

TERESA DE LISIEUX GUEDES FERREIRA LÔBO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE UM ADESIVO DENTINÁRIO COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOSINTETIZADAS COM PRÓPOLIS
VERMELHA DE ALAGOAS**

Maceió-2021

TERESA DE LISIEUX GUEDES FERREIRA LÔBO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE UM ADESIVO DENTINÁRIO COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOSINTETIZADAS COM PRÓPOLIS
VERMELHA DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto
Faculdade de Odontologia - FOUFAL
Universidade Federal de Alagoas

Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Camila Braga Dornelas
Instituto de Ciências Farmacêuticas – ICF
Universidade Federal de Alagoas

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Livia Silva dos Santos – CRB-4 – 1670

L799s Lôbo, Teresa de Lisieux Guedes Ferreira.
Síntese e caracterização de um adesivo dentinário com nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas / Teresa de Lisieux Guedes Ferreira
Lôbo. – 2021.
139 f. : il.

Orientadora: Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto.
Coorientadora: Camila Braga Dornelas.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 109-124
Anexos: f. 136-139
Apêndice: f. 125-135

1. Nanopartículas de prata. 2. Própolis vermelha. 3. Adesivo dentinário. 4. Antioxidantes
I. Título.

CDU: 620.3:616.314.74

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus e Nossa Senhora, pois sempre me deram proteção durante toda minha vida, além de forças para lutar diante dos meus objetivos em meio aos percalços da vida.

Dedico a minha avó Therezinha Guedes Ferreira, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos da minha vida, dona de todas as minhas conquistas e minha maior incentivadora, minha eterna gratidão!

Dedico a meus pais, pelo apoio em todos os momentos da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Santa Terezinha pela proteção em todos os momentos da minha vida.

Agradeço especialmente a minha orientadora Professora Dra. Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto, por me auxiliar com amor e paciência em cada passo desse trabalho, obrigada por ter acreditado em mim e me motivado não só na construção desse trabalho, mas como exemplo de pessoa e profissional, admiro muito a pessoa e profissional que és e serei eternamente grata por todos os ensinamentos, obrigada por tudo minha mamãe científica!

Agradeço a minha Co-orientadora Professora Dra. Camila Braga Dornelas pelo apoio e ensinamentos para realização deste trabalho. Obrigada por tudo!

Agradeço a professora Dra. Lara Mendes de Almeida, pelo apoio, ensinamentos e carinho comigo durante esse tempo de mestrado, por ter me aceito no seu grupo de pesquisa e me incentivado a buscar novos horizontes, obrigada por tudo!

Ao professor Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, pelo apoio em vários experimentos e ensinamentos durante as aulas, obrigada por tudo!

Ao meu primo, amigo e incentivador Rodrigo José Nunes Calumby, pelo amor incondicional, amizade e ajuda nos experimentos de microbiologia, “gracias por todo, mi querido amigo”.

Aos meus queridos amigos do laboratório Tecnano-UFAL, pelo apoio, descontração e aprendizados. Obrigada por cada um de vocês, todos acrescentaram valiosos aprendizados para mim.

Aos meus queridos amigos que colaboraram em várias fases da pesquisa na UFAL, pelo apoio: Valcilaine Barbosa, Ingrid Vieira, Arthur Lui, Mailde Liodorio, Igor, Jucenir e Saulo Vitor, minha eterna gratidão a vocês!

Aos meus amigos de mestrado que me acolheram e tornaram meus momentos mais alegres e pela convivência durante essa jornada, em especial à Rafael Silva e Maria Júlia Reis, obrigada por todo carinho e amizade!

Agradeço à Daniel Brito Ricarte por toda paciência, profissionalismo e ajuda nos documentos da secretaria.

Agradeço em especial a Kelly Schuldiner, minha amiga-irmã de alma e de coração, obrigada por sua amizade sincera e verdadeira e por estar comigo nos meus momentos difíceis e alegres! Gratidão eterna a ti meu amor.

Agradeço a Universidade Federal de Alagoas pela realização desse trabalho.

Aos coordenadores e professores do programa de pós graduação em ciências farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, pelo conhecimento e aprendizado prestado a mim e a todos os alunos que passam por esta instituição, meu muito obrigada!

“O que eu faço é uma gota no meio de um oceano. Mas sem ela, o oceano seria menor”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A síntese biogênica utiliza matéria prima natural para redução de macromoléculas de prata em nanopartículas, resultando em nanopartículas com melhor estabilidade e biocompatibilidade, reduzida toxicidade, além de ser uma reação completa, sem a formação de outras substâncias. A própolis é um composto natural que se apresenta como uma alternativa na redução da toxicidade das nanopartículas de prata através da síntese biogênica. **Objetivo:** O objetivo desse trabalho foi produzir e caracterizar um adesivo dentinário com nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas. **Metodologia:** O extrato hidroetanólico de própolis vermelha de Alagoas (EPV) foi utilizado na biossíntese de nanopartículas de prata com própolis vermelha (NPAgB). Também foram sintetizadas nanopartículas de prata pelo método convencional (NPAgC). As nanopartículas biossintetizadas e convencionais, foram caracterizadas através de FTIR, UV-vis e DRX. Foram avaliadas as atividades antioxidantes (método DPPH) do EPV, NPAgB e NPAgC. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram usados para analisar a atividade antimicrobiana do EPV, NPAgC e NPAgB contra *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*. Amostras de adesivos polimerizados foram testadas contra *Enterococcus faecalis* por meio de difusão em disco (MDD) Foram sintetizados seis adesivos com NPAgB 250 µg/mL; NPAgC 250 µg/mL; EPV250 µg/mL; EPV300 µg/mL; NPAgC 250 µg/mL + (EPV250) e NPAgC 250 µg/mL + (EPV300). O adesivo puro (AE) e Single Bond 2 (3M/ESPE) (SB) foram usados como controles. Também foi testado AE com 24 µL de etanol (solvente) para verificar o efeito do solvente. O EPV e as NPAgB foram submetidas ao ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação e quantificação dos biomarcadores da própolis que reduzem a prata em nanomaterial. Os adesivos experimentais foram caracterizados através das medidas do grau de conversão, liberação de nanopartículas em saliva artificial a partir do adesivo polimerizado e resistência de união à microtração (µTBS). Os dados foram analisados usando ANOVA um fator ($\alpha = 0,05$). **Resultados:** O teor médio de flavonoides totais no EPV foi de 1,56% e atividade antioxidante (AA%) variou de 5% a 46 % em média. Foram obtidas NPAgB e NPAgC na forma de um pó leve, fino, formato esférico, de coloração enegrecida para as NPAgB e de coloração prateada para as NPAgC. Comparadas às NPAgC, as NPAgB mostram melhores resultados de atividade bacteriostática, exceto contra *Enterococcus faecalis*, onde observou-se resultado similar para os dois tipos de NPs. O efeito bactericida das NPAgB foi melhor para *S. mutans* e *S. epidermidis* do que NPAgC. NPAgB apresentou melhor AA% do que NPAgC. Foram determinados os marcadores da própolis vermelha que reduzem a molécula de prata em nanomateriais. O grau de conversão dos adesivos testados variou entre 76,19 e 87,57 % ($p > 0,05$). O ensaio de MDD mostrou melhores resultados para NPAgB com um raio de difusão de 3,7mm. O ensaio de liberação de NP em saliva artificial demonstrou que os adesivos não liberavam NP. O teste de microtração demonstrou que embora os adesivos NPAgB (35,39 MPa), NPAgC (36,07 MPa), NPAgC + EPV250 (38,53 MPa) e NPAgC + EPV300 (36,11 MPa) tenham apresentado resistência de união imediata ligeiramente mais elevada do que o grupo controle (33,18 MPa), não se observou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$), porém a adição de extrato de própolis nas concentrações de 250 µg/mL e 300 µg/mL aumentou a resistência de união imediata, comparados ao controle ($p < 0,05$). **Conclusão:** A síntese de um adesivo dental com nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas resultou em um material com atividade antimicrobiana e matriz estável com o princípio ativo imobilizado dentro do material.

Palavras-chave: Adesivos Dentinários, Antioxidantes, Nanopartículas, Nitrato de prata, Própole.

ABSTRACT

Biogenic synthesis uses natural raw material to reduce silver macromolecules in nanoparticles, that shows better stability and biocompatibility, reduced toxicity, besides being a complete chemical reaction, without generate other substances. Propolis is a natural compound that presents itself as an alternative in reducing the toxicity of silver nanoparticles through biogenic synthesis. **Objective:** The objective of this work was to produce and characterize a dentin bonding agent with silver nanoparticles biosynthesized with red propolis from Alagoas. **Methodology:** The hydroethanolic extract of red propolis from Alagoas (EPV) was used in the biosynthesis of silver nanoparticles with red propolis (NPAgB). Silver nanoparticles without propolis were also synthesized by the conventional method (NPAgC). The biosynthesized and conventional nanoparticles were characterized by FTIR, UV-Vis and XRD. Antioxidant activity of EPV, NPAgB and NPAgC were evaluated by DPPH method. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were used to analyze the antimicrobial activity of EPV, NPAgC and NPAgB against *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*. Samples of polymerized dentin bonding agent were tested against *Enterococcus faecalis* by disc diffusion method (MDD). Six dentin bonding agents were synthesized with NPAgB 250 µg/mL; NPAgC 250 µg/mL; EPV250 µg/mL; EPV300 µg/mL; NPAgC 250 µg/mL + EPV250 µg/mL (EPV250) and NPAgC 250 µg/mL+ EPV300 µg/mL (EPV300). Pure adhesive (AE) and Single Bond 2 (SB - 3M/ESPE) were used as controls. AE was also tested with 24 µL of ethanol (solvent) to verify the effect of the solvent. EPV and NPAgB were submitted to high-efficiency liquid chromatography (HPLC) assay to identify and quantify propolis biomarkers that reduce silver in nanomaterial. The experimental dentin bonding agents were characterized by measurements of conversion degree (CD), the release of nanoparticles from the polymerized adhesive in artificial saliva and microtensile bond strength (µTBS). The data were analyzed using ANOVA one-way ($\alpha = 0.05$). **Results:** The mean content of total flavonoids in EPV was 1.56% and AA% ranged from 5% to 46% on average. NPAgB and NPAgC were obtained in the form of a light, thin, spherical powder, dark in color for NPAgB and silver-colored for NPAgC. Compared to NPAgC, NPAgB showed better results of bacteriostatic activity, except against *Enterococcus faecalis*, where similar result was observed for both types of NPs. The bactericidal effect against *S. mutans* and *S. epidermidis* was better for NPAgB than NPAgC. NPAgB presented higher AA% than NPAgC. Markers of red propolis that reduce the silver molecule in nanomaterial were determined. The CD of the dentin bonding agents varied between 76.19 and 87.57% ($p > 0.05$). The MDD assay showed better results for NPAgB with a diffusion radius of 3.7mm. The NP release assay in artificial saliva demonstrated that the dentin bonding agents did not release NP. The µTBS showed that, although the dentin bonding agents NPAgB (35.39 MPa), NPAgC (36.07 MPa), NPAgC + EPV250 (38.53 MPa) and NPAgC + EPV300 (36.11 MPa) have shown immediate bond strength higher than the control group (33.18 MPa), there was no significant difference between the groups ($p > 0.05$), but the addition of EPV at concentrations of 250 µg/mL and 300 µg/mL increased the immediate bond strength compared to the control ($p < 0.05$). **Conclusion:** The synthesis of a dentin bonding agent with silver nanoparticles biosynthesized with red propolis from Alagoas resulted in a material with antimicrobial activity and a stable matrix with the active principle immobilized within the material.

Key words: Dentin bonding agent, Antioxidants, Nanoparticles, Silver nitrate, Propolis.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Fatores de desenvolvimento da cárie dentária. | 24 |
| Figura 2 | Ilustração da estrutura dentinária. | 28 |
| Figura 3 | Estrutura química dos monômeros e fotoiniciadores utilizados nesse estudo. | 29 |
| Figura 4 | Demonstração da interface adesiva com presença de fibrilas colágenas protegidas pelo material adesivo e presença da camada híbrida em amarelo. | 31 |
| Figura 5 | Ilustração da abelha <i>Apis melífera</i> e da planta <i>Dalbergia ecastophyllum</i> . | 36 |
| Figura 6 | Desenho esquemático dos métodos de síntese de nanopartículas. | 38 |
| Figura 7 | Desenho esquemático do método de síntese biogênica utilizando extrato de própolis vermelha de Alagoas. | 40 |
| Figura 8 | Preparação do extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas (EPV). a) própolis vermelha de Alagoas bruta pesada. b) preparação de álcool a 80% e colocada no béquer com a própolis vermelha bruta; c) após maceração o extrato foi acondicionado por 48 horas. | 43 |
| Figura 9 | Evaporador rotativo com o extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas, para liberação do solvente residual | 44 |
| Figura 10 | Imagem representando a placa utilizada para o experimento, e a água deionizada sendo aquecida a uma temperatura de $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$. | 47 |
| Figura 11 | Fórmula estrutural dos compostos presentes no adesivo experimental puro | 53 |
| Figura 12 | Ilustração do processo de preparação dos adesivos experimentais. | 54 |
| Figura 13 | Mapa esquemático dos grupos experimentais utilizados neste trabalho. | 55 |
| Figura 14 | Ilustração do processo de preparação dos dentes e teste de microtração. | 60 |
| Figura 15 | Ilustração do experimento de MDD realizado com todos os grupos experimentais. | 64 |
| Figura 16 | Gráfico explicativo da equação da reta realizadas através da curva de calibração das amostras de nanopartículas de prata. | 65 |
| Figura 17 | Demonstração do experimento de liberação dos adesivos polimerizados. | 66 |
| Figura 18 | Médias das atividades antioxidantes do EPV de acordo com as concentrações utilizadas no experimento. | 70 |
| Figura 19 | Aspecto da coloração da síntese verde de nanopartículas de prata, em a) síntese sendo preparada com o EPV com aspecto de vermelho claro, b) aspecto da síntese após adição de nitrato de prata, com coloração em marrom escuro após 24 horas | 70 |
| Figura 20 | Espectros UV-Vis da síntese de NPAgC, identificando o pico máximo de absorção em 425nm. | 71 |
| Figura 21 | Espectros UV-vis de NPAgB, demonstrando a absorbância máxima em 420 nm. | 72 |
| Figura 22 | Cromatogramas do EPV e NPAgB em uma concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, no comprimento de onda de 281nm | 74 |
| Figura 23 | Espectros do EPV em vermelho, indicando as bandas de absorção e NPAgB em preto indicando as bandas de absorção responsáveis pela redução da macromolécula em nanopartículas. | 77 |
| Figura 24 | Difratograma demonstrando os padrões de difração de raios X em pó de NPAgC. | 78 |
| Figura 25 | Difratograma demonstrando os padrões de difração de raios X em pó de NPAgB. | 79 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| Figura 26 | Representação dos valores médios da atividade antioxidante das NPAgB e NPAgC, pelo sequestro do radical DPPH. | 80 |
| Figura 27 | Comparação das médias obtidas pelo sequestro do radical DPPH das amostras de: extrato etanólico de própolis vermelha de alagoas, nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de alagoas, nanopartículas de prata. | 81 |
| Figura 28 | Espectros demonstrativo dos adesivos polimerizados e não polimerizados para cálculo do grau de conversão | 82 |
| Figura 29 | Valores médios do grau de conversão (%) dos adesivos testados no estudo | 83 |
| Figura 30 | Porcentagem do tipo de fratura entre os grupos experimentais aplicados | 84 |
| Figura 31 | Gráfico demonstrativo das publicações entre o ano de 2013 e 2020 | 125 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|-----|
| Tabela 1 | Reagentes utilizados nesta pesquisa | 42 |
| Tabela 2 | Composição química dos materiais utilizados neste trabalho | 55 |
| Tabela 3 | Concentrações de EPV testadas e suas respectivas leituras no espectrofotômetro para determinação da curva padrão de flavonoides | 69 |
| Tabela 4 | Demonstração dos flavonóides marcadores identificados na própolis vermelha de alagoas e nas nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas. | 76 |
| Tabela 5 | Tabela de dados ANOVA do grau de conversão dos adesivos testados | 82 |
| Tabela 6 | Valores médios de resistência de união imediata dos adesivos testados neste estudo. | 83 |
| Tabela 7 | Análise de variância dos dados de resistência de união a microtração (24h) | 84 |
| Tabela 8 | Valores de CIM das nanopartículas, frente a bactérias testadas | 85 |
| Tabela 9 | Valores de CBM, frente as bactérias testadas. | 85 |
| Tabela 10 | Valores de halo de inibição dos adesivos testados | 86 |
| Tabela 11 | Registros da pesquisa realizada para a prospecção tecnológica para os descritores em português. | 122 |
| Tabela 12 | Registros da pesquisa realizada para a prospecção tecnológica para os descritores em inglês. | 124 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|---|
| µG | Microgramas |
| µL | Microlitro |
| AA% | Atividade antioxidante |
| ABS | Absorbância |
| AE | Adesivo experimental |
| ALC | Agente de ligação cruzada |
| ANOVA | Análise de variância |
| B | Branco |
| BIS-GMA | Bis-glicidilmetacrilato |
| CBM | Concentração bactericida mínima |
| CH | Camada híbrida |
| CHX | Clorexidina |
| CIM | Concentração inibitória mínima |
| CLSI | Clinical laboratory standards institute |
| CPS | Cisteínas catepsinas |
| CQ | Canforoquinona |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picril-hidrazil |
| EDMAB | 4-dimetil amina benzoato de etila |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EPS | Substância polimérica extracelular |
| EPV | Extrato etanólico de própolis vermelha |
| FA | Fratura adesiva |
| FD | Fratura coesiva em dentina |
| FM | Fratura mista |
| FR | Fratura coesiva em resina |
| FTIR | Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier |
| g | Gramma |
| GC | Grau de conversão |
| H | Hora |
| HAP | Hidroxiapatita |
| HEMA | 2-hidroetil metacrilato |
| MDD | Meio de Difusão em Disco |
| mg | Miligrama |
| MH | Caldo mueller hinton |
| ml | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| MMPS | metaloproteinases |
| nm | Nanômetro |
| NPAg | Nanopartículas de prata |
| NPAgB | Nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de alagoas |
| NPAgC | Nanopartículas de prata convencionais |
| NPs | Nanopartículas |
| PF | Falhas prematuras |

| | |
|--------|---|
| PV | Própolis vermelha |
| PVA | Própolis vermelha de alagoas |
| RU | Resistência de união |
| S | Segundo (s) |
| SB | Single bond |
| SE | Self etch |
| SISGEN | Sistema nacional de gestão do patrimônio genético |
| SPR | Ressonância plasmônica de superfície |
| TEGDMA | Etilenoglicol dimetacrilato |
| TTC | Cloreto trifenil tetrazólio |
| UDMA | Uretano dimetacrilato |
| XRD | Difração de raios-x |

LISTA DE SIMBOLOS

| | |
|--------------------------|------------------|
| α | Alfa |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Celsius |
| $>$ | Maior |
| \pm | Mais ou menos |
| $<$ | Menor |
| μ | Micro |
| $\%$ | Porcentagem |
| p | Valor-p |
| $\text{\textcircled{R}}$ | Marca registrada |
| β | Beta |
| θ | Teta |
| λ | Lambda |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 23 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 23 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 25 |
| 3.1 Cárie dentária | 25 |
| 3.2 Cárie secundária | 25 |
| 3.3 Adesão e adesivos em Odontologia | 27 |
| 3.4 Fatores que influenciam a degradação da interface adesiva | 31 |
| 3.5 Prata | 32 |
| 3.6 Própolis vermelha de Alagoas. | 34 |
| 3.7 Nanotecnologia. | 37 |
| 3.8 Síntese biogênica de nanopartículas de prata | 39 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 43 |
| 4.1 Tipo de estudo | 43 |
| 4.2 Reagentes | 43 |
| 4.3 Preparo e análise do extrato de própolis vermelha de Alagoas (EPV) | 44 |
| 4.3.1 Preparo do EPV | 44 |
| 4.3.2 Determinação do teor de flavonoides totais do EPV | 45 |
| 4.3.3 Análise do potencial antioxidante por DPPH do EPV | 46 |
| 4.4 Síntese das nanopartículas de prata | 47 |
| 4.4.1 Síntese de nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas – NPAgB | 47 |
| 4.4.2 Síntese de nanopartículas de prata convencionais (NPAgC) | 49 |
| 4.5 Caracterização das NPAgB e NPAgC na forma de suspensão coloidal e pó. | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5.1 Uv-Vis | 49 |
| 4.5.2 Determinação dos marcadores por Cromatografia Líquida | 50 |
| 4.5.3 Difração de raios-X (XRD) | 51 |
| 4.5.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) | 52 |
| 4.5.5 Atividade antioxidante das nanopartículas NPAgB e NPAgC | 52 |
| 4.6 Síntese dos adesivos experimentais | 53 |
| 4.7 Análise do grau de conversão dos adesivos em espectroscopia no infravermelho | 56 |
| 4.8 Resistência de união a microtração | 57 |
| 4.8.1 Preparo dos dentes | 57 |
| 4.8.2 Procedimento adesivo | 58 |
| 4.8.3 Teste de resistência de união a microtração | 59 |
| 4.9 Atividade antimicrobiana | 61 |
| 4.9.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) | 61 |
| 4.9.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM) | 63 |
| 4.9.3 Meio de Difusão em Disco (MDD) | 63 |
| 4.10 Teste de liberação das NPAgB e NPAgC em saliva artificial | 65 |
| 4.10.1 Liberação em pH 6,7 | 66 |
| 4.10.2 Liberação em pH 4,0 | 67 |
| 4.11 Análise estatística | 67 |
| 5 RESULTADOS | 70 |
| 5.1 Caracterização do extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas | 70 |
| 5.1.2 Análise do teor de flavonoides totais do EPV | 70 |
| 5.1.3 Avaliação da atividade antioxidante do EPV | 71 |
| 5.2 Síntese e caracterização das NPAgB e NPAgC | 71 |
| 5.2.1 UV-VIS | 72 |
| 5.2.2 Identificação dos marcadores da própolis vermelha por HPLC | 73 |

| | |
|---|------------|
| 5.2.3 XRD | 77 |
| 5.2.4 Equação de Debye-Scherrer. | 78 |
| 5.2.5 FTIR | 78 |
| 5.3 Atividade antioxidante (AA%) | 80 |
| 5.3.1 AA% das nanopartículas NPAgB e NPAgC | 80 |
| 5.3.2 AA% do EPV | 81 |
| 5.4 Grau de conversão dos adesivos experimentais | 82 |
| 5.5 Resistência de união imediata, teste de microtração | 84 |
| 5.5.1 Modo de fratura | 85 |
| 5.6 Atividade antimicrobiana | 86 |
| 5.6.1 Concentração inibitória mínima – CIM | 86 |
| 5.6.2 Concentração bactericida mínima – CBM | 86 |
| 5.6.3 Meio de difusão em disco – MDD | 87 |
| 5.7 Liberação de NPAgB e NPAgC em saliva pH 6,8 e 4,0 | 88 |
| 6 DISCUSSÃO | 90 |
| CONCLUSÃO | 107 |
| CONCLUSÃO | 107 |
| REFERÊNCIAS | 109 |
| APÊNDICES | 126 |
| APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE | 126 |
| APÊNDICE B – PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA REALIZADA NESTE TRABALHO | 131 |
| ANEXOS | 137 |
| ANEXO A – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO | 137 |

**ANEXO B – CADASTRO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO
PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO -
SIGEN** **140**

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de materiais com princípios bioativos e novas técnicas que contribuam para reduzir sua toxicidade é de grande importância para as ciências dos materiais e para a odontologia restauradora. As propriedades antibacterianas dos sistemas adesivos constituem uma questão importante em odontologia operatória, uma vez que bactérias viáveis podem permanecer após a realização do preparo cavitário (NAKAJIMA et al., 2011) também podem penetrar na interface dente/restauração através de fendas marginais (CHEN et al., 2014; SU et al., 2018).

A principal causa de falhas nas restaurações de resina composta é a cárie secundária (DEMARCO et al., 2012; HECK et al., 2018), que geralmente ocorre após os três primeiros anos (ÁSTVALDSDÓTTIR et al., 2015). Por isso, é muito importante que novos materiais com atividade antimicrobiana sejam produzidos, prevenindo cáries secundárias e, conseqüentemente, aumentando a longevidade das restaurações adesivas.

A desmineralização dentinária nas lesões cariosas, é promovida pelos ácidos bacterianos, porém os microrganismos não são os únicos responsáveis pela degradação do colágeno (HANNAS et al., 2007). Estudos demonstram que as enzimas endógenas metaloproteinases da matriz (MMPs) desempenham um papel na progressão da lesão cariosa, destruindo a matriz orgânica da dentina (HANNAS et al., 2007). Essas enzimas são ativadas pela redução do pH e têm ação colagenolítica sobre as fibrilas de colágeno do tecido dentinário (TJÄDERHANE et al., 1998).

Várias formulações de adesivos dentinários bioativos vêm sendo propostas, pela incorporação em adesivos de compostos minerais (XIE, et al., 2017), extratos de plantas (YU et al., 2017, FONSECA, 2015; ROY et al., 2010), nanopartículas de quaternário de amônia (CHEN et al., 2014), nanopartículas de prata (OSORIO et al.,

2015; DUTRA-CORREA et al., 2018), fungos (ROSHMI et al., 2018), quercetina, resveratrol e própolis vermelha (ROCHA et al., 2020) dentre outros. Com o objetivo de investigar os efeitos dessas substâncias na resistência de união a dentina (CHEN et al., 2014; DUTRA-CORREA et al., 2018; PORTO et al., 2021), atividade antioxidante (PORTO et al., 2021) e antimicrobiana e antibiofilme contra bactérias cariogênicas (ROSHMI et al., 2018), vários estudos demonstraram o potencial de ação daquelas substâncias na preservação das restaurações de compósitos.

As nanopartículas metálicas têm se destacado como agentes promissores com atividade antibacteriana em baixas concentrações (ZHU et al., 2017). Nesse aspecto, destacam-se as nanopartículas de prata, que apresentam atividade antimicrobiana associada a uma alta efetividade e baixa resistência dos microrganismos (ZHANG et al., 2013).

A adição de nanopartículas de prata em adesivos odontológicos, demonstrou atividade antibacteriana específica na interface dente-restauração (ZHANG et al., 2013). As nanopartículas de prata inibem o crescimento descontrolado do colágeno e regulam a sua deposição, direcionando o alinhamento adequado e o arranjo espacial da matriz de colágeno. (KWAN; LIU; TO; YEUNG; HO; WONG, 2011). A prata é capaz de melhorar a reticulação, a natureza e a estrutura secundária do colágeno dentinário desmineralizado, preparando a matriz orgânica para a mineralização interfibrilar a longo prazo (OSORIO et al., 2018).

As nanopartículas metálicas podem ser criadas por meios físicos, químicos ou biológicos. O método biológico vem obtendo destaque perante os demais por ser ecologicamente correto, econômico e por reduzir a toxicidade das nanopartículas. Esse método consiste no uso de microrganismos ou plantas medicinais para redução de macromoléculas (KESHARI et al., 2020). O uso de plantas tem uma enorme

vantagem pois as propriedades dos extratos são adicionadas às nanopartículas durante a síntese (FERREIRA-RANGEL, 2009).

A própolis é produzida pela saliva de abelhas, utilizadas com a finalidade de fechar pequenas lacunas na colmeia, impedir a entrada de insetos e reduzir a proliferação de fungos e bactérias. É, portanto, um importante antibiótico natural e desempenha um papel promissor em medicina e odontologia (TORETI et al., 2013; MENDONÇA et al., 2015).

No Brasil, a biodiversidade da flora favorece o surgimento de 13 tipos de própolis. O 13º tipo de própolis brasileira, que tem como característica a coloração vermelha intensa, e é produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* com a seiva de *Dalbergia ecastophyllum*, uma planta leguminosa que habita os mangues do Nordeste do Brasil (SILVA et al., 2007). A própolis vermelha de Alagoas, tem componentes únicos que a diferenciam de outras própolis produzidas no Brasil e em todo o mundo, dentre os compostos já conhecidos, isoflavonóides, propolonas/gutiferonas, terpenos, e compostos fenólicos, são as principais classes de metabólitos secundários presentes na própolis vermelha (MENDONÇA et al., 2015; MACHADO et al., 2016; RUFATTO et al., 2017). Além de componentes únicos, a própolis vermelha de Alagoas apresenta uma potente atividade antimicrobiana contra bactérias orais, com valores de <math><10 \mu\text{g/mL}</math> para *Streptococcus mutans* (DAUGSCH, 2017; PORTO et al., 2018). Essa composição fenólica da própolis, principalmente rica em flavonoides, a tornam adequadas para a síntese de nanopartículas metálicas, por proporcionarem a redução de metais e também sua estabilização (BARBOSA, et al., 2019).

O desenvolvimento de biomateriais com nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas pode resultar em materiais com atividade antimicrobiana, antioxidante e com potencial para inibir a ação de

metaloproteinases da matriz na dentina devido à alta atividade antioxidante da própolis, reduzindo a incidência de cáries secundárias e proporcionando maior longevidade para as restaurações adesivas.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar um adesivo dental com nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter o extrato de própolis vermelha de Alagoas (EPV);
2. Determinar o teor de flavonoides e atividade antioxidante do EPV;
3. Produzir nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de alagoas (NPAgB);
4. Caracterizar as nanopartículas em forma de pó e de suspensão coloidal;
5. Avaliar a atividade antioxidante das nanopartículas;
6. Sintetizar um adesivo dental com nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha;
7. Analisar o grau de conversão dos adesivos;
8. Avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas e do adesivo experimental;
9. Avaliar a liberação de nanopartículas de prata do adesivo polimerizado em saliva artificial;
10. Avaliar a resistência de união à microtração da interface resina/dentina.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cárie dentária

A cárie é uma doença infecciosa, sacarose dependente, causada pela presença de um biofilme poli microbiano maduro na superfície dentária, cuja atividade metabólica, confere um processo dinâmico de desmineralização e remineralização do esmalte dentário, causando desgaste dental e o desenvolvimento da doença (HESSE *et al.*, 2014; ISMAIL *et al.*, 2013). Múltiplos fatores, incluindo os ácidos bacterianos, açúcares (dieta), saliva, fatores internos e externos, podem afetar o processo de desmineralização e remineralização dos dentes. Durante o processo da cárie, bactérias acidúricas e acidogênicas são predominantes no biofilme dental, sendo o *Streptococcus mutans* a mais fortemente associada (BUENO-SILVA *et al.*, 2013).



Figura 1. Fatores de desenvolvimento da cárie dentária. Fonte: O autor (2021).

3.2 Cárie secundária

A cárie secundária é uma das causas mais frequentes de falhas e substituições das restaurações dentárias e o tratamento demanda tempo e alto custo (DE BACKER *et al.*, 2006; ARJMAND *et al.*, 2018). Durante o exame clínico é

importante verificar as condições da estrutura dental, para que as margens da restauração estejam ajustadas com precisão e isentas de porosidades, além de efetivo acabamento e polimento, para evitar o acúmulo de biofilme sobre a restauração (HADDAD *et al.*, 2011). Os microrganismos responsáveis pelo surgimento da cárie secundária são os mesmos envolvidos na cárie primária e os principais agentes etiológicos são do gênero *Streptococci*, como o *Streptococcus mutans* e *Streptococcus Sobrinus* (NEDELJKOVIC *et al.*, 2015).

A película adquirida é uma camada de proteínas salivares que recobrem as superfícies de dentes e restaurações. Essa camada agrega microrganismos colonizadores iniciais e, caso não seja removida por meios mecânicos ou químicos, há a formação do biofilme bacteriano (ALLAKER *et al.*, 2010). Esse biofilme é composto por diversas espécies bacterianas por mL de saliva ou mg de biofilme, em uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS), que é constituída de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (CHENG *et al.*, 2012). No biofilme os microrganismos aderem uns aos outros na superfície, tornando-se assim mais resistentes a agentes antimicrobianos (ALLAKER *et al.*, 2010). Condições repetidas de pH baixo no biofilme fazem o número de microrganismos acidogênicos e acidúricos prevalecer como *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* (MARSH *et al.*, 2000).

Mediante a fermentação da sacarose proveniente da dieta, os microrganismos do biofilme produzem ácidos, como o ácido láctico (MELO *et al.*, 2016), que junto com os ácidos advindos de alimentos, bebidas e do suco gástrico (OSÓRIO *et al.*, 2018), são responsáveis pela desmineralização do esmalte e dentina, além da degradação da interface dente/restauração (NEDELJKOVIC *et al.*, 2015). A progressão de cárie no esmalte e dentina assumem aspectos diferentes. A cárie no esmalte refere-se à

dissolução de um tecido altamente mineralizado como resultado da agressão pelos ácidos, enquanto que na dentina envolve tanto a desmineralização do tecido como a degradação da matriz orgânica de fibrilas de colágeno tipo I (LIMA *et al.*, 2007).

Há vários fatores que influenciam o surgimento de cáries secundárias, a contração de polimerização das resinas odontológicas que favorecem o selamento cavitário não adequado, a degradação hidrolítica e enzimática da interface adesiva e o acúmulo de biofilme sobre as restaurações (NEDELJKOVIC *et al.*, 2015; OSÓRIO *et al.*, 2018; ALLAKER *et al.*, 2010 HADDAD *et al.*, 2011).

Mais de 70% dos ensaios clínicos, que avaliaram restaurações de resina composta entre um e cinco anos de estudo, demonstraram que o maior percentual de falhas nas restaurações ocorre por cárie secundária (52%), seguidas de falhas por fratura (33%), forma anatômica (23%), adaptação marginal (23%) (MELO *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2016).

3.3 Adesão e adesivos em Odontologia

Atualmente, a principal opção para o tratamento das lesões cariosas baseia-se no preparo de cavidades conservadoras e na utilização de materiais restauradores adesivos. No entanto, uma das limitações da interface resina-dentina criada pelos sistemas adesivos é a degradação ao longo do tempo, o que compromete a durabilidade das restaurações de resina composta (HASHIMOTO *et al.*, 2000; DE MUNCK *et al.*, 2005; SANO *et al.*, 2006; BRESCHI *et al.*, 2008; FRASSETO *et al.*, 2016).

A adesão dos materiais dentários aos tecidos duros dos dentes é um desafio enfrentado pelos dentistas na conquista de restaurações que permaneçam adequadas por maior tempo, sem a necessidade de novos procedimentos e mais desgaste de estrutura sadia, que podem evoluir para o comprometimento da polpa dental. Devido a sua natureza complexa, a interface entre o dente e o material restaurador é o ponto

mais vulnerável da técnica adesiva, independentemente da estratégia empregada (HASHIMOTO 2010; PASHLEY *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011).

Na adesão de materiais dentários, é necessário levar em consideração os dois substratos presentes, o esmalte e a dentina, e seus aspectos estruturais e histológicos, que são diferentes e têm relação direta com o desempenho final do material restaurador (SANCHEZ, 2017).

O esmalte é uma estrutura composta basicamente por cristais de hidroxiapatita (HAP), altamente calcificado, com 98% de conteúdo inorgânico e apenas 2% de água em sua composição, tornando-o, assim, mais favorável para adesão. (SANCHEZ, 2017).

Já a dentina é um tecido conjuntivo mineralizado, cuja estrutura histológica difere drasticamente do esmalte. Em sua composição encontra-se 20% de colágeno Tipo I, 10% de água e 70% de cristais de hidroxiapatita. A dentina é considerada o substrato menos favorável para restaurações adesivas não somente por sua composição, mas também pela presença de túbulos dentinários que fazem dela um tecido altamente permeável e mais suscetível a degradação ao longo do tempo (DUTRA-CORREA *et al.*, 2018).

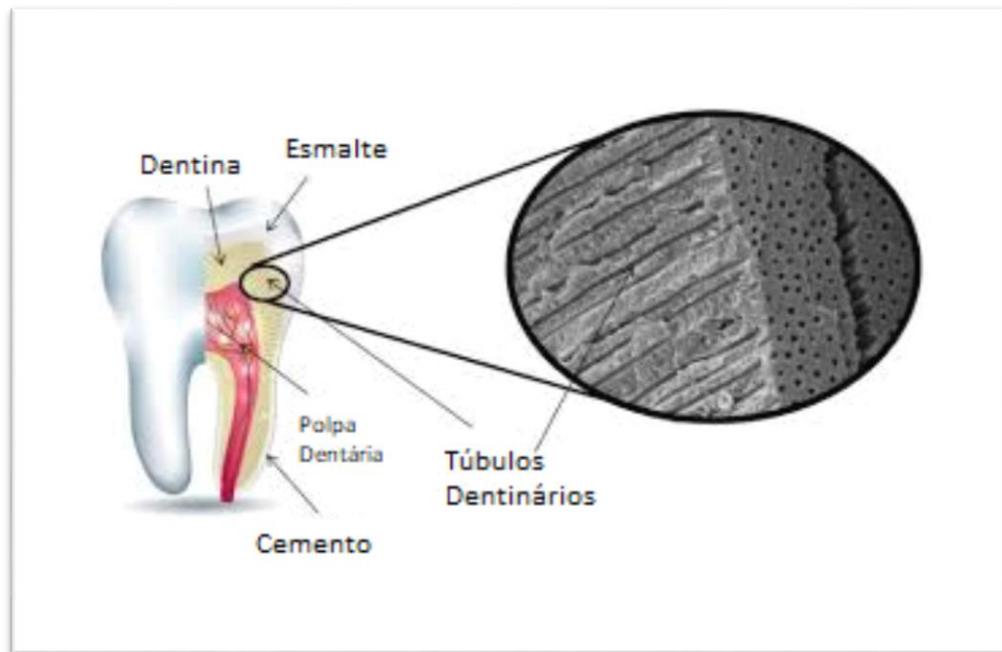


Figura 2. Ilustração da estrutura dentinária. Fonte: Adaptado de BARATIERI 2001.

Os sistemas adesivos são materiais fundamentais para a união do material restaurador às estruturas dentárias (NAKAJIMA *et al.*, 2011). Esses sistemas se baseiam da combinação entre monômeros resinosos, ácidos, foto-iniciadores, diluentes, solventes orgânicos e adição de carga inorgânica (OMAR *et al.*, 2007; ANUSAVICE *et al.*, 2013; ANDRÉ *et al.*, 2015). Os sistemas adesivos podem ser agrupados de acordo com o tipo de interação com o substrato dental a adesão através de retenção micromecânica, química ou ambas (TJÄDERHANE *et al.*, 2013) e podem ser classificados como sistemas de condicionamento total, autocondicionantes ou universais, e segundo o número de passos exigidos para sua aplicação, classificados como de passo único, dois ou três passos (MATTOS *et al.*, 2017).

Nos sistemas adesivos de condicionamento total, o ácido fosfórico a 37% com $\text{pH} < 1$, considerado agressivo (SKUPIEN, 2014), é aplicado no substrato dental para remover a smear layer, que é uma camada de esfregaço produzida através da instrumentação rotatória sobre este tecido, composta por resíduos de dentina,

presença de saliva, sangue, bactérias, fragmentos de materiais restauradores que penetram nos túbulos dentinários (SANCHEZ, 2017; ANUSAVICE, 2013).

Os adesivos contêm monômeros hidrofílicos como o 2-hidroetil metacrilato (HEMA), que associados aos solventes orgânicos como álcool, acetona e água, servem para deslocar, a umidade presente no substrato dental, e assim levar os monômeros resinosos para o interior das fibrilas de colágeno (MATTOS *et al.*, 2017). O colágeno exposto serve como um intermediário para a ligação do substrato dental hidratado ao adesivo hidrofóbico e posterior formação da camada híbrida (ARINELLI *et al.*, 2016). Os adesivos também podem apresentar monômeros hidrofóbicos como o Bis-Glicidilmetacrilato (Bis-GMA), uretano dimetacrilato (UDMA) e etilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA).

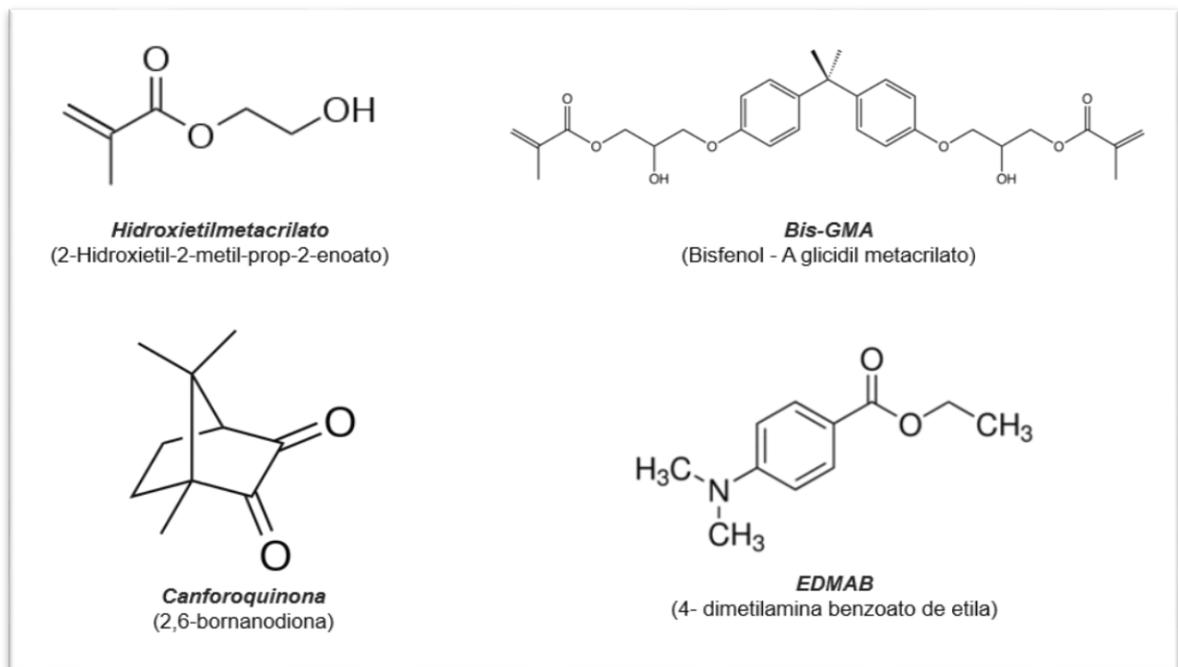


Figura 3. Estrutura química dos monômeros e fotoiniciadores utilizados nesse estudo. Fonte: Adaptado de google acadêmico 2021

As técnicas de condicionamento total do substrato dental contam com a subjetividade da quantidade de água que permanece no substrato após processo de lavagem e remoção do ácido fosfórico (ARINELLI *et al.*, 2016). Se a água for removida

em excesso, ocorre o colapso das fibras colágenas, e os monômeros resinosos não penetram adequadamente entre os espaços interfibrilares. E se a dentina for deixada muito úmida, os monômeros serão diluídos, o que interfere diretamente no grau de conversão do adesivo (SOUZA & MORO, 2014).

3.4 Fatores que influenciam a degradação da interface adesiva

A eficácia da adesão está diretamente relacionada à eficiência da penetração dos monômeros nos espaços interfibrilares, ao completo envolvimento das fibrilas expostas pelo condicionamento ácido e ao grau de conversão do adesivo *in situ* (PASHLEY *et al.*, 2000). Dois fatores desempenham papel principal no processo de degradação da interface adesiva e, conseqüentemente, na redução da resistência de união de sistemas adesivos à dentina: (1) a degradação hidrolítica do polímero presente na camada híbrida e no material adesivo ao longo do tempo e (2) a presença de fibrilas de colágeno desprotegidas abaixo da camada híbrida, que não foi completamente infiltrada pelo adesivo, e estão sujeitas à hidrólise pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) e catepsina cisteínas (CTs) (GANDOLFI *et al.*, 2010; ÖRTENGREN 2000; SANCHEZ ., 2017; AGUIAR ., 2019).

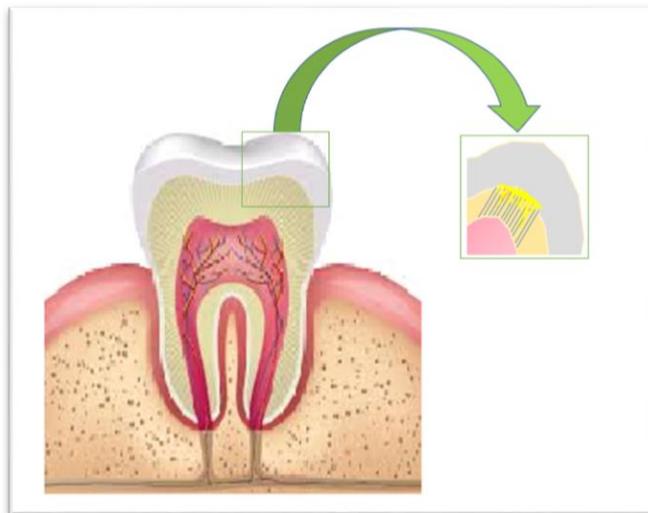


Figura 4. Demonstração da interface adesiva com presença de fibrilas colágenas protegidas pelo material adesivo e presença da camada híbrida em amarelo. Fonte: O autor (2021).

A degradação da interface adesiva, envolve uma série de fatores, desde a exposição à água proveniente do fluido dentinário e do ambiente oral (degradação hidrolítica) aos fatores enzimáticos inerentes do hospedeiro (degradação enzimática) (TJADERHANE *et al.*, 2013). Estudos vêm sendo desenvolvidos para elucidar qual delas atua primordialmente na desestabilização da união (PERDIGÃO *et al.*, 2013).

Acredita-se que a degradação da interface adesiva pela ação enzimática seja induzida pela ação de ácidos na dentina sobre as fibrilas colágenas expostas e não totalmente permeadas pelo adesivo (PASHEY *et al.*, 2004). O baixo pH pode ser provocado pelo processo cariioso, pelo condicionamento com ácido fosfórico e pelos monômeros resinosos ácidos, usados durante o procedimento restaurador (SKUPIEN, 2010). A desmineralização expõe a matriz de colágeno, causando alterações no arranjo molecular, a quebra das ligações cruzadas entre as fibrilas do colágeno, expondo os sítios de união (PERDIGÃO *et al.*, 2013). Os inibidores de MMPs podem prevenir e minimizar a degradação do colágeno exposto e com incompleta infiltração da resina na camada híbrida, contribuindo assim para a longevidade e manutenção da resistência de união (SANCHEZ, 2017).

A degradação da interface adesiva começa pela região não infiltrada pelos adesivos até chegar na camada de resina adesiva ao longo do tempo. Além disso, o desgaste mecânico pelas forças mastigatórias aumenta a degradação da interface adesiva, ao ponto de permitir, em algumas ocasiões, o contato da interface adesiva com os fluidos salivares, o que aumenta a degradação dos metacrilatos pelas enzimas salivares (SANCHEZ, 2017).

3.5 Prata

A prata é conhecida como agente antimicrobiano, seus efeitos atingem as bactérias cariogênicas, principalmente *Streptococcus mutans*, inibindo o crescimento de biofilme cariogênico nos dentes. As nanopartículas de prata (NPAgC) tem sido investigada em odontologia principalmente por sua propriedade antibacteriana a longo prazo, através de liberação de íons de prata. As NPAgC, possuem um amplo espectro antibacteriano, mesmo em baixas concentrações, possibilitando assim a perda da integridade da membrana celular causada pela aderência e penetração da prata na parede celular, fazendo com que haja a perda de capacidade de replicação de DNA e inativação das enzimas vitais das bactérias e na formação de espécies reativas de oxigênio (RAI *et al.*, 2012; RAI *et al.*, 2009; DUTRA-CORREA *et al.*, 2018).

Além disso, foi demonstrado que as NPAgC têm 25 vezes mais eficácia antibacteriana do que a clorexidina (BESINIS *et al.*, 2014). Além disso, a biocompatibilidade dos NPAgC, especialmente em menor concentração, já foi confirmada previamente por Gomes-Filho *et al.* (2010). No estudo de Fatemeh *et al.*, 2017, o pré-tratamento com NPAgC antes ou depois do condicionamento com ácido não altera a resistência de união dos adesivos de dois passos, seja de condicionamento total ou autocondicionante.

Em baixas concentrações as nanopartículas de prata demonstram maior efeito antimicrobiano contra *Streptococcus mutans* do que outros agentes, como ouro ou zinco, isso permite efeitos clínicos importantes com toxicidade reduzida (HERNÁNDEZ-SIERRA *et al.*, 2008).

ZHAO e cols. (2018) relataram a remineralização de esmalte desmineralizado pela ação da prata, nesse estudo os autores mostraram que a perda mineral do esmalte e dentina era reduzida após o tratamento com a prata. Uma superfície altamente mineralizada rica em cálcio e fosfato foi formada em lesões cariosas. Esse

estudo demonstrou ainda o efeito protetor da prata sobre o colágeno da dentina, com a ação inibitória de colagenase da dentina (ZHAO, *et al.*, 2018).

3.6 Própolis vermelha de Alagoas.

A própolis é produzida por abelhas para fechar pequenas lacunas na colmeia, impedir a entrada de insetos e reduzir a proliferação de fungos e bactérias. A própolis é uma substância resinosa derivada da seiva e brotos de plantas e misturada à saliva das abelhas. Sua composição é bastante complexa, e suas propriedades são influenciadas pela época da colheita, clima, estações do ano, a flora da região (REGUEIRA *et al.*, 2017; NASCIMENTO, *et al.*, 2019) e, portanto, um importante antibiótico natural e desempenha um papel promissor em medicina e odontologia (TORETI *et al.*, 2013; MENDONÇA *et al.*, 2015).

Em odontologia, alguns trabalhos foram publicados em diversas áreas, entre elas endodontia (PAROLIA *et al.*, 2010; MALHOTRA *et al.*, 2011; ANAUATE *et al.*, 2013), cariologia (MALHOTRA *et al.*, 2011; ASAWAHAME *et al.*, 2015), cirurgia (CASAROTO *et al.*, 2010) e periodontia (CHEN *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2011), e no campo da odontologia restauradora (DUTRA-CORREA *et al.*, 2018; PORTO *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2019).

A atividade biológica da própolis é frequentemente associada a presença de compostos fenólicos, principalmente flavonóides, isoflavonas, entre outros e esses compostos são responsáveis pelas várias propriedades da própolis vermelha (BUENO-SILVA *et al.*, 2013), tendo também efeito anti-proliferativo para as células cancerígenas (KOUIDHI, ZMANTAR, & BAKHROUF, 2010) e combatendo microrganismos resistentes encontrados em infecções odontogênicas, e nas doenças periodontais (SHABBIR, RASHID, TIPU, 2016). No Brasil, a biodiversidade da flora favorece o surgimento de 13 tipos de própolis. O 13º tipo de própolis brasileira tem uma característica de coloração vermelha intensa, e é produzido por abelhas da

espécie *Apis mellifera* com a seiva de *Dalbergia ecastophyllum*, uma planta leguminosa que habita os mangues nordestinos do Brasil (DAUGSCH *et al.*, 2007). Além disso esse tipo de própolis pode reduzir a colonização de microrganismos facultativos de anaeróbios como *Streptococcus mutans*, auxiliando assim na prevenção de cárie dentária (BUENO-SILVA *et al.*, 2013), além de suas outras propriedades antimicrobianas estudadas.

A Própolis Vermelha de Alagoas (PVA) é cada vez mais pesquisada, por causa das suas diversas atividades biológicas comprovadas. Embora possam existir diferenças em sua composição química e algumas atividades podem não ser presentes em todas as amostras. Isso vai de acordo com a região mediante a fauna e flora da região e o período em que foi coletada, pelas alterações climáticas (REGUEIRA *et al.*, 20017; NASCIMENTO *et al.*, 2019). A atividade antimicrobiana foi estudada frente a diversas bactérias gram-positivas dentre elas *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* (MATTOS *et al.*, 2015), e Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (RIGHI *et al.*, 2011).

A própolis vermelha de Alagoas, tem componentes químicos únicos que diferenciam de outras própolis brasileiras e em todo o mundo. Terpenos, isoflavonóides, chalconas, gutiferronas e compostos fenólicos são os principais metabólitos secundários presentes na PVA (ALENCAR *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2016; RUFATTO *et al.*, 2017).

Foi relatado na literatura que o Medicarpin, Neovestitol e Vestitol podem ser os compostos responsáveis pelas propriedades antimicrobianas do extrato de própolis vermelha (INUI *et al.*, 2014; BUENO-SILVA, MARSOLA, *et al.*, 2017). De fato, uma combinação natural de Vestitol e Neovestitol interrompeu a formação de biofilmes cariogênicos de *Streptococcus mutans* (BUENO-SILVA, *et al.*, 2013), e essas

moléculas bioativas foram responsáveis pelos efeitos antimicrobianos do extrato etanólico de própolis vermelha. Estudos demonstram, também, uma potente atividade antimicrobiana do extrato de PVA, mesmo em baixas concentrações 0,1% a 1% (PORTO *et al.*, 2015), sendo efetivo contra *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* (BUENO-SILVA *et al.*, 2013; ANAUATE *et al.*, 2013; ASAWAHAME *et al.*, 2015; PORTO *et al.*, 2015) que é atribuída à alta concentração de flavonoides e compostos fenólicos na própolis vermelha brasileira (BUENO-SILVA *et al.*, 2017).

O mecanismo da atividade antimicrobiana da própolis é complexo e pode ser atribuído a presença de vários compostos bioativos, particularmente isoflavonóides e à combinação entre eles. (FERNANDES-JÚNIOR *et al.*, 2006) Atua pelo dano à membrana citoplasmática (causado por baixa fluidez da membrana), inibição da síntese de ácidos nucleicos (causada pela inibição da topoisomerase), inibição do metabolismo energético (causado pelo NADH-citocromo inibindo a C redutase) e pela inibição da ligação e formação de biofilmes (YIXI *et al.*, 2015).



Figura 5. Ilustração da abelha *Apis mellifera* e da planta *Dalbergia ecastophyllum*.
Fonte: Adaptado de Magalhães *et al.*, 2011.

3.7 Nanotecnologia.

De acordo com COLLIER *et al.*, (2015) a nanotecnologia é definida pelo intervalo de tamanho, formas químicas e estruturais que os nanomateriais podem assumir. A faixa de tamanho mais comumente utilizada para identificar os nanomateriais está entre 1 e 100 nm. Além do tamanho, esses materiais possuem propriedades que surgem em função de vários fatores de interação, incluindo a composição química, forma e estrutura cristalina das nanopartículas (BOVERHOF *et al.*, 2015; HULL *et al.*, 2019).

Diferentes Nanopartículas (NPs) de metal têm sido usadas em várias áreas da Odontologia devido as suas propriedades antibacterianas. Além disso, as bactérias têm menor probabilidade de desenvolver resistência a nanopartículas de metal do que a maioria dos antibióticos disponíveis comercialmente (BORZABADI-FARAHNI *et al.*, 2014).

Dentre os nanomateriais estudados, as nanopartículas metálicas destacam-se, principalmente as de prata, que possuem vasta aplicabilidade em diversos setores. As NPs metálicas são sintetizadas principalmente por métodos físico e químico (JIROVA *et al.*, 2016). Um dos métodos convencionais mais utilizados é por redução química de sais, sendo o boro hidreto de sódio um dos mais difundidos (OTTONI *et al.*, 2018).

Os métodos utilizados na preparação dos nanomateriais em geral, podem ser agrupados em dois métodos distintos: “Bottom-up” da tradução de baixo pra cima, que envolve a construção de estruturas, através da manipulação de aglomerados de moléculas ou partículas utilizando-se um meio químico ou biológico (LOPES, 2017). Pela via “Top-down”, da tradução de cima pra baixo, é onde o material em escala

maior é quebrado em pequenas partículas através de uma redução de tamanho com o auxílio de um agente redutor (BARBOSA, 2019).

Essas nanopartículas podem ter formato esférico, cúbico, pontiagudo (ALAKER *et al.*, 2010) e triangular, além disso, a redução de partículas a tamanhos nanométricos aumenta sua área de superfície (RIAZ *et al.*, 2017), e modifica as propriedades como dureza, reatividade química, e atividade biológica (LI *et al.*, 2013; RIAZ *et al.*, 2017), portanto, podem ter benefícios mesmo quando aplicadas em baixas concentrações (PADOVANI *et al.*, 2015).

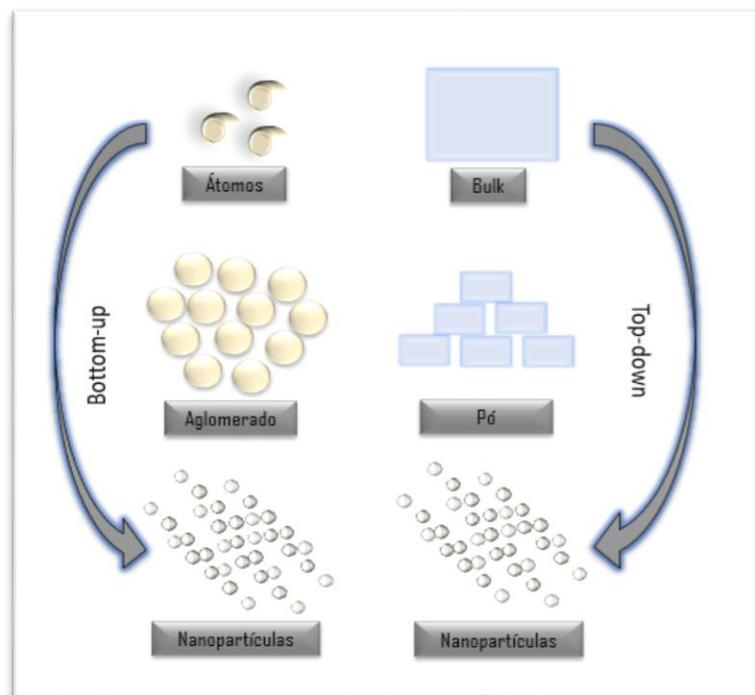


Figura 6. Desenho esquemático dos métodos de síntese de nanopartículas. Fonte: O autor (2021).

Seu tamanho diminuto está diretamente relacionado com o aumento da capacidade de penetração em membranas celulares. As nanopartículas metálicas podem ser utilizadas para controlar biofilmes devido suas propriedades biocidas, anti-adesivas e de liberação de substâncias (ALAKER *et al.*, 2010). Muito embora os métodos químicos sejam os mais descritos, esses métodos dependem de agentes estabilizantes e redutores que por muitas vezes são tóxicos e dependem de processos

mais trabalhosos e custosos (XUE *et al.*, 2016). Visando superar essas desvantagens, na última década, muitos estudos têm utilizado uma abordagem biológica para a obtenção de NPs metálicas.

3.8 Síntese biogênica de nanopartículas de prata

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar, sendo utilizada em várias áreas como engenharia, medicina, odontologia, física, botânica, dentre outras. Essa tecnologia tem sido amplamente aceita, em razão das propriedades químicas, mecânicas, biológicas e estruturais que os nanomateriais podem assumir (COLLIER *et al.*, 2015; BOVERHOT *et al.*, 2015; HULL *et al.*, 2019).

Síntese biogênica ou síntese verde são termos utilizados para a síntese ecologicamente correta de nanopartículas. O processo de síntese de nanopartículas através de métodos químicos e físicos, envolve substâncias químicas tóxicas, aumentando a toxicidade do material (XUE *et al.*, 2016).

MOHANPURIA *et al.*, (2008) relatam que as NP biológicas são mais vantajosas quando comparadas com as sintetizadas por via química e física, uma vez que, neste tipo de síntese não são utilizados agentes químicos além do metal precursor. Os autores também destacam que as NP biológicas possuem uma maior estabilidade e biocompatibilidade (não produzem efeitos nocivos sobre tecidos biológicos), reduzindo assim, a sua toxicidade, além de ser uma reação completa, sem a formação de outras substâncias (SCHRÖFEL *et al.*, 2014).

O processo de formação das nanopartículas ocorre em duas fases: Nucleação, onde ocorre a formação de pequenos núcleos de nanopartículas devido a presença do agente redutor e da redução dos íons Ag ao estado metálico (CRUZ, 2010). Após essa formação, ocorre o crescimento, por deposição de novos núcleos a superfícies dos existentes. As nanopartículas possuem um revestimento composto por um material orgânico que lhes confere estabilidade, que pode prevenir a agregação

dos pequenos núcleos de nanopartículas, obtendo-se assim nanopartículas com pequenos tamanhos.

Existem vários meios para produzir nanopartículas biossintetizadas utilizando plantas, fungos, bactérias. O método de síntese via extrato de plantas, é rápido, ecologicamente correto, rentável e de baixo custo. A síntese biológica apresenta algumas outras vantagens em comparação às obtidas por via química e física: baixa toxicidade, não possuem alta demanda de energia e são processos considerados de baixo custo (SINGH *et al.*, 2015).



Figura 7. Desenho esquemático do método de síntese biogênica utilizando extrato de própolis vermelha de Alagoas. Fonte: O autor (2021).

A utilização da síntese biogênica com materiais biológicos, vem sendo estudados com vários tipos de plantas medicinais, com importantes propriedades antimicrobianas e bom resultado na formação de nanopartículas de tamanhos pequenos, isso pode ser explicado pela boa interação das propriedades redutoras da planta utilizada e da prata. Vários estudos utilizaram plantas para redução da prata e de outros metais em nanopartículas, como *Eucalyptus*, com tamanho de partícula entre 25-30 nm (SHIVAKUMAR *et al.*, 2017), *Malva. Crispa Linn*, com tamanho entre 5-50 nm (KRISHNARAJ *et al.*, 2017), *Proposis farcta*, com tamanho de 25nm (MIRI *et al.*, 2018), *aloe vera* (TIPPAYAWAT *et al.*, 2014) e flores de *calêndula* (PADALIA *et al.*, 2014). Barbosa *et al.* (2019) sintetizaram nanopartículas com própolis vermelha

de Alagoas, que apresentaram boa atividade antimicrobiana. Em comparação com a síntese química, a síntese biogênica apresenta uma nanopartícula com atividade superior (DURAN *et al.*,2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Esse é um estudo laboratorial *in vitro* desenvolvido no Laboratório de Caracterização e Análise de Biomateriais (LaCa-bio/FOUFAL), Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas (TecNANO/ICF), Laboratório de Análises Farmacêuticas (LAFA – ICF) e no Laboratório de Microbiologia (ICF) da Universidade Federal de Alagoas.

4.2 Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos possuíam grau de pureza analítica e estão discriminados na Tabela 1. As vidrarias foram previamente lavadas com água deionizada por 3 vezes e limpas com etanol a 70% GL.

Tabela 1. Reagentes utilizados nesta pesquisa.

| REAGENTES | FÓRMULA | FABRICANTE |
|---|---|---------------------------------|
| 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) | C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆ | Sigma-Aldrich, Alemanha |
| 4-dimetil aminobenzoato de etilo (EDMAB) | C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ | Sigma-Aldrich, Alemanha |
| Acetonitrila HPLC gradiente | CH ₃ CN | Metal Química, SP Brasil |
| Ágar Muller Hinton | | Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha |
| Água deionizada | H ₂ O | Nalgon, SP, Brasil |
| Álcool etílico absoluto p. A. | C ₂ H ₆ O | Química Moderna, SP Brasil |
| Álcool metílico p. A, | CH ₃ OH | Química Moderna, SP Brasil |
| Brometo de potássio | KBr | Synt, SP, Brasil |
| Canforoquinona | C ₁₀ H ₁₄ O ₂ | Sigma-Aldrich, Alemanha |
| Citrato de sódio tribásico | C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O | Vetec Química, SP, Brasil |
| Cloramina-t | C ₇ H ₇ ClNO ₂ SNa | Sigma-Aldrich, Alemanha |
| Cloreto de alumínio | AlCl ₃ | Sigma-Aldrich, Alemanha |
| Cloreto de trifetil tetrazólio 2,3,5- | C ₁₉ H ₁₅ ClN ₄ | Metal Química, SP Brasil |
| Dimetilsulfóxido | C ₂ H ₆ OS | Dinâmica, SP, Brasil |
| Hidróxido de sódio | NaOH | Sigma-Aldrich, Alemanha |
| Metacrilato de 2-hidroxietila (hema) | C ₆ H ₁₀ O ₃ | Sigma-Aldrich, Alemanha |
| Metacrilato de bisfenol a-glicidilo (bis-gma) | C ₂₉ H ₃₆ O ₈ | Sigma-Aldrich, Alemanha |
| Nitrato de prata | AgNO ₃ | Dinâmica, SP, Brasil |
| Tween 20 polissorbato | C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆ | Dinâmica, SP, Brasil |

Fonte: O Autor (2021)

4.3 Preparo e análise do extrato de própolis vermelha de Alagoas (EPV)

A própolis bruta foi coletada da cidade de Marechal Deodoro, estado de Alagoas, Brasil. A própolis foi coletada do apiário da ilha do Porto de coordenadas geográficas 9° 44.555' S, 35° 52.080' W e 18.1m acima do nível do mar. O projeto foi registrado no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético), com o número de cadastro A88DA2B.

4.3.1 Preparo do EPV

A extração foi realizada manualmente, inicialmente 50 g de própolis bruta foi macerada e colocada em um béquer com 200 mL de etanol a 80% GL (80:20 v/v) (Figura 1) e mantido no escuro sem agitação por 48 horas, o sobrenadante (porção líquida) foi removido através de uma pipeta e colocado em outro béquer, e ao macerado (porção sólida) foi adicionado 200 mL de etanol a (80:20 v/v). Todo esse processo foi realizado em triplicata.

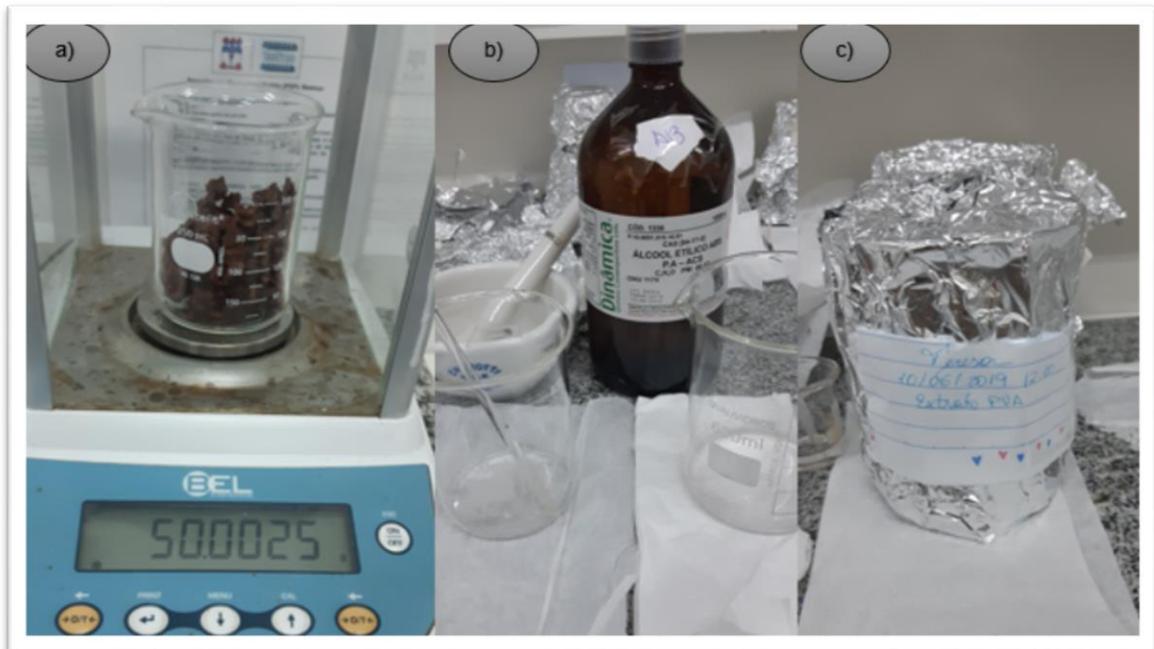


Figura 8. Preparação do extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas (EPV). a) própolis vermelha de Alagoas bruta pesada. b) preparação de álcool a 80% e colocada no béquer com a própolis vermelha bruta; c) após maceração o extrato foi acondicionado por 48 horas. Fonte: O Autor (2021)

A porção líquida final total (600mL) foi filtrada através de filtro Quality de papel e submetida à destilação sob pressão reduzida em um evaporador rotativo (modelo IKA RV 10; Marca IKA Works / IKA Werke GmbH & Co. KG) em banho maria à 35-40 °C (pressão em 800 mmHg e velocidade de 155 rpm), para remoção do solvente.



Figura 9. Evaporador rotativo com o extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas, para liberação do solvente residual. Fonte: O Autor (2021).

Após a rota evaporação, o extrato foi acondicionado em um recipiente de vidro, no escuro, a 27 °C para remoção do solvente residual. Ao final foram obtidos 33 g de extrato etanólico de própolis vermelha. O EPV foi ressuspenso no mesmo solvente a uma concentração de 1000 µg/mL e levado para agitação em placa agitadora (Quimis® Q261M23, Brasil), na velocidade de 200 rpm, até sua completa dissolução.

4.3.2 Determinação do teor de flavonoides totais do EPV

Para determinação do teor de flavonoides totais uma curva padrão de quercetina foi feita nas concentrações de 4 a 10 µg/mL, tornando-se como referência

para as outras amostras. A análise do teor de flavonoides totais foi realizada a partir de uma solução estoque contendo o EPV na concentração de 5000 µg/mL. Foram preparadas cinco concentrações diferentes para a PVA (100; 150; 200; 250; 300 µg/mL) em um balão de 5 mL com 100µL de AlCl₃ a 5% e adicionado com metanol, em seguida agitou-se levemente por alguns segundos e após o término do tempo de 30 minutos levou-se a leitura no espectrofotômetro, no comprimento de onda em 425 nm, calculando-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados. O teor total de flavonoides foi expresso em mg e as análises foram realizadas em triplicata.

4.3.3 Análise do potencial antioxidante por DPPH do EPV

O reagente de DPPH 0,004 mM, foi pesado em uma balança analítica da marca (Shimadzu AX 200), em seguida solubilizou-se em 100 mL de etanol absoluto para preparação de uma solução estoque de 100 mL de DPPH em etanol na concentração de 0,04 mg/mL, a solução foi acondicionada livre de luminosidade e mantida a 4 °C, com aspecto fluido e coloração violeta. Foram solubilizados 5 mg do extrato de PVA em 5 mL do meio extrator (etanol/água 80:20 V.V.). As amostras foram colocadas no ultrassom por quinze minutos e posteriormente filtrada, usando papel filtro analítico qualitativo (14 µm de tamanho do poro) resultando em uma solução estoque com concentração de 1000 µg/mL. Posteriormente, retirou-se os volumes determinados da solução estoque do extrato nas concentrações de: 50, 40, 30, 20, 10, 5 µg/mL. Adicionou-se 2 mL de solução de DPPH para cada balão de 5 mL, completando seu volume com etanol, obtendo assim as concentrações desejadas para análise posterior. Após 30 min de repouso na ausência de luz foi medida sua absorbância mediante leitura no espectrofotômetro UV-Mini em modo fotometria com comprimento de onda (λ) de 518 nm.

A capacidade antirradicalar foi expressa através do IC₅₀ (µg.mL⁻¹), que corresponde à concentração necessária de amostra para diminuir em 50 % a

absorbância inicial do radical DPPH. O cálculo do IC₅₀ foi conduzido a partir de uma regressão linear utilizando os dados colorimétricos obtidos a partir da seguinte equação:

$$AA (\%) = \left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \cdot 100\%$$

Onde A (controle) = absorbância da solução do controle negativo e A (amostra) = absorbância das dissoluções dos referidos grupos.

4.4 Síntese das nanopartículas de prata

4.4.1 Síntese de nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas – NPAgB

Com o EPV obtido, realizou-se a síntese de nanopartículas de prata assistidas com própolis vermelha de Alagoas (NPAgB) de acordo com BARBOSA, 2018, mediante a diluição de uma solução mãe de EPV em álcool etanólico diluído em água (80:20 V.V.) em uma concentração de 25 µg/mL, adicionados em água deionizada 500 mL sobre aquecimento a 32 °C ± 2 °C e agitação em 200 rpm, em placa agitadora/aquecedora (Quimis® Q261M23, Brasil), de acordo com a Figura 3.

O pH da síntese de NPAgB, foi ajustado para 10,6 através da adição de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M), o resultado foi obtido através de mensuração em um medidor de pH de bancada – mPA - 210 (MS Tecnoyon, São Paulo, Brasil). Essa fase é importante para que os flavonóides presentes no extrato que são responsáveis pela redução da prata, sejam oxidados e possuam elétrons disponíveis a serem doados no processo de redução. A síntese de NPAgB, foi levada novamente para agitação e adicionou-se uma solução de nitrato de prata (AgNO₃)

com 500 μM por gotejamento, aguardou-se um período de 30 minutos e a síntese foi armazenada no escuro por 24 horas, sem agitação.

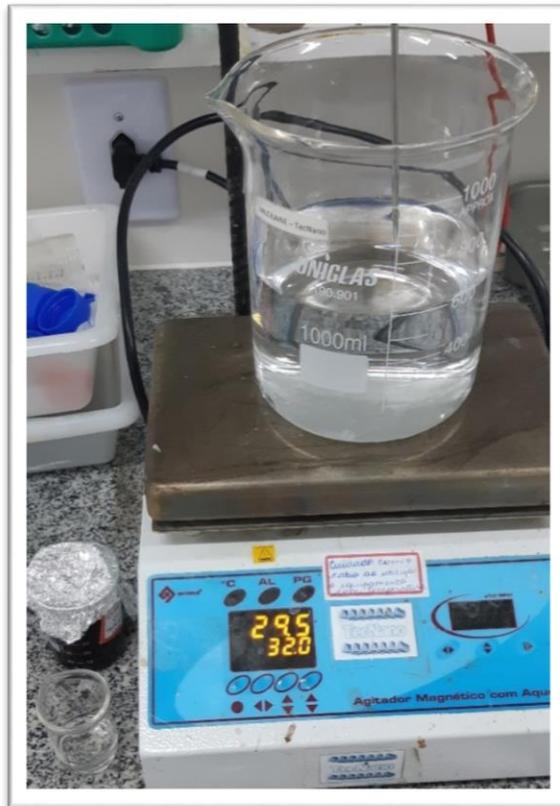


Figura 10. Imagem representando a placa utilizada para o experimento, e a água deionizada sendo aquecida a uma temperatura de $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$. Fonte: O Autor (2021)

Após o período de 24 horas, levou-se essa suspensão a tubos do tipo Falcon® de 50 mL que foram centrifugados em uma centrífuga RXII series (Hitachi, Japão) a 15000 rpm por 20 minutos. A seguir, retirou-se o sobrenadante e uniu-se os precipitados em tubos do tipo Falcon® de 50 mL únicos. Após isso, o sobrenadante residual foi novamente centrifugado nas mesmas condições acima, os precipitados residuais foram unidos. Depois procedeu-se a lavagem dos precipitados, que foram colocados em tubos do tipo Falcon® centrifugados e lavados por 3 vezes com água

deionizada, o precipitado foi removido com auxílio de um dispositivo do tipo conta gotas (pipeta de Pasteur®) e posto em placas de vidro e levados a estufa NI1512i (Nova Instruments, Brasil) a 50 °C por 24 horas. Após esse processo as nanopartículas foram raspadas e acondicionadas em microtubos do tipo Eppendorfs® de 1,5 mL e guardadas no escuro.

4.4.2 Síntese de nanopartículas de prata convencionais (NPAgC)

A síntese de NPAgC foi realizada conforme Sileikaite *et al.*, (2016), que utilizou citrato de sódio como agente redutor da prata. Uma solução de 500 µM de AgNO₃ foi aquecida até ebulição com agitação em 200 rpm. Cinco mL de uma solução de citrato de sódio a 1% foi adicionada por gotejamento. A solução foi mantida na placa aquecedora/agitadora por 30 minutos, e depois acondicionada no escuro por 24 horas para sua secagem, como acima descrito.

4.5 Caracterização das NPAgB e NPAgC na forma de suspensão coloidal e pó.

As Nanopartículas empregadas nesse estudo foram caracterizadas na forma de pó e suspensão coloidal por Espectrofotometria de UV-Vis (UV-Vis), Difração de Raios – X de pó (PXRD), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

4.5.1 Uv-vis

A análise foi feita com a suspensão coloidal das nanopartículas NPAgB e NPAgC e utilizou-se um leitor de placas (Flexstation® 3, EUA), onde observou-se a absorbância dos comprimentos de onda entre 200 a 800 nm em uma placa de

poliestireno de 96 poços de fundo chato. Essa técnica é muito empregada na caracterização de nanopartículas de prata, pois esse material absorve luz em um comprimento de onda específico, caracterizando a sua banda de SPR (ressonância plasmônica de superfície) onde de acordo com os valores das absorbâncias é possível ter uma noção do formato e estabilidade dessas partículas.

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos (LBFI) – ESENFAR, UFAL.

4.5.2 Determinação dos marcadores por Cromatografia Líquida

A identificação dos marcadores da própolis vermelha nas nanopartículas biossintetizadas foi realizado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD - Shimadzu, Tóquio, Japão).

As amostras foram preparadas em uma concentração de 250 µg/mL para extrato de própolis vermelha de Alagoas, usando etanol como solvente e uma concentração de 250 µg/mL de Nanopartículas biossintetizadas com PVA (NPAgB). A fase móvel consistiu em um sistema gradiente de água Milli-Q (A) e acetonitrila grau HPLC (B). A separação foi obtida usando uma coluna C 18 cm Phenomenex e mantida a uma temperatura de 33 °C. A taxa de fluxo foi de 0,03 mL/min. O sistema gradiente foi programado para 30% do solvente B no intervalo entre 0 e 2 min, 36% do solvente B em 5 min, 42% do solvente B em 8 min, 48% do solvente B em 11 min, 52 % do solvente B em 14 min, 56% do solvente B em 20 min, 62% do solvente B em 24 min, 68% do solvente B em 28 min, 72% do solvente em 32 min, 90% do solvente B em 36 min, 100% do solvente B de 40 a 43 min e então o solvente B foi reduzido para 30% onde permaneceu nessa condição até 47 minutos, definindo o tempo total de corrida. As amostras foram filtradas com uma unidade filtrante Millipore com filtro de 0,20 µm,

introduzidas diretamente no HPLC usando um injetor Rheodyne com um volume de injeção de 20 µL.

As análises foram obtidas no Laboratório de Análises Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, LAFA-UFAL.

4.5.3 Difração de raios-X (XRD)

Para análise da cristalinidade das NPAgB e NPAgC, os pós das amostras foram depositados em um difratômetro de raios - X (X - 7000 SHIMADZU DO BRASIL COMERCIO LTDA, São Paulo, Brasil). Foram pesados 50 mg de nanopartículas e colocada em uma célula de leitura do equipamento, e tendo como fonte a radiação CuK α , com voltagem de 30 kV e corrente de 30 mA, utilizando ângulos de 4 a 90°, com taxa de velocidade de 2° min⁻¹. A cristalinidade foi determinada através de software PCXRD. A análise foi realizada através de software Microcal Origin® (Microcal Software Inc., Northampton, MA, EUA).

O tamanho das nanopartículas foi calculado através da equação de Debye-Scherrer, conforme descrito por RAJA *et al.*, (2015).

Através da equação:

$$TC = \frac{K * \lambda}{\beta * \cos \theta}$$

Onde:

TC = tamanho do cristalito

K= é a constante de Scherrer, que varia de 0,9 a 1;

λ é o comprimento de onda do raio-X fonte (1,54056 Å) usada em XRD;

β é a largura total na metade do máximo (FWHM) do pico de difração em radianos;

θ é o ângulo de Bragg em radianos.

Os dados foram calculados com ajuda do software Microcal Origin® (Microcal Software Inc., Northampton, MA, EUA).

As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas (TecNano) – ESENFAR, UFAL.

4.5.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para análise das nanopartículas em pó, foram preparadas pastilhas de Brometo de Potássio (KBr) em uma proporção de 2 mg de amostra para 200 mg de KBr, com uma faixa de número de onda entre 4000 a 500 cm^{-1} , com 128 varreduras. Para análise das nanopartículas em suspensão coloidal as amostras foram lidas em modo ATR, onde retirou-se uma pequena alíquota de 20 μL das sínteses de NPAgB e NPAgC e colocadas diretamente no equipamento, as leituras se deram com uma faixa de comprimento de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} , com 64 varreduras. O equipamento utilizado foi o espectrômetro Smart-Omni Sampler Nicolet iS10 (Thermo Scientific, EUA). As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas (TecNano) – ESENFAR, UFAL.

4.5.5 Atividade antioxidante das nanopartículas NPAgB e NPAgC

O método foi realizado de acordo com BHAKYA *et al.*, (2016) com pequenas modificações. A atividade de eliminação de radicais livres das NPAgB e NPAgC foram determinados usando o método do sequestro do radical DPPH. O reagente foi pesado em uma balança analítica da marca Shimadzu (AX 200) 0,004 mMol de radical DPPH, em seguida solubilizou-se em 100 mL de etanol absoluto para preparação de uma solução estoque de 100 mL de DPPH em etanol na concentração de 0,04 mg/mL, a solução foi acondicionada livre de luminosidade e mantida a 4 °C, com aspecto fluido e coloração violeta.

Após a preparação da solução estoque do reagente, realizou-se a preparação das soluções das nanopartículas (NPAgB e NPAg) nas concentrações de 50 µg/mL; 40 µg/mL; 30 µg/mL; 20 µg/mL; 10 µg/mL. Adicionou-se 2 mL de solução de DPPH para cada balão de 5 mL, completando seu volume com etanol, cobertos com papel laminado e guardados em ambiente protegido da luz por 30 minutos, após esse período, as soluções foram depositadas, uma por vez, em uma cubeta de cristal de quartzo e inseridas no espectrofotômetro UV-Vis da marca SHIMADZU 1240, no modo de fotometria, com comprimento de onda de 518 nm que foi inicialmente calibrada com etanol, para se observar o valor da absorbância das amostras e posteriormente calcular o percentual antioxidante.

A percentagem da atividade antioxidante foi calculada a partir da equação:

$$\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \times 100$$

Onde:

A_{controle} = absorbância da solução de DPPH sem a amostra;

A_{amostra} = absorbância da amostra com o DPPH.

4.6 Síntese dos adesivos experimentais

O adesivo experimental foi preparado a partir de uma mistura na razão de 45/55 (m/m) dos monômeros hidroxietil metacrilato (HEMA) e bisfenol A-glicidil metacrilato (BisGMA). Como sistema fotoiniciador utilizou-se canforoquinona e 4-dimetil amina benzoato de etila (EDMAB). A Figura 11 mostra a fórmula estrutural de todos os compostos.

Para preparação dos adesivos, o BisGma foi pesado e a seguir adicionou-se o HEMA. A mistura foi aquecida a 68 °C e centrifugada por 30 minutos a 2000 rpm. A seguir a mistura foi aquecida novamente por 1 minuto a 68 °C e agitada em vortex por

30 s, alternadamente, durante 8 minutos, até que houvesse a completa homogeneização dos compostos. Após essa fase, adicionou-se, um a um, canforoquinona e EDMAB, sob agitação. Por fim, a mistura foi levada ao agitador até adquirir um caráter homogêneo e coloração amarelo límpida. O adesivo experimental puro foi armazenado em frasco plástico de cor âmbar a 4 °C. O processo de preparação dos adesivos experimentais foi ilustrado na Figura 12.

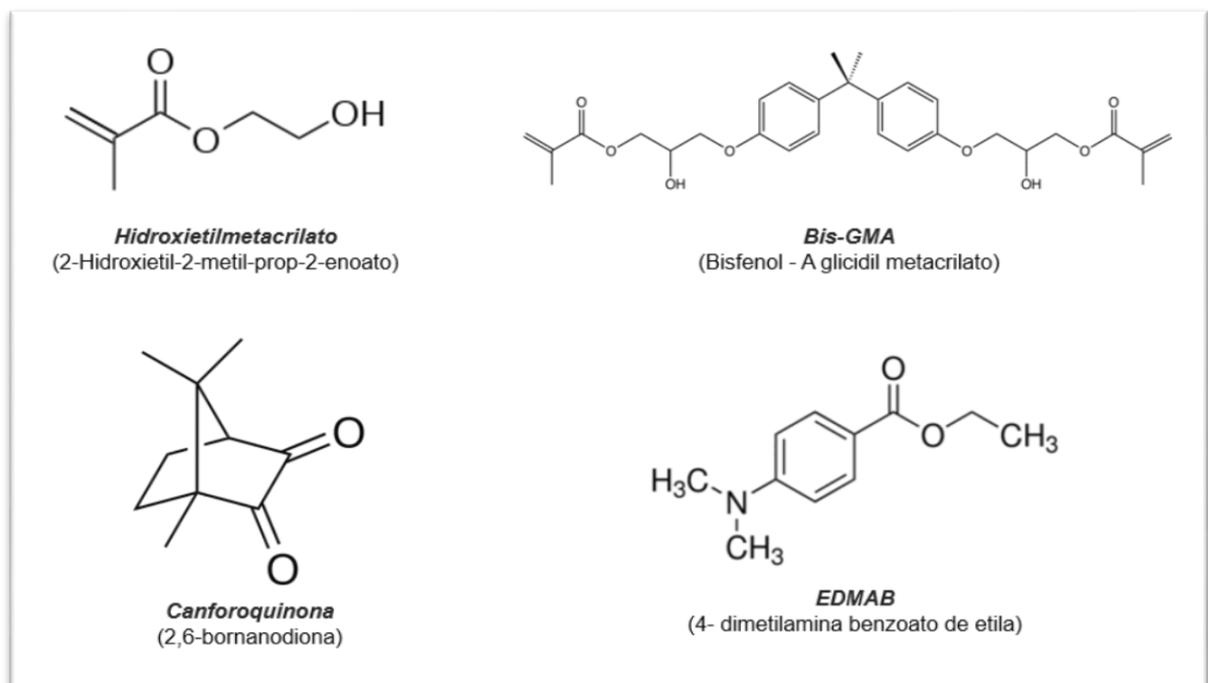


Figura 11. Fórmula estrutural dos compostos presentes no adesivo experimental puro. Fonte: O autor (2021).



Figura 12. Ilustração do processo de preparação dos adesivos experimentais. Fonte: O Autor (2021).

As nanopartículas em formato de pó (NPAgB, NPAgC – 250 µg/mL) e EPV (250 µg/mL e 300 µg/mL) foram incorporados a um mL do adesivo experimental puro (base), de forma individual, para formar os adesivos, distribuídos em grupos experimentais como descritos na Figura 13. Os adesivos foram homogeneizados em agitador magnético do tipo Vórtex® e armazenados em tubos do tipo Eppendorfs® de cor âmbar, a 4 °C, para análises posteriores. O adesivo Single Bond 2 (3M, Sumaré, São Paulo, Brasil) foi utilizado como adesivo comercial para comparação (Tabela 2).

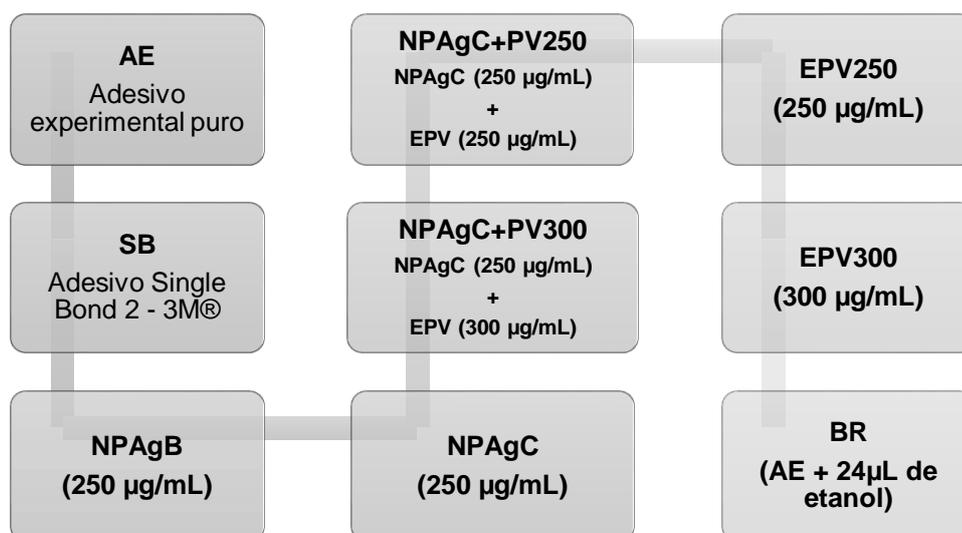


Figura 13. Esquema representativo da distribuição dos grupos experimentais com os adesivos utilizados neste trabalho. **NPAgB**: Nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas; **NPAgC**: Nanopartículas de prata obtidas por síntese química; **EPV**: Extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas. Fonte: O Autor (2021)

Tabela 2. Composição química do adesivo e da resina composta comercialmente disponíveis no mercado e utilizados neste estudo

| MATERIAL | COMPOSIÇÃO QUÍMICA |
|--|---|
| Adesivo experimental | HEMA, Bis-GMA, etanol, canforoquinona e EDMAB |
| Single Bond 2 (3M ESPE, Saint Paul, MN, EUA). | Primer/Adesivo: HEMA, Bis-GMA, água, etanol, DMA, fotoiniciador, ácido polialcenóico, ácido poliitacônico, 10 % (em peso) nanopartículas de sílica (5nm). |
| Resina Filtek Z250 (3M ESPE, Saint Paul, MN, EUA). | Bis-GMA, UDMA, Bis – EMA, Zircônia/Sílica 60% (0,01 a 3,5 micrômetros) |

Legendas: **HEMA:** Hidroxietil Metacrilato; **Bis-GMA:** bisfenol glicidil metacrilato, **EDMAB:** 4-dimetil amina benzoato de etila, **DMA:** metacrilamida dopamina, **UDMA:** uretano dimetacrilato, **Bis-EMA:** bisfenol A diglicidil metacrilato etoxilado.

4.7 Análise do grau de conversão dos adesivos em espectroscopia no infravermelho

Foram obtidos espectros, pela técnica de espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier – FTIR, de amostras polimerizadas (n= 5) e não polimerizadas (n= 5) de todos os adesivos. Os espectros foram coletados em um equipamento SHIMADZU IRAFFINITY-1 SERIAL N° A213749, (SHIMADZU do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil), na região entre 4000 a 400 cm^{-1} , com 128 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} no modo refletância total atenuada (ATR). Na análise dos espectros dos adesivos, levou-se em consideração o intervalo de 1555 a 1660 cm^{-1} , para a observação da absorbância entre 1610 e 1640 cm^{-1} que sinalizam, respectivamente, as ligações vinílicas aromáticas e alifáticas do grupamento funcional metacrilato. Essa técnica consiste em coletar a radiação refletida a partir da interface entre o adesivo e o cristal (ATR), mostrando a redução das ligações duplas de carbono (C=C) na intensidade de 1640 cm^{-1} , característica do grau de conversão das resinas a base de metacrilato.

Os comprimentos de onda foram ajustados com uma variedade Lorentziana para obtenção da altura dos picos no software Microcal Origin® (Microcal Software Inc., Northampton, MA, EUA). O grau de conversão (GC) foi calculado pela razão entre

os picos das ligações alifáticas 1640 cm^{-1} e aromática 1610 cm^{-1} , dos adesivos polimerizados e não polimerizados aplicando-se a seguinte equação:

$$\text{Grau de conversão (\%)} = 100 \times \left(1 - \left(\frac{R_{\text{polimerizada}}}{R_{\text{nãopolimerizada}}} \right) \right)$$

Onde, para as resinas de metacrilato, R é a razão entre a altura do pico da dupla ligação carbono-carbono alifático ($\text{C}=\text{C}$) 1640 cm^{-1} e a altura do pico da dupla ligação ($\text{C}=\text{C}$) do grupo benzeno aromático a 1610 cm^{-1} , cuja intensidade não se modifica durante a polimerização.

Para confecção das amostras polimerizadas foram colocados $25\ \mu\text{L}$ de cada adesivo sobre uma película de poliéster, esperou-se 30 segundos para evaporação da fração volátil do adesivo (solvente) e a seguir o adesivo foi fotoativado por 20 segundos (LED Emitter A; Schuster Com Equip Odontológicos Ltda, RS, Brazil; $1250\text{ mW}/\text{cm}^2$). As películas de adesivo foram armazenadas em frascos a prova de luz, temperatura ambiente ($24\text{ }^\circ\text{C} \pm 1$), durante 24 horas antes dos espectros FTIR serem obtidos. As amostras de adesivo não polimerizado ($25\ \mu\text{L}$) foram depositadas diretamente no porta-amostras com auxílio de uma pipeta.

4.8 Resistência de união a microtração

4.8.1 Preparo dos dentes

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados 84 terceiros molares, permanentes, humanos, hígidos, de pacientes com extração indicada por razões diversas, após assinatura de termo de consentimento prévio livre e esclarecido, sob protocolo revisado e aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Alagoas, de número (CAAE: 18101219.6.0000.5013). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentos aprovados. Os dentes foram lavados em água corrente. A seguir foi feita a remoção de debris com cureta

periodontal Gracey de nº17 e polimento em baixa rotação com taça de borracha e pasta de pedra pomes com água. Depois os dentes foram armazenados em solução de 0,5% de cloramina T a 4 °C.

Posteriormente foi realizado um corte transversal ao longo eixo do dente, no terço oclusal da coroa, com disco diamantado (Extec, Enfield, CT, USA) acoplado a uma máquina de corte (Extec Technologies Inc., Enfield, CT, EUA), com o objetivo de remover a camada de esmalte oclusal e expor a dentina subjacente. Após a exposição da superfície dentinária, realizou-se um desgaste manual com lixas de carbureto de silício de 600 grãos - SiC 600 (3M, Sumaré, SP, Brasil) por 1 minuto, girando-se ¼ de volta a cada 15 segundos, para padronização da camada de esfregaço (smear layer).

4.8.2 Procedimento adesivo

Para realização do procedimento restaurador foi observado o seguinte protocolo:

- I. Aplicação de ácido fosfórico a 37% (Biodinâmica Química e Farmacêutica – Ibiporã – PR) na dentina por 15 segundos;
- II. Lavagem por 30 segundos com jato de ar/água;
- III. Secagem com papel absorvente (mantendo a superfície levemente úmida);
- IV. Aplicação do adesivo com *microbrush* (KG Sorensen – Cotia - SP) de forma ativa em toda a dentina. Após 30 segundos, aplicou-se um leve jato de ar e procedeu-se à fotoativação por 10 segundos

(LED Emitter A; Schuster Com Equip. Odontológicos Ltda., RS, Brazil; 1250 mW/cm²);

- V. Aplicação da segunda camada de adesivo seguido de leve jato de ar e fotoativação por 10 segundos;
- VI. Aplicação da resina composta (Filtek Z250 XT – 3M®, Sumaré, São Paulo, Brasil, cor A2) em dois incrementos de ± 2 mm para formar uma cobertura ± 4 mm em toda dentina.
- VII. Fotoativação de cada incremento de resina composta por 20 segundos (LED Emitter A; Schuster Com Equip. Odontológicos Ltda., RS, Brazil; 1250 mW/cm²).

4.8.3 Teste de resistência de união a microtração

Após os dentes serem restaurados foram armazenados em saliva artificial, (Farmaderm – Farmácia de manipulação, AL, Brasil: Carboximetilcelulose sódica: 10g, Sorbitol: 30g, Cloreto de potássio 1,2 g, Fosfato de potássio monobásico: 342 mg, Cloreto de sódio: 84 mg Cloreto de cálcio anidro:146 mg Cloreto de magnésio: 52 mg, Água destilada qsp. 1000 mL), a 37 °C, por 24 horas. A seguir foram cortados em sentido mesio-distal e vestibulo-lingual com um disco diamantado montado em uma cortadeira metalográfica (Extec Technologies, Inc., Enfield, CT, EUA), a uma velocidade de 500 rpm, de maneira a produzir palitos com $0,9 \text{ mm}^2 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ de secção transversal, aferida com um paquímetro digital (Digimess Instrumentos de Precisão Ltda, São Paulo, Brasil).

Após a mensuração da área da interface adesiva, cada palito (n=25 por grupo experimental) foi colado em um dispositivo para teste de microtração com cola de

cianoacrilato (IC-GEL™ CA Paste, BSI – Bob Smith Industries, CA, USA) e testado em máquina de microtração (Microtensile OM 100 tester, Odeme, Luzerna, SC, Brasil) com uma velocidade de 0,1 mm / min e carga de 50 N até falhar. O valor da resistência de união foi determinado pelo quociente entre a força máxima aplicada durante o teste (Kgf) e área da interface adesiva (mm^2), que determinou a carga necessária para o rompimento da união adesiva na interface entre dentina e resina composta. Os valores da resistência de união foram expressos em Mpa.

Os espécimes fraturados foram examinados com um estereomicroscópio com aumento de 40 x (Coleman Co. Ltd., Santo André, SP, Brasil) para análise do modo de fratura. O modo de fratura foi categorizado em quatro grupos: (1) Fratura adesiva – FA, quando a falha ocorrer na interface adesiva; (2) Fratura Coesiva em Dentina – FD; (3) Fratura Coesiva em Resina (FR) e (4) Fratura Mista – FM, quando mais de um modo de fratura ocorrer simultaneamente. Todo o processo de preparação dos dentes, realização do teste de microtração e análise do modo de fratura, está ilustrado na figura 14.

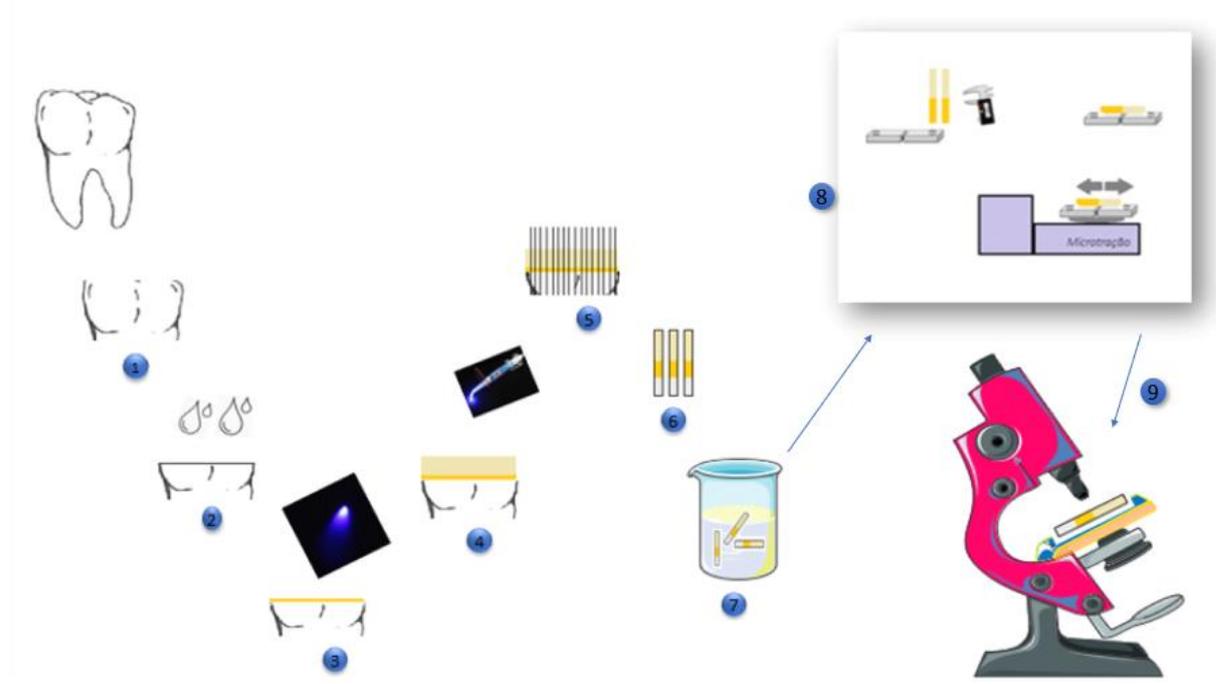


Figura 14: Ilustração do processo de preparação dos dentes e teste de microtração. Fonte: O Autor (2021). **1:** Espécime cortado transversalmente ao longo do eixo do dente, no terço oclusal da coroa; **2:** Aplicação de ácido fosfórico a 37%, lavagem, secagem e aplicação de adesivo dentinário ativamente por 30 segundos, evaporação do solvente ; **3:** Fotopolimerização da camada de adesivo; **4:** Aplicação de dois incrementos de resina composta e fotopolimerização até preencher todo o espécime com 4 mm de resina composta para formação de um complexo dentina/restauração de ± 8 mm; **5:** Cortes dos espécimes no sentido méso-distal e vestibulo-lingual para confecção de palitos de dentina/resina de 0,8 mm $\pm 0,2$ mm. **6:** Palitos cortados; **7:** Armazenamento dos palitos em saliva artificial por 24 Horas. **8:** Avaliação da resistência de união a microtração imediata no equipamento medido por MPa. **9:** Avaliação do modo de fratura no estereomicroscópio.

4.9 Atividade antimicrobiana

4.9.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As nanopartículas (NPAgB e NPAgC) foram ressuspensas a uma concentração inicial de 40 mg mL^{-1} e foram testadas contra *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*. Optou-se pela escolha destes microrganismos pois estão presentes no biofilme dental, na doença cárie e no canal radicular.

As nanopartículas foram testadas através do ensaio de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), conforme documento do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). As amostras foram solubilizadas em DMSO a 0,1%.

Os inóculos foram preparados em solução salina tamponada estéril e a suspensão bacteriana determinada pela transmitância equivalente à de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e diluída na proporção de 1:10, para se conseguir uma concentração final de bactérias de 5×10^4 UFC/poço ao inocular 5 μL dessa suspensão no caldo.

A CIM foi determinada em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços de fundo redondo. Cada placa possui 12 colunas que são enumeradas de 1 a 12 e 8

linhas marcadas de A-H. As colunas de 1 a 3 foram inoculadas com *Streptococcus mutans*, as de 4 a 6 foram inoculadas com *Enterococcus faecalis*, as de 7 a 9 inoculadas com *Staphylococcus aureus* e 10 a 12 inoculadas com *Staphylococcus epidermidis*. Todos os 96 poços foram preenchidos com 100 µL de caldo Mueller Hinton (MH) (MERCK® KGaA, Darmstadt, Alemanha). Nas colunas de 1 a 12, foram depositadas as diluições das nanopartículas solubilizadas, com um volume de 100 µL na concentração inicial de 40 mg mL⁻¹. Após esse processo, 100 µL de cada poço da linha A foi pipetado e transferido para o poço da linha B da mesma coluna, realizando a homogeneização do conteúdo e, então, 100 µL desse poço foi transferido para a linha C, repetindo-se o processo até a linha H e descartando o excedente, obtendo-se as seguintes concentrações decrescentes em mg mL⁻¹: 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; e 0,15625.

Para o controle da placa, utilizou-se uma outra placa estéril de poliestireno de fundo redondo de 96 poços, e em cada coluna de 1 a 12, nas linhas de A a C foi adicionado 5 µL do inóculo microbiano de cada micro-organismo separadamente. As linhas D a H não foram utilizadas nesta etapa. Para o controle negativo da atividade inibitória do diluente na linha A foi preenchida com uma solução de 100 µL de DMSO a 0,1%, utilizado na preparação das soluções. Para o controle da viabilidade microbiana a linha B recebeu o caldo Mueller Hinton (MERCK® KGaA, Darmstadt, Alemanha) e o inóculo microbiano. E para comprovar a esterilidade da placa e do próprio meio a linha C foi preenchida apenas com o caldo MH.

Em seguida, as microplacas foram acondicionadas em estufa microbiológica a 35 °C durante 24 horas. Decorrido o período de incubação, foi efetuada leitura das placas com auxílio do revelador Cloreto de Trifenil Tetrazólio 2,3,5- (TTC) numa concentração de 1%, que indica crescimento microbiano. Para isto, foi inoculado 20

μL do revelador (TTC) em todos os poços e, em seguida, as microplacas foram reincubadas por um período de 3 horas. Após este período, as mesmas foram observadas e analisadas visualmente.

A ausência de cor nos poços foi interpretada como microrganismo sensível a amostra testada (ausência de crescimento). De modo contrário, os poços que apresentaram coloração arroxeadas foram interpretados como microrganismo resistente (presença de crescimento). A CIM foi definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento do microrganismo. Para as nanopartículas NPAgB bem como NPAgC os experimentos foram realizados em duplicata com os quatro microrganismos empregados.

4.9.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A concentração bactericida mínima (CBM) das nanopartículas foi determinada a partir da metodologia empregada por SANTURIO *et al.*, 2007. A partir dos poços que não apresentaram crescimento bacteriano visível, foi retirada uma alíquota de 10 μL e, em seguida, inoculou-se na superfície do ágar MH contido em placas de Petri. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35 °C e, após 24 horas, a CBM foi definida como a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Os ensaios de CBM foram realizados em triplicata.

4.9.3 Meio de Difusão em Disco (MDD)

Para realização do teste, preparou-se inicialmente os discos dos adesivos fotopolimerizados, num diâmetro de ± 1 cm. Os discos foram colocados em uma câmara escura com transluminador UV (DONAL® eletrônica, EG-50) por 30 minutos cada lado. A determinação da atividade antibacteriana foi executada de acordo com

BAUER *et al.*, (1999) e MURRAY *et al.*, (1999). Utilizou-se cepas microbianas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), ativadas e cultivadas por 24 h a 37 °C em ágar Müeller-Hinton (MERCK® KGaA, Darmstadt, Alemanha). Após 24 horas de incubação a 37 °C procedeu-se a diluição até a obtenção de uma suspensão padronizada pelo grau 0,5 da escala de McFarland (108 microrganismos mL⁻¹).

O meio foi preparado conforme instruções de embalagem, e esterilizados em autoclave à 121 °C por 15 minutos e depois distribuído em placas. O plaqueamento foi realizado dentro da capela de fluxo laminar e todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados na autoclave. Os discos de adesivo polimerizado foram gentilmente colocados sobre o meio inoculado com a bactéria que foi testada, inclusive o grupo controle, contendo apenas o adesivo puro. Foram ainda colocados discos impregnados com solução salina 0,9% como “controle negativo” e discos de penicilina como “controle positivo”, as placas foram mantidas em estufa a 37 °C durante 24 horas. A leitura dos resultados foi executada conforme a formação de halos de inibição sob o crescimento bacteriano, medidos em milímetros, como esquematizado na figura 15.

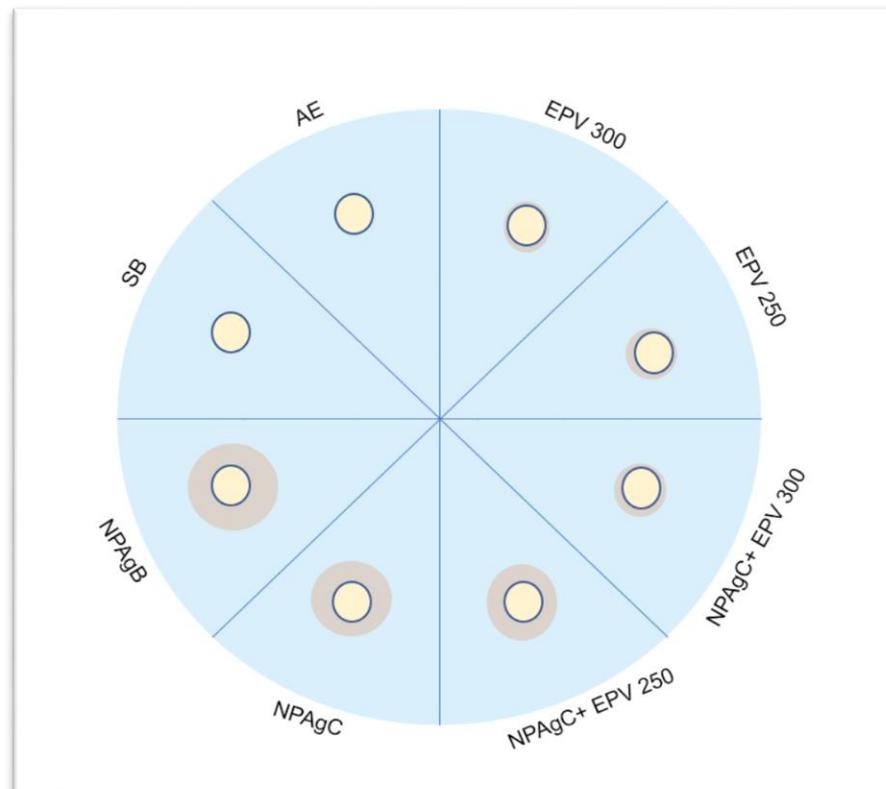


Figura 15. Ilustração do experimento de MDD realizado com todos os grupos experimentais. Fonte: O Autor (2021)

4.10 Teste de liberação das NPAGB e NPAGC em saliva artificial

Essa técnica foi realizada para caracterizar os adesivos odontológicos e suas propriedades estáveis e óticas. Foram estudados os espectros de absorvância das NPAGB e NPAGC incorporadas no adesivo odontológico. Foi utilizado uma micro-cubeta de absorção de quartzo, com caminho óptico de 1 mm e volume de 350 μL . A absorvância foi analisada nos comprimentos de onda de 425 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-mini Shimadzu. Todas as amostras foram analisadas para construção da curva de calibração.

Para construção da curva de calibração foram preparadas 5 soluções em concentrações decrescentes, entre 8000, 6000, 4000, 2000, 1000 $\mu\text{g/mL}$, em balões volumétricos de 5 mL. Em seguida, as leituras foram realizadas à uma temperatura de 27 °C, os valores de absorvância foram obtidos através dos comprimentos de onda

de 425 nm. As absorvâncias médias, correspondentes a três determinações para cada diluição, foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações, no eixo das abscissas, para a obtenção da equação da reta, como demonstrado na figura 16.

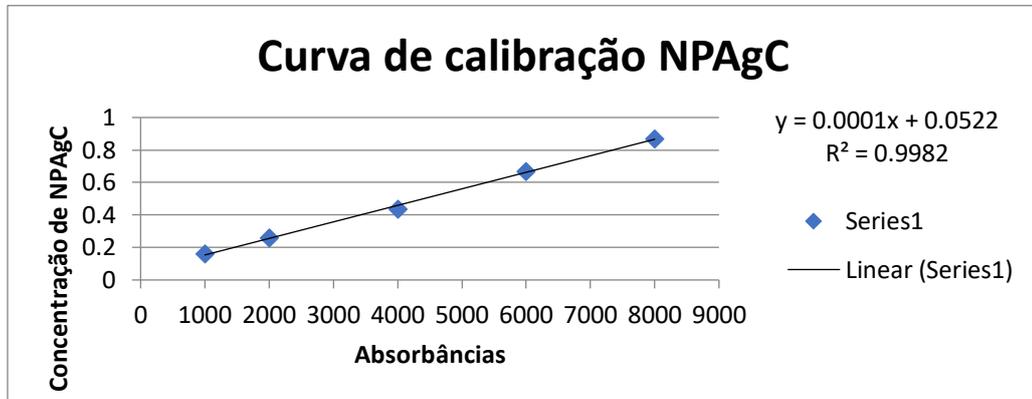


Figura 16. Gráfico explicativo da equação da reta realizadas através da curva de calibração das amostras de nanopartículas de prata. Fonte: O autor (2021)

4.10.1 Liberação em pH 6,7

Para avaliar a liberação de nanopartículas de prata dos adesivos com NPAgC e NPAgB, 25 µL de cada adesivo experimental foram polimerizados e imersos, separadamente, em potes de vidro com 15 mL de saliva artificial, pH 6,7, a 37 °C, e colocados sobre uma placa agitadora com aquecimento (KASVI®, PR / BRASIL – modelo K48-3820), a 200 rpm, a 37 °C, durante 24 horas (Figura 17). Foi retirada uma alíquota de 100 µL da solução de imersão (saliva artificial) em intervalos regulares de (0, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 24 horas), e os valores de absorvância foram obtidos através dos comprimentos de onda de 425 nm. As absorvâncias médias, correspondentes a três determinações para cada diluição, foram plotadas e calculadas através da fórmula dos mínimos quadrados determinada a partir da curva de calibração.



Figura 17. Demonstração do experimento de liberação dos adesivos polimerizados.
Fonte: O autor, (2021)

4.10.2 Liberação em pH 4,0

Para avaliação da liberação de nanopartículas de prata dos adesivos carregados com NPAgB e NPAgC, 25 μ L dos adesivos polimerizados dos grupos experimentais foram imersos em uma solução de 15mL de saliva artificial, pH 4,0, a 37 °C, durante 24h. Para redução do pH, utilizou-se uma solução de KCl a 0,1 M, que foi gotejada na saliva artificial até a redução do pH 6.8 ao pH 4.0, acompanhado com o medidor de pH de bancada – mPA -210 (MS Tecnoyon, São Paulo, Brasil). Foi retirada uma alíquota de 100 μ L da solução de imersão (saliva artificial) em intervalos regulares de (0, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 24 horas), e os valores de absorbância foram obtidos através dos comprimentos de onda de 425 nm. As absorbâncias médias, correspondentes a três determinações para cada diluição, foram plotadas e calculadas através da fórmula dos mínimos quadrados determinada a partir da curva de calibração.

4.11 Análise estatística

Os dados do grau de conversão e resistência de união foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com um fator seguido do teste de Tukey para comparações pareadas. Os testes foram realizados com auxílio do software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 26. A margem de erro empregada nas decisões dos testes estatísticos foi de 5%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas

Foi obtido um extrato de aspecto altamente viscoso e coloração avermelhada, com rendimento total de 60% a partir de 50 g de própolis vermelha de Alagoas bruta, que foi armazenado no escuro, a 4 °C, para realização das análises.

5.1.2 Análise do teor de flavonoides totais do EPV

No EPV foram encontrados uma média de 1,56% de flavonoides (Tabela 3). É sabido que os flavonoides presentes no extrato promovem a redução da prata em nanopartícula. Partindo desse pressuposto, identificamos a quantidade de flavonoides para calcular quanto de EPV seria necessário utilizar para que ocorra a total redução de nitrato de prata em nanopartículas de prata.

Tabela 3. Concentrações de EPV testadas e suas respectivas leituras no espectrofotômetro para determinação da curva padrão de flavonoides

| % FLAVONOIDES($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|-----------------------------------|------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| | | MÉDIA GERAL ($\mu\text{g/mL}$) | DESVIO PADRÃO ($\mu\text{g/mL}$) |
| 100 | 1,64 | 1,56 | 0,07 |
| 150 | 1,63 | | |
| 200 | 1,54 | | |
| 250 | 1,51 | | |
| 300 | 1,48 | | |

Fonte: O autor (2021)

5.1.3 Avaliação da atividade antioxidante do EPV

A Figura 18 demonstra o percentual de atividade antioxidante (AA%) do EPV. Nas concentrações de 50, 40, 30, 20, 10, 5 $\mu\text{g/mL}$, o percentual de inibição do radical DPPH variou entre 5% a 46%.

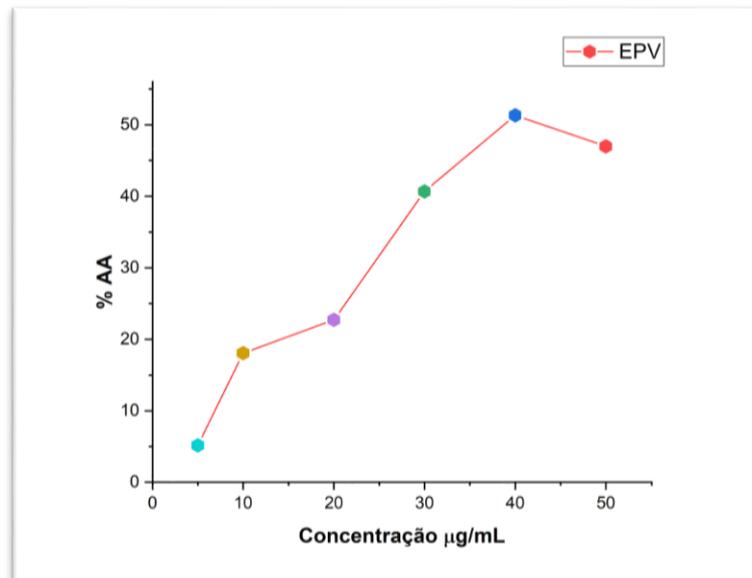


Figura 18. Médias das atividades antioxidantes do EPV de acordo com as concentrações utilizadas no experimento. Fonte O autor (2021).

5.2 Síntese e caracterização das NPAgB e NPAgC

A formação de nanopartículas começou após a mistura do EPV com a solução de nitrato de prata e a cor foi visivelmente alterada passando de vermelho claro para marrom escuro, como demonstrado na Figura 19.



Figura 19. Aspecto da coloração da síntese verde de nanopartículas de prata, em a) síntese sendo preparada com o EPV com aspecto de vermelho claro, b) aspecto da síntese após

adição de nitrato de prata, com coloração em marrom escuro após 24 horas. Fonte: O autor (2021).

As nanopartículas, tanto de NPAgB e NPAgC foram obtidas na forma de um pó leve, fino, de coloração enegrecida para as NPAgB e de coloração prateada para as NPAgC. No total foram sintetizados 2 g de cada tipo de nanopartícula.

5.2.1 UV-VIS

Na análise espectral foi confirmada a formação de nanopartículas de prata por espectroscopia UV-Vis, onde a absorção da banda de NPAgC foi observada entre 405nm e 435nm, com uma absorção máxima em 425 nm devido à ressonância plasmônica de superfície (SPR) das nanopartículas de prata esféricas (figura 20).

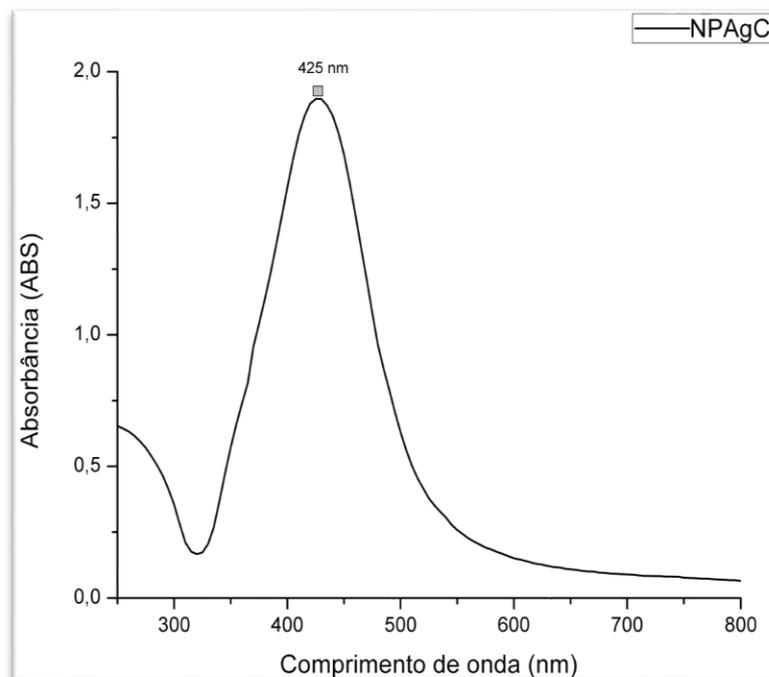


Figura 20. Espectro UV-Vis da síntese de NPAgC, identificando o pico máximo de absorção em 425nm. Fonte: O autor (2021).

Na Figura 21 observa-se que as bandas do espectro UV-vis das NPAgB, são semelhantes as das NPAgC, uma vez que o deslocamento na absorbância máxima

(425 nm) foi mínimo comparado com as NPAgC, configurando também nanopartículas esféricas.

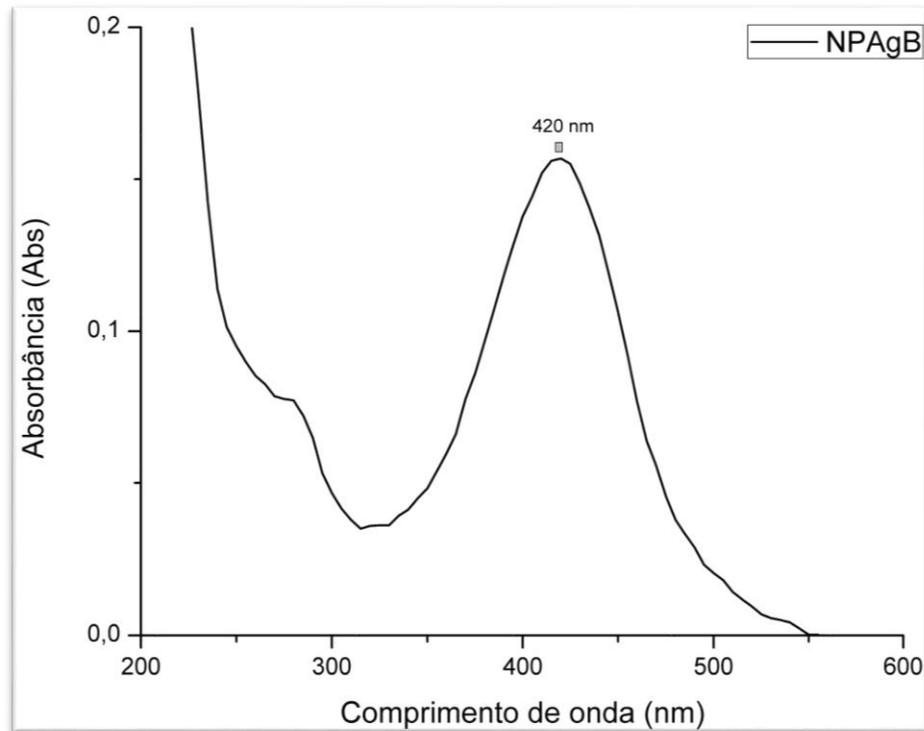


Figura 21. Espectros UV-vis de NPAgB, demonstrando a absorbância máxima em 420 nm.
Fonte: O autor (2021)

5.2.2 Identificação dos marcadores da própolis vermelha por HPLC

O método de HPLC-UV apresentou sinais no cromatograma do extrato de própolis na concentração de 250 µg/mL na Figura 22, demonstrando a complexidade do extrato de própolis vermelha, embora tenha sido possível obter uma resolução relativa entre os picos utilizando o método cromatográfico. Da mesma maneira para o cromatograma referente as nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de alagoas, onde está demonstrada uma complexação dos flavonóides presentes no extrato, que não são demonstrados no cromatograma das nanopartículas, indicando assim os marcadores da própolis vermelha que possuem atividade redutora para nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis

vermelha de Alagoas, além da quantificação dos flavonoides presentes no extrato de própolis vermelha e nas nanopartículas de prata biossintetizadas. A análise dos cromatogramas demonstrou a presença de ácidos fenólicos, flavanonas, flavonas, chalconas e isoflavonas na composição do EPV, possibilitando a identificação dos picos cromatográficos correspondentes a liquiritigenina, daidzeína, pinobanksina, isoliquiritigenina, formononetina, biochanina A.

Na figura 22 é possível observar, no cromatograma de NPAgB, a redução dos picos correspondentes a isoliquiritigenina, pinobanksina, biochanina A e formononetin, indicando os possíveis marcadores da própolis vermelha que complexam a nanopartícula ou que reduzem os íons Ag⁺ em nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas.

A quantificação dos marcadores da própolis vermelha de Alagoas (Tabela 4) foi obtida através de uma curva de calibração de cada composto presente no EPV e NPAgB. Assim foi possível identificar e quantificar os Isoflavonóides (Daidzeína, formononetina e Biochanina A), chalconas (isoliquiritigenina), flavanonas (liquiritigenina, pinocembrina) e ácidos fenólicos, na amostra analisada, além de outros compostos menos estudados como terpenos, propolonas e futiferronas, que possuem alto potencial anti-tumoral, antibacteriano, como demonstrado por NASCIMENTO *et al.*, (2020).

Tabela 4. Identificação e quantificação dos flavonoides marcadores da própolis vermelha de Alagoas, no extrato etanólico (EPV) e nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas (NPAgPV)

| Tempo de retenção EPV /NPAgB | Flavonoide | Quantidade/EPV µg/mL | % | Quantidade/ NPAgB µg/mL | % | λ nm |
|---|-----------------|-------------------------|-----|-------------------------------|-----|---------|
| 12.2 ^a / 11.8 ^b | Daidzeína | 0,628 | 6% | 0,295 | 3% | 265 |
| 12.15 ^a / 11.93 ^b | Liquiritigenina | 2,212 | 21% | 1,008 | 10% | 275 |
| 14.81 ^a /14.4 ^b | PinoBanksina | 0,211 | 2% | 0,097 | 1% | 289 |

| | | | | | | | |
|--|--|--------------------|-------|-----|-------|----|-----|
| 16.54 ^{a/} - ^b | | Isoliquiritigenina | 2,214 | 22% | 0,026 | 0% | 366 |
| 17.4 ^a / 17.30 ^b | | Formononetina | 2,581 | 26% | 0,519 | 5% | 249 |
| - ^a / - ^b | | Pinocembrina | 0,05 | 1% | 0,05 | 1% | 249 |
| 22.37 ^{a/} - ^b | | Biochanina A | 0,218 | 2% | 0,008 | 1% | 289 |

a: Cromatogramas de extrato de própolis vermelha 250 µg/mL; **b:** Cromatogramas de NPAgB 250 µg/mL.

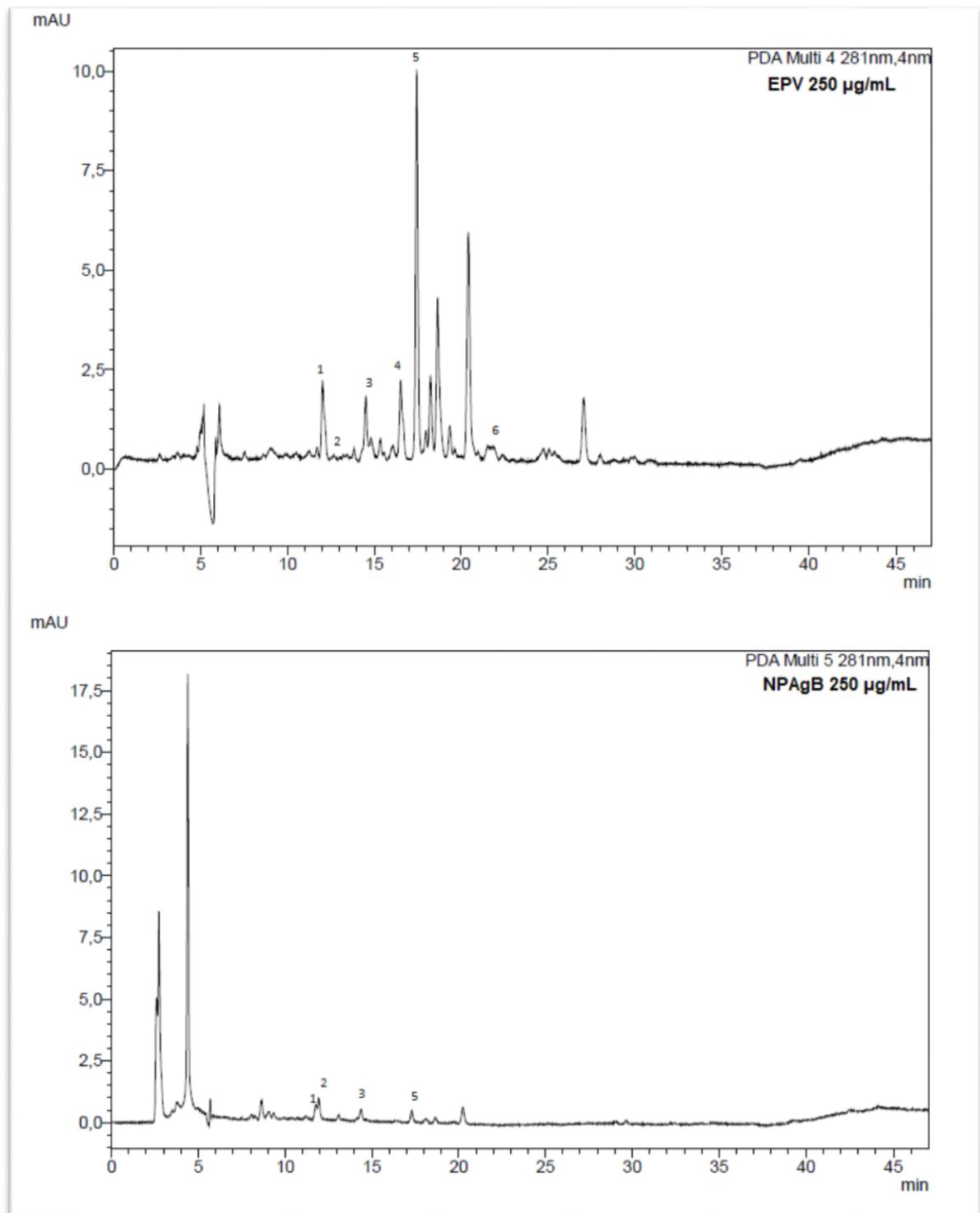


Figura 22. Cromatogramas do EPV e NPAGB em uma concentração de 250 µg/mL, no comprimento de onda de 281nm. Os flavonóides foram identificados usando padrões analíticos: 1- Liquiritigenina, 2- Daidzeina, 3- Pinobanksina, 4- Isoliquiritigenina, 5- Formononetina, 6- Biochanina A. Fonte: O autor (2021).

5.2.3 XRD

Na análise XRD das NPAgC em pó (Figura 24), observou-se que valores de pico nos ângulos 2θ em $38,04^\circ$, $44,24^\circ$, $64,40^\circ$, $77,36^\circ$, $81,42^\circ$, correspondendo a presença de NPAgC e confirmaram a estrutura cúbica centralizada na face (FCC) das NPAgC de acordo com o banco de dado do Comitê Conjunto sobre Padrões de Difração de Pó (JCPDS): (111), (200), (220), (311), (222), respectivamente (AHLUWALIA, *et al.*, 2018; DUTT, 2018; DURAN, 2016) e uma cristalinidade de 71%.

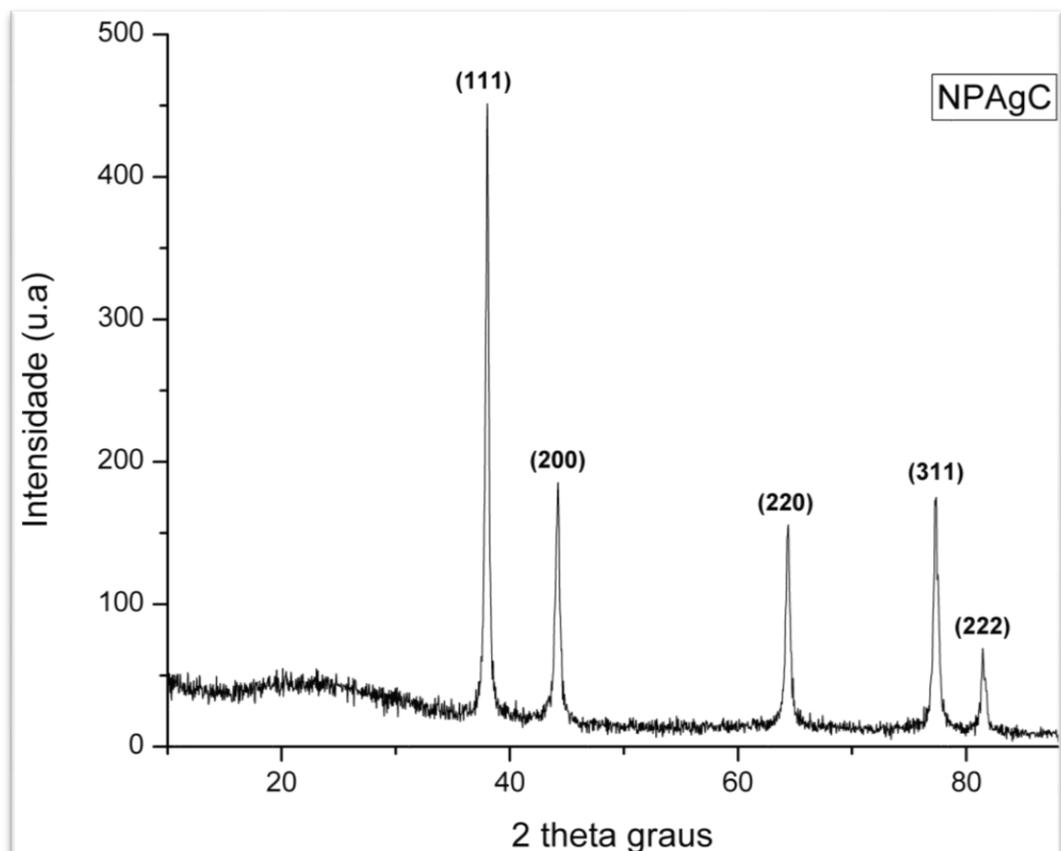


Figura 24. Difratograma XRD demonstrando a estrutura cristalina de NPAgC. Fonte: O autor (2021)

As propriedades cristalinas das NPAgB foram avaliadas usando DRX. É possível observar na Figura 25 os principais picos de difração identificados no difratograma. Os valores dos picos de 2θ de: 38° , $44,12^\circ$, $64,42^\circ$, $77,36^\circ$, $81,58^\circ$ correspondem aos planos de cristalinidade: (111), (200), (220), (311), (222),

respectivamente, e confirmaram a estrutura cúbica centralizada na face (FCC) das NPAgB de acordo com o banco de dado do Comitê Conjunto sobre Padrões de Difração de Pó (JCPDS). A análise por DRX confirmou através de software uma cristalinidade total de 39%.

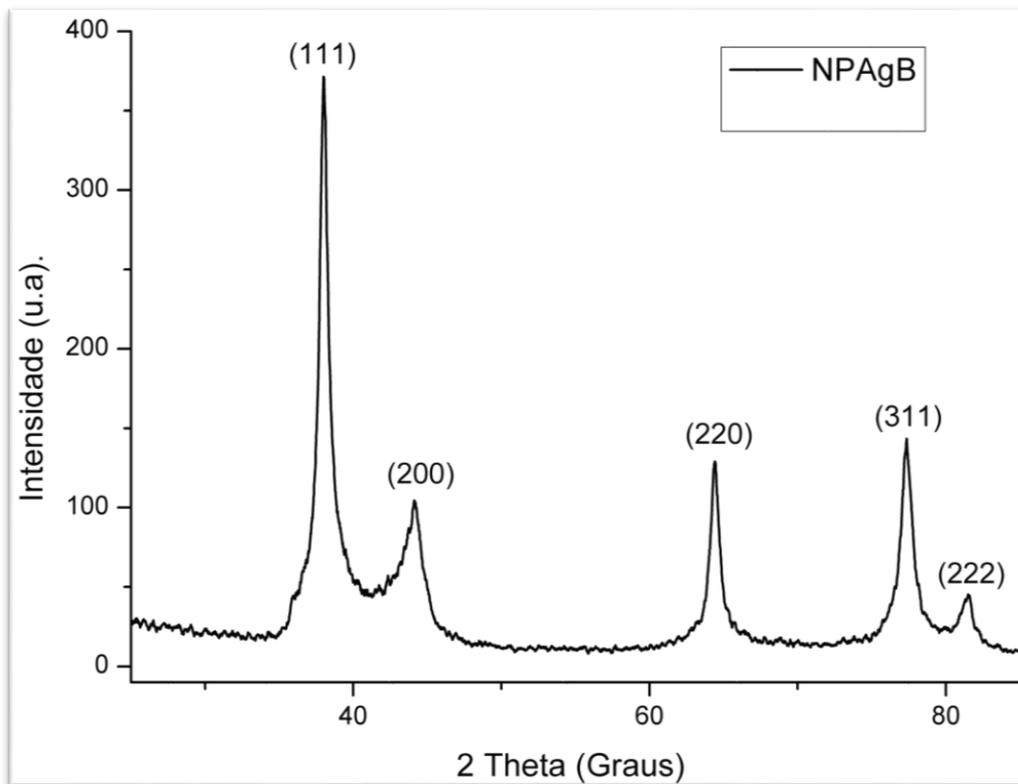


Figura 25. Difratoograma demonstrando a estrutura cristalina de NPAgB. Fonte: O autor (2021)

5.2.4 Equação de Debye-Scherrer.

O tamanho das nanopartículas, calculado através da equação de Debye-Scherrer, foi de 22 ± 1 nm para as NPAgC e 11 ± 1 nm para as NPAgB.

5.2.5 FTIR

Espectros FTIR das NPAgB (figura 23), forneceram picos de absorção diferentes, que foram atribuídos a diferentes grupos funcionais de compostos

orgânicos, que podem participar ativamente da redução da prata. Os picos de absorção observados em 3447, 2373 cm^{-1} referentes a hidroxilas (BARBOSA, 2019; RIVERA *et al.*, 2018) e 1636 cm^{-1} , atribuídos a carboxilas e 1078 cm^{-1} podem estar relacionados às proteínas contidas no extrato (BARBOSA, 2019). As bandas de 2875 e 2930 cm^{-1} podem ser atribuídas a $-\text{C}-\text{H}$ alongamento (SILVA B; SEABRA A, 2016). A banda a 1510 cm^{-1} pode ser devido ao grupamento carbonila (DADA, *et al.*, 2018), o pico a 1608 cm^{-1} pode ser atribuído a carbonila quelatada do grupo $-\text{OH}$ ou do grupo carboxílico (AMALADHAS, *et al.*, 2012). Além disso, as bandas de absorção entorno de 1630 cm^{-1} estão relacionados às vibrações de alongamento $\text{C}-\text{O}$, e $\text{C}-\text{C}$ de compostos fenólicos e alcanos, respectivamente. Está associada às vibrações das ligações cetonas conjugadas, quinonas, ácidos carboxílicos e ésteres (NOGINOV, *et al.*, 2007; AHMAD, *et al.*, 2011). Nas bandas de absorção em 1100 cm^{-1} , podem estar relacionadas a compostos heterocíclicos e flavonas (SHAMELI *et al.*, 2012) e em 831 cm^{-1} relativo à presença de glicosídeos (BARBOSA, *et al.*, 2019).

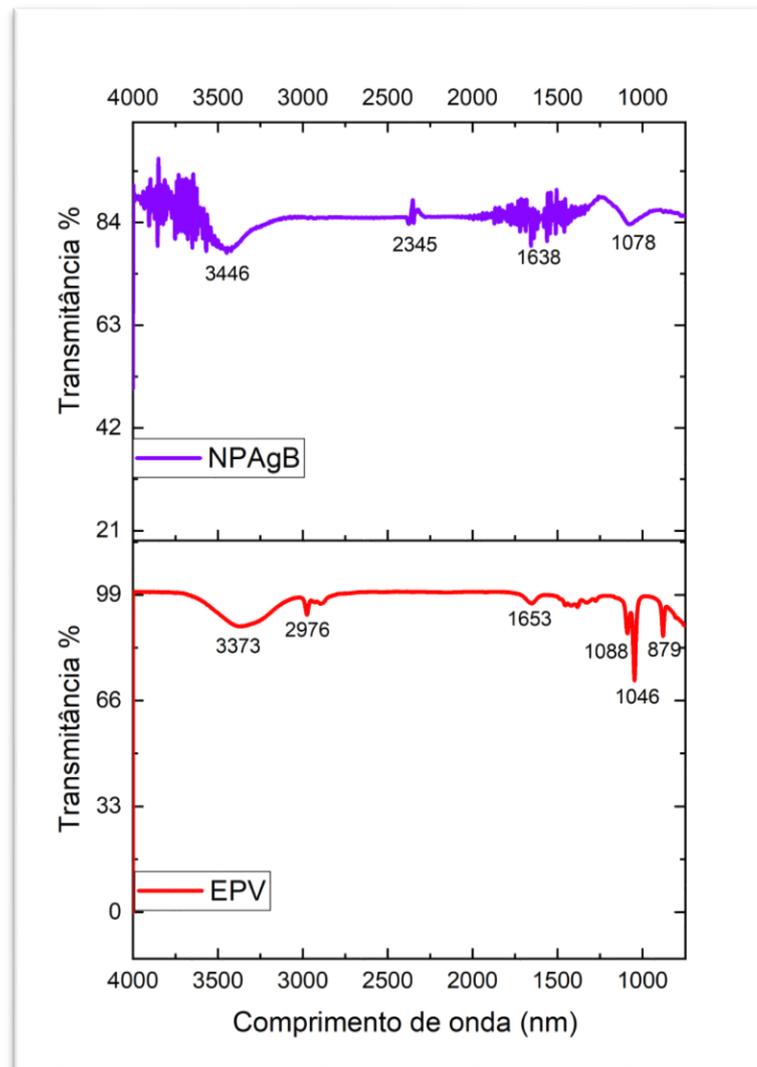


Figura 23. Espectros do EPV em FTIR, indicando as bandas de absorção responsáveis pela redução em nanopartículas de prata biossintetizadas. Fonte: O autor (2021)

5.3 Atividade antioxidante (AA%)

5.3.1 AA% das nanopartículas NPAgB e NPAgC

O ensaio DPPH mostrou maior capacidade de sequestro de radicais DPPH pelas NPAgB quando comparado a NPAgC, mesmo em baixas concentrações (figura 26).

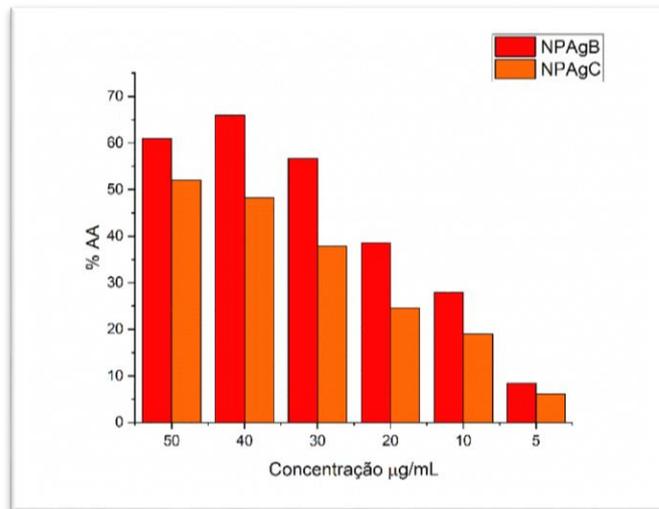


Figura 26. Representação dos valores médios da atividade antioxidante de NPAgB e NPAgC pelo sequestro do radical DPPH. Fonte: O autor (2021)

5.3.2 AA% do EPV

O EPV exibiu baixa atividade antioxidante, com aumento gradativo concentração dependente. Na Figura 27 se apresenta comparativamente a AA% do EPV, NPAgB e NPAgC. O melhor desempenho para sequestrar radicais livres foi exibido pelas nanopartículas de prata feitas por síntese biogênica com própolis vermelha de Alagoas.

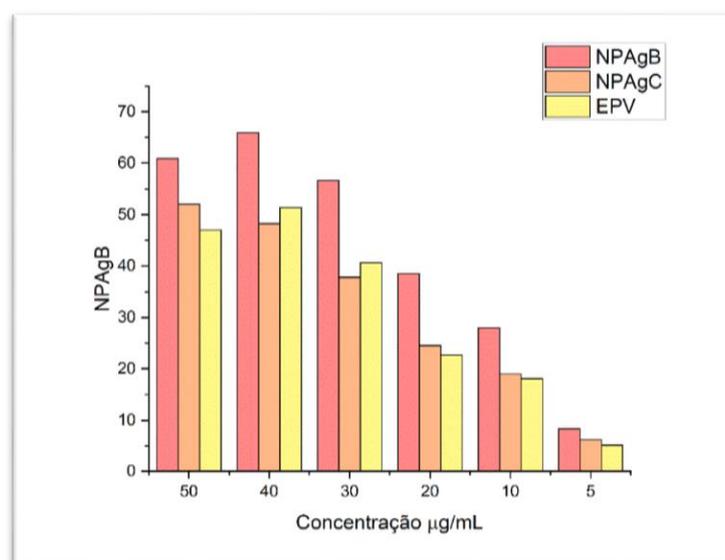


Figura 27. Comparação das médias de sequestro do radical DPPH pelas amostras de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas, nanopartículas de prata

biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas e nanopartículas de prata obtidas por síntese convencional. Fonte: O autor (2021)

5.4 Grau de conversão dos adesivos experimentais

Os espectros dos adesivos experimentais não polimerizados e polimerizados, foram observados na região espectral entre 1550 e 1650 cm^{-1} , e estão representados na Figura 28, onde é possível observar picos característicos de adesivos contendo HEMA E Bis-GMA (metacrilatos). O pico 1638 cm^{-1} que representa o modo vibracional das duplas ligações C=C do grupo dimetacrilato alifático e o pico 1608 cm^{-1} , que corresponde ao modo vibracional de ligações duplas C=C do grupo benzeno aromático, e permanece inalterado durante a polimerização. É possível observar, também, uma variação na intensidade do modo estiramento axial C=C do metacrilato em 1638 cm^{-1} , que apresenta intensidade reduzida após a formação do polímero.

Os valores médios do grau de conversão são apresentados na Figura 29. O grau de conversão para cada grupo experimental variou de 76,19 % até 87,57 %. A análise ANOVA não evidenciou interação significativa entre o grau de conversão dos adesivos testados (Tabela 5), embora tenha sido observado aumento do GC nos grupos experimentais, comparados ao grupo controle e ao adesivo comercial SB.

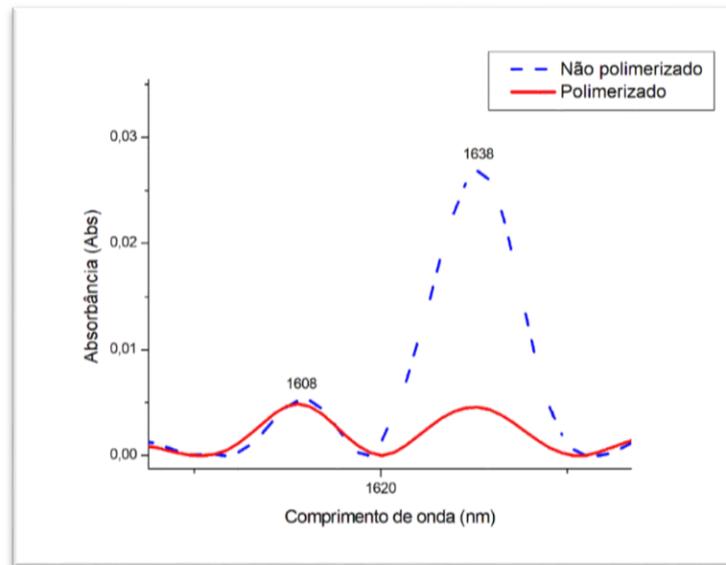


Figura 28. Espectros sobrepostos dos adesivos polimerizados e não polimerizados mostrando a redução da altura do pico em 1638 cm^{-1} (C=C) após a polimerização. Fonte: O autor (2021)

Tabela 5. Tabela de dados ANOVA do grau de conversão dos adesivos testados

| ANOVA | | | | | |
|--------------|--------------------|-------|----------------|-------|-------|
| GC | Soma dos Quadrados | gl | Quadrado Médio | F | Sig. |
| Entre Grupos | 1074,22 | 8,00 | 134,277 | 1,519 | 0,185 |
| Nos grupos | 3181,44 | 36,00 | 88,373 | | |
| Total | 4255,66 | 44,00 | | | |

ANOVA não evidenciou interação significativa entre o grau de conversão dos adesivos testados

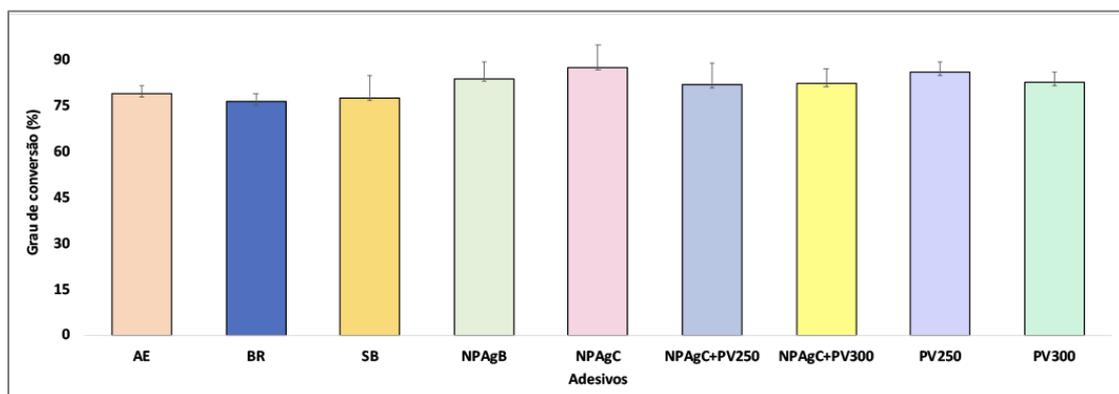


Figura 29. Valores médios do grau de conversão (%) dos adesivos testados no estudo. ANOVA não evidenciou interação significativa entre o grau de conversão dos adesivos testados. **AE:** Adesivo experimental puro; **BR:** Branco (Adesivo experimental + etanol); **SB:**

Single Bond 2; **NPAgB**: Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas; **NPAgC**: Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional; **NPAgC + PV250**: Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional com 250 µg/mL de própolis vermelha de Alagoas; **NPAgB + PV300**: Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional com 300 µg/mL de própolis vermelha de Alagoas; **PV250**: Adesivo experimental com 250 µg/mL de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas; **PV300**: Adesivo experimental com 300 µg/mL de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas.

Fonte: O autor (2021)

5.5 Resistência de união imediata, teste de microtração

Os resultados do teste de resistência à microtração (média e desvio padrão) estão na Tabela 6. A Tabela 7 mostra que o Teste F ANOVA evidenciou que houve interação significativa entre os grupos ($p=0,000$). A adição de extrato de própolis nas concentrações de 250 µg/mL e 300 µg/mL aumentou a resistência de união imediata, comparados ao controle ($p<0,05$).

Embora os adesivos NPAgB (35,39 MPa), NPAgC (36,07 MPa), NPAgC + EPV250 (38,53 MPa) e NPAgC + EPV300 (36,11 MPa) tenham apresentado resistência de união imediata ligeiramente mais elevada do que o grupo controle (33,18 MPa), não se observou diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 6. Valores médios de resistência de união à microtração imediata (MPa) \pm desvio padrão (DP) dos adesivos testados neste estudo.

| Adesivos | Resistência de união (MPa) | |
|-----------------|----------------------------|-----------------|
| | Média | DP |
| AE | 32,07 | $\pm 8,18^A$ |
| SB | 33,18 | $\pm 4,51^A$ |
| NPAgB | 35,39 | $\pm 6,47^{AB}$ |
| NPAgC | 36,07 | $\pm 5,59^{AB}$ |
| NPAgC + 250 EPV | 38,53 | $\pm 7,74^{AB}$ |
| NPAgC + 300 EPV | 36,11 | $\pm 8,37^{AB}$ |
| EPV 250 | 41,52 | $\pm 11,04^B$ |
| EPV 300 | 40,25 | $\pm 5,43^B$ |
| BR | 32,58 | $\pm 8,27^A$ |

AE: Adesivo experimental puro; **BR:** Branco (Adesivo experimental + etanol); **SB:** Single Bond 2; **NPAgB:** Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas; **NPAgC:** Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional; **NPAgC + PV250:** Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional com 250 µg/mL de própolis vermelha de Alagoas; **NPAgB + PV300:** Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional com 300 µg/mL de própolis vermelha de Alagoas; **PV250:** Adesivo experimental com 250 µg/mL de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas; **PV300:** Adesivo experimental com 300 µg/mL de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas. Letras iguais não representam diferença significativa entre os grupos.

Tabela 7. Análise de variância dos dados de resistência de união a microtração (24h)

| ANOVA | | | | | | |
|--------------|--------------------|-----|----------------|-------|-------|--|
| Resistencia | | | | | | |
| | Soma dos Quadrados | gl | Quadrado Médio | F | Sig. | |
| Entre Grupos | 2207,56 | 8 | 275,945 | 4,963 | 0,000 | |
| Nos grupos | 12344,376 | 222 | 55,605 | | | |
| Total | 14551,937 | 230 | | | | |

5.5.1 Modo de fratura

A Figura 30 mostra que o modo de fratura predominante em todos os grupos com própolis, em quaisquer das composições (EPV, NPAgB ou NPAgC + EPV), foi fratura mista. Os grupos SB, BR e AE apresentaram maior percentual de fraturas adesivas.

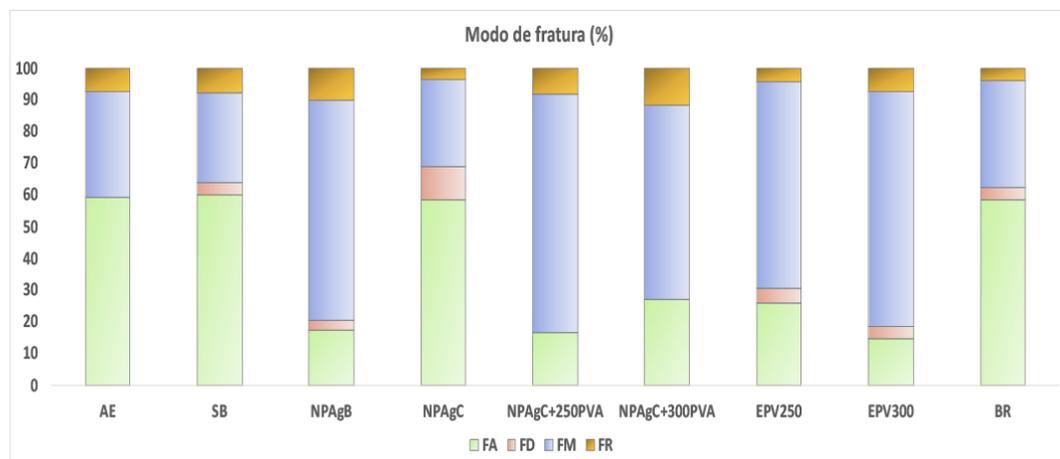


Figura 30. Tipos de fratura (%) por grupo de adesivos estudados. Em todos os adesivos que continham própolis o modo de fratura dominante foi a fratura mista. **FA:** Fratura Adesiva; **FD:** Fratura coesiva em dentina; **FR:** Fratura coesiva em resina; **FM:** Fratura mista. Fonte: **AE:** Adesivo experimental puro; **BR:** Branco (Adesivo experimental + etanol); **SB:** Single Bond 2; **NPAgB:** Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas; **NPAgC:** Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional; **NPAgC + PV250:** Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional com 250 µg/mL de própolis vermelha de Alagoas; **NPAgB + PV300:** Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional com 300 µg/mL de própolis vermelha de Alagoas; **PV250:** Adesivo experimental com 250 µg/mL de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas; **PV300:** Adesivo experimental com 300 µg/mL de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas. Fonte: O autor (2021).

5.6 Atividade antimicrobiana

5.6.1 Concentração inibitória mínima – CIM

Comparando-se com as nanopartículas de prata pura, as nanopartículas biossintetizadas com própolis mostraram melhores resultados de atividade antibacteriana, exceto contra *Enterococcus faecalis*, com valores de CIM de 2,5 µg/mL para os dois tipos de nanopartículas (Tabela 8).

5.6.2 Concentração bactericida mínima – CBM

Os valores de CBM (Tabela 9) foram determinados pela concentração mínima das nanopartículas que impedia o crescimento bacteriano. Notou-se um melhor efeito bactericida das NPAgB contra *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus epidermidis*. Com relação a *Enterococcus faecalis*, foram observados resultados similares para os dois tipos de nanopartículas (5 µg/mL), sugerindo boa efetividade bactericida.

Tabela 8. Valores de CIM das nanopartículas, frente a bactérias testadas.

| Nanopartículas | Microorganismos | | | |
|----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| | <i>Streptococcus mutans</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| NPsAgC | 20 µg/mL | 2,5 µg/mL | >20 µg/mL | 5 µg/mL |
| NPsAgB | 10 µg/mL | 2,5 µg/mL | 20 µg/mL | 2,5 µg/mL |

NPAgB: Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas; **NPAgC:** Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional. Fonte: O autor (2021)

Tabela 9. Valores de CBM, frente as bactérias testadas.

| Nanopartículas | Microorganismos | | | |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| | <i>Streptococcus mutans</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| NPsAgC | >20 µg/mL | 5 µg/mL | >20 µg/mL | 10 µg/mL |
| NPsAgB | 10 µg/mL | 5 µg/mL | >20 µg/mL | 5 µg/mL |

NPAgB: Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas; **NPAgC:** Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional. Fonte: O autor (2021).

5.6.3 Meio de difusão em disco – MDD

Os adesivos com NPAgB e NPAgC pura ou misturada a EPV nas concentrações de 250 µg/mL e 300 µg/mL reduziram o crescimento de *Enterococcus faecalis*, evidenciado pela presença de halos de inibição. O adesivo contendo NPAgB promoveu maior halo de inibição quando comparado a quaisquer dos outros grupos testados (3,4 mm), seguido do adesivo com NPAgC (2,7 mm), indicando que as nanopartículas biossintetizadas com própolis possuem atividade bactericida melhor do que todas as outras composições. Não houve formação de halo de inibição nas amostras do adesivo experimental puro e do adesivo comercial SB.

Tabela 10. Valores de halo de inibição dos adesivos testados.

| AMOSTRAS | HALO DE INIBIÇÃO (mm) |
|-----------------------|------------------------------|
| AE | 0,00 |
| SB | 0,00 |
| NPAgB | 3,40 |
| NPAgC | 2,70 |
| NPAgC + EPV250 | 1,70 |
| NPAgC + EPV300 | 1,40 |
| EPV 250 | 0,80 |
| EPV 300 | 0,90 |

AE: Adesivo experimental puro; **BR:** Branco (Adesivo experimental + etanol); **SB:** Single Bond 2; **NPAgB:** Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas; **NPAgC:** Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional; **NPAgC + PV250:** Adesivo experimental + 250µg/mL de

Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional com 250 µg/mL de própolis vermelha de Alagoas; **NPAgB + PV300**: Adesivo experimental + 250µg/mL de Nanopartículas de prata sintetizadas de modo convencional com 300 µg/mL de própolis vermelha de Alagoas; **PV250**: Adesivo experimental com 250 µg/mL de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas; **PV300**: Adesivo experimental com 300 µg/mL de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas. Fonte: O autor (2021).

5.7 Liberação de NPAgB e NPAgC em saliva pH 6,8 e 4,0

Não foi detectada a liberação de nanopartículas do adesivo polimerizado, independente do valor do pH da saliva (pH 6,8 e pH 4.0), mostrando a estabilidade das NPs dentro do material após polimerização.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo utilizou-se a biossíntese verde para obtenção de nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas, que foram adicionadas a um adesivo dental experimental. A utilização de materiais biológicos na síntese de nanopartículas de prata desempenha importância na atividade biológica do produto final, resultado do possível sinergismo entre as propriedades do material utilizado e da prata, conforme observado por TIPPAYAWAT *et al.* (2016) e PADALIA *et al.* (2014), através do aumento da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata biossintetizadas com *Aloe vera* e flores de calêndula, respectivamente.

Comparando-se a síntese biogênica com a química, SHAIK *et al.*, (2016) observaram que a nanopartícula de prata quimicamente sintetizada exibiu atividade antibacteriana menor ou comparável a proveniente de síntese biogênica, corroborando os resultados desse estudo, onde observou-se clara superioridade na atividade antimicrobiana das nanopartículas biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas, sobre as nanopartículas sintetizadas de modo convencional (químico).

A composição fenólica da própolis, principalmente seu alto teor de flavonoides, a tornam importante na síntese de nanopartículas metálicas por proporcionarem a redução de metais e também sua estabilização (BARBOSA *et al.*, 2019). No cromatograma de NPAgB, observou-se a redução dos picos correspondentes a isoliquiritigenina, pinobanksina, biochanina A e formononetina, indicando os possíveis marcadores da própolis vermelha que complexam a nanopartícula ou que reduzem os íons Ag^+ em nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas.

A Isoliquiritigenina é uma chalcona bio-precursora dos flavonoides, e também uma substância de grande interesse nos estudos com própolis, devido a sua estrutura

química simples e suas propriedades farmacológicas: atividade anti-inflamatória (ÖZDEMIR *et al.*, 2015) antinociceptiva (MOHAMAD *et al.*, 2010) antioxidante (VANANGAMUDI *et al.*, 2017), anticonvulsivante (NASSAR *et al.*, 2016) e antimicrobiana (GAUR *et al.*, 2016). Pinobanksina é um flavonol com atividade antioxidante, que inibe a peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade e tem propriedades doadoras de elétrons (de MENDONÇA *et al.*; 2015SALGUEIRO, 2012). Biochanina A é uma isoflavona, um composto fitoquímico natural presente em leguminosas, ervas, soja, amendoim, grão de bico (BREIKAA, 2013) e em plantas como na *Dalbergia ecastophyllum* (ALDANA-MEJÍA *et al.*, 2021; DAUGSCH, 2007), possui capacidade anti-tumoral, podendo suprimir significativamente o crescimento de tumores das células cancerosas como demonstrado por Yanagihara *et al.* (1993), além de potente atividade antimicrobiana ((DAUGSCH, 2007; FLESAR *et al.*, 2009) e a Formononetina que é uma isoflavona, apresenta atividade antifúngica e antimicrobiana (NEVES *et al.*, 2016).

Em relação ao teor de flavonoides presentes no extrato etanólico de própolis, neste trabalho obteve-se valor médio de 1,53%, o que está de acordo com as exigências da legislação, cujo valor fixo é de no mínimo 0,25% de flavonoides (SOBRINHO *et al.*, 2008) e foi superior aos valores apresentados por SILVA *et al.*, (2009), que variaram entre 0,19% a 0,52%. Entretanto, os resultados desse estudo são mais baixos do que os mostrados por NASCIMENTO *et al.*, (2018) e por RIGHI *et al.*, (2008), que quantificaram no extrato etanólico de própolis vermelha valores de 2,83% e 3,29%, respectivamente.

A atividade anti-inflamatória é, também, uma característica da própolis vermelha de Alagoas e estudos apontam que essa propriedade está, igualmente, ligada aos flavonoides (BUENO-SILVA *et al.*, 2015). Esses compostos podem inibir a

ciclooxigenase (COX) e a lipooxigenase, dessa forma inibindo o processo inflamatório (NETTO *et al.*, 2013) e é tão ativo quanto a dexametasona a 10 mg/kg (BUENO-SILVA *et al.*, 2013), o que destaca seu grande potencial antiinflamatório.

O percentual de atividade antioxidante (%AA) é equivalente à quantidade de DDPH consumida pelo antioxidante, e a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀) ou concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (SOUZA, *et al.*, 2007).

Os resultados do ensaio DPPH mostraram que as NPAgB têm melhor capacidade de inibir o radical DPPH do que NPAgC, demonstrando, assim, atividade antioxidante possivelmente devido ao extrato de própolis vermelha que fica ao redor da nanopartícula interagindo melhor com o radical DPPH. A desmineralização dentinária resulta na exposição de uma camada externa de matriz orgânica totalmente desmineralizada e a reconstrução biológica desse substrato desmineralizado é um dos principais objetivos da odontologia conservadora (TOLEDANO *et al.*, 2018; MEI *et al.*, 2013). Nesse processo, as enzimas metaloproteinases da matriz (MMPs) podem ser ativadas pelo baixo pH e passam a desempenhar papel importante na degradação do colágeno exposto e não recoberto pelo adesivo. Nesse panorama, um sistema adesivo com atividade antioxidante, que promove a inibição de MMPs é altamente desejável.

Observa-se que o aumento das concentrações do extrato etanólico de própolis vermelha também aumenta, gradualmente, a porcentagem de sequestro do radical DPPH. Porém, nesse estudo obtivemos valores relativamente baixos comparado com estudos anteriores (BUENO-SILVA *et al.*, 2016; MENDONÇA *et al.*,

2015), embora de acordo com NASCIMENTO *et al.*, 2019, a concentração total de flavonoides represente os únicos compostos responsáveis pela ação antioxidante dos extratos de própolis vermelha de Alagoas, havendo uma sinergia entre os efeitos dos flavonóides e gutiferronas promovendo assim a diminuição dos valores de IC₅₀. Ainda segundo com NASCIMENTO *et al.*, 2019, que relaciona os valores encontrados de flavonóides e gutiferronas com os dados meteorológicos espaciais para o aumento de flavonóides nos períodos chuvosos e gutiferronas nos períodos de intensa radiação solar. Estudos demonstram que a época ou estação da coleta afeta qualitativamente a composição química da própolis vermelha, devido a efeitos do clima e a vegetação de origem (BUENO-SILVA *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

O estudo de Nascimento *et al.* (2020) corrobora os resultados apresentados na análise dos cromatogramas desse estudo. Os picos cromatográficos identificados no extrato de própolis vermelha de Alagoas por aqueles autores indicaram os marcadores da própolis vermelha de Alagoas flavonas, flavanonas, isoflavonas, chalconas e ácidos fenólicos, também registrados nesse estudo.

Segundo OLDONI *et al.*, (2007) a alta atividade antioxidante está relacionada com o teor compostos fenólicos, principalmente de flavonoides, que possuem atividade de sequestro de espécies reativas de oxigênio, incluindo os radicais hidroxil, peroxil e radicais superóxido, além de quelar metais de transição, impedindo assim, a formação de espécies reativas, e assim, assumindo um papel importante neste estudo, pois os flavonoides tem potencial capacidade de proteger o colágeno da dentina devido a sua atividade antioxidante. No estudo de Almeida *et al.*, (2017) o extrato de própolis vermelha em concentração 50 µg/mL teve uma capacidade de inibição de radicais livres de 98%, enquanto KESHAHI *et al.*, (2020) relataram que as

nanopartículas de prata biossintetizadas possuem atividade antioxidante superior a vitamina C.

Observando-se o percentual de AA% das nanopartículas, podemos dizer que as NPAgB possuem maior AA% comparada com as NPAgC e até ao EPV. Esse comportamento das NPAgB ocorre devido a presença de compostos do extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas na superfície das nanopartículas de prata.

Em um estudo anterior, ISLAN *et al.*, (2012) demonstrou a capacidade protetora da hesperidina que é uma flavona, que possui alto potencial antioxidante na proteção da dentina que foi exposta a condicionamento ácido. ISLAN *et al.*, (2014) verificaram que a adição de hesperidina em um adesivo comercial resulta em alta capacidade protetora da matriz de dentina após um ano de armazenamento. Assim, espera-se que a ação antioxidante das NPAgB, adicionadas ao adesivo dental, represente uma ajuda em potencial para reduzir a ação das metaloproteinases da dentina.

A cor marrom escura da síntese de NPAgB confirmou a redução de nitrato de prata em nanopartículas de prata com própolis vermelha, além disso a formação de nanopartículas foi confirmada através da espectrofotometria UV-Vis (200 e 800 nm). A espectrofotometria por UV-vis tornou-se um padrão para caracterização de nanopartículas de prata, pois esses materiais possuem absorção de luz em um comprimento de onda específico (420 nm), indicando assim a formação de nanopartículas, pelas bandas de SPR.

Os espectros UV-Vis da solução preparada foram obtidos em diferentes intervalos de tempo, 30 minutos, 1 hora e 24 horas. Os picos de absorbância foram observados entre 420 e 425nm, que se iniciaram alguns minutos após o início da reação, e se acentuaram com o tempo. De acordo com relatos anteriores (WEI. H,

XU.H., 2012; FEMI-ADEPOJU, *et al.*, 2019), o aumento da intensidade é atribuído à excitação da ressonância plasmônica de superfície (SPR) da NPAg, sugerindo a redução do nitrato de prata em nanopartículas de prata. As características das nanopartículas de prata esféricas estão relacionadas à absorção das bandas de SPR (DUTT. A, 2018; CHENGZHENG *et al.*, 2018).

A SPR consiste na oscilação dos elétrons que entram em ressonância com a frequência da radiação eletromagnética da luz incidente. E essa frequência está diretamente relacionada à forma, tamanho e organização das nanopartículas e o índice de refração do meio (ANTUNES *et al.*, 2013; BABUMATHI *et al.*, 2017). A absorvância de SPR em um determinado comprimento de onda, pode ser usada para indicar o tamanho da partícula. Quanto maiores forem as nanopartículas produzidas, maior será o pico de absorção da SPR (SOLOMON *et al.*, 2007).

Nanopartículas de prata têm sido amplamente utilizadas devido à suas propriedades ópticas únicas, ou seja, SPR, que podem ser ajustadas na faixa visível, variando tamanho, morfologia, composição e formação. Baixos comprimentos de onda, indicam a formação de nanopartículas de prata com menores tamanhos de partícula. (SANTOS *et al.*, 2015). Nesse estudo a banda de absorção foi 425 nm para os dois tipos de nanopartículas (NPAgB e NPAgC), caracterizando nanopartículas esféricas.

A SPR depende fortemente do tamanho, forma e do ambiente no qual as nanopartículas são formadas. As bandas de absorção de SPR são largas, com uma onda de absorção nos comprimentos de onda mais longos, aumentando assim a concentração de NPsAg, indicando um aumento na distribuição do tamanho de partícula das NPsAg biossintetizadas (DADA *et al.*, 2019).

Para nanopartículas de prata, a SPR ocorre na região da luz visível, o que faz com que apresentem coloração característica. Para NPAg esféricas com diâmetro entre 10-20 nm o espectro apresenta uma banda de absorção em torno de 400 nm, sendo a solução amarelada (ZHANG *et al.*, 2008). Além disso, a presença de uma única banda SPR no Espectro UV-vis associado à formação de nanopartículas uniformemente esféricas, uma vez que dois ou mais picos de absorção estão associados com NPAg de formato irregular (SHERVANI *et al.*, 2007).

A absorbância máxima da SPR foi localizada a 420 nm, comprimento de onda relativamente baixo, sugerindo a formação de pequenas nanopartículas (TAN *et al.*, 2013). Além disso, foi demonstrado que a intensidade da banda de absorção do SPR foi maior para as NPAgC em comparação com a NPAgB. A presença da própolis diminuiu a intensidade de absorção do SPR das NPAgB, conferindo assim a característica de nanopartículas menores de acordo com a SPR das sínteses, o que foi comprovado pela equação de Debye-Scherrer.

A técnica de FTIR é uma das mais importantes para a caracterização de novos produtos, utilizada para identificação e determinação de características estruturais, grupos funcionais orgânicos e de ligações presentes na amostra, além disso permite uma determinação semiquantitativa de componentes de uma determinada amostra, determinando assim os responsáveis para redução da prata em nanopartículas.

O espectro FTIR das NPAgC demonstrou uma ligeira mudança de posição e intensidade nos picos comparado ao espectro das NPAgB. O deslocamento em 3412 cm^{-1} está relacionado à quebra da ligação de hidrogênio, que desempenha um papel importante na diminuição de íons de prata em nanopartículas de prata.

No espectro FTIR de NPAgB, observou-se um deslocamento na região da absorção em 3560 até 3454 cm^{-1} , a absorção nessa região é associada as vibrações

de deformação axial nos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos, oxigênios e nitrogênios. Foi possível observar, também, uma redução da intensidade dos picos, indicando a sua participação da formação das nanopartículas. De acordo com BARBOSA (2019) tal fato contribui com o esperado, já que tais grupos estão presentes nos flavonoides, substâncias que participam da composição da própolis e tem características redutoras. Há também a presença de deslocamento da região de compostos heterocíclicos de 1110 para 1089 cm^{-1} , bem como desaparecimento da banda referente aos glicosídeos (831 cm^{-1}). Tais deslocamentos também sugerem a possibilidade de participação desses compostos na redução da prata para formação de NPAgB.

Na técnica de difração de raios-X, podemos ver o padrão de interferência de ondas presentes em um feixe de raios-X e assim determinar a estrutura atômica e molecular de um cristal. Na análise PXRD da amostra de NPAgC e NPAgB, os valores dos picos dos ângulos 2theta, confirmam a sua estrutura cúbica, de acordo com o Joint Committee on Powder Diffraction (Arquivo de normas nº: a = 4.086 Å; JCPDS PDF 04-0783) (JCPDS), onde para o padrão de XRD confirma a rede cúbica de face centrada (FCC), com picos em: 38°; 48,12°; 64,12°; 77,36°; 81,58°, que correspondem a (111), (200), (220), (311) e (222) planos de cristalização, nenhum outro pico de difração foi detectado, isso implica dizer que há a formação de nanopartículas de prata como demonstrado em estudos anteriores (BARBOSA et al., 2019; SINGH et al., 2018; SINGH; PANDEY, 2011). Assim, os resultados evidenciaram que os padrões de DRX para NPAgB e NPAgC são semelhantes aos padrões propostos no JCPD, indicando que as nanopartículas sintetizadas têm estrutura cristalina com 39% e 71% de cristalinidade, respectivamente. Esses dados corroboram com o estudo de BARBOSA, *et al.*, 2019, que também utilizou extrato de

própolis vermelha para síntese biogênica de nanopartículas de prata. O grau de cristalinidade total registrado foi de 39% das NPAgB.

As nanopartículas biossintetizadas com própolis utilizadas neste estudo apresentaram tamanho de 11 nm e são menores que as biossintetizadas por ROLIN *et al.* (2019), RAJA *et al.* (2015) e LEE *et al.* (2016), que exibiram valores de 34, 77,57 e 35 nm., respectivamente.

A atividade antibacteriana do EPV e NPAgC e NPAgB, foi avaliada contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, utilizando-se o teste de micro diluição em caldo. As NPAgB, mostraram bons resultados frente a bactérias gram-negativas, em comparação com as células bacterianas gram-positivas. Esses resultados estão de acordo com outros estudos, que demonstraram a boa atividade antibacteriana de nanopartículas biossintetizadas (ATANASOV *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2007; GUPTA *et al.*, 2017; AWARD *et al.*, 2020).

As nanopartículas biossintetizadas com própolis mostraram melhores resultados de atividade antibacteriana, exceto frente ao *Enterococcus faecalis*, grupo onde observou-se MIC de 2,5 µg/mL para os dois tipos de nanopartículas.

Enterococcus faecalis, é uma bactéria anaeróbica gram-positiva que prospera em condições de baixos nutrientes ou alto oxigênio (ALGHAMDI; SHAKIR, 2020; NAJAFI *et al.*, 2020). *E. faecalis* é identificado em 50-70% dos casos de tratamento insatisfatório do canal radicular (NAJAF *et al.*, 2020) e está relacionado com ausência de sintomas (Zancan *et al.*, 2018), pode se alimentar de fluido ligamentar periodontal e desenvolver biofilmes para se proteger da resistência do hospedeiro e agentes desinfetantes (PRADA *et al.*, 2019; SAKKO; TJÄDERHANE; RAUTEMAA-RICHARDSON, 2016). Além desses mecanismos, *E. faecalis* tem a capacidade de

desenvolver resistência a antibióticos, particularmente à eritromicina e azitromicina, bem como a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários e colágeno, apresenta resistência ao hidróxido de cálcio, que é o padrão ouro para tratamento do canal radicular (Zancan et al., 2016). Pesquisas sobre o uso e tratamento de própolis são alternativas naturais e de grande interesse devido aos efeitos colaterais causados por medicamentos sintéticos (SKOSKIEWICZ-MALINOWSKA et al., 2016).

Também muito importante, foi o registro do valor de MIC 2,5 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis*, que está presente em infecções odontogênicas oportunistas, e isolados principalmente em canais radiculares infectados, (SIQUEIRA et al., 2002), foi associado também a infecção cerebral depois de manipulação dental, onde pode infectar o cérebro de duas maneiras: diretamente por propagação contígua e alterações odontogênicas, o que geralmente resulta em um único abscesso cerebral, ou indiretamente através da propagação hematogena, que pode resultar em numerosos abscessos (AL MOUSSAWI et al., 2018). Também foi correlacionado em um caso de falha de tratamento endodôntico com uma sinusite maxilar, onde confirmou-se a presença de *S.epidermidis* em biópsias de conteúdo sinusal do paciente (DRAGO et al., 2013). Embora haja um equilíbrio homeostático entre a microbiota residente na cavidade bucal e o hospedeiro, as alterações na microbiota oral podem levar à formação de infecções não orais multirresistentes, segundo pesquisas (ZAATOUT, 2021). As vias moleculares que conectam esses transportes não são bem conhecidas, uma vez que *S. epidermidis* foi recentemente associada a doença peritoneal e colonização da cavidade bucal pelo mesmo patógeno, indicando provável conexão e potencial infeccioso do transporte oral (SIMÕES-SILVA et al., 2018).

Além disso obtivemos MIC de 10 µg/mL para *Streptococcus mutans* e 20 µg/mL para *Staphylococcus aureus*. Todos esses valores estão abaixo daqueles registrados para NPAgC.

De acordo com REGUEIRA *et al.*, (2017) os possíveis mecanismos de ação relacionados a atividade antimicrobiana da própolis são: inibição da síntese de ácidos nucleicos, mecanismo inibitório da DNA girase, inibição da função da membrana citoplasmática, inibição do metabolismo energético e inibição da formação de biofilme.

Com relação as NPAgC podemos observar que a capacidade bactericida é superior a bacteriostática em relação a *S. mutans* e *E. faecalis*. Os resultados MIC e MBC das NPAgB estão de acordo com o estudo de LEE *et al.* (2016), no qual as nanopartículas biossintetizadas foram mais eficazes contra patógenos gram-positivos

O maior diâmetro da zona de inibição no ensaio MDD contra *Enterococcus faecalis* foi alcançado pelo adesivo formulados com NPAgB (3,4mm), seguido pelos adesivos com NPAgC, combinação de NPAgC e concentrações seriadas de EPV e EPV puro, O que demonstra que a atividade antimicrobiana da própolis é concentração dependente. Embora o mecanismo de ação das nanopartículas de prata não tenha sido ainda bem elucidado, vários estudos sugerem que as NPAgC podem se unir à superfície da parede celular e à membrana da bactéria e podem inibir as enzimas respiratórias das bactérias causando assim morte celular (KVITEK *et al.*, 2008; TAMBOLI *et al.*, 2013).

Em relação a *Enterococcus faecalis*, a mais alta atividade antibacteriana das nanopartículas de prata pode estar relacionada à inibição da absorção de fosfato, bem como a penetração de nanopartículas na parede celular, levando a alterações estruturais e morte celular. Esse mecanismo de ação é amplamente reconhecido, e pode ser mediado pela oxidação parcial das NPAgC e liberação dos íons prata (Ag⁺).

Por sua vez, os íons Ag^+ podem interagir com o peptidoglicano da parede celular e membrana plasmática, causando lise celular, com o DNA bacteriano (citoplasmático), impedindo a replicação do DNA, e com proteínas bacterianas, interrompendo a síntese protéica. As NP AgC também podem danificar as bactérias diretamente pela penetração na parede celular e membrana celular (VIEGAS, 2018). NP AgC menores podem ter um efeito bactericida mais intenso do que as maiores, devido à maior área de superfície disponível para interação e consequente mais fácil absorção (JIN *et al.*, 2001).

Nesse estudo foram sintetizados adesivos dentinários com ação antimicrobiana pelo acréscimo de própolis e nanopartículas de prata. A odontologia contemporânea procura impedir a evolução da cárie, prevenir novas lesões e preservar a vitalidade do dente com o mínimo de intervenção. Tradicionalmente, o tratamento da cárie envolve a remoção de tecido cariado, substituindo-o por um material restaurador. No entanto, a remoção convencional de tecido cariado e procedimentos de preparação da cavidade não garantem eliminação completa de bactérias cariogênicas orais que podem ser aprisionadas dentro dos túbulos dentinários ou camada de esfregaço (ARAÚJO *et al.*, 2010). Maiores benefícios podem ser alcançados através de medidas para eliminar a quantidade máxima de bactérias que permanecem no tecido dentário, como a desinfecção da cavidade antes do procedimento restaurador (ARAÚJO *et al.*, 2010) e adesivos com atividade antimicrobiana podem ser eficazes para a erradicação de bactérias que permanecem após o preparo cavitário.

Durante o processo de polimerização dos adesivos odontológicos, novas ligações simples serão construídas a partir das ligações duplas, além da formação de uma rede de polímero tridimensional. De acordo com DURNER *et al.*, 2012 quanto

menor o grau de conversão, maior a quantidade de monômeros não curados e outros compostos que serão liberados nos tecidos adjacentes. O grau de conversão dos monômeros para polímeros tem influência nas propriedades mecânicas e biocompatibilidade do material.

As ligações duplas não convertidas que permanecem no adesivo surgem de pelo menos duas situações: (1) a não reação dos monômeros ou (2) duplas ligações pendentes nas extremidades das cadeias de polímero. Os monômeros que não reagem na cadeia de polímeros podem causar danos aos tecidos circundantes (DURNER *et al.*, 2012; MANTELLINI *et al.*, 2003).

As áreas de união são suscetíveis à ruptura por fadiga cíclica após serem submetidas a cargas repetitivas durante a função. A entrada de água na camada híbrida serve como meio funcional para a hidrólise da matriz da resina, favorecendo a atividade de esterases e enzimas colagenolíticas, como as metaloproteinases da matriz, que desempenham papel fundamental no processo de degradação da camada híbrida (BETANCOURT *et al.*, 2019). O baixo grau de conversão pode, ainda, tornar o polímero mais sujeito a oxidação e degradação hidrolítica ao longo do tempo, comprometendo assim o sucesso dos procedimentos restauradores (COLLARES *et al.*, 2014).

Alto grau de conversão, em uma faixa entre 85 e 90%, está relacionado a altas densidades de reticulação de polímeros dentais (DEGRAZIA *et al.*, 2016). Os valores mais altos do grau de conversão neste estudo estão no grupo com as NPAgC (87,57%), seguido dos grupos PV 250 µg/mL, NPAgB, PV300 µg/mL, NPAgC+PV 300 µg/mL + NPAgC+PV 250 µg/mL, mas em todos esses grupos o GC ficou acima de 80%. As nanopartículas em pó incorporadas ao adesivo experimental não influíram negativamente no grau de conversão, diferentemente do estudo de Degrazia *et al.*

(2016) que notaram redução do GC do adesivo no qual foram adicionadas NPAg em solução.

Os adesivos experimentais utilizados nesse estudo não continham carga inorgânica, caracteristicamente utilizadas para reforço nessa categoria de material (sílica coloidal e outras), mas a adição de prata e própolis pode gerar interações com a luz necessária para fotoativação e, por consequência, no resultado do GC.

As partículas de carga interferem na polimerização, promovendo diferenças na absorção e dispersão de fótons (PORTO *et al.*, 2010). O valor máximo da transmitância da luz através do compósito depende fortemente do tamanho de partícula de carga usado. Menores partículas aumentam a quantidade de luz transmitida (FUJITA *et al.*, 2011). Assim, as nanopartículas adicionadas aos adesivos podem ter contribuído para o aumento do grau de conversão.

A natureza das moléculas de monômeros desempenha um papel importante nos valores finais do GC e as diferenças de composição orgânicas podem explicar diferenças nos valores de GC entre um estudo e outro. Os resultados do grau de conversão dos adesivos contendo NPAGC (87,57%) obtidos nesse trabalho, estão de acordo com o estudo de DEGRAZIA *et al.*, 2013, que registrou o valor de 87,51% em um adesivo também contendo nanopartículas de prata, embora os autores tenham utilizado TEGDMA na composição do adesivo. A adição de TEGDMA aumenta o GC e a contração de polimerização do compósito devido a um aumento da concentração de ligações duplas de carbono-carbono (PALIN *et al.*, 2003). PORTO *et al.* (2021), que também utilizaram EPV nos adesivos dentinários, obtiveram valores de GC entre 80,57% a 85,69%, semelhante aos valores do GC dos adesivos com EPV desse estudo. A interação entre os compostos fenólicos da própolis pode gerar um aumento

de ligações cruzadas nos adesivos com própolis vermelha, resultando em uma matriz orgânica mais estável e resistente (OLIVEIRA et al., 2021).

Porto *et al.* (2021) demonstraram que a adição de própolis vermelha de Alagoas em um adesivo dentinário comercialmente disponível elevou o grau de conversão e preservou a resistência de união após um ano de observação. Nesse estudo, a adição de própolis, como extrato ou nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas, promoveu aumento de resistência de união imediata e aumento do grau de conversão dos adesivos experimentais testados. O acompanhamento do comportamento dos adesivos com própolis a longo prazo será importante para se observar a durabilidade da resistência de união.

DUTRA-CORREA *et al.*, 2018 obteve valores elevados e significativos de resistência de união (45,90 MPa) comparados ao grupo controle (49,40 MPa), quando adicionou nanopartículas de prata em sua forma coloidal a um adesivo comercial, e afirmaram que a adição de nanopartículas de prata aos adesivos parece ser promissora para a melhorar da eficácia desses materiais.

A incorporação de diferentes tipos de nanopartículas inorgânicas aos adesivos, faz com que os valores de resistência do adesivo aumentem. Apesar da maior rigidez do material, a adição de partículas de carga proporciona uma melhor distribuição das forças oclusais na camada adesiva, sendo capaz também de distribuir e dissipar a força de contração gerada durante a polimerização de resinas (VAN MEERBEEK *et al.*, 2001; DAUVILLIER *et al.*, 2000; NAKABAYASHI e PASHLEY, 1998).

O sistema adesivo Single Bond 2 apresenta em sua composição, além do etanol, a água como diluente, fazendo com que a evaporação do adesivo seja mais lenta e a camada adesiva formada seja mais uniforme. Isso proporciona uma etapa

de secagem pós condicionamento ácido fosfórico menos crítica na aplicação desse adesivo devido a presença da água favorecer a reidratação da rede de colágeno caso esteja demasiadamente seca. Essa capacidade de hidratação das fibras colágenas é muito importante para que os monômeros possam permear por entre a malha com mais facilidade e formar a camada híbrida (VAN MEERBEEK *et al.*, 2001; NAKABAYASHI *et al.*, 1982; ERICKSON, 1992; EICK *et al.*, 1993). O adesivo experimental utilizado em nosso estudo não continha água nem partículas de sílica em sua formulação, mas ainda assim demonstrou resistência adesiva similar ao adesivo Single Bond2.

A adição de cargas à matriz resinosa melhora as suas propriedades mecânicas, como: resistência a compressão, resistência a tração e módulo de elasticidade (TRIBIOLLI, 2011). Para isso, é importante a utilização de agentes de união, ligando carga e matriz orgânica. O agente de união é utilizado para melhorar as propriedades mecânicas e produzir uma melhor estabilidade hidrolítica, evitando que a água penetre entre a interface carga/matriz de resina. O aumento da fração de partículas de carga também propicia menor contração de polimerização, que depende exclusivamente da porção orgânica do material. (REIS *et al.*, 2006).

A resistência de união dentinária aumenta nas primeiras 24 horas pela complementação do processo de copolimerização que ocorre através de diferentes monômeros. Sendo importante a espera de um período de 24 horas para confecção dos corpos de prova, e realização dos testes mecânicos (HIRONAKA, 2016).

A predominância de falha mista nos grupos que receberam própolis aponta para maior resistência adesiva na interface de união, o que foi confirmado com os resultados do ensaio de microtração e leva a acreditar que a adição de própolis

vermelha de Alagoas ao adesivo dentinário pode ter resultado em um material que promove uma adesão mais resistente.

Com base no experimento realizado neste trabalho, os adesivos com incorporação de nanopartículas de prata, sejam as sintetizadas de modo convencional ou biossintetizadas com o extrato de própolis vermelha, mostraram atividade antimicrobiana e estabilidade do material quando polimerizado, não havendo liberação de prata nos tecidos circundantes, demonstrando segurança para realização de procedimentos adesivos envolvendo esmalte e dentina. Estudos clínicos e de longo prazo auxiliarão na avaliação do material e sua possível indicação clínica.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

- 1- Foram produzidas nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas), esféricas, com tamanho de 11 ± 1 nm, atividade antioxidante e antimicrobiana superior à NPAgC.
- 2- As nanopartículas de prata obtidas pela síntese convencional apresentaram forma esférica, com tamanho de 22 ± 1 nm, atividade antioxidante e antimicrobiana.
- 3- A síntese de um adesivo dental com nanopartículas de prata biossintetizadas com própolis vermelha de Alagoas resultou em um material com atividade antimicrobiana e matriz estável com o princípio ativo imobilizado dentro do material.
- 4- Nenhuma das composições testadas alterou negativamente o grau de conversão dos adesivos.
- 5- NPAgB apresentou atividade antioxidante superior a NPAgC e EPV.
- 6- Os adesivos com EPV 250 $\mu\text{g/mL}$ e EPV 300 $\mu\text{g/mL}$ mostraram resistência de união imediata significativamente mais elevada do que o grupo controle.
- 7- O modo de fratura predominante em todos os grupos com própolis foi fratura mista.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

1. AGR, M. Correlação entre grau de conversão e resistência de união de sistemas adesivos autocondicionantes. 2010. **Piracicaba** 2012. p. 1–107, 2012.
2. ALLAKER, R. P. Critical review in oral biology & medicine: The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 11, p. 1175–1186, 2010.
3. ALVES, J.; AUED, N.; SOARES, F.; JACQUES, ILL.; KAIZER, M.; MALLMANN, A. Avaliação da cor de um compósito com espectrofotômetro em diferentes modos de leitura e condições de armazenagem. **Rfo Upf**, v. 19, n. 1, p. 101–106, 2014.
4. AMALADHAS, T. P.; SIVAGAMI, S.; DEVI, T. A.; ANANTHI, N.; VELAMMAL, S. P. Biogenic synthesis of silver nanoparticles by leaf extract of *Cassia angustifolia*. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 3, n. 4, 2012.
5. AMARAL SILVA, M. DO; VALADAS, L. A. R.; JUNIOR, F. J. G.; OLIVEIRA, G. A. L. DE; MELLO FIALLOS, A. C. DE; NETO, E. M. R.; PONTE, E. D.; SOUZA NETO, P. A. DE; BAPTISTA, G. R. Perception and Adverse Effects of Patients after using Propolis- Containing Dentifrice. **Journal of Young Pharmacists**, v. 11, n. 4, p. 421–423, 2019.
6. AMERICAN JOURNAL OF SOCIOLOGY. Predicting the binding mode of flexible polypeptides to proteins is an important task that falls outside the domain of applicability of most small molecule and protein–protein docking tools. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2019.
7. ANDRÉ, C. B.; GOMES, B. P. F. A.; DUQUE, T. M.; STIPP, R. N.; CHAN, D. C. N.; AMBROSANO, G. M. B.; GIANNINI, M. Dentine bond strength and antimicrobial activity evaluation of adhesive systems. **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 4, p. 466–475, 2015.
8. ARIELLI, A. M. D.; PEREIRA, K. F.; PRADO, N. A. S.; RABELLO, T. B. Sistemas adesivos atuais. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 73, n. 3, p. 242–246, 2016.
9. ARJMAND, N.; BORUZINIAT, A.; ZAKERI, M.; MOHAMMADIPOUR, H. S. Microtensile bond strength of resin cement primer containing nanoparticles of silver (NAg) and amorphous calcium phosphate (NACP) to human dentin. **Journal of Advanced Prosthodontics**, v. 10, n. 3, p. 177–183, 2018.
10. ARRUDA, R. E. DOS S. **Efeito da Sazonalidade na Composição Química e Atividades Antimicrobiana, Antioxidante e Tripossomicida de Extratos Brutos de**

Própolis Vermelha de Alagoas, 2019. Disponível em:

<http://www.repositorio.ufal.br/handle/riufal/5565>

11. ASSUNÇÃO, C. M.; SANTOS, N. M. DOS; ESSVEIN, T. E.; SILVA, M. G. R.; ERHARDT, M. C. G.; RODRIGUES, J. A. Microshear Bond Strength of Adhesive Systems on Eroded Primary Enamel and Dentin. **Pediatric dentistry**, v. 42, n. 1, p. 47–52, 2020.
12. BAPAT, R. A.; CHAUBAL, T. V.; JOSHI, C. P.; BAPAT, P. R.; CHOUDHURY, H.; PANDEY, M.; GORAIN, B.; KESHARWANI, P. An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. **Materials Science and Engineering C**, v. 91, n. 2017, p. 881–898, 2018.
13. BARBOSA, V. T. *et al.* Biogenic synthesis of silver nanoparticles using Brazilian propolis. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 6, p. 1–9, 2019.
14. BASÍLIO, J. A. D. Desenvolvimento e avaliação in vitro da atividade cicatrizante de membranas poliméricas incorporadas com própolis vermelha. 2008.
15. BAYNE, S. C.; FERRACANE, J. L.; MARSHALL, G. W.; MARSHALL, S. J.; NOORT, R. VAN. The Evolution of Dental Materials over the Past Century: Silver and Gold to Tooth Color and Beyond. **Journal of Dental Research**, v. 98, n. 3, p. 257–265, 2019.
16. BECERRA, T. B.; CALLA-POMA, R. D.; REQUENA-MENDIZABAL, M. F.; MILLONES-GÓMEZ, P. A. Antibacterial Effect of Peruvian Propolis Collected During Different Seasons on the Growth of Streptococcus Mutans. **The Open Dentistry Journal**, v. 13, n. 1, p. 327–331, 2019.
17. BEDRAN-RUSSO AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater** 2008;86:330–334.
18. BHAKYA, S.; MUTHUKRISHNAN, S.; SUKUMARAN, M.; MUTHUKUMAR, M. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their antioxidant and antibacterial activity. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 6, n. 5, p. 755–766, 2016.
19. BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Seminars in Cancer Biology**, v. 20, n. 3, p. 161–168, 2010.
20. BUENO-SILVA, B.; KAWAMOTO, D.; ANDO-SUGUIMOTO, E. S.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L.; MAYER, M. P. A. Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling cascade in Ipsiactivated macrophages. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2015.

21. BUENO-SILVA, B.; MARSOLA, A.; IKEGAKI, M.; SEVERINO, M.; ROSALEN, P. L.; MARSOLA, A.; IKEGAKI, M.; SEVERINO, M. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source : chemical composition and antibacterial activity. **Natural Product Research**, v. 6419, n. October, p. 0, 2016.
22. CAI J, Palamara JEA, Burrow MF. Effects of collagen crosslinkers on dentine: a literature review. *Calcif Tissue Int* 2018;102:265–279.
23. CHENG, L.; ZHANG, K.; MELO, M. A. S.; WEIR, M. D.; ZHOU, X.; XU, H. H. K. Anti-biofilm dentin primer with quaternary ammonium and silver nanoparticles. **Journal of Dental Research**, v. 91, n. 6, p. 598–604, 2012.
24. CHOUDHARY, P.; VELAGA, N. R. Análise da estrutura de covariância de indicadores relacionados à saúde em idosos no domicílio com foco na saúde subjetiva. p. 1–9, 2017.
25. COLLARES, F. M.; PORTELLA, F. F.; LEITUNE, V. C. B.; SAMUEL, S. M. W. Discrepancies in degree of conversion measurements by FTIR. **Brazilian Oral Research**, v. 28, n. 1, p. 9–15, 2014.
26. CORRÊA, J. M.; MORI, M.; SANCHES, H. L.; DIBO, A.; JR, E. P.; ANDRÉA, I.; POLA, V. Silver Nanoparticles in **Dental Biomaterials**. v. 2015, 2015.
27. CRISTINA, I. *et al.* Mechanical and aesthetics compatibility of Brazilian red propolis micellar nanocomposite as a cavity cleaning agent. p. 1–17, 2018.
28. CRISTINI, D.; SOUZA, B. D. E. Autarquia associada à Universidade de São Paulo Versão Corrigida Versão Original disponível no **IPEN São Paulo**. 2013.
29. CUEVAS-SUÁREZ, C. E.; RAMOS, T. S.; RODRIGUES, S. B.; COLLARES, F. M.; ZANCHI, C. H.; LUND, R. G.; SILVA, A. F. DA; PIVA, E. Impact of shelf-life simulation on bonding performance of universal adhesive systems. **Dental Materials**, v. 35, n. 9, p. e204–e219, 2019.
30. DAMASCENO, R. F.; SILVA, L. L. E; ARAGÃO, L. R.; ALBUQUERQUE, T. E. DE F.; PASSOS, V. F.; CARVALHO, B. M. D. F. DE; NERI, J. R.; CANDEIRO, G. T. DE M. Efeito da saturação de cor na profundidade de polimerização de resina composta nanohíbrida. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 42, p. e2875, 2020.
31. DAUGSCH, A. A própolis vermelha do Nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas. p. 144, 2007.
32. DEGRAZIA, F. W.; LEITUNE, V. C. B.; GARCIA, I. M.; ARTHUR, R. A.; SAMUEL, S. M. W.; COLLARES, F. M. Effect of silver nanoparticles on the physicochemical and antimicrobial properties of an orthodontic adhesive. **Journal of Applied Oral Science**, v. 24, n. 4, p. 404–410, 2016.
33. DEHGHANI, M.; ABTAHI, M.; HASANZADEH, N.; FARAHZAD, Z.; NOORI, MOHAMAD; NOORI, MEYSAM. Effect of Propolis mouthwash on plaque and gingival

- indices over fixed orthodontic patients. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 11, n. 3, p. e244–e249, 2019.
34. DEMIRKAYA, K.; CAN DEMIRDÖĞEN, B.; ÖNCEL TORUN, Z.; ERDEM, O.; ÇETINKAYA, S.; AKAY, C. In vivo evaluation of the effects of hydraulic calcium silicate dental cements on plasma and liver aluminium levels in rats. **European Journal of Oral Sciences**, v. 124, n. 1, p. 75–81, 2016.
35. DIAS, H. B.; BERNARDI, M. I. B.; MARANGONI, V. S.; ABREU BERNARDI, A. C. DE; SOUZA RASTELLI, A. N. DE; HERNANDES, A. C. Synthesis, characterization and application of Ag doped ZnO nanoparticles in a composite resin. **Materials Science and Engineering C**, v. 96, p. 391–401, 2019.
36. DICKENS, S. H.; STANSBURY, J. W.; CHOI, K. M.; FLOYD, C. J. E. Photopolymerization kinetics of methacrylate dental resins. **Macromolecules**, v. 36, n. 16, p. 6043–6053, 2003.
37. DUAILIBE, S. A. D. C.; GONÇALVES, A. G.; AHID, F. J. M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo. **Journal of Applied Oral Science**, v. 15, n. 5, p. 420–423, 2007.
38. DURÁN, N.; ROLIM, W. R.; DURÁN, M.; FÁVARO, W. J.; SEABRA, A. B. *Quim. Nova*, v. 42, n. 2, p. 206–213, 2019.
39. DURNER, J.; OBERMAIER, J.; DRAENERT, M.; ILIE, N. Correlation of the degree of conversion with the amount of elutable substances in nano-hybrid dental composites. **Dental Materials**, v. 28, n. 11, p. 1146–1153, 2012.
40. DUTRA-CORREA, M.; LEITE, A. A. B. V.; CARA, S. P. H. M. DE; DINIZ, I. M. A.; MARQUES, M. M.; SU, I. B.; FERNANDES, M. S.; TOMA, S. H.; ARAKI, K.; MEDEIROS, I. S. Antibacterial effects and cytotoxicity of an adhesive containing low concentration of silver nanoparticles. v. 77, n. June, p. 66–71, 2018.
41. DUTRA-CORREA, M.; LEITE, A. A. B. V.; CARA, S. P. H. M. DE; DINIZ, I. M. A.; MARQUES, M. M.; SUFFREDINI, I. B.; FERNANDES, M. S.; TOMA, S. H.; ARAKI, K.; MEDEIROS, I. S. Antibacterial effects and cytotoxicity of an adhesive containing low concentration of silver nanoparticles. **Journal of Dentistry**, v. 77, n. March, p. 66–71, 2018.
42. DZIEDZIC, A.; KUBINA, R.; WOJTYCZKA, R. D.; KABAŁA-DZIK, A.; TANASIEWICZ, M.; MORAWIEC, T. The antibacterial effect of ethanol extract of polish propolis on *mutans streptococci* and *lactobacilli* isolated from saliva. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
43. ECHEGOYEN, Y.; NERÍN, C. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 16–22, 2013.

44. EL-TAYEB, M. M.; ABU-SEIDA, A. M.; ASHRY, S. H. EL; EL-HADY, S. A. Evaluation of antibacterial activity of propolis on regenerative potential of necrotic immature permanent teeth in dogs. **BMC Oral Health**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2019.
45. ELIANA do Nascimento Torre; ODONTOLOGIA, F. DE. Metaloproteinases da Matriz Extracelular e Cárie Dentária . Avaliação dos Metaloproteinases da Matriz Extracelular e Cárie Dentária . Avaliação dos fluoretos TiF_4 , SnF_2 , ZnF_2 e NaF na expressão das MMP-2 e MMP-9 salivares. p. 0–83, 2014.
46. ELIANE PLACIDO. MICRO-CISALHAMENTO MEDIANTE ANÁLISE DE ELEMENTOS FINITOS Eliane Placido Distribuição de tensões em testes de cisalhamento e micro-cisalhamento mediante análise de elementos finitos. 2006.
47. EM, M.; MARA, O.; LEITE, D. I. Universidade de uberaba. p. 923820, 2014. FLESAR, J.; SKLENICKOVA, O.; VLKOVA, E.; MALIK, J.; KOKOSKA, L. Selective antimicrobial activity of biochanin A. **Planta Medica**, v. 75, n. 09, p. 876–877, 2009.
48. FANG M, Liu R, Xiao Y, Li F, Wang D, Hou R, Chen J. Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin-dentin bonds. **J Dent** 2012;40:458–466.
49. FRANCHIN, M.; COLÓN, D. F.; CUNHA, M. G. DA; CASTANHEIRA, F. V. S.; SARAIVA, A. L. L.; BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S. M.; CUNHA, T. M.; ROSALEN, P. L. Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: Involvement of nitric oxide and IL-6. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, 2016.
50. FREIRES, I. A.; ALENCAR, S. M. DE; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267–279, 2016.
51. FUJITA, K.; IKEMI, T.; NISHIYAMA, N. Effects of particle size of silica filler on polymerization conversion in a light-curing resin composite. **Dent. Mater.**, v. 27, n. 11, p. 1079-1085, 2011.
52. GAO, S. S.; ZHAO, I. S.; DUFFIN, S.; DUANGTHIP, D.; LO, E. C. M.; CHU, C. H. Revitalising silver nitrate for caries management. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 1, 2018.
53. GAUR, R.; GUPTA, V. K.; SINGH, P.; PAL, A.; DAROKAR, M. P.; BHAKUNI, R. S. Drug Resistance Reversal Potential of Isoliquiritigenin and Liquiritigenin Isolated from Glycyrrhiza glabra Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **Phytotherapy Research**, v. 1715, n. June 2015, p. 1708–1715, 2016.
54. GE, L.; LI, Q.; WANG, M.; OUYANG, J.; LI, X.; XING, M. M. Q. Nanosilver particles in medical applications: Synthesis, performance, and toxicity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 2399–2407, 2014.

55. GEHRKE, S. A.; RAMÍREZ-FERNANDEZ, M. P.; GRANERO MARÍN, J. M.; BARBOSA SALLES, M.; FABBRO, M. DEL; CALVO GUIRADO, J. L. A comparative evaluation between aluminium and titanium dioxide microparticles for blasting the surface titanium dental implants: an experimental study in rabbits. **Clinical Oral Implants Research**, v. 29, n. 7, p. 802–807, 2018.
56. GOMES, T. *et al.* Comprehensive multivariate correlations between climatic effect , capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. p. 1–16, 2019. GUTIÉRREZ, M. F. *et al.* Biological, mechanical and adhesive properties of universal dentin bonding agent containing zinc and copper nanoparticles. **Journal of Dentistry**, v. 82, n. January, p. 45–55, 2019.
57. HASS V, Luque-Martinez IV, Gutierrez MF, Moreira CG, Gotti VB, Feitosa VP, Koller G, Otuki MF, Loguercio AD, Reis A. Collagen cross-linkers on dentin bonding: stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. **Dent Mater** 2016;32:732–741.
58. HEMLATA; MEENA, P. R.; SINGH, A. P.; TEJAVATH, K. K. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Cucumis prophetarum Aqueous Leaf Extract and Their Antibacterial and Antiproliferative Activity against Cancer Cell Lines. **ACS Omega**, v. 5, n. 10, p. 5520–5528, 2020.
59. IMAZATO, S.; KOHNO, T.; TSUBOI, R.; THONGTHAI, P.; XU, H. H. K.; KITAGAWA, H. Cutting-edge filler technologies to release bio-active components for restorative and preventive dentistry. **Dental Materials Journal**, v. 39, n. 1, p. 69–79, 2020.
60. JAVAN BAKHT DALIR, S.; DJAHANIANI, H.; NABATI, F.; HEKMATI, M. Characterization and the evaluation of antimicrobial activities of silver nanoparticles biosynthesized from *Carya illinoensis* leaf extract. **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. e03624, 2020.
61. JOWKAR, Z.; FARPOUR, N.; KOOHPEIMA, F.; MOKHTARI, M. J.; SHAFIEI, F. Effect of silver nanoparticles, zinc oxide nanoparticles and titanium dioxide nanoparticles on microshear bond strength to enamel and dentin. **Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 19, n. 11, p. 1405–1412, 2018.
62. JOWKAR, Z.; SHAFIEI, F.; ASADMANESH, E.; KOOHPEIMA, F. Influence of silver nanoparticles on resin-dentin bond strength durability in a self-etch and an etch-and-rinse adhesive system. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 44, n. 2, p. 1–9, 2019.
63. JUN, S. K.; YANG, S. A.; KIM, Y. J.; EL-FIQI, A.; MANDAKHBAYAR, N.; KIM, D. S.; ROH, J.; SAURO, S.; KIM, H. W.; LEE, J. H.; LEE, H. H. Multi-functional nano-

adhesive releasing therapeutic ions for MMP-deactivation and remineralization. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

64. KESHARI, A. K.; SRIVASTAVA, R.; SINGH, P.; YADAV, V. B.; NATH, G. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 37–44, 2020.

65. KIM, J. I.; PANT, H. R.; SIM, H. J.; LEE, K. M.; KIM, C. S. Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 52–57, 2014.

66. LEE, J. H.; LIM, J. M.; VELMURUGAN, P.; PARK, YOOL JIN; PARK, YOUN JONG; BANG, K. S.; OH, B. T. Photobiologic-mediated fabrication of silver nanoparticles with antibacterial activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 93–99, 2016.

67. LEONEL, M. *et al.* Archives of Oral Biology Cytotoxic and antibacterial effect of a red propolis mouthwash , with or without fluoride , on the growth of a cariogenic biofilm. **Archives of Oral Biology**, v. 107, n. July, p. 104512, 2019.

68. LUCA, M. P. DE. Efeito de verniz de própolis em *Streptococcus mutans* e em modelo experimental de cárie. p. 72, 2015.

69. MAHROUS, A.; RADWAN, M.; KAMEL, S. Micro-Shear Bond Strength of Novel MDP Calcium-Fluoride–Releasing Self-Adhesive Resin Cement After Thermocycling. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 40, n. 3, p. 445–455, 2020.

70. MANTELLINI, M. G.; BOTERO, T. M.; YAMAN, P.; DENNISON, J. B.; HANKS, C.T.; NOR, J.E. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. **J. Dent. Res.**, v.82, n. 8, p. 592-596, 2003.

71. MARIA, B.; FONSECA, D. A.; EPIGALOCATEQUINA--GALATO, I. D. E.; MARIA, B.; FONSECA, D. A. Beatriz maria da fonseca. 2015.

72. MARTINA, I.; WIESINGER, R.; SCHREINER, M. Micro-Raman Characterisation of Silver Corrosion Products: Instrumental Set Up and Reference. **e-Preservation Science**, v. 9, p. 1–8, 2012.

73. MARTINS, M. L.; LEITE, K. L. DE F.; PACHECO-FILHO, E. F.; PEREIRA, A. F. DE M.; ROMANOS, M. T. V.; MAIA, L. C.; FONSECA-GONÇALVES, A.; PADILHA, W. W. N.; CAVALCANTI, Y. W. Efficacy of red propolis hydro-alcoholic extract in controlling *Streptococcus mutans* biofilm build-up and dental enamel demineralization. **Archives of Oral Biology**, v. 93, n. January, p. 56–65, 2018.

74. MARTINS, M. L.; MONTEIRO, A. S. N.; FERREIRA-FILHO, J. C. C.; VIEIRA, T. I.; GUIMARÃES, M. B. DE C. T.; FARAH, A.; ROMANOS, M. T. V.; MAIA, L. C.; CAVALCANTI, Y. W.; FONSECA-GONÇALVES, A. Antibacterial and cytotoxic potential of a brazilian red propolis. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clinica Integrada**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2019.
75. MATOS, A. B.; TREVELIN, L. T.; SILVA, B. T. F. DA; FRANCISCONI-DOS-RIOS, L. F.; SIRIANI, L. K.; CARDOSO, M. V. Bonding efficiency and durability: Current possibilities. **Brazilian Oral Research**, v. 31, p. 3–22, 2017.
76. MEI, M. L.; ITO, L.; CAO, Y.; LI, Q. L.; LO, E. C. M.; CHU, C. H. Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralisation and collagen degradation. **Journal of Dentistry**, v. 41, n. 9, p. 809–817, 2013.
77. MEI, M. L.; ITO, L.; CHU, C. H.; LO, E. C. M.; ZHANG, C. F. Prevention of dentine caries using silver diamine fluoride application followed by Er:YAG laser irradiation: an in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 6, p. 1785–1791, 2014.
78. MELO, M. A.; ORREGO, S.; WEIR, M. D.; XU, H. H. K.; AROLA, D. D. Designing Multiagent Dental Materials for Enhanced Resistance to Biofilm Damage at the Bonded Interface. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 18, p. 11779–11787, 2016.
79. MENDONÇA, I. C. G. DE; PORTO, I. C. C. DE M.; NASCIMENTO, T. G. DO; SOUZA, N. S. DE; OLIVEIRA, J. M. DOS S.; ARRUDA, R. E. DOS S.; MOUSINHO, K. C.; SANTOS, A. F. DOS; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D.; PAROLIA, A.; BARRETO, F. S. Brazilian red propolis: Phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015.
80. MENDONÇA, M. DE. Aplicação dos sistemas adesivos nos últimos cinco anos Aplicación de sistemas adesivos en los últimos cinco años. v. 6, p. 554–560, 2017.
81. MONTEIRO, D. R. Análise da incorporação de nanopartículas de prata a uma resina acrílica para base protética Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba-Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-UNESP, para obtenção. 2009.
82. MOON, A.; POWERS, J. M.; KIAT-AMNUAY, S. Color stability of denture teeth and acrylic base resin subjected daily to various consumer cleansers. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 26, n. 4, p. 247–255, 2014.
83. MOREIRA, D. M.; OEI, J.; RAWLS, H. R.; WAGNER, J.; CHU, L.; LI, Y.; ZHANG, W.; WHANG, K. A novel antimicrobial orthodontic band cement with in situ-generated silver nanoparticles. **Angle Orthodontist**, v. 85, n. 2, p. 175–183, 2015.

84. MPHIL. no title. **Diretriz de tratamento 2 da Pain Clinic Society**, n. May, p. 1–9, 2019.
85. NAIK, S. V.; TRIPATHI, A. P.; ATTIGUPPE, P.; SUGANDHAN, S.; DEEPAK, B. M. Nanotechnology in Dentin Disinfection: Can We Preserve the Bond? **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 12, n. 1, p. 42–46, 2019.
86. NAJAFI, K.; GANBAROV, K.; GHOLIZADEH, P.; TANOMAND, A.; REZAEI, M. A.; MAHMOOD, S. S.; ASGHARZADEH, M.; KAFIL, H. S. Oral cavity infection by *Enterococcus faecalis*. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 51–60, 2020.
87. NAKAJIMA, M.; KUNAWAROTE, S.; PRASANSUTTIPORN, T.; TAGAMI, J. Bonding to caries-affected dentin. **Japanese Dental Science Review**, v. 47, n. 2, p. 102–114, 2011.
88. NARCISO, A. M.; PAIM, B.; GONÇALVES DA ROSA, C.; PAES, J. V.; NUNES, M. R.; MASIERO, A. V. Green Synthesis of Silver Nanoparticles for Use in Dental Biomaterials. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde da UNIARP**, v. 9, n. 2, p. 64–73, 2019.
89. NASCIMENTO, T. G. DO *et al.* Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, 2016.
90. NASCIMENTO, T. S.; SILVA, I. S. M.; ALVES, M. C. M. A.; GOUVEIA, B. B.; BARBOSA, L. M. R.; MACEDO, T. J. S.; SANTOS, J. M. S.; MONTE, A. P. O.; MATOS, M. H. T.; PADILHA, F. F.; LIMA-VERDE, I. B. Effect of red propolis extract isolated or encapsulated in nanoparticles on the in vitro culture of sheep preantral follicle: Impacts on antrum formation, mitochondrial activity and glutathione levels. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 1, p. 31–38, 2019.
91. NAZERI, R.; GHAIOUR, M.; ABBASI, S. Evaluation of Antibacterial Effect of Propolis and Its Application in Mouthwash Production. **Frontiers in Dentistry**, p. 1–12, 2019.
92. NEDELJKOVIC, I.; TEUGHEL, W.; MUNCK, J. DE; MEERBEEK, B. VAN; LANDUYT, K. L. VAN. Is secondary caries with composites a material-based problem? **Dental Materials**, v. 31, n. 11, p. e247–e277, 2015.
93. NEKOOFAR, M. H.; MOTEVASSELIAN, F.; MIRZAEI, M.; YASSINI, E.; POUYANFAR, H.; DUMMER, P. M. H. The micro-shear bond strength of various resinous restorative materials to aged bioceramic. **Iranian Endodontic Journal**, v. 13, n. 3, p. 356–361, 2018.
94. NETO, M. S. R.; RELISON, S.; RAQUEL, A.; COSTA, S.; AUGUSTI, A.; MATIAS, E. F. F.; QUEIROZ, V. DE; MENEZES, I. R. A.; DOUGLAS, H.; COUTINHO, M. Seasonal variation of Brazilian red propolis : Antibacterial activity , synergistic effect

and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 572–580, 2017.

95. NEVES, M. V. M. DAS; SILVA, T. M. S. DA; OLIVEIRA LIMA, E. DE; CUNHA, E. V. L. DA; OLIVEIRA, E. DE J. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 159–166, 2016.

96. NEVES, T. DA C.; PRESOTO, C. D.; WAJNGARTEN, D.; CAMPOS, E. A. Micro-shear bond strength of dentin bonding agent with different degrees of acidity: Effect on sound and artificially hypermineralized dentin. **Microscopy Research and Technique**, v. 83, n. 4, p. 393–401, 2020.

97. NYVAD, B.; TAKAHASHI, N. Integrated hypothesis of dental caries and periodontal diseases. **Journal of Oral Microbiology**, v. 12, n. 1, 2020.

98. ODONTOLOGIA, F. D. E.; DOUTORADO, C. D. E. Pré-Hibridizada : Efeito Dos Métodos De Tratamento De Superfície E Da Temporização. p. 1–139, 2006.

99. OLIVEIRA, L. L.; QUEIROZ, E. DA C.; RABELO, Z. H.; LINHARES, N. P.; RODRIGUES, L. D.; RODRIGUES, M. M. M.; ESTELITA, M. C. A.; PASCOAL, S. C. D.; MENDES, T. A. D. Agentes de ligações cruzadas de origem natural e sua influência na longevidade da interface adesiva: Revisão de Literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p. 8029–8041, 2020.

100. OSORIO, R.; OSORIO, E.; AGUILERA, F. S.; MEDINA-CASTILLO, A. L.; TOLEDANO, M.; TOLEDANO-OSORIO, M. Silver improves collagen structure and stability at demineralized dentin: A dynamic-mechanical and Raman analysis. **Journal of Dentistry**, v. 79, n. October, p. 61–67, 2018.

101. PACHECO, L. F. Efetividade de antioxidantes sobre a dentina afetada por cárie na degradação da união com sistemas adesivos. 2014.

102. PALIN, W. M.; FLEMING, G. J. P.; BURKE, F. J. T.; MARQUIS, P. M.; RANDALL, R. C. Monomer conversion versus flexure strength of a novel dental composite. **Journal of Dentistry**, v. 31, n. 5, p. 341–351, 2003.

103. PARAVINA, R. D.; GHINEA, R.; HERRERA, L. J.; BONA, A. D.; IGIEL, C.; LINNINGER, M.; SAKAI, M.; TAKAHASHI, H.; TASHKANDI, E.; MAR PEREZ, M. DEL. Color difference thresholds in dentistry. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 27, n. S1, p. S1–S9, 2015.

104. PAULISTA, U. E. Síntese biogênica de nanopartículas de prata por fungos marinhos: seleção, otimização, caracterização, atividade antimicrobiana e potencial toxicidade em organismo aquático. 2019.

105. PAZINATTO, R. B. Influência do selamento imediato da dentina na resistência de união de diferentes sistemas adesivos junto a cimentações de restaurações indiretas. p. 0–89, 2010.
106. PORTO, I. C. C. M.; AGUIAR, F. H. B. DE; BRANDT, W. C.; LIPORONI, P. C. S. Mechanical and physical properties of silorane and methacrylate-based composites. **Journal of Dentistry**, v. 41, n. 8, p. 732–739, 2013.
107. PORTO, I. C. C. M.; NASCIMENTO, T. G.; OLIVEIRA, J. M. S.; FREITAS, P. H.; HAIMEUR, A.; FRANÇA, R. Use of polyphenols as a strategy to prevent bond degradation in the dentin–resin interface. **European Journal of Oral Sciences**, v. 126, n. 2, p. 146–158, 2018.
108. PORTO, I. C. C. M.; ROCHA, A. B. B.; FERREIRA, I. I. S.; DE BARROS, B. M.; ÁVILA, E. C.; DA SILVA, M. C.; *et al.* Polyphenols and Brazilian red propolis incorporated into a total-etching adhesive system help in maintaining bonding durability. **Heliyon**, v. 7, n. 2, e06237, 2021.
109. PORTO, I. C. C. M.; SOARES, L. E. S.; MARTIN, A. A.; CAVALLI, V.; LIPORONI, P. C. S. Influence of the photoinitiator system and light photoactivation units on the degree of conversion of dental composites. **Brazilian Oral Research**, v. 24, n. 4, p. 475–481, 2010.
110. RAHEEM, I. A. A.; RAZEK, A. A.; ELGENDY, A. A.; SALEH, N. M.; SHAABAN, M. I.; EL-HADY, F. K. A. Design, evaluation and antimicrobial activity of egyptian propolis-loaded nanoparticles: Intrinsic role as a novel and naturally based root canal nanosealer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 8379–8398, 2019.
111. RAJA, S.; RAMESH, V.; THIVAHARAN, V. Antibacterial and anticoagulant activity of silver nanoparticles synthesised from a novel source-pods of *Peltophorum pterocarpum*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 29, p. 257–264, 2015.
112. REGUEIRA-NETO, M. S.; TINTINO, R.; PEREIRA, R.; COSTA, S.; MORAIS, D. DE; BOLIGON, A.; MENEZES, I. R. A.; BALBINO, D. Q.; DOUGLAS, H.; COUTINHO, M. Comparative Analysis of the Antibacterial Activity and HPLC Phytochemical Screening of the Brazilian Red Propolis and the Resin of *Dalbergia ecastaphyllum*. 2019.
113. REIS, A. F.; CASSONI, A.; KIRIHATA, M.; SAPATA, A. DA S. P.; ATUÍ, R. A. F. L.; PEREIRA, P. N. R.; GIANNINI, M. Degradação das interfaces resina-dentina: uma revisão da literatura Introdução Revisão da literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 3, p. 191–199, 2006.

114. RIBEIRO, M. D. F.; PAZINATTO, F. B. Critérios clínicos para decisão entre substituição ou reparo de restaurações em resina composta – revisão de literatura. **Revistas**, v. 73, n. 3, p. 223, 2016.
115. RODRIGUES, M. C.; ROLIM, W. R.; VIANA, M. M.; SOUZA, T. R.; GONÇALVES, F.; TANAKA, C. J.; BUENO-SILVA, B.; SEABRA, A. B. Biogenic synthesis and antimicrobial activity of silica-coated silver nanoparticles for esthetic dental applications. **Journal of Dentistry**, v. 96, n. March, 2020.
116. ROLIM, W. R.; PELEGRINO, M. T.; ARAÚJO LIMA, B. DE; FERRAZ, L. S.; COSTA, F. N.; BERNARDES, J. S.; RODRIGUES, T.; BROCCCHI, M.; SEABRA, A. B. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. **Applied Surface Science**, v. 463, n. May 2018, p. 66–74, 2019.
117. SADEK, F. T.; EDUARDO, P.; CARDOSO, C. Influência de parâmetros metodológicos sobre o ensaio de microtração. Microscopia eletrônica de varredura e resistência de união. 2005.
118. SALLOUME, F.; BONAFÉ, S. UNESP - Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho ” Faculdade de Odontologia de Araraquara UNESP - Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho ” Faculdade de Odontologia de Araraquara. p. 1–73, 2014.
119. SANTOS, E. D. B.; MADALOSI, N. V.; SIGOLI, F. A.; MAZALI, I. O. Silver nanoparticles: Green synthesis, self-assembled nanostructures and their application as SERS substrates. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 2839–2846, 2015.
120. SFORCIN, J. M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 6, p. 894–905, 2016.
121. SHARIFI-RAD, M.; POHL, P. Synthesis of biogenic silver nanoparticles (Agcl-nps) using a pulicaria vulgaris gaertn. aerial part extract and their application as antibacterial, antifungal and antioxidant agents. **Nanomaterials**, v. 10, n. 4, p. 1–17, 2020.
122. SIQUEIRA, J. E.; LIMA, K. C. Staphylococcus epidermidis and staphylococcus xylosus in a secondary root canal infection with persistent symptoms: A case report. **Australian Endodontic Journal**, v. 28, n. 2, p. 61–63, 2002.
123. ŞIŞMANOĞLU, S.; GÜRCAN, A. T.; YILDIRIM-BILMEZ, Z.; TURUNÇ-OĞUZMAN, R.; GÜMÜŞTAŞ, B. Effect of surface treatments and universal adhesive application on the microshear bond strength of CAD/CAM materials. **Journal of Advanced Prosthodontics**, v. 12, n. 1, p. 22–32, 2020.

124. SKUPIEN, J. Influência Da Smear Layer Na Profundidade De Desmineralização E Na Espessura De Camada Híbrida Formada Por Sistemas Adesivos Atuais. **Tese de Mestrado**, 2010.
125. SOBRINHO, T. J. D. S. P.; SILVA, C. H. T. P. DA; NASCIMENTO, J. E. DO; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. DE; AMORIM, E. L. C. DE. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de Bauhinia cheilantha (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 683–689, 2008.
126. SOLOMON, S. D.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAM, A. V.; RUTKOWSKY, S. A.; BORITZ, C.; MULFINGER, L. Synthesis and study of silver nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322–325, 2007.
127. SÖTEBIER, C. A.; WEIDNER, S. M.; JAKUBOWSKI, N.; PANNE, U.; BETTMER, J. Separation and quantification of silver nanoparticles and silver ions using reversed phase high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in combination with isotope dilution analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1468, p. 102–108, 2016.
128. SOTO-ALVAREDO, J.; MONTES-BAYÓN, M.; BETTMER, J. Speciation of silver nanoparticles and silver(I) by reversed-phase liquid chromatography coupled to ICPMS. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 1316–1321, 2013.
129. SOUZA, P. H. DE; GODEIRO, S.; RABELO, F. Avaliação do grau de conversão de resinas compostas fotoativadas em diferentes tempos e potências. p. 219–223, 2016.
130. TAN, K. S.; CHEONG, K. Y. Advances of Ag, Cu, and Ag-Cu alloy nanoparticles synthesized via chemical reduction route. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 4, 2013.
131. TAYLOR, P.; KOO, H.; FALSETTA, M. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Effect of neovestitol – vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. n. October 2014, p. 37–41, 2013.
132. TEZVERGIL-MUTLUAY, A.; SESEOGULLARI-DIRIHAN, R.; FEITOSA, V. P.; TAY, F. R.; WATSON, T. F.; PASHLEY, D. H.; SAURO, S. Zoledronate and ion-releasing resins impair dentin collagen degradation. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 10, p. 999–1004, 2014.
133. THOMAS, R.; SNIGDHA, S.; BHAVITHA, K. B.; BABU, S.; AJITH, A.; RADHAKRISHNAN, E. K. Biofabricated silver nanoparticles incorporated polymethyl

methacrylate as a dental adhesive material with antibacterial and antibiofilm activity against *Streptococcus mutans*. **3 Biotech**, v. 8, n. 9, p. 1–10, 2018.

134. TICHY, A.; HOSAKA, K.; ABDOU, A.; NAKAJIMA, M.; TAGAMI, J. Degree of conversion contributes to dentin bonding durability of contemporary universal dentin bonding agent. **Operative Dentistry**, v. 45, n. 5, p. 556–566, 2020.

135. TOLEDANO, M.; AGUILERA, F. S.; CABELLO, I.; TOLEDANO-OSORIO, M.; OSORIO, E.; LÓPEZ-LÓPEZ, M. T.; GARCÍA-GODOY, F.; LYNCH, C. D.; OSORIO, R. Silver-loaded nanoparticles affect ex-vivo mechanical behavior and mineralization of dentin. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 24, n. 2, p. e156–e164, 2019.

136. VANNI, R.; WALDNER-TOMIC, M.; BELIBASAKIS, G. N. Antibacterial Efficacy of a Propolis Toothpaste and Mouthrinse Against a Supragingival Multispecies Biofilm. v. 13, n. 6, p. 531–535, 2015.

137. VASCONCELOS, W. A.; BRAGA, N. M. A.; CHITARRA, V. R.; SANTOS, V. R.; ANDRADE, Â. L.; DOMINGUES, R. Z. Bioactive Glass-Green and Red Propolis Association: Antimicrobial Activity Against Oral Pathogen Bacteria. **Natural Products Chemistry & Research**, v. 2, n. 6, 2014.

138. WANG, W.; YU, Z.; ALSAMMARRAIE, F. K.; KONG, F.; LIN, M.; MUSTAPHA, A. Properties and antimicrobial activity of polyvinyl alcohol-modified bacterial nanocellulose packaging films incorporated with silver nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 100, p. 105411, 2020.

139. ZANCANELA, D. C.; FUNARI, C. S.; HERCULANO, R. D.; MELLO, V. M.; RODRIGUES, C. M.; BORGES, F. A.; BARROS, N. R. DE; MARCOS, C. M.; ALMEIDA, A. M. F.; GUASTALDI, A. C. Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: Physical-chemistry and antimicrobial behaviours. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, n. November 2017, p. 576–582, 2019.

140. ZHANG, K.; CHENG, L.; IMAZATO, S.; ANTONUCCI, J. M.; LIN, N. J.; LIN-GIBSON, S.; BAI, Y.; XU, H. H. K. Effects of dual antibacterial agents MDPB and nano-silver in primer on microcosm biofilm, cytotoxicity and dentine bond properties. **Journal of Dentistry**, v. 41, n. 5, p. 464–474, 2013.

141. ZHANG, N. *et al.* Nanostructured Polymeric Materials with Protein-Repellent and Anti-Caries Properties for Dental Applications. **Nanomaterials**, v. 8, n. 6, p. 393, 2018.

142. ZHAO, I. S.; GAO, S. S.; HIRAISHI, N.; BURROW, M. F.; DUANGTHIP, D.; MEI, M. L.; LO, E. C. M.; CHU, C. H. Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review. **International Dental Journal**, v. 68, n. 2, p. 67–76, 2018.

143. ZHOU, W.; LIU, S.; ZHOU, X.; HANNIG, M.; RUPF, S.; FENG, J.; PENG, X.; CHENG, L. Modifying adhesive materials to improve the longevity of resinous restorations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 2019.
144. ZHU, C. *et al.* Processo de comunicação com os agricultores, adoção da filosofia da economia de suficiência. Em Chiang Mai. **Аҧаҧ**, v. 8, n. 2, p. 2019, 2019.
145. ТРУШКИН, Е. В.; СЕНЯВИНА, Н. В.; САХАРОВ, Д. А.; РУСАНОВ, А. Л.; МАРКС, У.; ТОНЕВИЦКИЙ, А. Г. Tecnologias modernas, testes in vitro de medicamentos in vitro: uso de microbiorreatores. **Biotechnology**, n. 1, p. 51–58, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)

"O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após o consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa"

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo **"EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOSINTETIZADAS COM PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS EM MATERIAL ODONTOLÓGICO"**, que será realizado na Clínica de odontologia da UFAL, Pela mestrand: Teresa de Lisleux Guedes Ferreira Lôbo, pesquisadora responsável pela pesquisa. A seguir, as informações do projeto de pesquisa com relação a sua participação neste projeto:

1. Que o estudo se destina a avaliar atuação de nanopartículas sintetizadas com material biológico, que tem efeitos benéficos comprovados, em um material restaurador, visando uma melhora na minha condição de saúde bucal.
2. Que a importância deste estudo é testar se a adição dessas substâncias em materiais odontológicos faz com que o dente fique mais saudável, de acordo com os efeitos dessa substância.
3. Que os resultados que se desejam alcançar são os de que as restaurações possam permanecer mais tempo na cavidade oral, sem presenças de infiltrações, pelo fortalecimento causado pelos materiais adicionados ao adesivo experimental, incluindo a atividade anti-degradante do dente, atividade antimicrobiana, e são eficazes contra bactérias cariogênicas, impedindo a evolução de cáries secundárias, causando assim longevidade do material adesivo. E uma maior efetividade antimicrobiana do material com uma alta taxa de penetração da medicação intracanal nos túbulos dentinários, a fim de reduzir o número de bactérias remanescentes após o preparo-químico-mecânico do canal radicular.
4. Que este estudo começará com a coleta dos dentes em 1 de Setembro de 2019 e terminará em 28 de fevereiro de 2020.
5. A pesquisadora garante que o início da coleta dos dados só será realizada após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa- CEP/UFAL.
6. O estudo será feito através de ensaio in vitro com o emprego de substâncias com efetiva ação antimicrobiana descrita pela literatura como medicações intracanal nos dentes doados.

7. Você participará do estudo doando seu dente, que foi indicado para extração pelo seu dentista. Que a decisão de qual (is) dente (s) será(ão) extraído (s) é de total responsabilidade do profissional que fez a indicação, ficando os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa completamente fora dessa decisão;

8. Que os possíveis riscos à sua saúde física e mental são de sentir-se constrangido com a presença da pesquisadora dentro do consultório quando for fazer a extração e ficar angustiado em relação ao que vai ser feito com o dente. Além disso, poderá sentir-se preocupado com a possibilidade de exposição de informações referentes a extração que realizou e com o risco de vir a sentir dor durante a realização e/ou após a extração do seu dente.

9. Que os pesquisadores adotarão as seguintes medidas para minimizar os riscos: esclarecer o sujeito da pesquisa que a pesquisadora também é dentista, e caso você continue constrangido, a pesquisadora se retirará da sala enquanto ocorre o procedimento. A abordagem do paciente será feita de modo a evitar quaisquer constrangimentos e todos os esforços possíveis serão feitos pela equipe de pesquisa para manter em sigilo a identidade do participante. Você será esclarecido, também, sobre todo o procedimento a ser realizado com seu dente. Os efeitos relativos à cirurgia para remoção do elemento dental não serão dependentes do estudo, uma vez que, esta já estará prevista e será um procedimento independente da pesquisa. Mesmo assim, objetivando evitar a possibilidade de ocorrência dos fatores indesejados, será feito um planejamento cuidadoso e empregado um anestésico tópico (pomada anestésica) para minimizar a sensibilidade à picada da agulha, além de utilizar uma substância anestésica eficiente, de modo a tornar o procedimento indolor. Você receberá uma receita médica com analgésicos, para usar se sentir dor após a realização do procedimento.

10. Que apesar de que a extração a que você será submetido seja realizada por um dentista da clínica de odontologia da UFAL e não pela pesquisadora, você terá garantida a assistência médica e odontológica por parte da pesquisadora Teresa de Lisleux Guedes Ferreira Lôbo, com telefone e endereço disponibilizado neste documento.

11. Você não terá benefício imediato, uma vez que a cirurgia para remoção do seu dente já estava planejada independente, portanto, da realização dessa pesquisa. Como benefício direto da pesquisa (após a intervenção), poderá se obter uma medicação intracanal com potente atividade antimicrobiana com possibilidade de uso no âmbito da saúde coletiva, e o provável benefício futuro que você poderá esperar com sua participação é, caso os resultados dessa pesquisa sejam favoráveis, poderá no futuro se beneficiar e beneficiar a comunidade. Como benefício indireto, os sujeitos da pesquisa estarão colaborando para o desenvolvimento de um nanomaterial para uso odontológico, com alguns princípios ativos, com propriedades comprovadas, em estudos anteriores, como antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório,

Imunomodulatório e cicatrizante, acessível à população de baixa renda. Uma vez que, comprovadamente, a própolis e as nanopartículas de prata tem ação anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante. O estudo não lhe trará efeitos nocivos, mas poderá contribuir com outros estudos e/ou com técnicas clínicas desenvolvidas futuramente ou com o desenvolvimento de novos produtos com nanopartículas a partir dos resultados desse estudo;

12. Você será informado(a) do resultado final do projeto e sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.

13. A qualquer momento, você poderá recusar a continuar participando do estudo e, também, que poderá retirar seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo.

14. As informações conseguidas através da sua participação não permitirão a identificação da sua pessoa, exceto para a equipe de pesquisa, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto após a sua autorização.

15. Você deverá ser ressarcido por qualquer despesa que venha a ter com a sua participação nesse estudo e, também, indenizado, na forma da lei, por todos os danos que venha a sofrer pela mesma razão, sendo que, para estas despesas lhe foi garantida a existência de recursos.

16. Você receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por todos.

*Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da UFAL, pelo telefone: (82) 3214-1041. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científico que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. Este papel está baseado nas diretrizes éticas brasileiras (Res. CNS 466/12 e complementares). De acordo com estas diretrizes: "toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à apreciação de um CEP". As atribuições do CEP são de papel consultivo e educativo, visando contribuir para a qualidade das pesquisas, bem como a valorização do pesquisador, que recebe o reconhecimento de que sua proposta é eticamente adequada. Para esclarecimentos de dúvidas e reclamações em relação à ética do projeto entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (CEP/UFAL), colegiado Interdisciplinar e Independente que defende os interesses dos participantes da pesquisa dentro de padrões éticos, de acordo com as disposições da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares".

Eu, _____, tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(ou, as) responsável(eis) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):
Instituição: Universidade Federal de Alagoas, Campus AC Simões,
Endereço: Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins,
Cidade/CEP: CEP: 57072-970, Maceió, Alagoas, Brasil.
Telefone: Telefone: 82 3214 6714

Contato de urgência: Sr(a). Teresa de Lisleux Guedes Ferreira Lôbo
Endereço: Avenida Don Antônio Brandão, n 384,
Complemento: Grand parc farol, bloco 2, apto 702
Cidade/CEP: Maceió/AL, 57051-190
Telefone: 82 9 9167-4244
E-mail: Teresalqfobo@gmail.com

ATENÇÃO: O Comitê de Ética da UFAL analisou e aprovou este projeto de pesquisa. Para obter mais informações a respeito deste projeto de pesquisa, informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:
Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas
Prédio do Centro de Interesse Comunitário (CIC), Térreo, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária
Telefone: 3214-1041 – **Horário de Atendimento:** das 8:00 as 12:00hs.
E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

Maceió, de de .

| | |
|--|---|
| | |
| Assinatura ou impressão dactiloscópica d(o,a) voluntár(o,a) ou responsável legal e rubricar as demais folhas | Nome e Assinatura do Pesquisador pelo estudo (Rubricar as demais páginas) |

APÊNDICE B – Prospecção tecnológica realizada neste trabalho

Foi realizado uma prospecção tecnológica sobre o tema abordado neste trabalho, no período entre 20 de julho de 2020 à 20 de agosto de 2020. A fim de se alcançar os objetivos propostos nesta pesquisa. Foram utilizadas as seguintes bases de dados, Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, Espacenet – Latipat, Patentscope, que são bases de dados online e gratuitas de buscas de patentes e pedidos de patentes em português e espanhol. Os descritores utilizados para esta busca foram traduzidos para o idioma da base de dados. Além dessas bases em português, foi realizada uma busca nas bases de dados da World Intellectual Property Organization (WIPO), European – Espacenet; The Lens; Patentscope; USPTO - United States Patent and Trademark Office; JPO – Japan Patent Office. A coleta de dados foi realizada utilizando os termos descritos na Tabela 8 para os descritores em português e Tabela 9 para os descritores em inglês, e as buscas foram facilitadas pela utilização da Classificação Internacional de Patentes – ICP (do inglês IPC - International Patentes Classification), sendo considerados os documentos de patentes que apresentassem esses termos da Tabela 8 e 9 ou títulos no resumo. Foram realizadas as leituras dos resumos encontrados com a finalidade proposta e, quando necessário, a patente na íntegra. Além disso as buscas avançadas foram separadas quando obtiveram duas ou mais palavras pelos operadores booleanos “AND” e “OR” e com ICP determinado em A61K, que se referem a produtos com finalidade médica e odontológica.

Para o desenvolvimento de uma prospecção tecnológica, os métodos devem ser divididos em: monitoramento, que acompanha a evolução e mudança da

tecnologia de forma contínua e sistemática; previsão, permitindo assim projetar novas tendências com base em informações anteriores; visibilidade, possibilitando assim a antecipação de novas tecnologias mediante o uso das informações adquiridas anteriormente por especialistas (CARUSO TIGRE, 2004).

Assim o mapeamento foi iniciado e analisado pelo número absoluto dos documentos de patentes em cada banco de dados de acordo com cada termo pesquisado. Podemos verificar na Tabela 11 os descritores em português e na Tabela 12 os descritores em inglês, que foram utilizados na pesquisa.

Tabela 11. Registros da pesquisa realizada para a prospecção tecnológica para os descritores em português.

| | ESPACENET - Latipat | INPI | WIPO - PATENTSCOPE |
|---|----------------------------|-------------|---------------------------|
| <i>“Adesivo dental” OR “nanopartículas de prata”</i> | 25 | 49 | 12 |
| <i>“Adesivo dental”</i> | 7 | 11 | 20 |
| <i>“Própolis vermelha”</i> | 22 | 194 | 14 |
| <i>“Própolis vermelha de Alagoas”</i> | 2 | 2 | 7 |
| <i>“Nanopartículas de prata”</i> | 18 | 46 | 12 |
| <i>“Adesivo dental” AND própolis”</i> | 0 | 0 | 0 |
| <i>“Adesivo dental” AND nanopartículas”</i> | 1 | 1 | 2 |
| <i>“Adesivo dental” AND “nanopartículas de prata”</i> | 0 | 0 | 0 |

Fonte: O autor (2021).

Os resultados contidos na Tabela 11 demonstram que o INPI, possui o maior número de depósito de patentes referentes aos termos pesquisados, com um total de 303 documentos, de acordo com esta pesquisa. Seguidos pela PATENTSCOPE e LATIPAT, com 175 e 67 respectivamente.

De acordo com o termo pesquisado “PRÓPOLIS VERMELHA”, o INPI obteve maiores resultados de patentes depositadas do que o ESPACENET ou PATENTSCOPE, isso se dá pela própolis vermelha ser um material abundante no

Brasil e especialmente na região nordeste do país, embora em outros países também podemos encontrar outros tipos de própolis verde, marrom, por isso o número alto de patentes e estudos com este material no INPI.

Analisando o mesmo termo pesquisado, na base de dados ESPACENET – LATIPAT, foi encontrado 22 depósitos de patentes com este descritor no título ou resumo. Dentre elas destacam-se a patente de número BR1020180036663 (A2), referindo-se a um colutório contendo própolis vermelha para combate de infecções da cavidade oral. A patente de número BR102017021229 (A2), referindo-se a um gel dermocosmético incorporado com própolis vermelha para tratamento da acne vulgar. A patente de número BR102017011097 (A2), referindo-se ao desenvolvimento de dentifrícios incorporados com própolis vermelha associado a outros compostos para controle de microrganismos orais, e prevenção de cárie dentária e gengivite.

Já para o termo “nanopartículas de prata”, a base de dados do ESPACENET – LATIPAT, obteve-se 17 depósitos. Na análise das patentes, destacam-se a patente de número: BR102016031050 (A2), referindo-se a uma composição contendo nanopartículas de prata biogênica utilizando óleo de copaíba com atividade antibacteriana. Essa composição utiliza-se da síntese biogênica ou síntese verde, adquirindo uma maior vantagem pelas características do óleo que estão aderidas na superfície destas nanopartículas, o que confere características diferenciadas. A patente de número BR102013013996 (A2), referindo-se a uma formulação antisséptica contendo nanopartículas de prata para uso odontológico, onde trata-se de uma composição com nanopartículas associadas ou não a compostos químicos, como potencial bactericida e ou bacteriostático, aplicado na odontologia (endodontia e/ou periodontia) no combate a diferentes tipos de bactérias que contaminam e que são causadoras das principais periapicopatias endodônticas, objetivando a

antisepsia do canal radicular. A patente de número BR102012027335 (A2), referindo-se a uma composição envolvendo nanopartículas de prata, quitosana e antibióticos com potencial antibacteriano combinado. A referida patente diz respeito à confecção de um material que possui atividade antibacteriana e potencial de aplicação no controle de bactérias Gram positivas e Gram negativas, resistentes ou que apresentem sensibilidade diminuída a antibióticos. A patente de número BR102017017454 (A2), refere-se a uma formulação para tratamento da candidíase orofaríngea contendo nanopartículas de prata obtidas através de extrato de *caesalpina férrea*, tratando-se de um fitoterápico nanoparticulado em gel para empresas de produtos odontológicos, com a finalidade de tratamento da candidíase oral.

Na análise do termo “Adesivo dental” com ICP A61K, obtivemos 7 resultados encontrados na base de dados do ESPACENET-Latipat, uma delas de número BRPI06036634(A) adesivo dental de um componente, contendo nanopartículas autocorrosivas, endurecidas pela luz, esta invenção demonstra um material adesivo que possui nanopartículas de dióxido de silício (SiO_2) com tamanho entre 5 a 100nm.

Os resultados contidos na Tabela 12 demonstram que o THE LENS, obteve os maiores resultados referente aos termos de busca utilizados nesta pesquisa, mesmo com classificação ICP para precisão dos resultados deste trabalho, isso se dá pelo fato do The Lens ser um recurso de pesquisa online, gratuito, fornecido pela Cambia, uma organização internacional independente sem fins lucrativos dedicada a democratização da inovação, permitindo a busca de mais de 10 milhões de documentos de patentes de texto completas, incluindo patentes e pedidos nos Estados Unidos, patentes e pedidos australianos, patentes Europeias e pedidos de tratado de Cooperação de patentes (PCT).

Tabela 12. Registros da pesquisa realizada para a prospecção tecnológica para os descritores em inglês.

| | ESPACENET - EUROPEAN | THE LENS | US PT O | JAPAN PATENTS | WIPO - PATENTSCOPE |
|---|-----------------------------|-----------------|----------------|----------------------|---------------------------|
| "dental adhesive" AND "silver nanoparticles" | 10 | 394 | 7 | 19 | 28 |
| "dental adhesive" <u>OR</u> "silver nanoparticles" | 1305 | 934.385 | 4967 | x | 1909 |
| "Dental adhesive" AND "green synthesis" | 1 274 | 1.863 | 1 | 0 | 0 |
| "Dental adhesive" | 3 065 | 81 | 966 | 140 | 2660 |
| "Silver nanoparticles" | 146 | 749 | 4008 | 1 | 1909 |
| "Red propolis" | 33 | 5 | 4 | 0 | 27 |
| "Dental adhesive" AND "nanoparticles" | 125 | 509 | 121 | 0 | 391 |
| "Green synthesis of silver nanoparticles" | 0 | 22 | 0 | 0 | 20 |
| "green synthesis of silver nanoparticles" AND "dental adhesive" | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| "Green synthesis" AND "silver nanoparticles" | 0 | 59 | 76 | 0 | 38 |

Fonte: O autor (2021).

Como demonstrado na Tabela 12 o somatório das patentes encontradas foi de 938.067, seguido da WIPO – World Intellectual Property Organization, em português OMPI – Organização Mundial da Propriedade Intelectual, isso se dá pelo fato de que a OMPI é uma entidade internacional de direito internacional público com sede na Suíça e integrante do sistema das nações unidas. A direção estratégica e as atividades da OMPI são definidas por seus Estados membro e atualmente são 192 estados associados ou seja 90% dos países do mundo, por isso a grande quantidade de patentes depositadas neste banco de dados. Na pesquisa como exemplificado na Tabela 12, demonstra que o somatório de patentes da WIPO para estes descritores totaliza 6982, seguidos pela USPTO, ESPACENET e JAPAN PATENTS.

Caracterizando a pesquisa do The Lens, com o descritor "*Dental adhesive*" AND "*silver nanoparticles*", na leitura e análise das patentes, observou-se um aumento

do interesse no tema no ano de 2017 com 7 depósitos de patentes diferentes relacionadas ao tema, como demonstrado na Figura 31.

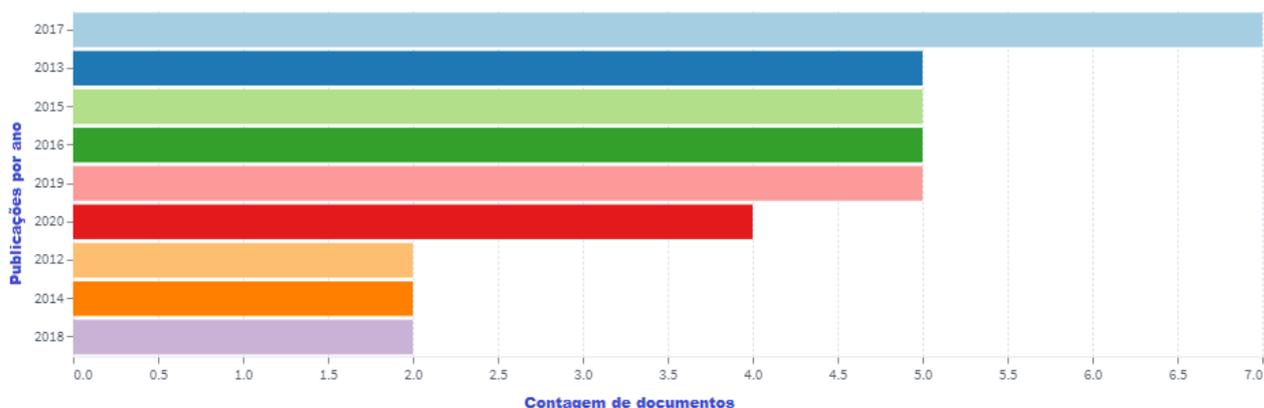


Figura31. Gráfico demonstrativo das publicações entre o ano de 2013 e 2020, referente ao tema “*Dental adhesive*” AND “*silver nanoparticles*”, na base de dados The Lens. Fonte: Adaptado de The Lens(2021).

Na pesquisa observou-se que não há registros de patentes relacionadas com os descritores: “Adesivos dentais” AND “Nanopartículas de prata”; em todas as bases de dados pesquisadas no Brasil. Já nos descritores em inglês “*DENTAL ADHESIVE*” AND “*SILVER NANOPARTICLES*” foram encontrados 8 arquivos envolvendo patentes depositadas fora do Brasil. Nos descritores ““green synthesis of silver nanoparticles” AND “dental adhesive”” que é onde obtemos o foco do nosso projeto não obtivemos nenhum arquivo com esses descritores, onde podemos concluir o ineditismo do trabalho, e que se trata de um produto inovador.

ANEXOS

ANEXO A – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



Continuação do Parecer 3.686.144

devidamente assinada e carimbada.

Relatoria atual: Pendência devidamente respondida.

p.8- FORMULÁRIO DE PESQUISA

- Incluir o formulário da pesquisa, uma vez que o que foi apresentado, foi o prontuário da Instituição sede da pesquisa; e neste não tem elementos que respondam aos seus objetivos de pesquisa.

Relatoria atual: Pendência devidamente respondida.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo Aprovado

Prezado (a) Pesquisador (a), lembre-se que, segundo a Res. CNS 466/12 e sua complementar 510/2016:

O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber cópia do TCLE, na íntegra, assinado e rubricado pelo (a) pesquisador (a) e pelo (a) participante, a não ser em estudo com autorização de declínio;

V.S.P. deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade por este CEP, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata;

O CEP deve ser imediatamente informado de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É responsabilidade do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas a evento adverso ocorrido e enviar notificação a este CEP e, em casos pertinentes, à ANVISA;

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial;

Seus relatórios parciais e final devem ser apresentados a este CEP, inicialmente após o prazo determinado no seu cronograma e ao término do estudo. A falta de envio de, pelo menos, o

Endereço: Av. Lourival Melo Neto, s/n - Campus A. C. Simões,
Bairro: Cidade Universitária CEP: 57.072-900
UF: AL Município: MACEIÓ
Telefone: (82)3214-1041 E-mail: comitedeticosufal@gmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS**



Continuação do Parecer: 3.686.144

relatório final da pesquisa implicará em não recebimento de um próximo protocolo de pesquisa de vossa autoria.

O cronograma previsto para a pesquisa será executado caso o projeto seja APROVADO pelo Sistema CEP/CONEP, conforme Carta Circular nº. 061/2012/CONEP/CNS/GBMS (Brasília-DF, 04 de maio de 2012).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|--|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PS_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1381708.pdf | 06/09/2019 14:53:06 | | Aceito |
| Outros | CARTARESPOSTACEP.docx | 06/09/2019 14:52:35 | Teresa de Lisleux Guedes Ferreira Lôbo | Aceito |
| Outros | declaraçãodecumprimento.jpg | 05/09/2019 20:56:38 | Teresa de Lisleux Guedes Ferreira Lôbo | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | declaraçãodearmazenamentodematerialbiológico.jpg | 05/09/2019 20:56:07 | Teresa de Lisleux Guedes Ferreira Lôbo | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | declaraçãodeconcordânciainfraestruturas.jpg | 05/09/2019 20:55:38 | Teresa de Lisleux Guedes Ferreira Lôbo | Aceito |
| TGLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TGLE.docx | 05/09/2019 20:54:50 | Teresa de Lisleux Guedes Ferreira Lôbo | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETOcep.docx | 05/09/2019 20:54:18 | Teresa de Lisleux Guedes Ferreira Lôbo | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaderosstocep.pdf | 05/09/2019 10:33:17 | Teresa de Lisleux Guedes Ferreira Lôbo | Aceito |
| Outros | prontuarioclinica.pdf | 30/07/2019 14:17:52 | Teresa Lôbo | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Lourival Melo Neto, s/n - Campus A. C. Simões,
Bairro: Cidade Universitária CEP: 57.072-900
UF: AL Município: MACEIÓ
Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeticuafal@gmail.com

ANEXO B – CADASTRO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO - SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A88DA2B

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A88DA2B**
 Usuário: **Isabel Cristina Celerino de Moraes**
 CPF/CNPJ: **277.732.994-04**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Impossibilidade de identificação

Título da Atividade: **Estudos de caracterização, avaliação de propriedades biológicas e aplicações da própolis vermelha brasileira em Odontologia**

Equipe

| | |
|---|--|
| Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto | Universidade Federal de Alagoas |
| Ticiano Gomes do Nascimento | Universidade Federal de Alagoas |
| Izabel Cristina Gomes de Mendonça | centro Universitário CESMAC |
| José Marcos dos Santos Oliveira | Universidade Federal de Alagoas |
| Lillian Maria Santos Silva | Universidade Federal de Alagoas |
| Dayse Chaves Cardoso de Almeida | Centro Universitário CESMAC |

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação