

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

CONTROLE DE QUALIDADE E AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA
HOMOGENEIDADE DA CAMADA HÍBRIDA DA DENTINA EM MEV DE
SOLUÇÕES CONTENDO BIOATIVOS AMAZÔNICOS PARA LIMPEZA
DE CAVIDADE DENTINÁRIA

Bolsista: Luisa Rissoni Santos Machado, CNPq

MANAUS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0111/2013

CONTROLE DE QUALIDADE E AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA
HOMOGENEIDADE DA CAMADA HÍBRIDA DA DENTINA EM MEV DE
SOLUÇÕES CONTENDO BIOATIVOS AMAZÔNICOS PARA LIMPEZA
DE CAVIDADE DENTINÁRIA

Bolsista: Luisa Rissoni Santos Machado, CNPq

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

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Andréa Corrêa Garcia Simões

MANAUS

2014

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa de Dentística- UA da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas.

RESUMO

O Brasil destaca-se por ser detentor de grande biodiversidade, porém as pesquisas sobre fitoterápicos ainda são deficientes, principalmente na área odontológica. Desta forma, este trabalho analisou as características físico-químicas de uma emulsão à base de óleo de copaíba para limpeza de cavidade dentinária através do controle de qualidade, obedecendo às legislações vigentes, bem como avaliou em microscopia eletrônica de varredura (MEV) a homogeneidade da camada híbrida formada após a utilização desta emulsão. Para o controle de qualidade, as emulsões-teste foram armazenadas em diferentes ambientes e avaliadas em diferentes períodos experimentais. Realizaram-se, nestas emulsões, testes de centrifugação, determinação de pH, densidade relativa, avaliação microbiológica e dos caracteres organolépticos. Para avaliação do MEV, foram utilizados 30 terceiros molares, sendo 15 hígidos e 15 com indução de cárie. Após a preparação dos dentes, as emulsões-teste e controle foram aplicadas. Em seguida, realizou-se aplicação do adesivo e tramitação histopatológica. Selecionaram-se 10 lâminas, uma de cada grupo, as quais foram analisadas quanto à espessura e homogeneidade da camada híbrida. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA e teste de Bonferroni na avaliação do pH e na densidade relativa foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido da comparação múltipla das médias utilizando o Teste de Dunn ($\alpha = 0,05$). Os demais testes receberam análise descritiva. Na centrifugação, não foi observado separação de fases no tempo 0, freezer, geladeira e ar-condicionado, enquanto que nos outros ambientes houve separação de fases; no teste de pH o ambiente de armazenamento estufa e temperatura ambiente ao abrigo da luz apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (tempo 0), na densidade ocorreu diferença estatística em relação ao grupo controle no armazenamento em estufa; na avaliação microbiológica não houve crescimento bacteriano; na avaliação dos caracteres organolépticos, houve apenas alteração da coloração da emulsão armazenada em estufa. No MEV, independente das soluções de limpeza, os grupos com dentina hígida apresentaram formação predominante de camada híbrida fina, nos grupos de dentina afetada houve formação predominante de camada híbrida grossa. Nos grupos controle água destilada (G1, G2) e digluconato de clorexidina (G3 e G4) houve formação de camada híbrida descontínua, nos grupos da emulsão à base de óleo de copaíba com conservante a 0,3% (G5 e G6) e 0,9% (G9 e G10) houve formação de camada híbrida contínua, nos grupos de emulsão com conservante a 0,6% (G7 e G8) houve formação de camada híbrida contínua e descontínua, respectivamente. Conclui-se que, dentre as propriedades físico-químicas, há necessidade de adequação de pH, para torná-lo mais básico. Considerando a clínica diária o melhor ambiente de armazenamento é a geladeira. Quanto ao MEV, na maioria das emulsões-teste houve formação de camada híbrida contínua, sugerindo que os resultados obtidos foram superiores aos resultados do digluconato de clorexidina a 2%.

Palavras-chave: medicamentos fitoterápicos, controle de qualidade, camada híbrida.

ABSTRACT

Brazil stands out for its great plant biodiversity, however research regarding its use as medicinal herbs are still lacking and even less is known for its use in the dental field. Therefore, this study aimed to analyze the physicochemical characteristics of the copaiba oil emulsion used to clean the dentin cavity by means of quality control process. The homogeneity of hybrid layer was also determined after using this emulsion by scanning electron microscopy (SEM). All the studies were conducted in accordance to the existing laws. For quality control test, the emulsions were stored in different environments and evaluated during different experimental periods. It was conducted: centrifuge tests, determination of pH, relative density test and microbiological evaluation of organoleptic characters. For SEM, it was evaluated 30 third molars, where 15 were classified as sound and 15 were microbiologically processed for induction of caries. After preparation of teeth, emulsions test and control were applied, followed by adhesive application and histopathologic process. Ten blades were then selected and analyzed from each one of the groups for homogeneity and thickness of the hybrid layer. Data were analyzed by ANOVA and Bonferroni for pH evaluation and relative density was analyzed by non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by multiple comparison of means using the test Dunn ($\alpha = 0.05$). For other tests were given descriptive analysis. During centrifugation, no phase separation at time 0, freezer, refrigerator and air conditioning was observed, whereas in other environments there were phase separation; at pH test, the storage environment incubator and room temperature protected from light, presented statistically significant difference from the control group (time 0). At density test, the storage environment incubator presented statistically significant difference from the control group (time 0); during microbiological evaluation, no bacterial growth was detected. For the evaluation of organoleptic characters, it was documented only a discoloration of the emulsion stored in incubator. In SEM, regardless of the cleaning solutions used, the groups with sound dentin had predominant formation of thin hybrid layer and the groups that had affected dentin there were predominant formation of thick hybrid layer. For the control groups with distilled water (G1, G2) and chlorhexidine digluconate (G3 and G4) were observed the formation of discontinuous hybrid layer. In groups with copaiba oil emulsion with preservative 0,3% (G5 and G6) and 0,9% (G9 and G10) there was formation of continuous hybrid layer. For groups of the emulsion with preservative 0,6% (G7, G8) there was formation of hybrid layer continuous and discontinuous respectively. It was concluded that, among physicochemical properties, it is necessary to adjust pH, in order to make it more basic. Considering daily clinical practices, the best storage environment is the refrigerator. As for SEM, in most of the emulsions tested there was formation of continuous hybrid layer, suggesting that results were superior when compared with the ones obtained with chlorhexidine digluconate at 2%.

Keywords: Phytotherapeutic drugs, quality control, hybrid layer.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	7
3 REVISÃO DE LITERATURA	8
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1 Considerações Éticas.....	13
4.2 Coleta do óleo-resina de copaíba.....	13
4.3 Preparo da emulsão.....	13
4.4 Testes físico-químicos do controle de qualidade.....	14
4.5 Análise em microscopia eletrônica de varredura	16
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
6 CONCLUSÃO.....	27
7 REFERÊNCIAS	28
8 ANEXO	30

1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença infecto-contagiosa e de caráter multifatorial, dentre os fatores principais incluem-se a microbiota, o hospedeiro, o substrato, o tempo e fatores coadjuvantes como socioeconômicos e ambientais. Por ser uma doença crônica, esta normalmente é de progressão lenta, e por isso, caso o processo cariioso esteja no seu estágio inicial e forem readquiridos os hábitos de higiene, este processo está passível de estagnação devido à remineralização (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Porém existem casos em que o processo de remineralização não é possível, e por isso é necessário realizar uma intervenção invasiva, o preparo cavitário. Durante o preparo cavitário, é formada uma camada composta por detritos, bactérias, saliva e óleo da caneta, chamada de smear layer ou lama dentinária. Diferentes agentes de limpeza são utilizados com a finalidade de remover totalmente ou parcialmente esta camada. Estes compreendem em dois grupos: os agentes desmineralizantes, correspondente ao ácido fosfórico e os agentes não-desmineralizantes, como o digluconato de clorexidina e água de hidróxido de cálcio (FRANCO et al., 2007, MONDELLI, 1998).

Diante do crescente estudo, utilização e aceitação pela população dos produtos naturais, a copaíba vem se destacando dentre os fitoterápicos. Originária da América Latina e da África Ocidental, a árvore da copaíba produz um óleo que nos seres humanos possui propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes, antibacterianas e anticancerígenas. Com base nisto, e principalmente na ação antibacteriana, associou-se a utilização do óleo da copaíba ao processo restaurador (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002, VASCONCELOS, 2008).

Baseado nas características apresentadas por este óleo-resina, a proposição deste trabalho é analisar as características físico-químicas da emulsão formulada à base do óleo-resina de copaíba através do controle de qualidade, bem como analisar a homogeneidade da camada híbrida, após a utilização desta emulsão, em Microscopia Eletrônica de Varredura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Caracterizar a formulação de uma emulsão à base de óleo-resina de copaíba (*Copaifera multijuga*) para limpeza de cavidade dentinária e avaliar a morfologia da camada híbrida em MEV, após utilização desta emulsão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as características físico-químicas da emulsão formulada através do controle de qualidade, obedecendo as normatizações da Anvisa RDC n° 17/2010, RE n° 899/2003, RE n° 01/2005, RDC n° 13/2013 e a Farmacopeia Brasileira (1988/2010).

- Avaliar a homogeneidade da camada híbrida após utilização da emulsão à base de óleo de copaíba em MEV.

- Avaliar a espessura da camada híbrida após utilização da emulsão à base de óleo de copaíba em MEV.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Copaíba

Veiga Junior; Pinto (2002) realizaram uma revisão sobre o gênero *Copaifera* L., pertencente à família das *Caesalpiniaceae*, abordando sua história, química e farmacologia. Observaram que poucos artigos apresentaram a identificação botânica da espécie estudada, já estudos de atividade biológica confirmaram a sabedoria popular e o conhecimento adquirido dos índios pelos portugueses. Poucos destes estudos conseguiram identificar os princípios ativos, apesar de sugerirem que compostos fortemente ativos estavam presentes, inferindo-se, dessa forma, que os óleos de copaíba são importantes fontes de princípios ativos em farmacologia.

3.2 O Controle de qualidade

Zhang et al. (2012) detalharam fatores externos e internos que afetam a qualidade dos fitoterápicos e elucidaram algumas soluções para estes fatores, tais como, para fatores externos: a aplicação rigorosa das Boas Práticas Agrícolas e de Coleta e Boas Práticas de Fabricação que podem minimizar o risco de contaminação e adulteração. Para fatores internos, a fabricação de produtos à base de plantas padronizadas, com qualidade controlável, através de métodos analíticos modernos e técnicas farmacêuticas. Assim, para que a qualidade dos fitoterápicos seja alcançada em âmbito global, é necessário o aprofundamento em pesquisas metodológicas, a melhora na regulamentação dos medicamentos fitoterápicos e o engajamento das organizações governamentais para orientação e fiscalização.

Kunle; Egharevba; Ahmadu (2012) esclareceram a necessidade de estabelecer parâmetros de qualidade para coleta, manuseio, processamento e produção de fitoterápicos. Estes vêm representando uma porção substancial do mercado de medicamentos mundial, sendo principalmente utilizados como medicamentos caseiros e como matéria-prima para a indústria farmacêutica. Porém, tem sido evidenciado, os perigos do uso indiscriminado de algumas

plantas, destacando-se, assim, a necessidade de padronização das plantas, implantação de ferramentas analíticas para testar parâmetros de qualidade, a monitorização da qualidade do produto para garantir segurança e eficácia desde a coleta até o produto final. Além disso, recomendou-se que as agências do governo sigam uma abordagem mais universal sobre a qualidade dos medicamentos à base de plantas, adotando diretrizes da Organização Mundial da Saúde e o desenvolvimento de monografias, visando fortalecer o processo de regulamentação, minimizando a quebra da qualidade.

Brasil (2013) elaborou um consolidado de normas para esclarecer aspectos da legislação sanitária referentes ao registro ou pós-registro dos medicamentos fitoterápicos, dinamizados, específicos e notificados. Diversas resoluções são apresentadas de forma a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos, satisfazendo às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade. Dentre elas, destacam-se: RDC nº 17/2010, a qual estabelece os requisitos mínimos na fabricação de medicamentos, padronizando a verificação dos cumprimentos das Boas Práticas de Fabricação, as quais asseguram que os produtos sejam produzidos e controlados com padrões de qualidade apropriados para uso pretendido e requerido pelo registro, bem como, os processos de fabricação sejam definidos e revisados, qualificados e validados; a RE nº 899/2003, valida os métodos analíticos e bioanalíticos, demonstrando que o método é apropriado para a finalidade pretendida, cumprindo com as exigências das aplicações analíticas, proporcionando resultados confiáveis; a RE nº 01/2005, guia os testes de estabilidade, assim prevendo, determinando ou acompanhando o prazo de validade e RDC nº. 13/2013, dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos assegurando que o Produto Tradicional Fitoterápico é consistentemente produzido e controlado, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pela notificação ou registro.

3.3 A homogeneidade da camada híbrida

Nakajima et al. (2011) discutiram o potencial de adesão em dentina afetada por cárie e analisaram as características desta dentina. A dentina afetada por cárie é muito diferente da dentina hígida em sua morfologia e características físicas e químicas. Clinicamente, a resina composta é aderida ao assoalho da cavidade com presença de dentina afetada por cárie. Esta dentina apresenta menor eficácia de adesão, porém na clínica essa deficiência pode ser contornada quando as paredes circundantes apresentam dentina hígida ou esmalte que proporcionam boa adesão. No entanto, a contração sofrida pela resina no assoalho da cavidade, associada a baixa eficácia de adesão na dentina afetada, causaria uma maior deteriorização da interface do adesivo. Quando esta interface é exposta ao ambiente oral, a má qualidade da camada híbrida poderia comprometer a longevidade da restauração devido à hidrólise da resina e das fibras colágenas. Além disso, a composição específica dos adesivos poderia interferir na ligação à dentina afetada por cárie, no entanto o efeito do aprimoramento da composição não é claro. Dessa forma, a melhoria do potencial de adesão à dentina afetada por cárie deve ser considerada no desenvolvimento de novos materiais adesivos e no tratamento da cárie, o que levaria a um reforço do complexo dente-restauração, protegendo-o de cáries secundárias e fraturas.

Sanabe; Costa; Hebling (2011) avaliaram o efeito da clorexidina no colágeno presente na união resina-dentina hígida e afetada por cárie após envelhecimento. Foram produzidas superfícies planas de dentina em dezesseis terceiros molares hígidos, sendo que oito elementos passaram por um processamento microbiológico de indução à cárie. Após remoção do tecido cariado ou sobre a dentina hígida, realizou-se condicionamento ácido e aplicação do sistema adesivo Single Bond 2. Os espécimes preparados em número de 6 para cada grupo, foram aleatoriamente divididos, segundo o substrato e de acordo com a condição de armazenamento: água destilada por 24 horas; água destilada, clorexidina 0,12% ou óleo mineral por 6 meses.

Nos espécimes armazenados em clorexidina 0,12%, após o condicionamento ácido, aplicou-se 20 µm de clorexidina 2%, seguidos da aplicação do adesivo. Em seguida, estes espécimes foram preparados para cortes histológicos e corados com Tricômico de Goldner. Os espécimes foram analisados sob microscopia óptica em aumento de 400 x e foi realizada a mensuração da espessura da zona de colágeno exposto. Os dados foram submetidos aos testes estatísticos de ANOVA a dois critérios fixos e Tukey ($\alpha=0,05$). Não houve diferença estatística entre os substratos de dentina hígida e cariada independente da condição de armazenamento. As zonas mais espessas de colágeno exposto foram observadas nos grupos armazenados durante 6 meses em água destilada. Os grupos tratados com clorexidina demonstraram resultados que ficaram entre o grupo armazenado em água destilada por 24 horas e durante 6 meses. Nos grupos armazenados em óleo mineral, não foi observado aumento de áreas com colágeno exposto. Concluiu-se que o envelhecimento em água resultou em degradação da união resina-dentina, demonstrado pelo aumento da zona de colágeno exposto. Porém, na presença de clorexidina, os efeitos de degradação sobre o colágeno exposto foram reduzidos.

Hegde; Hegde; Chandra (2012) avaliaram a morfologia da interface resina-dentina e qualidade da camada híbrida de sistemas adesivos convencionais e autocondicionantes em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram utilizados 40 molares humanos sem cáries, nos quais foram confeccionadas cavidades classe V. Após a preparação, os elementos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos com 10 espécimes cada. Os elementos do grupo I e II foram condicionados com ácido, lavados e secos com auxílio de gaze. Após preparo, o grupo I foi tratado com adesivo convencional (XP Bond, Dentsply), o grupo II com adesivo convencional (Adper Single Bond 2, 3M ESPE). O grupo III foi tratado com adesivo autocondicionante (Adper Easy One, 3M ESPE) e o grupo IV com adesivo autocondicionante (Xeno V, Dentsply). As cavidades classe V foram restauradas com resina composta e as amostras foram armazenadas em água destilada à temperatura ambiente. Os espécimes foram

submetidos a termociclagem, em seguida foram seccionados longitudinalmente duas vezes em um plano vestibulo-lingual, produzindo dois espécimes por dente, resultando em 80 amostras. Os espécimes foram desmineralizados usando 6N HCl, desproteinizados com 2,5% de NaOCl, pulverizados com ouro e foram analisados através da microscopia eletrônica de varredura. Os resultados demonstraram que o grupo I apresentou clara formação de camada híbrida, a qual era grossa, definida, contínua, com presença de tags, sem falhas adesivas porém com falhas coesivas . O grupo II apresentou clara formação de camada híbrida, a qual era fina, com presença de tags e falhas adesivas e coesivas. O grupo III apresentou camada híbrida fina, pouco definida, com presença de tags, sem falhas coesivas ou adesivas. O grupo IV não mostrou evidência de camada híbrida, mas a interface entre resina-dentina era fina, contínua e sem falhas adesiva ou coesiva. Dessa forma, uma devida adaptação da resina à dentina, como no caso dos adesivos autocondicionantes, foi necessária para um melhor tratamento, reduzindo sensibilidade pós-operatória.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

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

4.2 Coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera Multijuga*)

A coleta do óleo-resina de copaíba foi realizada na Reserva Ducke, quilômetro 17 da rodovia Manaus-Itacoatiara, catalogada sob o nº69 pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia –INPA (BARBOSA *et al*, 2013).

4.3 Preparo da emulsão

Para o preparo da emulsão de limpeza de cavidade, foi utilizado o óleo-resina da *Copaifera multijuga* a 10%, polissorbato 80 (Vetec, Brasil) a 1%, água triesterilizada e diazolidinil uréia (Aldrich Chemistry, EUA) a 0,6% para o controle de qualidade e 0,3%, 0,6% e 0,9% para realização do MEV.

As emulsões formuladas foram acondicionadas em vidros cor âmbar com capacidade de 30 mL. Para o controle de qualidade estas emulsões foram mantidas em localidades distintas e em diferentes temperaturas, conforme a padronização descrita na Farmacopeia Brasileira (1988), os locais escolhidos para o teste foram estufa (37°C), freezer (-11,8°C), geladeira (-1,2°C), temperatura ambiente (25,2°C), temperatura ambiente ao abrigo da luz (28,2 °C), local com ar-condicionado (23,7°C). Os períodos experimentais analisados foram de 0 e 3 meses (BRASIL, 2013). Para a microscopia eletrônica de varredura, a emulsão foi acondicionada sob refrigeração.

4.4 Testes físico-químicos do controle de qualidade

O controle de qualidade da emulsão à base de óleo de copaíba para limpeza de cavidade dentinária foi formulado segundo as especificações da Farmacopeia Brasileira (1988/2010) e resoluções da Anvisa (BRASIL, 2013), para definição da estabilidade química e física desta emulsão, além da sua esterilidade, determinando assim o melhor local para armazenamento do produto.

4.4.1 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa foi obtida através da utilização de balança analítica (SHIMADZU, Brasil) e um picnômetro limpo e seco, com capacidade de 50 mL e previamente calibrado, através da determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água destilada e fervida a 20 °C.

A amostra foi transferida para o picnômetro e pesada. O peso da amostra foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. Calculou-se a densidade relativa através da razão entre a massa da amostra líquida e massa da água. O resultado foi obtido através da média de três determinações sucessivas (BRASIL, 2010).

4.4.2 Determinação do pH

O pH foi aferido através do potenciômetro (HANNA Instruments, Romênia). Os eletrodos foram calibrados com soluções-tampão pH 7,0 e 4,0 (DINÂMICA, Brasil), permitindo linearidade nas respostas em relação às alterações de potencial observadas. O resultado foi obtido através da média de três determinações sucessivas (BRASIL, 2010).

4.4.3 Teste de centrifugação

A centrifugação foi realizada utilizando 5 mL das emulsões à base de óleo de copaíba, as quais foram acondicionadas em tubos de Falcon previamente esterilizados e, posteriormente, centrifugados em centrífuga (SIGMA laborzentrifugen 2K15, Alemanha) a 3000 rpm por 30

minutos, à temperatura ambiente, para observação de uma possível separação de fases da emulsão. O teste foi realizado em triplicata (BRASIL, 2010).

4.4.4 Avaliação dos caracteres organolépticos

Foi baseada na alteração de cor, brilho, odor e consistência. A cor e o brilho foram analisados à luz do dia.

A consistência foi avaliada através do toque, observando presença ou ausência de grânulos.

O odor da emulsão foi verificado através de uma pequena amostra, a qual foi inalada. Assim, determinou-se primeiramente, a intensidade do odor: nenhum; fraco; distinto ou forte e a sensação causada pelo odor: aromático; frutoso; mofado; rançoso ou amadeirado.

4.4.5 Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes

O controle microbiológico da emulsão foi constituído pela determinação de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010).

Para pesquisa de *Escherichia coli*, foi utilizado 1 mL da emulsão de *Copaifera multijuga* para 9 mL de caldo caseína-soja (Acumedia, EUA), o qual foi homogeneizado e incubado a 35 °C durante 18 - 24 horas. Após esse período, 1 mL do caldo caseína-soja com emulsão foi transferido para tubos contendo 10 mL de caldo MacConkey (Acumedia, EUA) e incubou-se a 43 °C ± 1 °C durante 24 - 48 horas. Após, 0,01 mL foi semeado em placa de ágar MacConkey (Acumedia, EUA) e incubada a 35 °C durante 18-72 horas. O crescimento e características das colônias foram observados.

Para pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*, foi utilizado 1 mL da emulsão de *Copaifera multijuga* para 9 mL de caldo caseína-soja (ACUMEDIA, EUA), a qual foi homogeneizada e incubada a 35 °C durante 18 - 24 horas. Após esse período, 0,01 mL foi semeado em ágar Cetrimida (ACUMEDIA, EUA) e incubado a 35 °C durante 18-72 horas. O crescimento e as características das colônias foram observados. Os testes foram realizados em triplicata.

4.5 Análise em microscopia eletrônica de varredura

4.5.1 Preparação dos corpos de prova

Utilizou-se 30 terceiros molares selecionados aleatoriamente, fornecidos pelo banco de dentes da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas. Foram utilizados dentes hígidos extraídos por razões cirúrgicas. Os elementos com a presença de cáries, restaurações, coroas com áreas hipoplásicas, trincas e/ou fraturas foram excluídos. Imediatamente após a extração, os dentes receberam profilaxia utilizando escova de Robson, contra-ângulo, pasta de pedra-pomes e água.

Após a profilaxia, os dentes foram examinados em lupa estereoscópica ZEISS (10x de aumento), permitindo, dessa forma, observar a possível presença de trincas ou falhas estruturais que poderiam causar alguma alteração nos resultados experimentais. Posteriormente os dentes foram armazenados em soro fisiológico, a temperatura ambiente, até o momento das cavidades serem preparadas, prevenindo a desidratação dos mesmos. A metodologia de preparo foi baseada no estudo de Sanabe; Costa; Hebling (2011).

Para preparação dos corpos-de-prova, utilizou-se a máquina de corte Mecatome P100 (PRESI, França) e um disco diamantado dupla face (Extec Water Brake 4'x 0,12x ½, EUA), assim sob lubrificação constante (300 rpm e 200gf) foram removidas as porções oclusais dos dentes e produzidas superfícies planas em dentina. A porção oclusal foi desprezada.

Na face oclusal, a superfície dentinária foi abrasionada, utilizando a politriz AROTEC (Aropo 12V, Brasil) com lixas de carboneto de silício de granulações crescentes 180 - 240 - 320, sucessivamente, sob refrigeração à água, com o objetivo de produzir uma lama dentinária padronizada. 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.

Os trinta dentes selecionados tiveram o forâme de suas raízes selados com resina composta. Em seguida, foram impermeabilizados com uma camada de adesivo epoxi (ARALDITE, Brasil), seguido de outra camada de esmalte ácido resistente (Colorama, Brasil), deixando apenas a superfície dentinária exposta.

4.5.2 Indução de cárie

Quinze dos trinta dentes foram suspensos com fio ortodôntico em um béquer contendo água destilada para esterilização em autoclave por 20 minutos a 121°C. Após este procedimento, foi produzida uma solução cariogênica composta por 3,7 g de BHI caldo (Brain Heart Infusion, Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA), 2 g de sacarose (Synth; LabSynth, Brasil), 1 g glicose (Synth; LabSynth, Brasil) e 0,5 g de extrato de levedura (Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA) 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.

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 Aplicação do adesivo e obtenção dos espécimes

Com auxílio de broca esférica de aço nº 4 (KG Sorensen, Brasil) em baixa rotação, a superfície cariada foi removida e a broca foi trocada por uma nova a cada 4 dentes. A dentina

cariada amolecida foi removida até a obtenção de uma dentina mais endurecida e resistente ao toque com sonda exploradora sem pressão.

Nos outros 15 elementos não induzidos por cárie (hígidos), brocas esféricas também foram utilizadas por 30s para que a smear layer fosse produzida pelo mesmo tipo de instrumento de corte. Em seguida, foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos, conforme tabela 1.

Grupos	Substrato	Solução de Limpeza
G1	Dentina Hígida	Água destilada
G2	Dentina Afetada	Água destilada
G3	Dentina Hígida	Digluconato de clorexidina 2%
G4	Dentina Afetada	Digluconato de clorexidina 2%
G5	Dentina Hígida	Emulsão Copaíba+ Conservante 0,3%
G6	Dentina Afetada	Emulsão Copaíba+ Conservante 0,3%
G7	Dentina Hígida	Emulsão Copaíba+ Conservante 0,6%
G8	Dentina Afetada	Emulsão Copaíba+ Conservante 0,6%
G9	Dentina Hígida	Emulsão Copaíba+ Conservante 0,9%
G10	Dentina Afetada	Emulsão Copaíba+ Conservante 0,9%

Tabela 1. Grupos conforme substrato e material de limpeza.

O sistema adesivo Single Bond (3M ESPE, EUA) foi aplicado conforme recomendação do fabricante. A dentina foi condicionada por 15 s com ácido fosfórico a 35% (3M ESPE, EUA), lavada por 15s e seca com papel absorvente para obtenção de uma superfície úmida. Após o condicionamento ácido foram aplicados 20 µL das soluções de limpeza cavitária, por 60s, seguidos da remoção dos excessos com papel absorvente.

Duas camadas consecutivas do adesivo Single Bond (3M ESPE, EUA), foram aplicadas, sendo cada uma delas individualmente submetidas a leves jatos de ar para remoção do solvente. Ao final, as camadas foram fotoativadas com o fotopolimerizador (DABI Atlante DB686, Brasil), cuja irradiância foi monitorada com radiômetro (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 24horas em estufa.

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.

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

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 semanas 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.

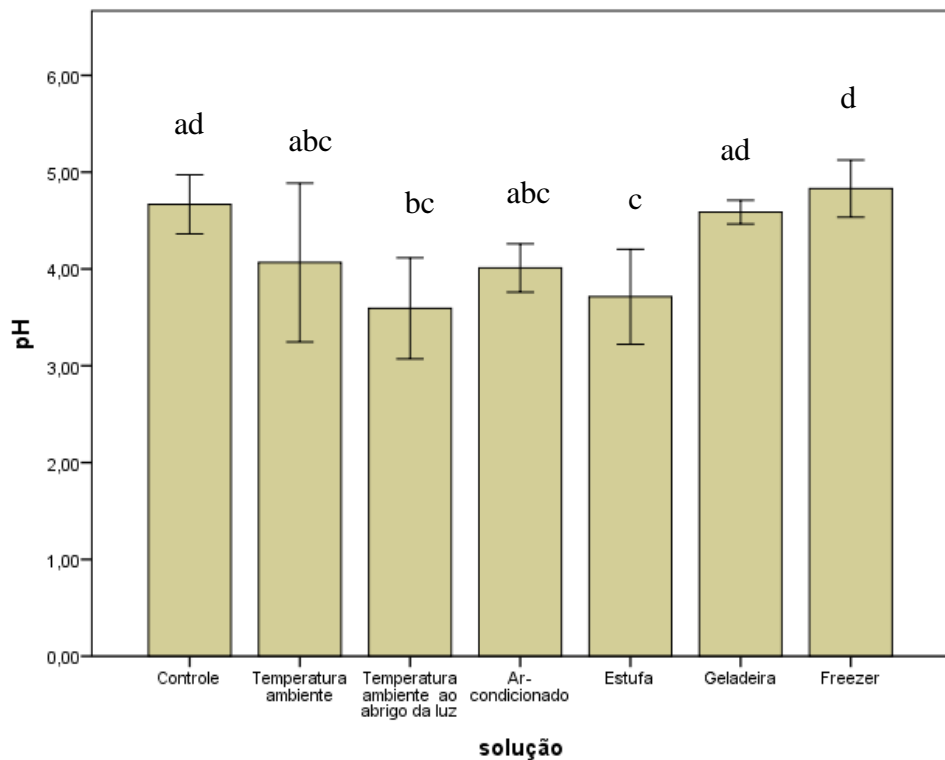
Cortes de aproximadamente 4 μ m de espessura (820 Spencer Microtome, EUA) foram corados pelo Tricrômico de Goldner. Foi preparado uma lâmina de cada corpo de prova, com números variados de corte em cada lâmina. Este trabalho faz parte de uma complementação de dissertação do mestrado, desta forma, das 80 lâminas, 10 foram selecionadas aleatoriamente sendo uma de cada grupo e um corte de cada espécime foi aleatoriamente selecionado e analisado em MEV (MEV - FEI Company, Quanta 250 – FEG, EUA) em aumento de 875X, spot 5.0.

A partir dessa análise, foram coletadas três imagens de cada corte e foram selecionados três pontos aleatórios de cada imagem para aferição da espessura da camada híbrida. A análise qualitativa descritiva foi realizada por um examinador, previamente calibrado, estabelecendo um parecer quanto a espessura da camada híbrida, especificando ainda se a camada híbrida apresentava-se contínua ou descontínua. (HEDGE; HEDGE; CHANDRA, 2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Controle de qualidade

A avaliação do pH foi realizada com análise de variância ($\alpha=0,05$) com comparação múltipla das médias utilizando teste de Bonferroni, através do software PAWS Statics (v. 19, SPSS Inc, Chicado, IL) (CALLEGARI-JACQUES, 2007). As alterações de pH ocorridas durante o período do teste estabilidade podem ser visualizadas no gráfico 1.



*Letras diferentes referem-se a diferenças significantes.

Gráfico 1. Teste de pH, de acordo com local de armazenamento e período analisado.

Os resultados demonstraram diferença estatisticamente significativa, quando comparados grupo controle (tempo 0) à temperatura ambiente ao abrigo da luz e à estufa. Neste último ambiente o resultado corroborou com Simões (2004). Segundo Oliveira (2008), as alterações no pH podem ser decorrentes de processos oxidativos dos componentes da formulação, como os óleos vegetais, que podem sofrer auto oxidação quando expostos ao oxigênio atmosférico ou altas temperaturas.

No teste de centrifugação, não foi observado separação de fases no tempo 0, geladeira, freezer e ar-condicionado nos demais ambientes armazenados por 3 meses observou-se separação de fases conforme a tabela 2.

Tempos	Separação de fases
Tempo 0	N
Tempo 3 meses	
Temperatura Ambiente	S
Temperatura Ambiente ao abrigo de luz	S
Ar-condicionado	N
Estufa	S
Geladeira	N
Freezer	N

S= Houve separação de fases N= Não houve separação de fases

Tabela 2. Teste de centrifugação das amostras da emulsão à base de óleo de copaíba para limpeza de cavidade dentinária, realizado em centrífuga a 3000 rpm, de acordo com o local de armazenamento e período analisado.

Os resultados demonstram que em temperatura ambiente e temperatura ambiente ao abrigo de luz o óleo separou-se de forma clara dos outros componentes da emulsão, sedimentando-se no fundo do tubo. Na estufa, o óleo também separou-se dos componentes de forma clara, porém este ficou localizado acima dos outros componentes. Isso pode ser explicado pelo tipo de armazenamento, pela quantidade e tipo do tensoativo utilizado, já que de acordo com Oliveira (2008) a maioria das referências relataram que uma maior estabilidade é obtida utilizando dois tensoativos: um hidrofílico e outro lipofílico, por estes favorecerem a formação de um filme mais coeso, o que difere deste trabalho. Entretanto esta mesma autora relatou que utilizando tween 80, um tensoativo hidrofílico, o óleo de copaíba se mostrou apto na formação de nanoemulsão, apresentando estabilidade.

No teste de densidade, utilizou-se teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, devido os dados não passarem pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($\alpha > 0,05$), seguido da comparação múltipla das médias utilizando o Teste de Dunn ($\alpha = 0,05$). O teste de Kruskal-Wallis e Dunn foi realizado com o software PAWS Statics (v. 19, SPSS Inc, Chicado, IL)

(VIEIRA, 2004), visando analisar a influência do tipo de ambiente na densidade da emulsão à base do óleo de copaíba. Os resultados são demonstrados na tabela 3.

Tempos	Densidade (g/cm³)
Tempo 0	0,9993 ^a
Tempo 3 meses	
Temperatura Ambiente	0,9969 ^{ab}
Temperatura Ambiente ao abrigo de luz	0,9994 ^a
Ar-condicionado	0,9942 ^{ab}
Estufa	0,9777 ^b
Geladeira	0,9953 ^{ab}
Freezer	0,9938 ^{ab}

*Letras diferentes referem-se a diferenças significantes.

Tabela 3. Testes de densidade, expresso em gramas por cm³, das amostras da emulsão à base de óleo de copaíba para limpeza de cavidade dentinária, de acordo com o local de armazenamento e período analisado.

A partir dos resultados, observou-se que a estufa apresentou diferença estatisticamente significativa do grupo controle ($\alpha= 0,032$). Demonstrando que a densidade é inversamente proporcional à temperatura, corroborando com Almeida et al. (2011), assim quanto maior a temperatura, menor a densidade.

Nos caracteres organolépticos, observou-se a cor, o odor, brilho e consistência. Dessa forma, os resultados estão expressos na tabela 4.

Tempos	Cor	Odor	Brilho	Consistência
Tempo 0	N	N	N	N
Tempo 3 meses				
Temperatura Ambiente	N	N	N	N
Temperatura Ambiente ao abrigo de luz	N	N	N	N
Ar-condicionado	N	N	N	N
Estufa	S	N	N	N
Geladeira	N	N	N	N
Freezer	N	N	N	N

N= Não houve alteração S= Houve alteração

Tabela 4. Avaliação dos caracteres organolépticos, conforme cor, odor, brilho e consistência das amostras da emulsão à base de óleo de copaíba para limpeza de cavidade dentinária, de acordo com o local de armazenamento e período analisado.

A partir dos resultados, observou-se que na maioria das amostras não houve alteração dos caracteres organolépticos, quando comparados tempo 0 e 3 meses. A alteração na cor demonstrada neste trabalho, deve-se ao ambiente de armazenamento. A emulsão caracteriza-se por possuir cor branca, odor fraco e amadeirado, com presença de brilho e consistência fluida. A cor e consistência corroboram com trabalho de Oliveira (2008) e a sensação causada pelo odor corrobora com Nascimento et al.(2011).

Para avaliação microbiológica foram analisados os microrganismos *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* os resultados estão demonstrados na tabela 5.

Tempos	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Tempo 0	N	N
Tempo 3 meses		
Temperatura Ambiente	N	N
Temperatura Ambiente ao abrigo de luz	N	N
Ar-condicionado	N	N
Estufa	N	N
Geladeira	N	N
Freezer	N	N

N= Não houve crescimento bacteriano

Tabela 5. Avaliação do crescimento bacteriano das amostras da emulsão à base de óleo de copaíba para limpeza de cavidade dentinária, de acordo com o local de armazenamento e período analisado.

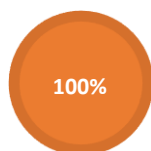
Observou-se que em nenhum tempo e ambiente houve crescimento bacteriano. De acordo com os resultados os melhores locais de armazenamento são freezer e geladeira, porém considerando a clínica diária o melhor ambiente de armazenamento é a geladeira.

5.2 Microscopia eletrônica de varredura

Os resultados obtidos na análise da microscopia eletrônica de varredura são demonstrados no gráfico 2 e no quadro 1.

ÁGUA DESTILADA

■ Camada híbrida contínua
■ Camada híbrida descontínua



DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA 2%

■ Camada híbrida contínua
■ Camada híbrida descontínua



EMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE COPAÍBA

■ Camada híbrida contínua ■ Camada híbrida descontínua

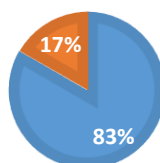


Gráfico 2. Homogeneidade da camada híbrida conforme solução de limpeza, independente dos substratos e concentração de conservante.

Grupos	Classificação da homogeneidade
G1	Camada híbrida fina descontínua com espessura entre 5 e 11 μm
G2	Camada híbrida grossa descontínua com espessura entre 11 e 18 μm
G3	Camada híbrida fina descontínua com espessura entre 5 e 11 μm
G4	Camada híbrida fina descontínua com espessura entre 5 e 11 μm
G5	Camada híbrida fina contínua com espessura entre 5 e 11 μm
G6	Camada híbrida grossa contínua com espessura entre 11 e 18 μm
G7	Camada híbrida grossa contínua com espessura entre 11 e 18 μm
G8	Camada híbrida grossa descontínua com espessura entre 11 e 18 μm
G9	Camada híbrida fina contínua com espessura entre 5 e 11 μm
G10	Camada híbrida fina contínua e espessura entre 5 e 11 μm

Quadro 1. Classificação da homogeneidade da camada híbrida segundo grupos.

A camada híbrida é a impregnação do monômero à superfície dentinária desmineralizada, formando uma camada ácido-resistente de dentina reforçada por resina (Nakabayashi et al., 1982). No entanto, a dentina é um tecido duro, elástico, avascular, composto em 70% por tecido inorgânico, 20% por tecido orgânico e 10% por água, o que leva a certos cuidados nos procedimentos adesivos (Oliveira et al. 2010). Nakajima et al. (2011) demonstraram que a dentina afetada por cárie apresenta características químicas e morfológicas diferentes da dentina

hígida, esta dentina afetada está mais susceptível ao condicionamento ácido devido a desmineralização parcial promovida pelo processo carioso, resultando em uma zona desmineralizada mais profunda, proporcionando a formação de uma camada híbrida mais espessa. Nos resultados obtidos, independente das soluções de limpeza, os grupos com dentina hígida apresentaram formação predominante de camada híbrida fina e os grupos com dentina afetada por cárie, apresentaram predominância de formação de camada híbrida grossa, corroborando com Nakajima et al. (2011). O critério de classificação da espessura em fina (5 - 11 μm) e grossa (11 - 18 μm) foi baseada nos resultados de Hegde; Hedge; Chandra (2012) com modificações, considerando que esses autores utilizaram uma metodologia diferente que desproteinizava e desmineralizava menos a dentina possibilitando menor espessura do que esta pesquisa.

A profundidade da desmineralização acarreta na dificuldade da difusão do monômero resinoso no colágeno, criando camadas híbridas espessas, porém mais susceptíveis a imperfeições, expondo fibrilas colágenas à degradação hidrolítica e enzimática nesta interface (Sanabe; Costa; Hebling, 2011). No entanto, Miyazaki et al.(2003) enfatizaram que a qualidade da camada híbrida é mais importante que a sua espessura.

Tem sido demonstrado que o uso do digluconato de clorexidina após o condicionamento ácido e previamente aplicação do sistema adesivo, tem adquirido bons resultados na inibição de metaloproteinases. Estas são conjunto de 23 endopeptidases zinco e cálcio dependentes que apresentam capacidade de degradação de componentes da matriz extracelular (Sanabe; Costa; Hebling, 2011). Assim os grupos tratados com digluconato de clorexidina 2% foram considerados como controle positivo neste estudo. Os grupos tratados com a emulsão à base de óleo de copaíba independente da concentração de conservante obtiveram resultados superiores em relação a continuidade da camada híbrida, quando comparados com água destilada e digluconato de clorexidina 2%, conforme gráfico 2. Apenas o G8 apresentou descontinuidade

da camada, enquanto que os dois grupos tratados com digluconato de clorexidina (G3 e G4) e água destilada (G1 e G2) apresentaram descontinuidade desta camada.

Embora este trabalho apresente metodologia de análise diferente da Sanabe; Costa; Hebling (2011), algumas comparações podem ser realizadas. Em seu estudo, os fenômenos de degradação foram validados quando armazenados em óleo mineral, com o objetivo de impedir os mecanismos de degradação hidrolítica e enzimática. Assim, foi observado que a degradação do grupo armazenado em óleo mineral não diferiu dos espécimes armazenados em água destilada por 24 horas. Demonstrando que a presença de uma solução hidrófoba a água na interface adesiva, ajuda na remoção gradual desta, favorecendo a conversão monomérica e impedindo a degradação hidrolítica. Além disso, pelas metaloproteinases serem dependentes da água e da presença de íons cálcio e zinco para serem ativadas, acreditou-se que a ação destas enzimas não ocorreria quando armazenados neste ambiente.

Diante desta realidade, sugere-se que a emulsão à base de óleo de copaíba apresente características hidrófobas como a do óleo mineral, o que impediria a degradação hidrolítica e enzimática e permitiria a permanência da homogeneidade e qualidade da camada híbrida, conforme demonstrado nos resultados deste trabalho.

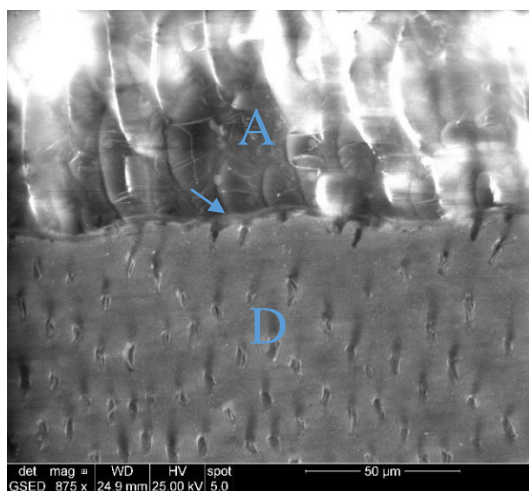


Imagem 1. Ilustrativo de camada híbrida fina contínua, obtida através do MEV. A= adesivo, D= dentina e Seta= camada híbrida.

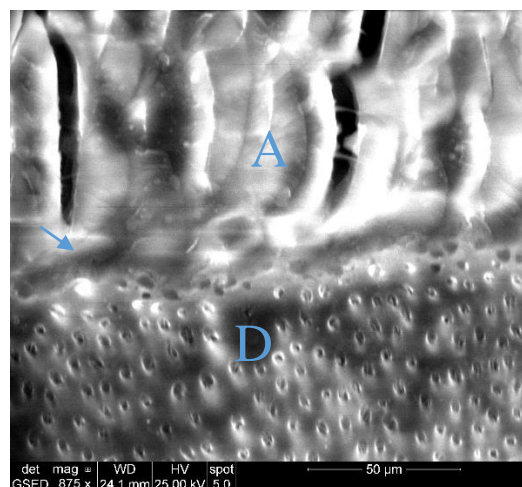


Imagem 2. Ilustrativo de camada híbrida grossa descontínua, obtida através do MEV. A= adesivo, D= dentina e Seta= camada híbrida.

6 CONCLUSÃO

Diante da realidade deste trabalho, observou que a emulsão à base de óleo de copaíba necessita ser ajustada em relação ao pH, tornando-a mais básica. Os melhores ambientes de armazenamento de acordo com os resultados, foram freezer e geladeira, considerando a utilização na prática clínica diária sugere-se a geladeira como melhor ambiente. Com relação, a homogeneidade da camada híbrida, na maioria das emulsões à base de óleo de copaíba houve formação de camada híbrida contínua sugerindo que os resultados foram superiores ao digluconato de clorexidina e água destilada.

7 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.K.P et al. Caracterizações físico-químicas de óleos vegetais utilizados para a produção de biodiesel com metodologias alternativas simples. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 31, 2011, Belo Horizonte. Anais...Belo Horizonte: Enegep, 2011, p. 1-14.
- BARBOSA, P.C.S. et al. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. *Chemistry & Biodiversity*, v.10, n.7, p.1350–1360, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, v. 1. Brasília: ANVISA, 1988.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, v. 1. Brasília: ANVISA, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de Normas da Coordenação de Fitoterápicos, Dinamizados e Notificados. Brasília, 2013.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- FEJERSKOV, O.; KIDD, E. Cárie dentária – A doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Santos, 2005.
- FRANCO, A.P.G.O. et al. Desinfecção de cavidades com clorexidina. *Publication UEPG. Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 13, n. 1-2, p. 53-58, 2007.
- HEGDE, M.N.; HEGDE, P.; CHANDRA, C.R. Morphological evaluation of new total etching and self etching adhesive system interfaces with dentin. *Journal of Conservative Dentistry*, v.15, n.2, p 151-155. 2012.
- KUNLE, O.F.; EGHAREVBA, H.O.; AHMADU, P.O. Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation* , v. 4, n.3, p. 101-112, 2012.
- MIYAZAKI, M. et al. Determination of residual double bonds in resin-dentin interface by Raman spectroscopy. *Dental Materials*, v.19, n.3, p. 245-251, 2003.
- MONDELLI, J. Proteção do Complexo Dentinopulpar. São Paulo: Artes Médicas, 1998.
- NASCIMENTO et al. Caracterização físico-química do óleo de *Copaifera Publiflora* (Copaíba) cultivada em Boa Vista – RR. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. 34, 2011, Florianópolis. Anais...Florianópolis. SBQ, 2011, p.1.
- NAKABAYASHI, N., et al. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J. Biomed. Mater.Res.*, v.16, n.3, p.265-273, 1982.
- NAKAJIMA, M. et al. Bonding to caries-affected dentin. *Japanese Dental Science Review*, v.47,n. 2, p.102-114, 2011.

OLIVEIRA, B.R. Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente frente a *Aedes Aegypti*. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

OLIVEIRA, N.A.et al. Sistemas Adesivos: Conceitos atuais e aplicações clínicas. Revista Dentística on line, v.9, n.19, p.6-14, 2010.

SANABE, M.E.; COSTA, C.A.S.; HEBLING, J. Exposed Collagen in Aged Resin-Dentin Bonds Produced on Sound and Caries-affected Dentin in the Presence of Chlorhexidine. J Adhes Dent, v.13, n.2, p117-124, 2011.

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

VASCONCELOS, K.R.F.; VEIGA Jr, V. F.; 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, suppl.0, p. 733-738, 2008.

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

VIEIRA, S. Bioestatística : tópicos avançados. 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.


ZHANG, J. et al. Quality of herbal medicines: Challenges and solutions. Complementary Therapies in Medicine v. 20, n. 1-2, p. 100-106, 2012.

8 ANEXO

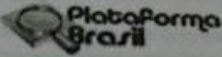
80

ANEXOS

Anexo A - Aprovação do Comitê



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EMULSÕES CONTENDO BIOATIVOS AMAZÔNICOS: AVALIAÇÃO DO EFEITO NA METALOPROTEINASE 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: 244.528

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 Copalifera 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