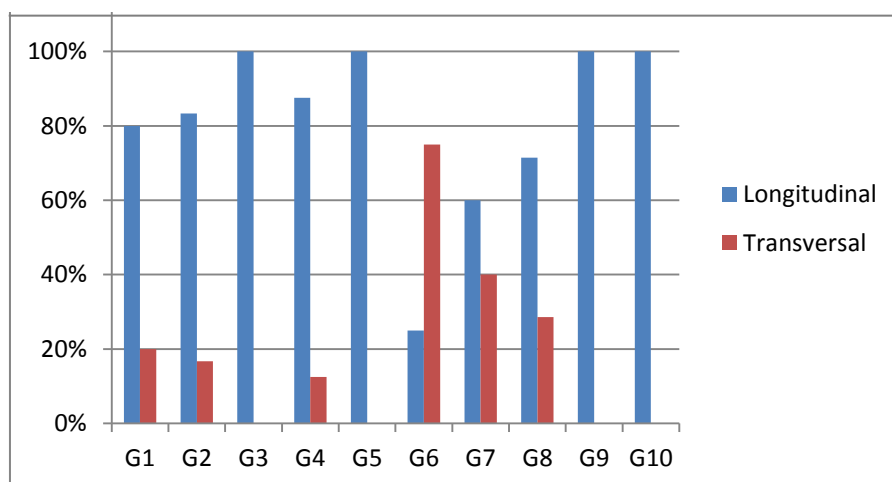


Gráfico 1 - Distribuição dos corpos de prova de acordo com a disposição dos túbulos dentinários.

Grupos	Túbulos dentinários				
	Longitudinal		Transversal		Total
	f _i	%	f _i	%	
G1 - Dentina Hígida + Água	4	80,0	1	20,0	5
G2 - Dentina Cariada + Água	5	83,3	1	16,7	6
G3 - Dentina Hígida + CLX	7	100,0	-	-	7
G4 - Dentina Cariada + CLX	7	87,5	1	12,5	8
G5 - Dentina Hígida + CM+A	5	100,0	-	-	5
G6 - Dentina Cariada + CM+A	1	25,0	3	75,0	4
G7 - Dentina Hígida + CM+B	3	60,0	2	40,0	5
G8 - Dentina Cariada + CM+B	5	71,4	2	28,6	7
G9 - Dentina Hígida + CM+C	8	100,0	-	-	8
G10 - Dentina Cariada + CM+C	7	100,0	-	-	7
Total	52	83,9	10	16,1	62

Tabela 1 - Distribuição segundo a mediana do *score* de direção dos túbulos dentinários em relação aos diferentes grupos.

Comparando a tabela 1 e o gráfico 1 e 2 é possível inferir que, não há relação entre disposição dos túbulos dentinários e favorecimento de hibridização de colágeno, tendo em vista que, apesar da semelhança nos resultados dos grupos G1 (DH + água) , G2 (DC + água) , G4 (DC + CLX) e G6 (DC + CM+A), onde a maior porcentagem de túbulos longitudinal está diretamente proporcional para a porcentagem de colágeno hibridizado, os demais grupos apresentam proporções contrárias quando comparados entre si. G5 (DH + CM+A) e G10 (DC + CM+C) por exemplo, apresentam 100% de corpos de prova com túbulos dentinários em disposição longitudinal. Destes corpos de prova, 60% (G5) e 76% (G10) apresentaram colágeno não hibridizado. Do mesmo modo G3 (DH + CLX) e G9 (DH + CM+C) apresentaram 100% de corpos de prova com túbulos dentinários em disposição longitudinal e

destes, 43% (G3) e 13% (G9) apresentaram colágeno não hibridizado. Já os grupos G7 (DH + CM+B) e G8 (DC + CM+B) apresentam respectivamente 60% e 70% de corpos de prova com túbulos em disposição longitudinal, sendo que G7 apresentou somente corpos de prova com colágeno hibridizado e G8 apresentou 43% de corpos de prova com colágeno não hibridizado.

Segundo Carrigan *et al* (1984), o número e diâmetro dos túbulos dentinários e a disposição dos mesmos depende da região da dentina analisada, como também da idade fisiológica do dente. Para Garberoglio, Brännstrom (1976) a média de túbulos por região depende da proximidade com a polpa, onde quanto mais próximo estiver da mesma, maior será o número de túbulos. No presente estudo não se estabeleceu como critério de inclusão ou exclusão um padrão de faixa etária dos pacientes cujos dentes foram utilizados para a pesquisa. Sendo assim, durante os cortes na cortadeira observou-se que alguns discos de dentina estavam mais próximos a câmara pulpar e outros mais distantes, o que pode justificar a alteração na disposição dos túbulos dentinários.

O gráfico 2 mostra que no G1 80% dos espécime apresentaram colágeno hibridizado comparando-se ao G2, que apresentou 83% de espécime com colágeno hibridizados.

Quando a solução teste foi a CLX observou-se diferença entre os diferentes tipos de substratos onde os espécimes de dentina hígida (G3) tiveram hibridização em 57% dos casos, contra 87% dos espécimes de dentina cariada (G4).

Dentre as emulsões comparando os grupos de dentina hígida a maior porcentagem em espécimes com colágeno hibridizado foi no grupo G7 (100%), seguido de G9 (87%) e G5 (40%). Em se tratando de dentina cariada a maior porcentagem para colágeno hibridizado foi para G8 (57%), seguidos de G6 (25%) e G10(14%).

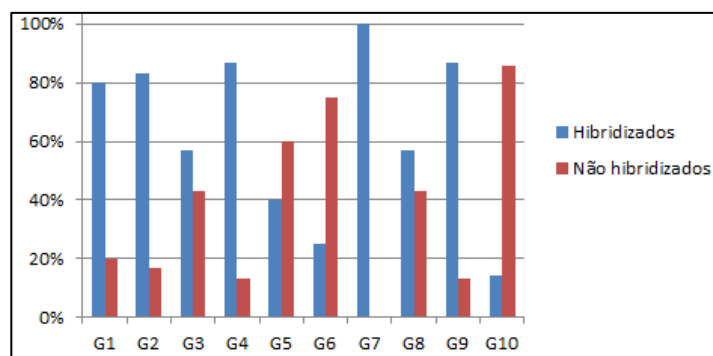


Gráfico 2 - Distribuição dos corpos de prova de acordo com a hibridização do colágeno na camada híbrida

Uma solução ideal para limpeza e desinfecção da dentina de um preparo cavitário deve possuir alguns requisitos, tais como, ser bactericida ou bacteriostático, remover resíduos, manter os tampões, ser biocompatível, de fácil aquisição e utilização (Mondelli 1998; BUSATO, 2002; BENGSTON *et al*, 2008)

Na literatura há consenso quanto à eficácia da clorexidina como agente antimicrobiano (CAVALCANTI NETO *et al*, 2005; ZANATTA *et al*, 2007; BENGSTON *et al*, 2008; KIM *et al* 2011).

Muitos estudos têm relatado que a aplicação de CLX na cavidade dentária melhora a estabilidade da camada híbrida. Acredita-se que essa melhora na durabilidade de união resina-dentina ocorre porque a CLX inibe a atividade das MMPs da matriz, a qual é responsável pela auto-degradação do

colagénio (CAVALCANTI NETO *et al*, 2005; FRANCO *et al*, 2007; CAMPOS *et al*, 2009; KIM *et al*, 2011; PEREIRA *et al*, 2011). O exato mecanismo de ação desse agente catiônico ainda não está totalmente esclarecido, porém sugere-se que devido a sua carga positiva, as moléculas de clorexidina competem com sítios das MMPs que deveriam ser ativados por íons metálicos como cálcio e o zinco, inativando dessa forma sua ação proteolítica (SANABE, 2009).

No entanto reações adversas como manchamento de dentes, restaurações, próteses e língua, alterações do paladar, motivam a pesquisa por novas soluções que não apresentem esses efeitos adversos (MAEKAWA *et al*, 2010; ZANATTA *et al*, 2007)

A armazenagem em água tem sido frequentemente utilizada como controle negativo em métodos de investigação de longevidades de interface adesiva, uma vez que a água é a responsável pela degradação hidrolítica (SANO *et al.*, 1995; NAKAJIMA *et al*, 1995; TJADERHANE *et al.*, 1998; Helbling *et al*, 2006; Pereira *et al*, 2006; SANABE *et al*, 2009; Lopes *et al*, 2009). Porém, neste estudo observou-se que, mesmo após três meses em imersão em água, os corpos de prova dos grupos G1 (dentina hígida + água) e G2 (dentina cariada + água) apresentaram, respectivamente 80% e 83% de corpos de prova com colágeno hibridizado.

Coelho (2011) avaliou a atividade antimicrobiana e a compatibilidade biológica, em molares de ratos, de emulsões de limpeza de cavidade formulada à base do CM. Baseada na metodologia empregada concluíram que as emulsões do óleo-resina da copaíba a 10% demonstraram resultados promissores para a utilização na odontologia.

Santos *et al* (2013) avaliou a citotoxicidade *in vitro* de emulsão de limpeza de cavidade restauradora. A CM+A apresentou atividade hemolítica em 50% dos fibroblasto humano MRC-5 humanos. Porém, associado com os conservantes B e C podemos observar que não ocorreu lise celular, logo não foi citotóxico, sendo um importante avanço para a formulação da emulsão a base do óleo de copaíba.

As mesmas soluções foram utilizadas em teste de microtração e microinfiltração em restauração adesiva onde concluíram que os agentes de limpeza cavitária a base de óleo de copaíba interferiram positivamente no teste de microinfiltração enquanto no teste de microtração, não tiveram diferenças significantes entre os grupos testados (Água, CLX, CM+A, CM+B, CM+C) (MENEZES, 2013).

No presente estudo, as medidas do colágeno exposto e colágeno hibridizado foi realizada por um mesmo examinador onde o teste de correlação de Pearson mostrou concordância de 0,94 para mensuração de colágeno exposto e 0,98 para mensuração de colágeno hiridizado, entre as duas leituras (Gráfico 3 e 4).

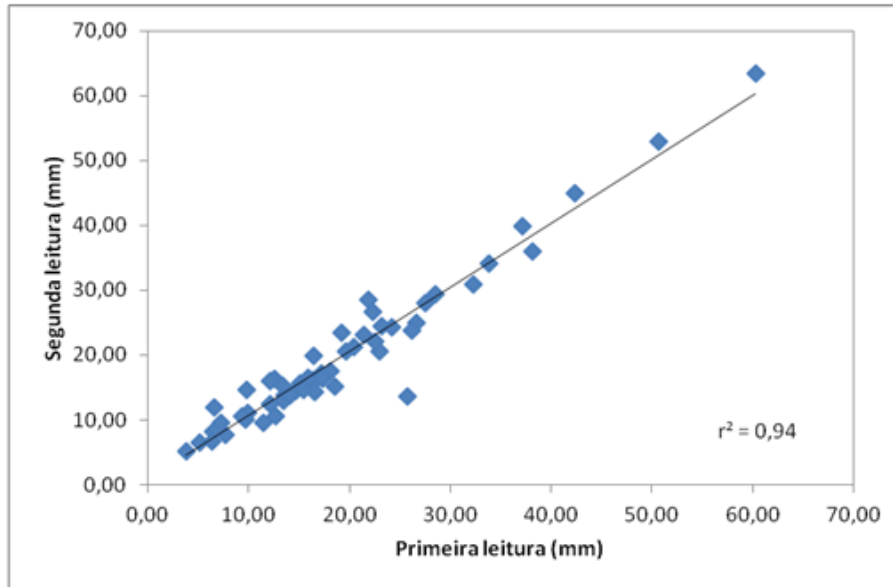


Gráfico 3 - Correlação segundo as leituras em micrometros do colágeno exposto em dois momentos pelo mesmo pesquisador.

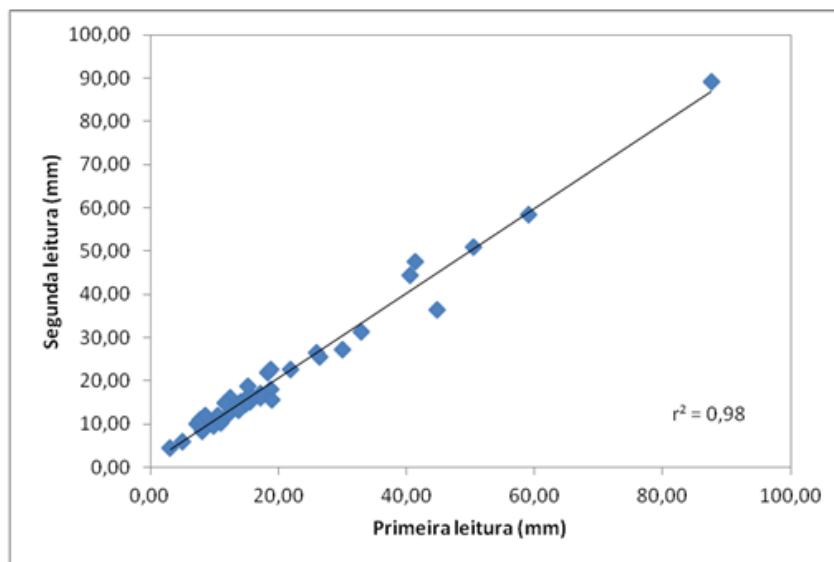


Gráfico 4 - Correlação segundo as leituras em micrometros do colágeno hibridizado em dois momentos pelo mesmo pesquisador.

Analisando comparativamente a tabela 2 e o gráfico 5, da espessura de colágeno exposto, tanto em dentina hígida e cariada, frente as emulsões teste observou-se que não houve diferença estatística para G5,G6,G7 e G9, tendo esses as maiores espessuras. Comparando as emulsões com os grupos controles nos diferentes substratos (dentina hígida e cariada) não houve diferença estatística entre as emulsões testes (G7, G8, G9 e G10) e os grupos da CLX (G3 e G4), sendo diferente dos grupos água (G1 e G2) que apresentaram menor espessura.

Grupos	Q₁	Mediana	Q₃
G5 - Dentina Hígida + CM+A	26,65	32,32 ^a	42,38
G6 - Dentina Cariada + CM+A	24,18	28,54 ^a	37,16
G7 - Dentina Hígida + CM+B	20,25	26,64 ^{ab}	30,67
G9 - Dentina Hígida + CM+C	12,17	21,49 ^{ab}	26,15
G8 - Dentina Cariada + CM+B	17,19	21,47 ^{bc}	22,95
G3 - Dentina Hígida + CLX	15,15	16,29 ^{bc}	19,22
G10 - Dentina Cariada + CM+C	12,72	15,48 ^c	17,31
G4 - Dentina Cariada + CLX	12,01	13,36 ^c	16,12
G1 - Dentina Hígida + Água	6,52	7,12 ^d	9,90
G2 - Dentina Cariada + Água	6,37	7,02 ^d	9,71

Tabela 2 - Distribuição segundo a mediana das medidas em μm do colágeno exposto em relação aos diferentes grupos. Valor de $p < 0,001$ (Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis); Q_i = Quartil.

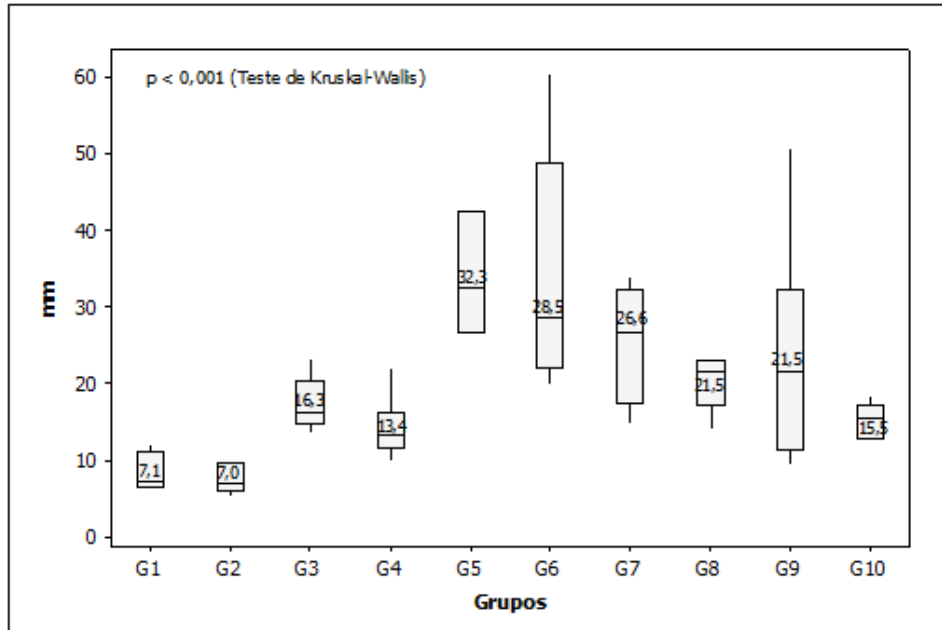


Gráfico 5. Distribuição segundo a mediana das medidas em μm do colágeno exposto em relação aos diferentes grupos.

Os dados demonstraram que não houve diferença estatística entre os grupos G7 e G9, que apresentaram maior espessura de colágeno hibridizado, havendo diferença quando 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 supracitados. Os grupos G5, G6 e G10 não foram estatisticamente analisados neste quesito por não apresentarem quantidade mínima de corpos de prova com colágeno hibridizado para análise ($n=3$).

Grupos	Q ₁	Mediana	Q ₃
G7 - Dentina Hígida + CM+B	18,79	30,09 ^a	33,00
G9 - Dentina Hígida + CM+C	8,57	18,86 ^a	41,42
G3 - Dentina Hígida + CLX	13,93	16,90 ^{ab}	22,12
G4 - Dentina Cariada + CLX	11,75	14,45 ^{ab}	17,20
G8 - Dentina Cariada + CM+B	12,10	13,72 ^{ab}	14,74
G1 - Dentina Hígida + Água	8,20	9,64 ^b	12,13
G2 - Dentina Cariada + Água	4,98	7,70 ^b	9,84

Tabela 3. Distribuição segundo a mediana das medidas em μm do colágeno hibridizado em relação aos diferentes grupos. Valor de $p = 0,006$ (Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis); Q_i = Quartil.

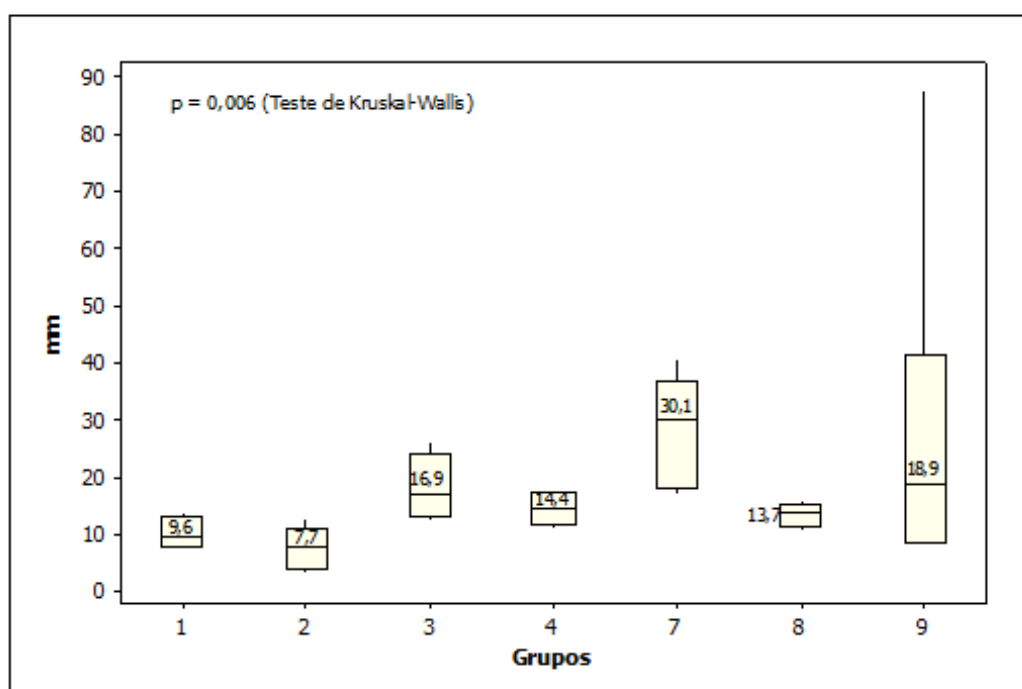


Gráfico 6. Distribuição segundo a mediana das medidas μm do colágeno hibridizado em relação aos diferentes grupos.

Observa-se no presente estudo que a concentração do conservante influenciou quantitativamente na hibridização do colágeno da camada híbrida, onde, na concentração de 0,3% (G5 e G6) não proporcionou um n amostral significativo para análise, na concentração de 0,6% destacou-se G7, sendo o único que apresentou colágeno hibridizado em todos os espécimes, e na concentração de 0,9%, G10 também não apresentou n amostral significativo para análise.

Segundo Pereira, Pinheiro (2011) a ativação das MMPs depende da queda do pH para valores abaixo de 5,5, que acarretam em perda mineral e conversão das MMPs latentes em forma ativa. Uma vez ativadas, seria necessário inativar essas MMPs, através do uso de soluções de limpeza para que o colágeno pudesse ser impregnado pelo sistema adesivo. Dentre as soluções testadas, somente as emulsões dos grupos G5 (DH + CM+A) e G6 (DC + CM+A) apresentaram pH 5. Esse fator justificaria o fato de a quantidade de copos de prova com colágeno hibridizado não ter sido significativa para estes grupos. As demais soluções apresentaram os seguintes pH: água destilada e CLX - pH7, CM+B e CM+C - pH 6.

Considerando a espessura de colágeno exposto, esses resultados diferem dos apresentados por Haj-Ali *et al* (2006) e Sanabe *et al* (2009), onde os autores, utilizando a mesma coloração histológica, observaram espessura da zona de colágeno exposta significativamente menos espessa, tanto em dentina afetada por cárie quanto em dentina hígida. No primeiro estudo, a espessura média da zona de colágeno exposto observada para dentina afetada por cárie foi de 8,6 μ m enquanto para dentina hígida foi de 6,01 μ m ($p=0,042$).

O estudo de Sanabe *et al* (2009) obteve média de espessura de colágeno exposto inferiores onde foram observadas, 2,99 μ m e 2,30 μ m para dentina afetada por cárie e dentina hígida. Respectivamente a diferença de valores entre os dois estudos pode ser atribuída ao fato de o estudo de Haj-Ali *et al* (2006) ter utilizado método químico de armazenagem de espécie em solução ácida tamponada (pH 4,5) para desmineralização de dentina, além da utilização de ácido fosfórico a 38%. Já o trabalho de Sanabe *et al* (2009) utilizou um método microbiológico para a produção de lesões artificiais de cárie e como agente desmineralizante de dentina, o ácido fosfórico a 35%.

O presente estudo, utilizou a mesma metodologia de Sanabe *et al* (2009). No entanto, durante a fase de processamento histológico, os espécimes ficaram imersos em solução de morse (solução descalcificante) por aproximadamente 10 dias, até que os mesmos apresentassem uma dureza adequada, de acordo com o Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Amazonas, onde a pesquisa foi desenvolvida. Nesse quesito, a metodologia de Sanabe preconiza a imersão dos corpo de prova em solução de morse por 48h somente. Acredita-se que o maior tempo de imersão na solução citada possa ter levado a uma maior exposição das fibrilas colágenas.

De acordo com Nakajima *et al* (1995), os condicionamentos ácidos testados em seu estudo, foram capazes de demineralizar da mesma forma ou mais a dentina afetada por cárie em comparação à dentina normal. Uma vez que os sistemas adesivos testados infiltraram mais em dentina afetada por cárie, foi produzido camada híbrida mais espessa. Mesmo assim obteve-se menor resistência a tração em dentina afetada por cárie, quando comparada a dentina hígida, sugerindo que existe pouca correlação entre a espessura da camada híbrida e a força de resistências adesivas.

Menezes *et al* (2013) utilizando espécimes de dentina hígida, não obteve diferença estatisticamente significando em relação à resistência a tração e microinfiltração quando comparados grupos que utilizaram como solução de limpeza de cavidade: água, clorexidina 2%, CM + A, CM + B, CM + C.

Considerando espessura de colégeno exposto, hibridizado e qualidade de camada híbrida sugere-se que a homogeneidade da camada híbrida é mais importante do que a espessura podendo proporcionar maior resistência adesiva nas restaurações (HORI, 2012). Essa homogeneidade de camada foi mais claramente observada histologicamente no grupo G7 (DH + CM B) (figura 26 A e B).

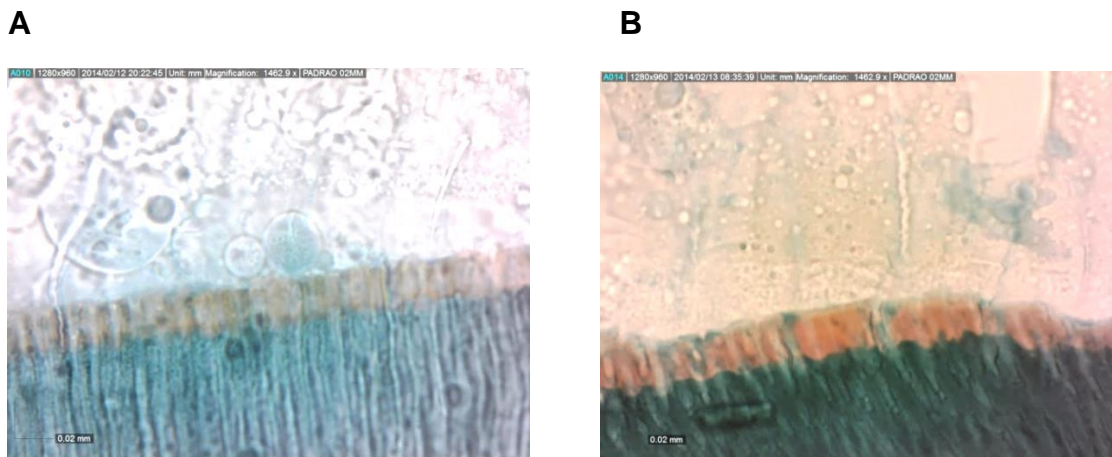


Figura 26 – Homogeneidade da camada híbrida em espécimes de dentina hígida tratados com CM+B (A e B).

Clinicamente na remoção de tecido cariado onde deve-se deixar a dentina passível de remineralização, no fundo da cavidade, e remover totalmente das paredes laterais, até que se obtenha uma dentina hígida, para permitir adequado selamento, é possível, no futuro, a viabilidade da emulsão

de copaíba com conservante B, em comparação com a clorexidina 2%, por ter apresentado melhor resultado em relação a hibridização do colágeno.

As características físicas e químicas da dentina afetada são diferentes da dentina hígida. A dentina afetada por cárie apresenta-se menos densa do que a dentina hígida, porque é parcialmente desmineralizada. O interior da dentina peritubular apresenta cristais dispersos e distribuídos aleatoriamente, com maiores cristais de apatita e espaços intercristalinos mais amplos em comparação com a dentina hígida. Além disso, a maioria dos túbulos de dentina afetada por cárie são obliterados com depósitos de cristais de fosfato de cálcio. (NAKAJIMA *et al* 1999; PEREIRA, 2007; EASHARDT *et al*, 2008).

O aumento da porosidade da dentina intertubular da dentina afetada por cárie em comparação à dentina hígida ocorre devido à sua desmineralização parcial. Em função dessas características, há menos minerais a ser removidos pelo condicionamento ácido em adição a menor resistência oferecida pelo tecido contra a difusão desse agente, o que resulta em desmineralização mais profunda do substrato. A penetração adequada dos sistemas adesivos torna-se menor à medida que a profundidade dessa desmineralização aumenta, em função das limitações inerentes à infiltração monomérica dessa zona (NAKAJIMA *et al*, 1995; SANABE, 2009, RICCI, 2011).

Essa menor impregnação do adesivo e maior obliteração dos túbulos em dentina afetada por cárie poderia justificar os maiores resultados em espessura obtidos nos grupos de dentina hígida do presente estudo.

Os resultados encontrados com CM+B (G7 e G8) são semelhantes aos resultados encontrados nos grupos tratados com CLX, demonstrando que esta emulsão apresenta viabilidade de uso na odontologia, necessitando ainda de mais pesquisas afim de elucidar sua aplicação clínica quanto a interferência nas propriedades dos materiais restauradores.

Conclusão

Com base nos resultados da metodologia empregada pode-se concluir que:

- Os espécimes tratados com as emulsões a base de copaíba apresentaram maior espessura de colágenos exposto e hibridizado que os grupos tratados com clorexidina e água.
- Comparando a CLX às CM, observou-se que, para dentina hígida, o grupo tratado com CM+B apresentou a melhor condição de hibridização. Em relação à dentina cariada, os grupos tratados com CLX apresentou maior proporção de colágeno hibridizado.
- Os corpos de prova do grupo de DH + CM+B apresentaram qualitativamente melhor homogeneidade da camada híbrida quando comparadas as demais soluções/emulsões teste.
- Necessário se faz realizar mais pesquisas envolvendo resistência mecânica e química utilizando as soluções teste desse estudo de acordo com os diferentes substratos dentinários, assim como analisar em MEV a qualidade da união resina-dentina. Ainda, sugere-se que seja feita análise zimográfica das soluções testadas para verificar sua ação nas metaloproteinases presentes no substrato dentinário.

REFERÊNCIAS

ARANA, V. KATCHABURIAM E. Complexo dentina polpa. In: Histologia e Embriologia Oral, São Paulo: Panamericana, 1999. 181-236.

ARANGO, H. G. Bioestatística Teórica e Computacional, Guanabara Koogan, 2001.

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

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

BENGTSON, C. R. G. *et al.* Efeito da Clorexidina 2% na Resistência de União de Dois Sistemas Adesivos à Dentina Humana. Pesq Bras Odontoped Clin Integr, v.8, n.1, p,51-56, 2008.

BEZERRA, S. L. J.; LIMA, R. S. L. A participação bioquímica da dieta no processo cariogênico, Revista RECCS, n. 10, p. 99-101, 1998.

BORRÁS, M.R.L. Plantas da Amazônia: Medicinais ou mágica? – Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa. Manaus: Valer/Governo do Estado do Amazonas, 2003. 322p

BRASIL . Decreto nº 5.813, de 22 de jun. de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 6 de 31.01.1995. Regulamenta o registro de fitoterápicos. Diário Oficial da União, 1995.

BRESCHI, L. *et al.* Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer., Dental Materials, p. 571–578, 2010.

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

CAMPOS, E. A. *et al.* Influence of chlorhexidine concentration on microtensile bond strength of contemporary adhesive systems. *Braz Oral Res.* v.23, n.3, p.340-5. 2009.

CARRIGAN, P. J. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J of Endod.* v.10, n.8, p. 359-63. 1984.

CAVALCANTI NETO, A. T. *et al.* Análise comparativa entre o óleo-resina de copaíba e o digluconato de clorexidina no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. *Revista de Odontologia da UNESP*, v.34, n. 2, p. 107-112, 2005.

COELHO, C. N. Emulsões amazônicas bioativas para limpeza do preparo cavitário: atividade antibacteriana, citotoxicidade, alteração de cor e compatibilidade biológica. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

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

DOI, R. K. *et al.* O papel das metaloproteinases no desenvolvimento de lesões cáries. *Odontol. Clín.-Cient.*, p. 473-475, 2011.

Erhardt MC, Osorio R, Toledano M. Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin. *J Dent.* v. 36, p.1068-73, 2008.

EVANGELISTA, S. S. *et al.* Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.15, n.4, p.513-519, 2013.

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

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

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

Haj-Ali, R. *et al*, Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. J Prosthodont, v.15, p.82-33, 2006.

HECK, M. C. *et al*, IMPORTÂNCIA DO ÓLEO DE *Copaifera* sp. (COPAÍBA), SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.7, n.1, p.82-90, 2012.

HEBLING, J. *et al*, Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. J Dent Res. v.84, p.741-746, 2005.

GARBEROGLIO, R.; BRANNSTROM, M., Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. Arch Oral Biol., v. 21, p.355-62, 1976.

ISMAIL, A.I.*et al*. Predictors of Dental Caries Progression in Primary Teeth. J Dent Res, v.88, n.3, p. 270-275, 2009.

KIM, D. *et al*. The influence of chlorhexidine on the remineralization of demineralized dentine. Journal of Dentistry, p. 855-862, 2011.

LIMA, G. R. Avaliação do efeito de bioativos amazônicos para limpeza de cavidades na lama dentinária: estudo ultra-estrutural em microscopia eletrônica de varredura. 2011. Monografia (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

MANSO, A. P. Avaliação da associação da clorexidina com etanol na durabilidade da adesão à dentina. 2009. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MAEKAWA, L. E. *et al*. Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais sem álcool à base de clorexidina sobre *Candida albicans*. Revista de Odontologia da UNESP. v. 39, n.1, p. 15-19, 2010.

MENEZES, M. S. C. Agentes de limpeza cavitária: estudo comparativo da microinfiltração marginal e microtração em restaurações adesivas. 2013. Monografia (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

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

NAKABAYASHI, N. The hybrid layer: A resin-dentin composite. Proc Finn Dent Soc, v.88, n. 1, p.322- 329, 1992.

NAKAJIMA, M. *et al.* Tensile Bond Strength and SEM Evaluation of Caries-affected Dentin Using Dentin Adhesives. J Dent Res., v. 74, n.10, 1995.

OLIVEIRA, F. Q. *et al.* Espécies vegetais indicadas na odontologia, Revista Brasileira de Farmacognosia, V.17, n.3, p. 466-476, 2007.

PASHLEY, D. H. *et al.* Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. J Dent Res, v.83, p.216-21. 2004.

PERDIGAO J, LAMBRECHTS P, VAN MEERBEEK B, TOME AR, VANHERLE G, LOPES AB. Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. Dent Mater, v.12, p. 262-71. 1996.

PEREIRA PN, NUNES MF, MIGUEZ PA, SWIFT EJ, Jr. Bond strengths of a 1-step selfetching system to caries-affected and normal dentin. Oper Dent. v. 31, p.677-81, 2006.

PEREIRA, D. R.; PINHEIRO, S. L. Avaliação da influencia das metaloproteinases (MMPs) na hibridização da dentina cariada. Anais do XVI Encontro de Iniciação Científica e I Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da PUC-Campinas. 2011.

PIERI, F. A. *et al.* Bacteriostatic Effect of Copaiba Oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. Braz Dent J, v. 23, n.1, p.36-38, 2012.

RICCI, H. 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., v. 20, n.53, p. 119-24.

SANABE, M. E.. Efeito da inibição de metaloproteinases da matriz dentinária na produção e estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista. Araraquara. São Paulo.

SANO H, *et al.* Comparative SEM and TEM observations of nanoleakage within the hybrid layer. Oper Dent., v. 20, p.160-7, 1995.

SANTOS, A. P. M. *et al.* Um sintoma preocupante: a hipersensibilidade dentinária. Rev. bras. odontol., Rio de Janeiro, v. 67, n. 2, p.242-6, 2010.

SANTOS, J. S. S. citotoxicidade de emulsão de limpeza de cavidade à base de óleo de copaíba (*copaifera multijuga*). 2013. Projeto de Iniciação Científica (PIBIC) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

TAUFNER, C. F. *et al.* Uso de plantas medicinais como alternative fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Tereza e Marilândia, ES. Natureza on line. v. 4, n.1, p. 30-39. 2006.

TEN CATE, A. R. Histologia e Embriologia Dental – Desenvolvimento, Estrutura e Função. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

Tjaderhane,L. *et al.* The activation and function of host matrix Metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. J Dent Res., v. 77, p. 1622-9, 1998.

TOLEDO, A.C.O. *et al.* Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. Revista Lecta, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

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

VASCONCELOS, K.R.F.; JUNIOR, V.F.V.; ROCHA, W.C.; BANDEIRA, M.F.C.L. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18 (Supl.), p. 733-738, Dez. 2008.

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

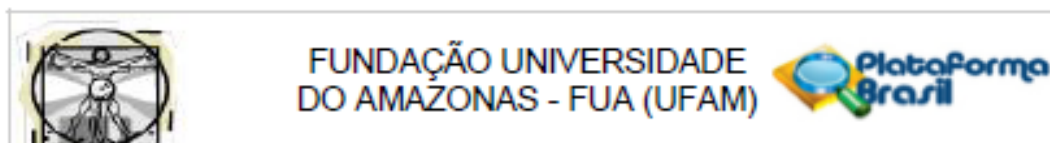
VIEIRA, S., *Bioestatística, Tópicos Avançados*. Rio de Janeiro. 2.ed. RJ: Elsevier, 2004.

VINAGRE, N. P. L. *et al.* Clinical efficacy of a phytotherapeutic mouthrinse with standardized tincture of *Calendula officinalis* in the maintenance of periodontal health. Revista de Odontologia da UNESP. v. 40, n. 1, p. 30-35, 2011.

ZANATTA, F. B.; ROSING, C. K. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. Scientific-A, v.1, n.2, p.35-43,2007.

ANEXOS

Anexo A - Aprovação do Comitê



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EMULSÕES CONTENDO BIOATIVOS AMAZÔNICOS: AVALIAÇÃO DO EFEITO NA METALOPROTEÍNASE E NO COLÁGENO DA DENTINA

Pesquisador: MARIA FULGÊNCIA COSTA LIMA BANDEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13329213.9.0000.5020

Instituição Proponente: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 244.526

Data da Relatoria: 03/04/2013

Apresentação do Projeto:

Após a desmineralização da dentina ocorrem significantes alterações levando a alterações na propriedade de adesão deste substrato, que são seguidas por outras transformações causadas pela aplicação de substâncias químicas durante os procedimentos adesivos. Dentre essas transformações pode-se citar como exemplo a ativação de metaloproteinases (MMPs) presentes na matriz dentinária após condicionamento ácido. As MMPs são classificadas como endopeptidases zinco cálcio dependentes e são capazes de degradar os componentes da matriz extra-celular. Uma maneira de prevenir a ação das metaloproteinases sobre o colágeno e prevenir a degradação da interface adesiva seria por meio do emprego de inibidores que impedissem a ativação dessas enzimas, tornando-a inócua ao colágeno exposto. A produção de uma solução de limpeza de cavidades à base de óleo de copaíba *Copaifera multijuga* (CM) viabilizará sua utilização nos preparos cavitários previamente à inserção do material restaurador. Devido às propriedades antimicrobianas, acredita-se que essa solução poderá contribuir na diminuição da incidência de cárie recorrente. Além disso, proporcionará a comprovação da eficácia de princípios ativos de um fitoterápico da biodiversidade amazônica e a viabilidade de sua introdução na Odontologia. Nesse sentido, baseados nos resultados das pesquisas realizadas evidenciando atividade antibacteriana, compatibilidade biológica, aceitabilidade nos testes de alteração de cor em dentes humanos das emulsões de CM, essa pesquisa se propõe a avaliar o efeito das soluções à base de CM na degradação do colágeno e na inibição de metaloproteinase da matriz dentinária. Para avaliar a

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)



exposição de fibras colágenas serão utilizados vinte e dois terceiros molares hígidos, que após profilaxia adequada, receberão preparo de superfície. Metade dos dentes selecionados sofrerão indução de cárie. Cada dente fornecerá três espécimes, totalizando 64 espécimes viáveis divididos em 8 grupos de acordo com o tipo de substrato e solução de limpeza de cavidade empregada. Os corpos de prova passarão por processamento histológico. Para análise da reprodutibilidade do examinador será utilizado o teste de correlação de Pearson. 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 comparação múltiplas de Tukey. Todos os testes serão considerados ao nível de significância de 5% e serão realizados no programa estatístico SPSS 20. O ação de inibição das emulsões de CM sobre a metaloproteinase presente na dentina serão quantificada através de análise zimográfica.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Esta pesquisa se propõe a avaliar o efeito das soluções à base de CM na degradação do colágeno e na inibição de metaloproteinase da matriz dentinária.

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito da CM e clorexidina a 2% quanto à inibição de MMPs da matriz dentinária em dentina afetada por cárie e dentina hígida associadas ao sistema adesivo.

Objetivo Secundário:

Identificar a zona de colágeno exposta na base da união resina dentina afetada por cárie, dentina hígida, produzida após a utilização de solução de CM e clorexidina. Verificar a ação da solução de CM sobre as metaloproteinases da matriz dentinária afetada por cárie e hígida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os elementos dentários a serem utilizados na pesquisa serão extraídos por razões ortodônticas ou cirúrgicas, obtidos através do banco de dentes 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:

O possível uso de uma solução de lavagem de cavidades à base de copalba para inibição da ação de metaloproteinases presentes na dentina viabilizará sua utilização nos preparos cavitários previamente à inserção do material restaurador. Devido às propriedades antimicrobianas, acredita-se

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)



que essa solução poderá contribuir na diminuição da incidência de cárie recorrente, principalmente se propiciar melhora na adesão do material restaurador. Além disso, proporcionará a comprovação da eficácia de um fitoterápico da biodiversidade amazônica e a viabilidade de sua introdução na Odontologia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

1- Metodologia: Trata-se de um estudo do tipo laboratorial *in vitro* que visa analisar o efeito das soluções à base de óleo de copaíba na degradação do colágeno e na inibição de metaloproteinase da matriz dentinária. A pesquisa será realizada em Manaus, na Faculdade de Odontologia, no Laboratório de Pesquisa do Curso de Odontologia e no Laboratório de Tecnologia do DNA da Universidade Federal do Amazonas. Serão necessários 44 terceiros molares hígidos selecionados aleatoriamente, fornecidos pelo banco de dentes da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas. Desta forma, considerando que os dentes serão disponibilizados pelo Banco de Dentes da FAO e o mesmo encontra-se autorizado pela Unidade, solicitamos DISPENSA do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a este respeitoso Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UFAM. O possível uso de uma solução de lavagem de cavidades à base de copaíba para inibição da ação de metaloproteinases presentes na dentina viabilizará sua utilização nos preparos cavitários previamente à inserção do material restaurador. Devido as propriedades antimicrobianas, acredita-se que essa solução poderá contribuir na diminuição da incidência de cárie recorrente, principalmente se propiciar melhora na adesão do material restaurador. Além disso, proporcionará a comprovação da eficácia de um fitoterápico da biodiversidade amazônica e a viabilidade de sua introdução na Odontologia.

2- Critério de Inclusão:

Serão utilizados 44 terceiros molares humanos hígidos, extraídos por razões cirúrgica, livres de cáries, restaurações, que apresentem coroas sem áreas hipoplásicas, trincas e/ou fraturas.

Critério de Exclusão:

Não serão utilizados terceiros molares humanos que apresentem lesões cariosas, cavidades ou não, com restaurações., que apresentem coroas com áreas hipoplásicas, trincas e/ou fraturas.

3- Cronograma : adequado.

4- Orçamento: adequado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto. Adequada

TCLE - Dispensa

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)



Termo de anuência - Adequado

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, considerando que o protocolo de pesquisa atende à Resolução 196/96 e complementares, somos pela **APROVAÇÃO** do mesmo.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

MANAUS, 12 de Abril de 2013

Assinador por:
Ana Paula Pessoa de Oliveira
(Coordenador)

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

Anexo B - Declaração do Banco de Dentes da FAO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
FACULDADE DE ODONTOLOGIA-FAO
BANCO DE DENTES HUMANOS-BDH

DECLARAÇÃO

Para fins de documentação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), o Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas auxiliou este projeto de pesquisa por meio da APROVAÇÃO de um empréstimo de 44 terceiros molares permanentes para a execução do trabalho de pesquisa com o título preliminar: "EMULSÕES CONTENDO BIOATIVOS AMAZÔNICOS: AVALIAÇÃO DO EFEITO NA METALOPROTEÍNASE E NO COLÁGENO DA DENTINA" a ser realizado pela equipe de pesquisadores: Joyce Meira e Maria Fulgência Costa Lima Bandeira, no âmbito do curso de Mestrado em Odontologia da UFAM.

Os dentes serão entregues para o pesquisador somente após a apresentação do comprovante de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFAM (CEP).

Orientações:

1. Solicitamos que após o término do experimento, os dentes sejam devolvidos para este Banco de Dentes para que o descarte seja realizado segundo as normas de biossegurança da instituição.
2. Citar em todas as publicações o número de dentes utilizados no trabalho e que foram originários do BDH-FAO-UFAM;
3. Citar o n. do protocolo de aprovação do CEP da UFAM;
4. Enviar uma cópia do(s) trabalho(s) de publicação onde for mencionado o BDH-FAO-UFAM e CEP UFAM.

Manaus, 20 de dezembro de 2012.



Prof. Emilio Carlos Sponchiado Jr
Coordenador do Banco de Dentes Humanos

APÊNDICE

Apêndice A – Análise dos patologistas

	Aspectos técnicos			Colágeno Hibrizado		Colágeno Não hibrizado
				Parcial	Total	TOTAL
Lâmina	Adesivo	Camada colágeno	Túbulos dentinários			
1.1						
1.2	P	P	L	X		
1.3	P	P	L	X		
1.4	P	P	L			X
1.5	P	P	L		X	
1.6						
1.7	P	P	T	X		
1.8						
2.1	P	P	L	X		
2.2	P	P	T	X		
2.3	P	P	L			X
2.4						
2.5						
2.6	P	P	L	X		
2.7	P	P	L	X		
2.8	P	P	L	X		
3.1	P	P	L		X	
3.2	P	P	L	X		
3.3	P	P	L			X
3.4	P	P	L			X
3.5	P	P	L	X		
3.6						
3.7	P	P	L	X		
3.8	P	P	L			X
4.1	P	P	L	X		
4.2	P	P	L	X		
4.3	P	P	L	X		
4.4	P	P	T	X		
4.5	P	P	L			X
4.6	P	P	L	X		
4.7	P	P	L	X		
4.8	P	P	L	X		
5.1	P	P	L		X	
5.2	P	P	L		X	

	Aspectos técnicos			Colágeno Hibridizado		Colágeno Não hibridizado
				Parcial	Total	TOTAL
Lâmina	Adesivo	Camada colágeno	Túbulos dentinários			
5.1	P	P	L		X	
5.2	P	P	L		X	
5.3						
5.4						
5.5	P	P	L			X
5.6						
5.7	A	P	L			X
5.8	P	P	L			X
6.1						
6.2						
6.3	P	P	L			X
6.4	P	P	T			X
6.5	P	P	T	X		
6.6						
6.7						
6.8	P	P	T			X
7.1						
7.2						
7.3	P	P	L		X	
7.4	P	P	T	X		
7.5	P	P	L	X		
7.6	P	P	L	X		
7.7						
7.8	P	P	T	X		
8.1						
8.2	P	P	T	X		
8.3	P	P	L			X
8.4	P	P	T	X		
8.5	P	P	L			X
8.6	P	P	L			X
8.7	P	P	L	X		
8.8	P	P	L	X		
9.1	P	P	L			X
9.2	P	P	L	X		
9.3	P	P	L	X		
9.4	P	P	L		X	
9.5	P	P	L	X		
9.6	P	P	L		X	
9.7	P	P	L		X	
9.8	P	P	L	X		

	Aspectos técnicos			Colágeno Hibridizado		Colágeno Não hibridizado
				Parcial	Total	TOTAL
Lâmina	Adesivo	Camada colágeno	Túbulos dentinários			
10.1	P	P	L			X
10.2	P	A	L			
10.3	P	P	L	X		
10.4	P	P	L			X
10.5	P	P	L			X
10.6	P	P	L			X
10.7	P	P	L			X
10.8	P	P	L			X

Legenda: P – Presente, L – Longitudinal, T – Transversal, Espécime fora do padrão para análise (ausência de adesivo ou camada de colágeno).