



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LILIAN MARIA SANTOS SILVA DE LIRA

**RESPOSTA DA POLPA DENTAL AO CAPEAMENTO DIRETO COM
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARREGADAS COM PRÓPOLIS
VERMELHA BRASILEIRA. Ensaio clínico randomizado triplo-cego**

Maceió
2019

LILIAN MARIA SANTOS SILVA DE LIRA

**RESPOSTA DA POLPA DENTAL AO CAPEAMENTO DIRETO COM
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARREGADAS COM PRÓPOLIS VERMELHA
BRASILEIRA. Ensaio clínico randomizado triplo-cego**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Isabel Cristina C de Moraes Porto

Maceió
2019

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

L768r Lira, Lilian Maria Santos Silva de.

Resposta da polpa dental ao capeamento direto com nanopartículas poliméricas carregadas com própolis vermelha brasileira : ensaio clínico randomizado triplo-cego / Lilian Maria Santos Silva de Lira. – 2019.
75 f. : il. color.

Orientadora: Isabel Cristina C de Moraes Porto.
Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 61-65.
Apêndices: f. 66-70.
Anexos: f. 71-75.

1. Própolis. 2. Nanopartículas. 3. Cárie dentária. 4. Capeamento da polpa dentária. I. Título.

CDU: 616.314-002

Dedico este trabalho aos pilares da minha vida:

Deus, meu respirar;

Enéas e Vânia, meus referenciais;

Natália e Emilie, minha alegria.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A todos os pacientes que participaram deste projeto, destinando tempo pessoal para atender às exigências de controle do ensaio clínico, obedecendo aos agendamentos de retorno e se comprometendo a realizar as cirurgias no dia pré-estabelecido, marcado muitas vezes, até com 60 dias de antecedência, compreendendo que isto se fazia necessário devido à complexidade da metodologia utilizada.

Agradeço também àqueles que não puderam participar por não se enquadrar nos rigorosos critérios desta pesquisa, mas carinhosamente se colocaram à disposição para contribuir com o avanço científico.

Minha sincera gratidão.

AGRADECIMENTOS

Aos familiares pelo incentivo e suporte, especialmente, meus pais, meu esposo, minha cunhada Erika e minha irmã Juliana que supriram minhas filhas com tanto amor nos momentos de minha ausência.

A minha querida orientadora, prof^a Isabel Porto, meu sincero agradecimento por sua cumplicidade diante das dificuldades encontradas na execução deste ensaio clínico. Tenho orgulho deste período de aprendizado que excedeu o campo científico. Posso assegurar que, como sua aluna, aprendi a valiosa lição de que é possível equilibrar exigência e generosidade.

A prof^a Camila Beder Panjwani, por sua fundamental participação na etapa de análise histomorfofisiológica da pesquisa e por suas palavras de encorajamento.

Ao prof^o Ticiano Gomes do Nascimento por sua disponibilidade e sua paciência diante das minhas dificuldades com a matemática. Obrigada professor!

Aos professores Ricardo Marinho, coordenador do curso de Odontologia da Faculdade de Tecnologia de Alagoas (FAT-AL), pela solidariedade e compreensão, entendendo minhas ausências, Luiz Arthur Barbosa da Silva, prof^o da disciplina de Histologia e Embriologia Oral pelo auxílio na leitura histológica e demais professores pela solidariedade.

A prefeitura de Satuba (AL), na pessoa de Diógenes José Neto de Amorim, Secretário Municipal de Saúde, pela sensibilidade e estímulo à pesquisa científica.

Aos agentes de saúde do município de Satuba (AL), por divulgar e acreditar no projeto. Não receio em afirmar que este se tornaria inviável, sem a solidez desta parceria. Gratidão especial a Cícera e Mônica, verdadeiras amigas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) pela oportunidade de ser apresentada a um novo universo de conhecimento.

Aos membros da Banca Examinadora, obrigada pela relevante contribuição à escrita desta monografia. Sinto-me honrada em tê-los como meus examinadores.

Aos professores responsáveis pelos laboratórios da UFAL: Laboratório de Análise Farmacêutica e Alimentícia (LAFA), Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamento (LabTCom), Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) e pelo Laboratório de Química do Instituto Federal de Alagoas (IFAL), por facilitarem o andamento das etapas pré-clínicas.

À indispensável colaboração de Marianna Brandão, Jennifer Freitas e Morgana Vital durante as etapas laboratoriais de obtenção de nanopartículas, análise física e ensaio de citotoxicidade dos materiais experimentais utilizados na pesquisa.

À direção e à coordenação da Faculdade de Odontologia da UFAL pelo espaço cedido na clínica da FOUFAL para a execução das etapas clínicas do ensaio e aos professores da graduação pela compreensão e apoio, em especial, profº Zenou Costa Filho e profº Amaro Carlos Junior.

Aos professores de cirurgia oral menor da Associação Brasileira de Odontologia de Alagoas (ABO-AL): Pedro Sales, Clarisse Andrade e Thalita Medeiros, e aos funcionários por nos receber tão bem durante a etapa cirúrgica.

À coordenadora do curso de Odontologia do Centro Universitário de Maceió (CESMAC), profª Roberta Penteado pela liberação do laboratório de Patologia Oral e, especialmente, à técnica de patologia Michele Tavares por sua conduta sempre ética e responsável.

Ao técnico de patologia e funcionários do Centro de Patologia de Maceió (CEPAMA), pelo importante auxílio na obtenção das lâminas histológicas.

A todos os meus amigos pelas palavras de carinho, em particular, minha amiga Josiane Pino que, literalmente pôs suas mãos nesta causa, realizando algumas das cirurgias da pesquisa e Isabelle Argolo, que garantiu o agendamento cirúrgico prévio dos pacientes, fundamental para o cumprimento dos tempos experimentais.

Aos colegas, sempre solícitos, que tive o prazer conhecer nesta jornada e aos amigos do grupo “mestrado dos chegados” que conquistaram meu profundo apreço.

Minha sincera gratidão a todos, que em algum momento ou de qualquer forma, contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

O agregado trióxido mineral (MTA) tem sido proposto como material de escolha para tratamento da polpa dentária exposta por trauma ou durante a remoção de tecido cariado, entretanto resultados controversos na literatura quanto a sua atividade antibacteriana e seu alto custo têm direcionado as pesquisas para a descoberta de novas alternativas. A própolis vermelha brasileira (PVB) tem demonstrado excelente atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e indutora de migração e proliferação celular. O propósito deste estudo clínico foi avaliar a resposta da polpa ao capeamento pulpar direto com nanopartículas poliméricas carregadas com PVB (NPP) em duas concentrações, 100µg e 50µg, e ao MTA acrescido de NPP, comparando com a resposta da polpa ao MTA convencional. Após a síntese, as NPP foram analisadas em espectroscopia infravermelha (FTIR). A citotoxicidade *in vitro* dos materiais utilizados no capeamento pulpar foi testada em macrófagos J774. A1. Para o ensaio clínico foram utilizados 60 terceiros molares hígidos divididos em quinze grupos (n=4) de acordo com o tratamento e o tempo experimental (15, 45 e 60 dias). Decorrido o período de intervenção, os dentes foram extraídos e processados para análise histológica. Foram observadas a resposta inflamatória da polpa, a formação de ponte de dentina e a presença ou ausência de bactérias. Para indicar significância estatística foi atribuído valor de $p < 0,05$. Não foram evidenciadas alterações nos espectros qualitativos de FTIR das NPP expostas à radiação UV e das misturas NPP e MTA. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação às respostas inflamatórias e organização do tecido pulpar, entretanto na análise destas variáveis foi observado um número maior de amostras com características de tecido normal nos grupos contendo própolis em quinze e 45 dias. Em relação à formação de tecido mineralizado, também não houve diferença significativa entre os materiais testados. Os agentes de capeamento pulpar direto utilizados no estudo foram biocompatíveis e induziram formação de tecido mineralizado semelhante ao controle.

Palavras-chave: própolis, nanopartículas, cárie dentária, capeamento da polpa dentária.

ABSTRACT

Mineral trioxide aggregate (MTA) has been suggested as gold standard material for direct pulp capping treatment by trauma or during the removal of carious tissue. However, its low antibacterial activity and high cost have led researchers to discover other alternatives. Brazilian red propolis (PVB) has demonstrated excellent antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory activities and cell migration and proliferation induction. The aim of this clinical study was to evaluate pulp response to direct pulp capping with polymeric nanoparticles loaded with PVP (NPP) at two concentrations, 100µg and 50µg, and to MTA plus NPP, compared to the pulp response to conventional MTA. After preparation, the NPP was analyzed in infrared spectroscopy (FTIR). The in vitro cytotoxicity of the materials used in pulp capping was tested in macrophages J774.A1. For the clinical trial, third sixty molars were divided into fifteen groups (n = 4) according to the treatment and the experimental time (15, 45 and 60 days). After the intervention period, the teeth were extracted and processed for histological analysis. The inflammatory response of the pulp, the formation of a dentin bridge and the presence or absence of bacteria were observed. Statistical significance was assigned a value of $p < 0.05$. There were no changes in the qualitative FTIR spectra of the NPPV exposed to UV radiation and the NPPV and MTA mixture. The direct pulp capping agents used in the study did not present cytotoxicity, which may be indicative of safety for clinical application. There was no significant difference between the experimental groups in relation to inflammatory responses and organization of the pulp tissue, however in the analysis of these variables a larger number of samples with characteristics of normal tissue was observed in the groups containing propolis in fifteen and 45 days. Regarding the formation of mineralized tissue, there was also no significant difference between the tested materials. The direct pulp capping agents used in the study were biocompatible and induced formation of mineralized tissue similar to the control.

Key words: propolis, nanoparticles, dental caries, dental pulp capping.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do órgão dentário.	17
Figura 2 - Camadas da Polpa Dentária.	21
Figura 3 - Fluxograma do processo de obtenção das nanopartículas.	34
Figura 4 - Dosagem, descontaminação e mascaramento dos materiais utilizados na pesquisa	38
Figura 5 - Escala Visual Analógica (EVA)	43
Figura 6 - Secção do terço radicular (A) e fixação da amostras (B).....	44
Figura 7 - Manipulação (A) e presa (B) dos materiais experimentais e controle	46
Figura 8 - Capeamento pulpar direto em dentes humanos.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição dos tecidos dentários.....	19
Quadro 2 - Mecanismos de defesa do complexo dentino-pulpar.	23
Quadro 3 - Grupos experimentais e controles nos tempos de preservação.....	39
Quadro 4 - Critérios de avaliação bacteriana.	45
Quadro 5 - Critérios de avaliação histomorfofisiológica.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação da resposta inflamatória	54
Tabela 2 - Avaliação da organização do tecido pulpar	55
Tabela 3 - Avaliação da presença de tecido mineralizado.	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Espectros de extrato bruto de própolis vermelha (A) e de nanopartículas carregadas com própolis vermelha (B).....	47
Gráfico 2 - Espectros FTIR de extrato bruto de própolis vermelha (A) e nanopartículas carregadas com própolis vermelha (B) antes e após a exposição à radiação UV.....	48
Gráfico 3 - Espectros de FTIR em antes (A) e após (B) manipulação dos agentes capeadores com água destilada.....	49
Gráfico 4 - Viabilidade celular por MTT de macrófagos J774,A1 expressa em porcentagem de sobrevivência celular após exposição aos extratos de EB, NP, MTA,NPP, MTA+NPP por 6h.	504
Gráfico 5 - Viabilidade celular por MTT de macrófagos J774, A1 expressa em porcentagem de sobrevivência celular após exposição aos extratos de EB, NP, MTA, NPP, MTA+NPP por 12h.	515
Gráfico 6 - Viabilidade celular por MTT de macrófagos J774, A1 expressa em porcentagem de sobrevivência celular após exposição aos extratos de EBP, NP, MTA, NPP, MTA+NPP por 24h.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATR	Refletância Total Atenuada (em inglês: <i>Attenuated Total Reflectance</i>)
CO ₂	Dióxido de carbono
CIV	Cimento de ionômero de vidro
CP	Controle positivo
CN	Controle negativo
D1A	Dissolução 1A
D1B	Dissolução 1B
DMSO	Dimetilsulfóxido
EBP	Extrato Bioativo de Própolis Vermelha
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier (em inglês: <i>Fourier Transform Infrared</i>)
HE	Hematoxilina-eosina
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% o crescimento
IFAL	Instituto de Federal de Alagoas
SFB	Soro Fetal Bovino
MTA	Agregado trióxido mineral (em inglês: <i>Mineral trioxide aggregate</i>)
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
NP	Nanopartícula pura
NPP	Nanopartícula carregada com própolis vermelha
NPP (50)	Porção de nanopartículas contendo 50µg de própolis vermelha
NPP (100)	Porção de nanopartículas contendo 100µg de própolis vermelha
PCL	Poli-ε-caprolactona
PEO-PPO-PEO	Polioxietileno-Polioxipropileno-Polioxietileno
pH	Potencial hidrogeniônico
PVB	Própolis vermelha brasileira
PVC	Policloreto de vinila
SPSS	<i>Statistical package for the social sciences</i>
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UV	Espectroscopia Ultravioleta
UFAL	Universidade Federal de Alagoas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1.	Complexo Dentino-Pulpar	18
2.2.	Mecanismos de Defesa do Complexo Dentino-Pulpar	21
2.3.	Terapias Pulpares Conservadoras	24
2.3.1.	Agentes de capeamento pulpar	26
2.4.	Própolis	27
2.4.1	. Estado da arte da própolis em odontologia	29
2.5.	Nanotecnologia	30
3	OBJETIVOS	31
3.1.	Objetivo Geral	31
3.2.	Objetivos Específicos	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1.	Materiais	32
4.2.	Implicações Éticas	32
4.3.	Obtenção de Nanopartículas Poliméricas Carregadas com Própolis Vermelha de Alagoas	33
4.4.	Descontaminação em radiação ultravioleta (UV)	34
4.5.	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	35
4.6.	Ensaio de citotoxicidade celular por MTT	35
4.7.	Obtenção das doses individuais dos agentes experimentais para capeamento pulpar direto	37
4.8.	Ensaio Clínico	37
4.9.	Análise Histológica	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1.	Análise qualitativa dos espectros de FTIR	47
5.2.	Ensaio de citotoxicidade por MTT	49
5.3.	Ensaio Clínico	52
5.4.	Avaliação Histológica	523
6	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICES	66
	ANEXOS	71

1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença crônica multifatorial que, se não controlada, evolui até a completa destruição dentária por sucessivas perdas minerais que ocorrem em função de um ambiente bucal ácido. A acidificação do meio oral é consequência da fermentação de carboidratos, como fonte energética, por bactérias cariogênicas. Recentes achados arqueológicos afirmam que sua existência é ainda anterior ao que se tinha conhecimento, datando de aproximadamente 15000 a.C. (HUMPHREY *et. al*, 2014). E no início do século XIX, em decorrência da expansão do consumo e comercialização do açúcar, torna-se epidêmica (OLIVEIRA; MORAIS; GOES, 2014).

Estudos epidemiológicos vêm registrando uma redução significativa da cárie, especialmente nos países com programas de prevenção em Saúde Pública que favorecem maior acesso a fluoretos; seja por métodos coletivos através da fluoretação das águas de abastecimento, por exemplo; seja por meios individuais como o uso de dentifrícios fluoretados (BURT; BAELUM; FEJERSKOV, 2011).

Acompanhando esta tendência de declínio, dados da última pesquisa nacional mostraram uma redução de 26,2% no índice da doença, posicionando o Brasil entre os países com baixa prevalência de cárie¹ (AGNELLI, 2015). Entretanto marcantes desigualdades regionais foram observadas no perfil epidemiológico brasileiro. Comparando os valores extremos, entre Norte (CPO aos 12 anos =3,16) e Sudeste (CPO aos 12 anos =1,72) essa diferença alcança 84%. O nordeste, embora tenha registrado um baixo índice, obteve o menor percentual de dentes restaurados e uma das maiores porcentagens de dentes perdidos do país (BRASIL, 2012).

As desigualdades no padrão de distribuição da cárie, fenômeno igualmente evidenciado em outros países (KASSEBAUM *et. al*, 2015), sinaliza para uma tendência de polarização, em que há maior prevalência e gravidade da doença em uma minoria da população que se encontra à margem da sociedade (GIMÊNEZ *et. al*, 2016; RAMADAN, KOLTERMANN, PIOVISAN, 2014). O caráter progressivo da doença associado à dificuldade de acesso ao tratamento inicial resulta, frequentemente, em perdas dentárias no extrato da população que depende da

¹ O índice de cárie CPO-D aos 12 anos, preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) desde 1997, avalia a condição dentária pela soma dos dentes (D) cariados (C), perdidos (P) e obturados /restaurados (O) e classifica como baixa prevalência a média CPO entre 1,2 e 2,6 (BRASIL, 2012).

atenção básica de saúde, visto que, tratamentos mais complexos que poderiam evitar esta perda são também mais onerosos.

Diante do exposto, a cárie ainda é considerada um problema de saúde de grande magnitude que afeta bilhões de pessoas e milhares de crianças em todo o mundo, (KASSEBAUM *et al*, 2015) representando a principal causa de agressões ao complexo dentino-pulpar (SIQUEIRA JR; ROÇAS; LOPES, 2013).

Considerando a natureza conjuntiva da polpa e sua capacidade de responder a danos teciduais, as técnicas minimamente invasivas têm sido recomendadas com o intuito de recuperar a integridade do tecido lesionado, seja por traumatismo dentário ou durante a remoção de uma lesão profunda de cárie (STRINGHINI JUNIOR *et. al*, 2014).

O objetivo do tratamento diante de uma exposição pulpar é favorecer a reorganização deste tecido, a diferenciação celular e a reparação da dentina perdida com a formação de uma barreira dentinária e, conseqüentemente, manter a vitalidade e funções normais. A técnica de eleição para esta finalidade é o capeamento pulpar direto que consiste na deposição do fármaco diretamente sobre o tecido exposto e selamento da cavidade com material restaurador provisório por um período compreendido entre 40 a 60 dias (CARVALHO *et. al*, 2012).

Atualmente o agregado trióxido mineral (MTA) tem sido proposto como agente capeador de excelência devido aos sólidos resultados clínicos decorrentes de suas propriedades biológicas, tais como: biocompatibilidade, capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado, pH elevado, ser hidrofílico e ter ação anti-inflamatória. No entanto, a reduzida atividade antimicrobiana e o custo elevado têm impulsionado pesquisas com o objetivo de minimizar estas desvantagens (BITTAR, 2010; SIQUEIRA *et. al*, 2017; SHEN *et. al*, 2018).

A importância de constantemente se pesquisar alternativas que melhorem as propriedades dos fármacos disponíveis originou o questionamento da contribuição da própolis vermelha brasileira (PVB) como agente de proteção pulpar tendo em vista suas excelentes propriedades biológicas já evidenciadas, tais como, antioxidante (MENDONÇA *et. al*, 2015), anti-inflamatória (ZAFALON, 2012), antimicrobiana (SIQUEIRA *et. al*, 2014) e indutora de migração e proliferação celular (ALMEIDA *et. al*, 2013; JACOB *et. al*, 2015). A hipótese desse estudo é que o uso da PVB como agente de capeamento pulpar direto reduz o processo inflamatório e promove a formação de dentina reparadora.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O sistema estomatognático é constituído por diversas estruturas anatómicas dentre elas, dentes, ossos, articulações, glândulas salivares, músculos, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, que se organizam para desempenhar as funções de sucção, deglutição, respiração, fonação e mastigação. Essenciais para o desempenho da atividade mastigatória, os dentes são órgãos mineralizados que atuam nas ações de cortar, furar e triturar os alimentos. Estão também associados a funções secundárias como fonação, oclusão, estética, sustentação e proteção dos tecidos moles (NANCI, 2013; REHER; REHER, 2008).

A estrutura dentária é histologicamente dividida de acordo com os diferentes tecidos que a compõem: esmalte, dentina e polpa dentária. Anatomicamente uma linha cervical separa o dente em coroa, porção visível na cavidade oral recoberta por esmalte; e raiz, porção implantada nos ossos alveolares recoberta por cimento (REHER; REHER, 2008). Fibras do ligamento periodontal articulam cimento ao osso alveolar permitindo a flexibilidade necessária para resistir às forças mastigatórias sem comprometer a inserção dentária (Fig. 1A)(NANCI, 2013; MOLERI; MOREIRA; RABELLO, 2013).

Figura 1 - Representação esquemática do órgão dentário.

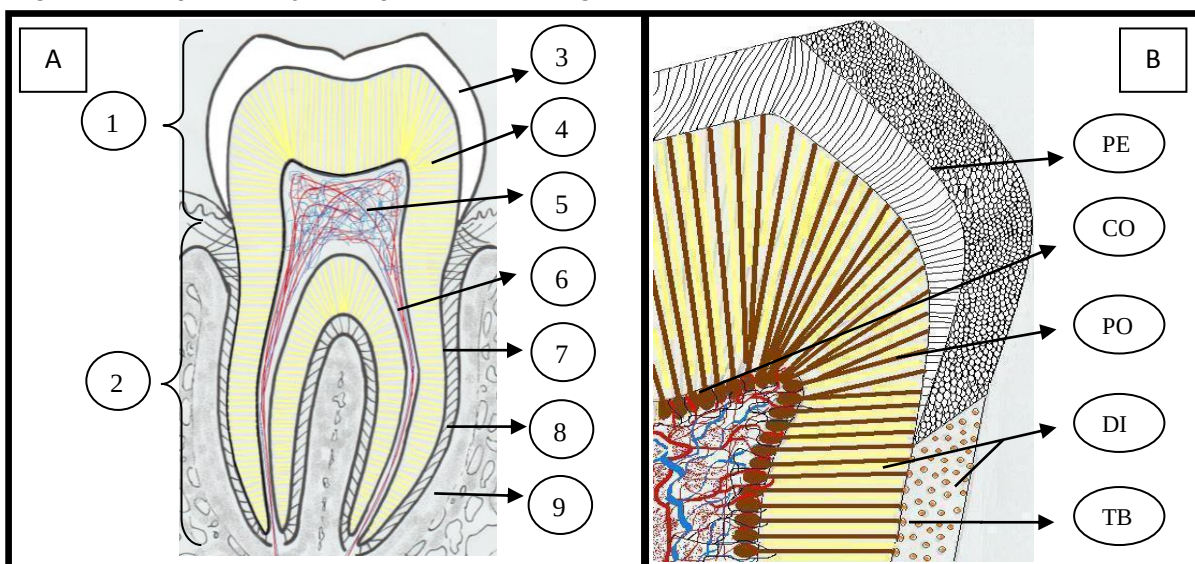


Figura 1A - Divisão anatômica: 1 - Coroa; 2 - Raiz; Divisão histoestrutural: 3 - Esmalte dentário; 4 - Dentina; 5 - Polpa coronária; 6 - Polpa radicular; 7 - Cimento; 8 - Ligamento periodontal; 9 - Osso alveolar; Figura 1B - Ilustração da relação Dentino-Pulpar: PE - Prismas do esmalte; CO - Camada odontoblástica; PO - Prolongamento odontoblástico; DI - Dentina intertubular; TB - Túbulo dentinário. Fonte: Autor

O esmalte dentário é o único “tecido” acelular e avascular do corpo. Isto ocorre porque as células periféricas e produtoras de esmalte, os ameloblastos, perdem-se durante a fase eruptiva, tornando-o não vital e incapaz de se regenerar (BATH-BALOGH; FEHERENBACH, 2012).

Representa a estrutura mais mineralizada do organismo, sendo composto de 96%, em peso, de matéria inorgânica organizada em estruturas cristalinas compostas por hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e traços de minerais, 1% de matéria orgânica e 3% de água (Quadro 1). Os cristais são orientados e acondicionados em forma de bastão ou prisma que se entrelaçam e conferem alta resistência ao desgaste. Entretanto, este tecido é incapaz de resistir ao esforço elástico necessitando de uma camada de suporte subjacente capaz de aumentar sua resiliência (BATH-BALOGH; FEHERENBACH, 2012; FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2013; NANJI, 2013).

Admite-se que o tecido dentinário adjacente atue amortecendo o impacto mastigatório, evitando a fratura de esmalte, devido a menor dureza da dentina conferida pelo seu arranjo de cerca de 20% de material orgânico, 10% de água e 70% de minerais (Quadro 1) (NANJI, 2013). Além disso, a dentina reforça internamente toda a estrutura dentária oferecendo uma cobertura para o tecido conjuntivo subjacente, delimitando a câmara pulpar e os canais radiculares que alojam a polpa coronária e radicular, respectivamente (BATH-BALOGH; FEHERENBACH, 2012; KATCHBURIAN; ARANA, 2017).

A dentina apresenta uma estrutura tubular que se estende por toda sua extensão, delimitada por dentina peritubular, altamente mineralizada, e entremeada por dentina intertubular. (Fig. 1B) (MOLERI; MOREIRA; RABELLO, 2013; HARGREAVES; BERMAN, 2017; NANJI, 2013).

2.1. Complexo Dentino-Pulpar

Polpa e dentina têm a mesma origem embrionária. Ambas resultam do desenvolvimento da papila dentária, tecido ectomesenquimático originado a partir da migração das células da crista neural, por volta da quarta semana de desenvolvimento intrauterino. Estes tecidos formam uma unidade biológica denominada de complexo dentino-pulpar devido à íntima relação que apresentam

(NANCI, 2013; MOLERI; MOREIRA; RABELLO; 2013; KATCHBURIAN; ARANA, 2017; HARGREAVES; BERMAN, 2017).

Os odontoblastos são as células responsáveis por esta conexão funcional. Enquanto seus corpos celulares delimitam perifericamente o tecido pulpar, seus prolongamentos citoplasmáticos estendem-se para o interior dos túbulos dentinários, além de serem as células responsáveis por produzir dentina. Isto explica a interdependência entre os dois tecidos, pois não existiria dentina sem a atividade odontoblástica, em contrapartida, não haveria integridade pulpar sem a proteção assegurada pelo arcabouço mineralizado (HARGREAVES; BERMAN, 2017).

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo diferenciado, composto principalmente por água (75%) e matéria orgânica (25%), constituída por células e matriz extracelular (Quadro 1). Sua estrutura conjuntiva, bem vascularizada e inervada, é responsável pelas atividades metabólicas que mantém a vitalidade do órgão dentário (FERRARIS; MUÑOZ, 2006).

Quadro 1 - Composição dos tecidos dentários.

Composição	Esmalte	Dentina	Polpa
Inorgânica	96% Cristais grandes de hidroxiapatita e traços de minerais ²	70% Pequenos cristais de hidroxiapatita e traços de carbonato e fluoreto	-
Orgânico	1% Proteínas e lipídeos	20% Principalmente colágeno tipo I e proteínas não colagenosas	25% Células e matriz extracelular
Água	3%	10%	75%

Fonte: Autor.

Histologicamente pode ser dividida em quatro zonas: camada odontoblástica, camada acelular de Weil, camada rica em células e região central (Fig. 2) (MOLERI; MOREIRA; RABELLO; 2013; NANCI, 2013).

² Carbonato, fluoreto, magnésio, potássio e sódio também podem estar presentes no esmalte, porém em menor quantidade (BATH-BALOGH; FEHERENBACH, 2012).

A camada odontoblástica reveste toda extensão pulpar. É composta pelos odontoblastos que se encontram dispostos em paliçada, imediatamente abaixo da pré-dentina³, fortemente unidos por mecanismos de junção celular e sustentados por uma rede de fibras reticulares, formadas por colágeno tipo IV, a rede de von Korff, (FERRARIS; MUÑOZ, 2006). Entre seus corpos celulares podem ser encontrados capilares, fibras nervosas⁴ e células dendríticas, estas responsáveis pela vigilância imunológica. Os prolongamentos citoplasmáticos das células dendríticas e as fibras nervosas podem acompanhar os processos odontoblásticos que se projetam para o interior da dentina (NANCI, 2013; HARGREAVES; BERMAN, 2017).

A camada acelular de Weil, embora seja assim denominada, apresenta alguns fibroblastos e células dendríticas, porém em menor densidade que a camada rica em células. É neste estrato que ocorre grande ramificação dos capilares formando os plexos sub-odontoblásticos sanguíneo e nervoso que se dirigem para a camada acima para nutrir e inervar os odontoblastos.

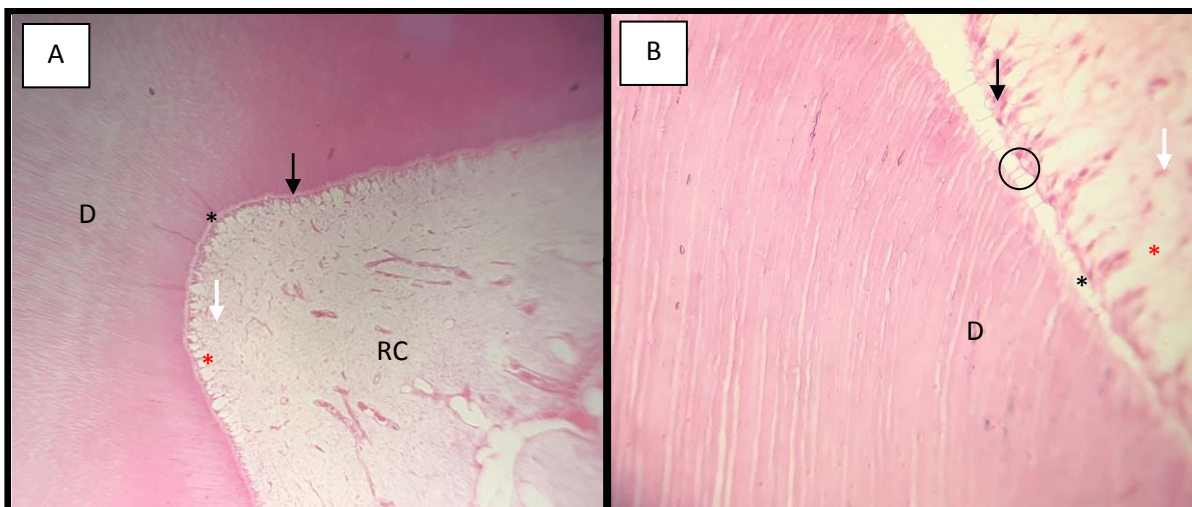
Já a camada rica em células é constituída principalmente por fibroblastos, células responsáveis pela formação e regulação da matriz extracelular, estes também emitem prolongamentos que se dirigem tanto para a camada acelular quanto para a região central. Podem também estar presentes neste estrato, células ectomesenquimais indiferenciadas, embora sejam mais numerosas na região central da polpa (NANCI, 2013; KATCHBURIAN; ARANA, 2017).

O tecido conjuntivo propriamente dito é constituído principalmente por fibroblastos, células mais abundantes da região central; células ectomesenquimais indiferenciadas, que funcionam como células de reserva e podem se diferenciar em novos odontoblastos ou fibroblastos a depender do estímulo gerado. Estão presentes também as células responsáveis pela resposta imunológica primária, as células dendríticas; e secundária, desempenhada por macrófagos e linfócitos T. Em processos inflamatórios, são evidenciados também plasmócitos, mastócitos e, eosinófilos (MOLERI; MOREIRA; RABELLO, 2013; KATCHBURIAN; ARANA, 2017).

³ Matriz orgânica não mineralizada, com espessura entre 20 a 30 μ , localizada imediatamente acima da camada odontoblástica. Esta matriz, à medida que se calcifica, configura-se em dentina secundária e nova pré-dentina é secretada pelos odontoblastos, sendo renovada por toda a vida. (BATH-BALOGH; FEHERENBACH, 2012).

⁴ Fibras aferentes sensitivas provenientes do nervo trigêmeo, quinto par craniano, que penetram na polpa pelo forame apical e atravessa a extensão pulpar para alcançar a camada sub-odontoblástica e ramificar dando origem ao Plexo nervoso de Raschkow – rede de fibras mielínicas do tipo A responsável pela resposta aguda e pulsátil característica da dor dentinária (MORELI; MOREIRA; RABELLO, 2013).

Figura 2 - Camadas da Polpa Dentária.



Aspecto microscópico do complexo dentino-pulpar, evidenciando Dentina (D); Pré-dentina (*); Prolongamento odontoblástico (O); Camada odontoblástica (setas pretas) Zona pobre em células (*), Zona rica em células (setas brancas) e Região central (RC). HE, 100X (A), 400X (B). Fonte: Autor.

O conteúdo celular da polpa está imerso em matriz extracelular composta por fibras e substância fundamental. O elemento fibroso mais abundante é o colágeno, especialmente o tipo I (60%). Já a substância fundamental é constituída por proteoglicanas e água (KATCHBURIAN; ARANA, 2017).

Vasos sanguíneos e linfáticos chegam à polpa pelo forame apical, acompanhando a dupla inervação pulpar, autônoma e sensitiva. As fibras autônomas são amielínicas do tipo C e controlam o calibre arteriolar. As fibras sensitivas são mielínicas do tipo A e respondem com dor aguda e localizada a estímulos hidrodinâmicos, osmóticos, táteis e térmicos (BATH-BALOGH; FEHERENBACH, 2012).

Através do suprimento sanguíneo e nervoso, a polpa exerce a função de nutrição e sensibilidade; e através de mecanismos celulares promove proteção e regeneração tecidual (NANCI, 2013).

2.2. Mecanismos de Defesa do Complexo Dentino-Pulpar

Para compreender como estímulos externos podem vencer as barreiras mineralizadas e alcançar o tecido pulpar, é preciso revisitar dois conceitos: 1) o esmalte, apesar de acelular, avascular e de seu elevado conteúdo mineral, apresenta água e material orgânico entre suas estruturas prismáticas possibilitando

trocas iônicas entre este tecido e o meio. Portanto o esmalte dentário pode ser considerado “um sólido microporoso compostos de cristais densamente compactados” (p.21) (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2013); 2) a dentina é um tecido mineralizado caracteristicamente permeável pela presença dos túbulos dentinários, estruturas cilíndricas que atravessam toda sua extensão (NANCI, 2013).

Apesar de muito discutido, acredita-se que a presença dos prolongamentos odontoblásticos e o preenchimento por fluido dentinário no interior dos túbulos são elementos essenciais para o mecanismo de sensibilidade do complexo dentina-polpa. A teoria hidrodinâmica de Bränströmm, no momento a mais aceita, propõe que movimentações do líquido em decorrência de alterações da pressão intravascular e tissular sensibilizem o plexo nervoso sub-odontoblástico, gerando a sensação dolorosa (FERRARIS; MUÑOZ, 2006). Dessa forma, é possível que embora confinada entre paredes mineralizadas, a polpa exerça sua função sensorial e responda a estímulos externos gerados sobre ela (MOLERI; MOREIRA; RABELLO, 2013; HARGREAVES; BERMAN, 2017; NANCI, 2013; LUKKO; KETTUNEN; FRISTAD; BERGGREEN; 2011).

Os mecanismos de defesa são proporcionais à natureza ou intensidade dos estímulos capazes de sensibilizar o tecido pulpar e a depender do impacto gerado, eles podem ser considerados fisiológicos ou nocivos (Quadro 2) (MOLERI; MOREIRA; RABELLO, 2013).

Em resposta a estímulos fisiológicos, os odontoblastos produzem dentina secundária por toda a vida após o fechamento do ápice radicular. Esta dentina é centrípeta e diminui progressivamente o diâmetro da câmara pulpar sem alterar sua configuração morfológica. Assemelha-se à dentina primária depositada durante o desenvolvimento dentário (MOLERI; MOREIRA; RABELLO, 2013).

Diante de estímulos nocivos, os odontoblastos respondem com a produção de dentina terciária, seja reacional ou reparadora (NANCI, 2013). Ocorrendo um estímulo persistente de baixa intensidade, a primeira estratégia defensiva é a esclerose tubular. Esta ocorre pela deposição de minerais, que obliteram gradativamente os túbulos dentinários na tentativa de impedir o progresso do agente agressor em direção à polpa. A dentina esclerosada pode ocorrer fisiologicamente em decorrência da idade, tornando-a menos permeável com o envelhecimento. Caracteriza-se como uma lesão crônica de aparência negra, lisa e brilhante (MOLERI; MOREIRA; RABELLO, 2013).

Se o estímulo for mais agressivo, pode haver retração dos prolongamentos odontoblásticos causando desvitalização celular dentro túbulo, que passa a ser definido como tratos mortos (MOLERI; MOREIRA; RABELLO, 2013).

Porém, quando um estímulo localizado atinge diretamente os odontoblastos, estes respondem produzindo dentina terciária reacional na tentativa de formar uma barreira entre o agressor e a polpa, logo que a desmineralização inicial da dentina acontece, sem necessariamente haver cavitação em esmalte (CARVALHO *et. al*, 2012). Esta deposição pontual modifica a morfologia da câmara pulpar e difere da dentina secundária por ser menos mineralizada e apresentar túbulos irregulares (NANCI, 2013).

Quadro 2 - Mecanismos de defesa do complexo dentino-pulpar.

Dentina	Mecanismo	Características
Dentina secundária	Fisiológico	Produzida lentamente pelos odontoblastos em resposta a estímulos fisiológicos de baixa intensidade por toda a vida, após o fechamento do forame apical. Menos mineralizada que a dentina primária ou de desenvolvimento e com presença de túbulos regulares
Dentina esclerosada	Reacionário	Obstrução parcial ou total dos túbulos dentinários por conteúdo mineral em resposta ao envelhecimento ou a estímulos patológicos persistentes de baixa intensidade. Assemelha-se à dentina peritubular
Dentina terciária	Reacionário	Produzida por odontoblastos residentes quiescentes que foram ativados por estímulos patológicos leves. Menos mineralizada que a dentina secundária e a com presença de túbulos irregulares
Dentina terciária	Reparador	Produzida por odontoblastos diferenciados de células progenitoras pulpares em resposta a estímulo agressivo. A qualidade da mineralização e a regularização tubular são dependentes da intensidade da agressão.

Fonte: Autor

Caso haja destruição odontoblástica focal pela persistência da agressão, uma nova geração de odontoblastos se origina a partir da diferenciação de células precursoras da polpa. Fatores de crescimento solubilizados durante o processo de desmineralização da dentina que alcançam a região de revestimento pulpar parecem estimular a produção de uma dentina reparadora (HARGREAVES; BERMAN, 2017).

A regeneração do tecido pulpar está diretamente relacionada à reserva de células ectomesenquimais indiferenciadas ou células-tronco que têm capacidade de se diferenciarem em outros constituintes celulares de acordo com a demanda, mesmo após o desenvolvimento dentário (NANCI, 2013). Essa característica possibilita o desenvolvimento terapêutico regenerativo (LIU *et. al*, 2014; RODAS-JUNCO *et. al*, 2017) de tecidos, resultando, por exemplo, na reparação por neoformação de tecido dentinário em casos de exposição pulpar. A qualidade e regularidade tubular do tecido mineralizado neoformado estão diretamente relacionadas à intensidade e duração dos estímulos nocivos ao órgão dentário (NANCI, 2013).

2.3. Terapias Pulpaes Conservadoras

A capacidade reparadora do complexo dentino-pulpar tem direcionado a odontologia contemporânea para tratamentos cada vez menos invasivos. Há evidências científicas mostrando que, diante de uma lesão cáriosa profunda, os tratamentos que visem à manutenção da vitalidade pulpar devem ser priorizados em relação à extirpação da polpa dentária (CHIBINSKI; CZLUSNIAK, 2003; CARVALHO *et. al*, 2012; STRINGHINI JUNIOR *et. al*, 2014). As técnicas que se baseiam no “Princípio da Mínima Intervenção” são a escavação gradativa, o capeamento pulpar indireto e o capeamento pulpar direto (CARVALHO *et. al*, 2012; STRINGHINI JUNIOR *et. al*, 2014).

A escavação gradativa preconiza a remoção incompleta da lesão cáriosa, forramento da cavidade, restauração provisória e acompanhamento por um período compreendido entre três a seis meses. Em uma nova consulta a cavidade é reaberta, a dentina cariada remanescente é removida e a cavidade é restaurada definitivamente (CARVALHO *et. al*, 2012). As principais vantagens são evitar a exposição pulpar e facilitar a resposta do tecido pela redução dos microrganismos. Como desvantagens são citados o longo tempo de preservação e a necessidade de mais de uma etapa operatória (MONARI; ARSATI; RODRIGUES, 2011; CARVALHO *et. al*, 2012).

Por se tratar de um conceito relativamente novo, alguns profissionais resistem à ideia de selar a cavidade sem a completa remoção do tecido cariado

mesmo com o risco de expor a polpa (WEBER; ALVES; MALTZ, 2011; CHISINI *et. al*, 2015). Neste caso, a limpeza completa da cavidade pode resultar em maior proximidade com a polpa, o que pode aumentar os estímulos nocivos e, por isso, recomenda-se não restaurar de imediato. Dessa forma, realiza-se um forramento da cavidade e restauração provisória com intuito de formar dentina terciária reacional aumentando a espessura da dentina remanescente e melhorando o prognóstico da restauração, procedimento denominado de capeamento pulpar indireto (CARVALHO *et. al*, 2012; STRINGHINI JUNIOR *et. al*, 2014).

Quando inadvertidamente ocorre exposição da polpa durante a remoção de lesão cariosa profunda ou mesmo devido a traumatismos dentários, a técnica de escolha é o capeamento pulpar direto. Este consiste na aplicação de material terapêutico diretamente sobre o tecido exposto, restauração provisória e preservação por um período compreendido entre 40 a 60 dias. Esta conduta favorece a reorganização tecidual pela diferenciação de células-tronco em novos odontoblastos capazes de sintetizar matriz mineralizada. Dessa forma, a dentina perdida é reparada por neoformação de tecido dentinário (CARVALHO *et. al*, 2012).

Contudo, sabe-se que o sucesso das terapias conservadoras depende diretamente do correto diagnóstico quanto à vitalidade do tecido pulpar e pode ser influenciado por outros fatores como tamanho da exposição tecidual, intensidade da infecção local, saúde geral e idade do paciente, visto que polpas de dentes jovens possuem melhor resposta biológica, pela maior quantidade de células e maior suprimento sanguíneo (BITTAR, 2010; CARVALHO *et. al.*, 2012; STRINGHINI JUNIOR *et. al*, 2014).

Outro fator a ser considerado nas terapias pulpares é a escolha de um material restaurador provisório que proporcione selamento da cavidade e isolamento térmico durante o período de preservação, pois os agentes de forramento oferecem uma barreira ao influxo de agentes agressores, biológicos ou químicos via túbulos dentinários, mas normalmente não oferecem a resistência mecânica e térmica necessária para resguardar à estrutura dentária condições para sua recuperação (ANUSAVICE, 2015). O isolamento absoluto durante as técnicas pulpares também deve ser considerado condição primordial para o sucesso do desfecho clínico, visto que, quanto mais asséptico o campo de trabalho, menor a probabilidade de infecção adicional ao tecido pulpar (INOJOSA, 2015; HEDGE *et. al*, 2017).

O respeito a todos estes fatores favorece o prognóstico diante de uma inflamação leve do tecido pulpar, chamada de pulpíte reversível, caracterizada por hiperemia vascular, sensibilidade provocada e dor de curta duração. Quando o agente agressor não é removido ou o dano inflamatório não pode mais ser contido pelo organismo, o tecido pulpar não responde mais positivamente a terapias conservadoras. Neste caso, considera-se o diagnóstico de pulpíte irreversível, caracterizada por aumento da hiperemia, que em consequência da rigidez da câmara pulpar e impossibilidade de expansão, pode levar ao estrangulamento da vascularização local e à formação de micro abscessos. Este processo continua até a coalescência dos abscessos levando à necrose pulpar (HARGREAVES; BERMAN, 2017).

2.3.1. Agentes de capeamento pulpar

Após o correto diagnóstico pulpar, a seleção dos materiais de capeamento e dos restauradores provisórios também são fundamentais no prognóstico do tratamento realizado (STRINGHINI JUNIOR *et. al*, 2014). Os cimentos utilizados para capeamento direto têm a função de proteger a polpa contra o influxo de irritantes, manter a vitalidade pulpar, inibir a atividade microbiana e favorecer um ambiente de recuperação do tecido (CARVALHO *et. al*, 2012).

Visto que são materiais aplicados diretamente sobre tecido conjuntivo, algumas exigências são pertinentes. Primeiramente devem ser biocompatíveis, ou seja, incapazes de causar efeitos indesejáveis, local ou sistemicamente, no desempenho de sua função (ANUSAVICE, 2015). Devem selar perfeitamente o local, evitando a umidade e a contaminação microbiana, fatores que dificultam o reparo pulpar (NOWICKA *et. al*, 2016). E, de forma ideal, apresentar atividades antimicrobiana e dentinogênica (SIQUEIRA *et. al*, 2017).

O hidróxido de cálcio foi utilizado como padrão-ouro nos procedimentos de capeamento pulpar direto por muitas décadas devido, principalmente, à sua biocompatibilidade e capacidade de induzir formação de tecido mineralizado (VIVAN *et. al*, 2012). Entretanto, as desvantagens associadas a este material como alta solubilidade em fluidos orais, falhas no selamento marginal, formação de ponte dentinária porosa, possibilidade de obliteração da câmara pulpar em dentes

decíduos (PAROLIA *et. al*, 2010; NOWICKA, *et. al*, 2016) direcionaram as pesquisas para o desenvolvimento de novas alternativas.

No início da década de 90, foi desenvolvido o agregado trióxido mineral (MTA) por Mahmoud Torabinejad, na Universidade de Loma Linda/Califórnia, com o objetivo primariamente de ser utilizado em cirurgias parendodônticas. Consiste em um pó de partículas finas cujos principais componentes são silicato tricálcico, aluminato tricálcico e óxido de silicato, além de alguns óxidos minerais responsáveis pelas propriedades químicas e físicas deste material. A reação de presa do MTA transformando-o em um cimento ocorre após hidratação dos silicatos pelo acréscimo de água destilada utilizada como solvente (CHAIN, 2013; LAVÔR *et. al*, 2017).

O MTA tem sido proposto como material capeador direto, pois além de apresentar as mesmas vantagens do hidróxido de cálcio, quanto à biocompatibilidade, indução de tecido mineralizado e alto pH, acrescenta melhor efeito selador (CHIBINSKI; CZLUSNIAK, 2003), menor inflamação ao tecido pulpar (PAROLIA *et. al*, 2010), maior estimulação de dentina e melhor reparo em relação ao hidróxido de cálcio (ANUSAVICE, 2015; PAROLIA *et. al*, 2010).

Embora seja um material alcalino e, portanto, inibidor de atividade enzimática de microrganismos (VIVAN *et. al.*, 2012), diversos estudos têm mostrado diminuição de sua propriedade antibacteriana, sendo inferior ao hidróxido de cálcio, especialmente contra bactérias anaeróbias (CHIBINSKI; CZLUSNIAK, 2003; SIQUEIRA *et. al*, 2017). Outras desvantagens normalmente associadas ao MTA são alto custo (CARVALHO *et. al.*, 2012) e elevado tempo de presa (MACHADO, 2014; BITTAR, 2010).

Pesquisas em engenharia tecidual estão em crescente ascensão pela possibilidade clínica, cada dia mais evidente, da regeneração biológica tecidual pela ativação de células tronco por moléculas ou materiais que estimulem o crescimento e diferenciação celular para reparar o dano pulpar (BITTAR, 2010) produzindo uma barreira dentinária mais espessa e em menor tempo.

2.4. Própolis

Própolis é um produto natural produzido por abelhas a partir da coleta de resina de plantas, brotos e flores e acréscimo de secreções orgânicas e salivares. É

utilizado na colmeia para reparar falhas ou frestas na estrutura e como agente de proteção contra a invasão de insetos e micro-organismos (COSTA *et. al*, 2014).

Tem sido utilizada pelo homem empiricamente desde a antiguidade principalmente para ação antisséptica, cicatrizante e antipirética (SFORCIN; BANKOVA, 2011) e se mantém inovadora pelas constantes descobertas em relação às suas propriedades biológicas, sendo considerada um dos produtos mais estudados no mundo (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011).

De acordo com Nascimento *et. al*, (2015) a composição química da própolis é altamente variável e fatores como: subespécies das abelhas, biodiversidade local, clima e sazonalidade da região de coleta, conferem peculiaridade à própolis de cada região. Portanto, são classificados de acordo com a fonte botânica principal, visto que são os compostos metabólicos das plantas que conferem as propriedades bioativas de cada tipo de própolis.

Segundo Costa *et. al*, (2014), somente no Brasil já foram classificadas 13 grupos de própolis provenientes da região sul (grupos de 1 ao 5), nordeste (grupos de 6 ao 11 e 13/própolis vermelha) e sudeste (grupo 12/própolis verde). Embora não exista uma composição química padrão, a composição principal são flavonóides, ácidos fenólicos e composições aromáticas.

A planta *Dalbergia Ecastophyllum* (Leguminosae, nome popular: Rabo de Bugio) presente no nordeste brasileiro é a principal fonte botânica para as abelhas da espécie *Apis mellifera* produzirem a matéria-prima própolis vermelha. As abelhas coletam exsudatos resinosos e juntamente com suas secreções salivares produzem um material biotecnológico rico em compostos fenólicos, flavonóides, isoflavonóides, terpenos e gutiferas polí-iso-prenilados que apresentam diversas propriedades biológicas. A territorialidade do produto proporcionou a proteção da própolis vermelha alagoana referente à indicação geográfica (IG)⁵ e, em 2012 foi concedido o selo pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), IG 201101 – União dos Produtores de Própolis Vermelha do Estado de Alagoas - Manguezais de Alagoas, BR/AL (SILVA; UCHÔA; TONHOLO, 2016).

Um dos desafios das pesquisas com própolis é, justamente, a variabilidade que este produto apresenta, porém avanços de técnicas analíticas têm possibilitado

⁵ Indicação Geográfica pode ser definida quando qualidade e características de um produtos ou serviço se devem essencialmente ao meio geográfico, incluindo fatores naturais e humanos de acordo com o art. 178 da lei 9279 de 14.05.96 (BRASIL, 1996).

o estudo dos componentes químicos e a relação entre os compostos ativos e suas atividades terapêuticas. Esta correlação é de fundamental importância para o enriquecimento científico por possibilitar, não só a comparação entre os estudos, mas facilitar os ajustes relacionados à potência e dose dos ativos responsáveis pelas propriedades biológicas (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011).

A própolis vermelha tem sido referida em muitos estudos científicos abordando suas diversas propriedades biológicas como cicatrizante e estimuladora de reparação tecidual (SFORCIN; BANKOVA, 2011; ALMEIDA *et. al*, 2013; JACOB *et. al*, 2015), antioxidante (CABRAL *et. al*, 2009; MENDONÇA *et. al*, 2015), antimicrobiana (SIQUEIRA *et. al*, 2014), antitumoral (MENDONÇA *et. al*, 2015), dentre outras.

2.4.1 Estado da arte da própolis em odontologia

Devido as suas propriedades biológicas, a própolis representa um produto promissor também para a área odontológica (BARRETO *et. al*, 2014; NASCIMENTO *et. al*, 2018). Algumas investigações tem sugerido sua aplicabilidade na endodontia para irrigação e medicação intracanal (BARRETO *et. al*, 2014), como meio de armazenamento para dentes após avulsão (BARRETO *et. al*, 2014; SANKARI *et. al*, 2014); na dentística, tem sido utilizada no tratamento da sensibilidade dentinária (BARRETO *et. al*, 2014; SANKARI *et. al*, 2014; CHEN *et. al*, 2015), prevenção de microinfiltração em restaurações (BARRETO *et. al*, 2014) e limpeza de cavidades (PORTO *et. al*, 2018).

A ação anticariogênica (CABRAL *et. al*, 2009; YADAV, R; YADAV, S., 2013; BARRETO *et. al*, 2014; SANKARI *et. al*, 2014) também foi investigada e verificou-se que quando flavonóides são adicionados em creme dental, inibem a formação de biofilme dental (BARRETO *et. al*, 2014; SANKARI *et. al*, 2014). E, além disso, verificou-se que a própolis quando adicionada em solução para bochecho bucal ajuda no reparo de feridas cirúrgicas intrabuciais e exerce efeitos anti-inflamatórios e analgésicos leves (SANKARI *et. al*, 2014).

A própolis vermelha foi avaliada como agente de capeamento pulpar e verificou-se que a resposta tecidual à própolis foi comparável ao hidróxido de cálcio e MTA quanto à formação e qualidade de dentina reparadora confirmando seu

potencial dentinogênico. Evidenciando nos grupos tratados com própolis e MTA uma camada bem organizada de odontoblastos adjacentes à ponte dentinária, o que não foi observado no grupo que recebeu hidróxido de cálcio (PAROLIA *et. al*, 2010)

2.5. Nanotecnologia

Com o avanço da nanotecnologia farmacêutica um número crescente de publicações tem documentado o uso de sistemas carreadores ou transportadores de fármacos ou compostos naturais como aliados no tratamento de diversas patologias. As principais vantagens de utilizar nanocarreadores é a melhoria da solubilidade de substâncias lipofílicas, como a própolis, aumentando a biodisponibilidade e a redução de toxicidade, pois permite diminuir a concentração necessária para obter resposta terapêutica desejada (FERREIRA, 2013; NASCIMENTO *et. al*, 2016).

Em odontologia, o conhecimento das estruturas físicas dos tecidos dentários em nanoescala, tem direcionado pesquisas para o desenvolvimento de novos materiais restauradores, possibilitado a melhor compreensão de mecanismos de defesa e reparação e, sem dúvida, tem incrementado propriedades físicas aos materiais odontológicos através de cargas nanométricas (USKOKOVIC, BERTASSONI, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar a resposta da polpa humana ao capeamento pulpar direto com nanopartículas poliméricas carregadas com própolis vermelha brasileira.

3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas poliméricas carregadas com própolis vermelha brasileira (NPP) nas concentrações de 50µg e 100µg.
- Realizar estudo de caracterização física de NPP e NPP + MTA através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- Testar a citotoxicidade *in vitro* de NPP, NPP+ MTA;
- Analisar histologicamente a **resposta celular inflamatória** da polpa dentária ao capeamento direto com NPP, NPP + MTA, nos períodos de 15, 45 e 60 dias;
- Estudar o efeito do capeamento direto com NPP, NPP + MTA no **reparo da dentina**, nos períodos de 15, 45 e 60 dias;
- Comparar a **resposta do tecido pulpar** ao capeamento direto com NPP, MTA + NPP e MTA nos períodos de 15, 45 e 60 dias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

As amostras de própolis vermelha foram obtidas do apiário Ilha do Porto na cidade de Marechal Deodoro, estado de Alagoas, com as seguintes coordenadas geográficas: 9° 44.555' de Latitude Sul e 35° 52.080' de Longitude Oeste a 18,1 metros acima do nível do mar.

Polímero PCL e Pluronic® F68 e padrões analíticos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

A linhagem de Macrófagos J774.A1 foi obtida no banco de células do Rio de Janeiro – BCRJ (Duque de Caxias, RJ, BR). Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), soro fetal bovino (SFB) e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.2. Implicações Éticas

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da Universidade Federal de Alagoas em 20 de dezembro de 2016, conforme processo de nº 1875464 (ANEXO A).

Os participantes do projeto foram explicitamente informados sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos e métodos, benefícios esperados, potenciais riscos ou desconfortos. Foram ainda consultados sobre a permissão de uso de seus exames radiográficos, registros fotográficos e prontuários por parte dos pesquisadores e informados sobre a possibilidade de, a qualquer momento e sem nenhum prejuízo, abandonar a participação na pesquisa. Após compreensão e consentimento, os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), determinando o início da participação no estudo.

4.3. Obtenção de Nanopartículas Poliméricas Carregadas com Própolis Vermelha de Alagoas

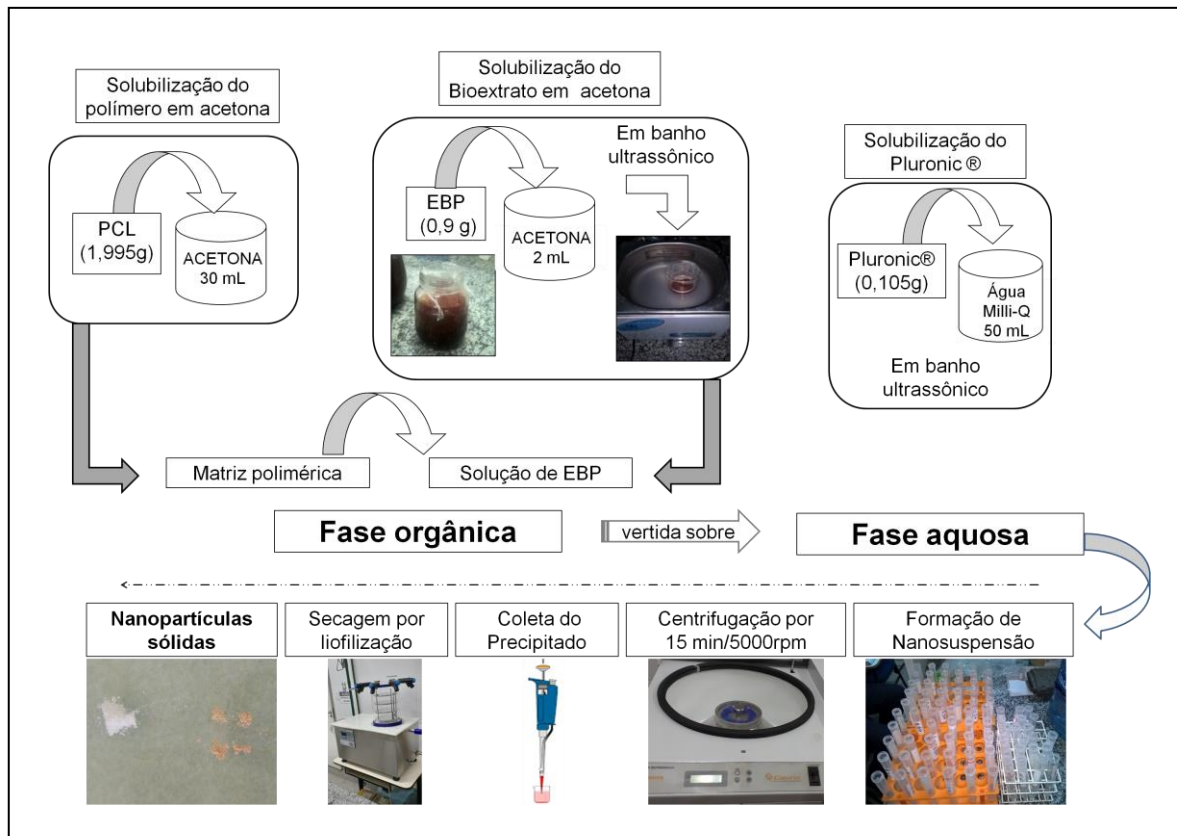
O extrato bioativo da própolis foi obtido segundo Nascimento *et. al*, (2016), através do método de maceração. Inicialmente, 100g de própolis vermelha foi pesada em balança analítica, reduzida em pedaços menores e então submetidos à extração com 1000mL de etanol/água (80:20, v/v.) por 48h. O processo foi repetido três vezes para alcançar o esgotamento do material. Para eliminar o solvente, o sobrenadante foi submetido à rotaevaporação (80 rpm, 50°C e 700mmHg). O extrato bruto foi posteriormente solubilizado em 20mL da mistura de etanol/água (7:3, v/v) e colocado em um funil de separação de 100mL. Para separar e eliminar a fração clorofórmica, foi adicionado 80mL de clorofórmio, sob agitação e após repouso a fração foi retirada do funil. O processo foi repetido algumas vezes e o material resultante foi submetido novamente à rotaevaporação nas mesmas condições citadas. O extratos bioativos foram armazenados sob congelamento.

A produção de nanopartículas utilizou sistema matricial polimérica com matriz de revestimento PCL_Pluronic® F108 (90:10, p/p) pela técnica de nanoprecipitação. Para obter a formulação com concentração de 30% de EBP, inicialmente o polímero PCL (1,995g), Poli-ε-caprolactona, foi solubilizado em acetona (30mL) e reservado. Em outro béquer o bioextrato (0,9g) foi solubilizado em acetona (2mL), com auxílio de banho ultrassônico. A matriz polimérica foi vertida na solução EBP e a mistura foi reservada com proteção de filme PVC para evitar a evaporação, finalizando a fase orgânica do processo. Posteriormente, a fase aquosa foi preparada solubilizando o copolímero Pluronic® (1,05g), PEO-PPO-PEO⁶, em água ultrapura (50mL) com auxílio de banho ultrassônico. A fase orgânica foi vertida sobre a fase aquosa formando uma nanossuspensão, levada em tubos Falcon para centrifuga durante 15 minutos na rotação de 5000rpm. Após a centrifugação, o precipitado formado foi coletado e acondicionados volumes de 10mL em frascos de vidro protegidos da luz para congelamento rápido em nitrogênio líquido (-196°C) por 10 minutos. Posteriormente foram levados ao processo de secagem por liofilização, obtendo-se partículas sólidas (Figura 3). Para as partículas puras, o processo foi

⁶ Copolímero surfactante formado por três blocos não-iônicos: polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno (PEO-PPO-PEO) com porção central hidrofóbica (PPO) e cadeias laterais hidrofílicas (PEO).

realizado da mesma forma, porém sem a solubilização do bioextrato (AZEVEDO, 2016).

Figura 3 - Fluxograma do processo de obtenção das nanopartículas.



Fonte: Autor.

A síntese de nanopartículas puras (NPs) e de nanopartículas carregadas com própolis (NPPs) foi realizada no Laboratório de Análise Farmacêutica e Alimentícia (LAFA) do Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF), UFAL.

4.4. Descontaminação em radiação ultravioleta (UV)

Todos os materiais utilizados na pesquisa, MTA, NPP e MTA + NPP, passaram por um processo de descontaminação por UV durante 15 minutos em câmara de luz ultravioleta (30w) realizado no Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamento (LabTCom) do ICF, UFAL (Figura 4G).

4.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Amostras de extrato bioativo de própolis vermelha (EBP), NP, NPP, MTA e MTA + NPP foram analisadas em espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no modo de ATR (Refletância Total Atenuada) pela disposição diretamente sobre o cristal de diamante sem necessidade de nenhum preparo prévio. Os espectros foram obtidos em transmitância, 64 varreduras, na faixa de comprimento de onda de 4000 a 500 cm^{-1} , utilizando-se um espectrofotômetro FTIR IRAffinity-1 (Shimadzu Corp., Tokyo,JP) no laboratório de Química do Instituto Federal de Alagoas – Campus Maceió. A análise em FTIR teve como o objetivo confirmar a incorporação da própolis nas NNPs e observar se houve interferência da radiação UV por 15 minutos nos materiais utilizados no ensaio de citotoxicidade *in vitro* e no estudo clínico. Também foi observada a mistura MTA + NPP antes e após a manipulação com água destilada.

4.6. Ensaio de citotoxicidade celular por MTT

As amostras foram preparadas a partir de 0,010g de EBP, NP, MTA, NPP e MTA + NPP em eppendorf por balança analítica e solubilizados em DMSO (Sigma-Aldrich) para obter as concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ filtrada com miliporo de 0,22 μm e 13mm (Milipore, Molsheim, FR) no laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), UFAL.

Manutenção da linhagem de macrófagos: Macrófagos da linhagem J774.A1, derivada de mamíferos, foram mantidos em garrafas de cultura com 10 mL de meio RPMI (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich), gentamicina (1 mg/L), L-glutamina (2 mM) e piruvato (2 mM) (Sigma-Aldrich), e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . No momento do uso, as células foram centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura completo e contadas para plaqueamento dos experimentos.

Determinação da viabilidade celular: Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em placas de 96 poços, na concentração de 5×10^4 células/poço e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 e mantidos

overnight para adesão dos macrófagos a placa. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e as células foram tratadas com as substâncias testes. Como controles negativo e positivo foram utilizados meio de cultura completo e os poços de lise tratados com 6 μ L de triton⁷ (Sigma-Aldrich) uma hora antes de adicionar MTT. As placas de cultivo celular foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 6, 12 e 24 horas.

Decorrido o tempo experimental previsto, as amostras dos grupos experimentais e controles foram submetidas à avaliação do metabolismo celular aplicando-se a técnica de MTT, que determina a atividade da enzima desidrogenase succínica produzida pelas mitocôndrias presentes nas células viáveis. Para a preparação da solução de MTT [brometo de 3-(4-5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio], 5 mg do sal de metiltetrazolium foi pesado em balança analítica de alta precisão (AG 2000 GEHAKA, SP, Brasil) e, diluído em 10 mL de meio de cultura, obtendo-se uma concentração final de 5 mg/10mL.

Foi retirado então o sobrenadante e adicionado 100 μ L de solução de MTT/poço. Esta solução disposta sobre as células foi incubada em estufa umidificada, em temperatura de 37°C durante 1 hora. Decorrido este período, as placas foram retiradas da incubadora e foi adicionado 100 μ L de DMSO/poço, com o objetivo de dissolver os cristais violeta resultantes da clivagem do anel do sal de metiltetrazolium pela enzima desidrogenase succínica das mitocôndrias das células viáveis.

Após agitação e verificação da homogeneidade das soluções com suas possíveis diferenças de tonalidade violeta, as placas foram lidas em leitor de ELISA (Thermo Plate, modelo TP-READER) numa absorbância de 550 nm. Para cada grupo, os dados numéricos obtidos foram convertidos em média e transformados em porcentagem de citotoxicidade. Os dados obtidos foram submetidos ao teste F de análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação dos pares. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%. Os dados foram analisados no programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) v.21.

⁷ Fórmula química: C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n (n=9-10)

4.7. Obtenção das doses individuais dos materiais experimentais para capeamento pulpar direto

Para padronizar as doses individuais foi estabelecido como medida padrão uma porção de porta-amálgama (Jon, SP), correspondendo a aproximadamente 30mg em peso dos materiais experimentais e controle. Para obter as doses de NPP contendo 100 μ g e 50 μ g de extrato bruto de própolis vermelha (EBP), as NPP foram diluídas em nanopartículas puras (NP) (Figura 4).

Sabendo-se que, na formulação de 30% NPP, 100mg de NPP contém 30mg de EBP, e, portanto em 3,33mg de NPP contem 1mg de EBP, para se obter a dose individual contendo 0,1mg ou 100 μ g de EBP, foi necessário diluir em 10x. Dessa forma, 3,33mg de NPP foi misturada a 30mg de NP, obtendo-se a diluição 1A (D1A). Assim, cada porção de 3,33mg de D1A apresentava 0,1mg de EBP, ou seja, 100 μ g deste princípio ativo.

Para obter a dose contendo de 50 μ g de EBP foi seguido o mesmo cálculo, diluindo-se 3,33mg de NPP em 20x, obtendo-se a dissolução 1B (D1B). Assim, cada 3,33mg de D1B apresentava 0,05mg de EBP ou 50 μ g deste princípio ativo.

As doses individuais contendo MTA puro (30mg), MTA + NPP 50 (30:3, m/m), MTA + NPP 100 (30:3, m/m), NPP50 (20mg) e NPP100 (20mg) foram acondicionadas em tubos eppendorf, descontaminadas por radiação UV (Figura 4G) e encaminhadas para mascaramento através da codificação por cores das embalagens (Figura 4H-I) e reservadas até o momento do uso.

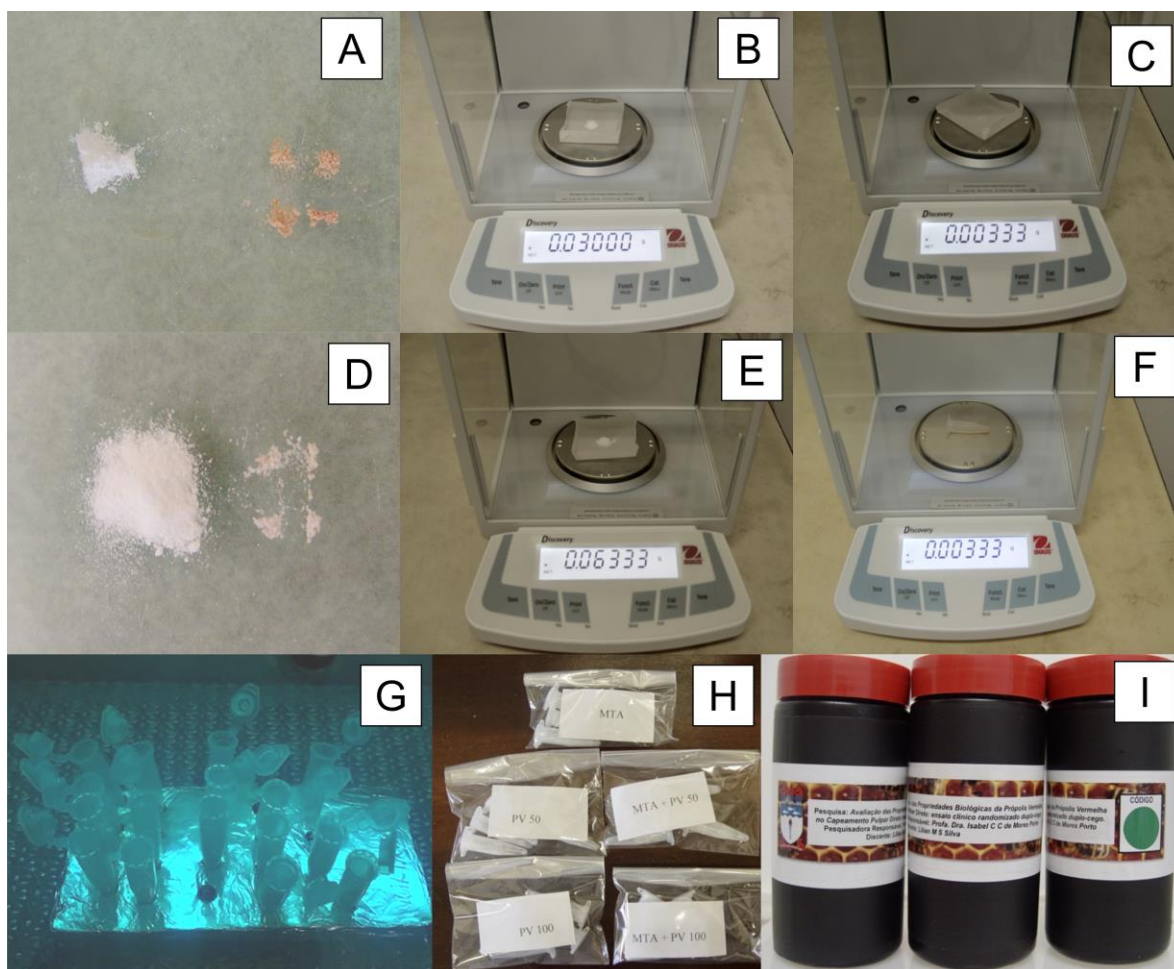
4.8. Ensaio Clínico

Ensaio clínico intervencional, triplo-cego, randomizado e controlado.

População

Os voluntários foram provenientes de demanda espontânea da Clínica de Odontologia da UFAL com indicação cirúrgica dos dentes terceiros molares, totalizando uma amostra composta por 60 dentes de 32 pacientes, que doaram de um a quatro terceiros molares hígidos.

Figura 4 - Dosagem, descontaminação e mascaramento dos materiais utilizados na pesquisa.



Fonte: Autor

Amostragem

A amostra envolvida nesta pesquisa foi composta por 60 terceiros molares permanentes hígidos com extração indicada por razões terapêuticas de indivíduos sem comprometimento sistêmico. As amostras foram aleatoriamente alocadas em 15 grupos ($n=4$) divididos de acordo com o produto a ser aplicado (5 produtos) e com o tempo de avaliação (15, 45 e 60 dias). Os grupos experimentais receberam capeamento direto com nanopartículas poliméricas carregadas com PVB (NPP) contendo 100 μ g e 50 μ g de EBP ou MTA (Angelus) convencional acrescido de NPP contendo 100 μ g e 50 μ g de EBP. Os grupos controle receberam MTA convencional (Quadro 3). Os dentes foram mantidos em Biorrepositório sob a guarda do pesquisador responsável, até a conclusão da pesquisa.

Quadro 3 - Grupos experimentais e controles nos tempos de preservação.

Materiais	15 dias	45 dias	60 dias
MTA	Grupo I	Grupo VI	Grupo XI
MTA+NPP(50)	Grupo II	Grupo VII	Grupo XII
NPP(50)	Grupo III	Grupo VIII	Grupo XIII
MTA+NPP(100)	Grupo IV	Grupo IX	Grupo XIV
NPP(100)	Grupo V	Grupo X	Grupo XV

MTA – Cimento reparador branco (Angelus®, PR, BR); NPP(50) – porção de NPP contendo 50µg de EBP; NPP(100) – porção de NPP contendo 100µg de PVB.

Critérios de aleatoriedade

Para que não comprometesse o cegamento da pesquisa, todos os materiais utilizados foram acondicionados em *ependorfs* e encaminhados à coordenadora da pesquisa para serem codificados por cores. Depois de aleatoriamente selecionar a cor de cada grupo, as embalagens foram colocadas em potes plásticos com bloqueio de luz solar com a cor designada (Figura 4I). A randomização amostral foi obtida pelo sorteio de uma das cinco cores e, posteriormente pelo sorteio de um dos três tempos de preservação, imediatamente antes do procedimento experimental. Dessa forma, o estudo é caracterizado como triplo-cego, visto que paciente, pesquisador responsável pela intervenção e avaliador dos resultados não tiveram conhecimento do tratamento alocado. O código de alocação ficou sob a guarda e responsabilidade de pesquisadora membro da equipe até a finalização das análises histológica das lâminas.

Critérios de inclusão

Os indivíduos foram considerados elegíveis para admissão ao estudo, quando eram maiores de 18 anos, estavam em condições mentais adequadas para fornecer o consentimento livre e esclarecido por escrito, além de atender os demais critérios:

- Presença de terceiros molares hígidos com extração indicada por razões terapêuticas.
- Indivíduo com boa higiene oral e sem comprometimento sistêmico.

Critérios de exclusão

Nenhum indivíduo que se enquadrasse em quaisquer dos seguintes critérios de exclusão foram admitidos no estudo:

- Pacientes com higiene oral deficiente.
- Bruxismo.
- Doença periodontal.
- Carie
- Restaurações em qualquer superfície
- Dentes com imagem radiolúcida em dentina.
- Resposta negativa ao teste térmico de sensibilidade pulpar ao frio.
- Impossibilidade de isolamento absoluto do campo operatório
- Indivíduos com alguma doença sistêmica ou condição de saúde que os impossibilitasse de participar da pesquisa.
- Incapacidade de cooperar com as exigências do protocolo da pesquisa e procedimentos de acompanhamento
- Indivíduos que apresentassem condições associadas à adesão precária ao tratamento, tais como, alcoolismo, doença mental ou dependência de drogas.
- Mulheres que estivessem grávidas ou dado à luz recentemente (últimos 06 meses).
- Membros da equipe (pesquisadores e auxiliares) diretamente ligados ao estudo ou seus parentes imediatos (cônjuge, pais, filhos, irmãos).
- Pacientes com histórico de reações alérgicas à picada de abelhas e/ou à produtos derivados do mel de abelhas, contendo ou não própolis.

Exame clínico

O exame clínico foi precedido de anamnese detalhada e exame físico. Com a finalidade de obter campo limpo e favorável à inspeção visual, foi realizada profilaxia (limpeza) com pasta profilática utilizando escova de Robinson (Microdont, SP, BR) em baixa rotação.

A inspeção dos dentes foi obtida com auxílio de espelho bucal (método europeu) e com campo seco e iluminado. Para análise dos tecidos periodontais foi utilizada sonda periodontal milimetrada tipo Who 621 (Golgran, SP, BR).

Todas as informações obtidas por meio dos exames clínico e complementares foram anotadas em ficha clínica específica (APÊNDICE – B) e as etapas foram registradas por fotografia.

Exame radiográfico

Foram realizadas duas tomadas radiográficas nos molares examinados, uma periapical e uma interproximal (bite-wing), utilizando-se a técnica do paralelismo com auxílio de posicionadores (Jon, SP, BR) e películas radiográficas (Kodak, SP, BR).

Teste de sensibilidade pulpar

Para diagnóstico do estado pulpar, foi empregado o gás refrigerante (Endo Ice®, Maquira, PR, BR), aplicado com uma bolinha de algodão presa por uma pinça clínica e imediatamente levada à superfície do dente, no terço médio da face vestibular, sob isolamento relativo.

O teste foi realizado inicialmente nos dentes adjacentes ao molar que receberia a intervenção, auxiliando como mecanismo de controle, para posteriormente ser realizado no dente selecionado. O tempo de aplicação foi de aproximadamente de 1 a 2 segundos. O teste foi repetido após intervalo de 5 minutos. Foram incluídos no estudo os dentes que apresentaram resposta leve transitória, considerada normal; e descartados aqueles com ausência de resposta ao estímulo térmico, indicativo de necrose pulpar.

Preparo cavitário

O preparo cavitário foi precedido das seguintes etapas:

- a) Randomização das amostras por sorteio do grupo de intervenção;
- b) Os pacientes realizaram bochecho com 10 ml de gluconato de clorexidina a 0,12% (PerioGard®, Colgate, SP, BR) durante 1 minuto, com o propósito de reduzir os níveis de microrganismos na cavidade bucal;
- c) Posteriormente foi aplicado anestésico tópico (Benzotop®, benzocaína a 20%, DFL, RJ, BR) para profunda anestesia da mucosa oral previamente à injeção anestésica;

d) Foi administrado anestésico com vasoconstrictor (lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000, DFL, RJ, BR) pela técnica de anestesia de bloqueio regional ou infiltrativa na região da intervenção;

e) Posteriormente à anestesia local, foi realizada a profilaxia do dente com pasta de pedra pomes e água utilizando escova de Robinson (Microdont, SP) em baixa rotação;

f) Obtido o isolamento absoluto com o auxílio de pinça porta grampo (Palmer, Golgran, SP, BR), arco de Ostby (Angelus, PR, BR), lençol de borracha, perfurador Ainsworth (Golgran, SP, BR) e grampos 200-205, 26, 29 e W8A;

g) Seguido da antisepsia do campo operatório, dente e o conjunto lençol de borracha/grampo, com algodão embebido em digluconato de clorexidina 2%.

Após estas etapas, um preparo cavitário classe I oclusal de aproximadamente 3-4mm de extensão mesio-distal e vestibulo-lingual e profundidade de aproximadamente 4mm foi executado com auxílio de ponta diamantada esférica nº 1016 (Fava, SP, BR) em alta rotação sob refrigeração a água, realizado com movimentos leves e intermitentes sem acessar a câmara pulpar. Para manter a padronização de corte, uma broca foi utilizada para quatro cavidades.

Capeamento Pulpar

O acesso à câmara pulpar foi realizado no centro do assoalho da cavidade de Classe I com ponta diamantada esférica nº 1011 (Fava, SP, BR) sob refrigeração à água, expondo área de aproximadamente 1,0 mm. Para manter a padronização de corte, as brocas foram utilizadas quatro vezes. O sangramento local foi controlado através da aplicação de leve pressão sobre o local exposto com bolinha de algodão umedecido com soro fisiológico estéril, até que a completa hemostasia fosse alcançada. A secagem do tecido pulpar exposto foi obtida com bolinha de algodão seco estéril e a exposição foi coberta com o material de proteção pulpar previamente sorteado. A porção padronizada contida no eppendorf foi misturada com água destilada, na proporção 0,14g / 50 µL, e a posicionada sobre a polpa exposta com o auxílio de porta-amálgama.

Restauração provisória

Em seguida, as cavidades foram seladas com cimento de ionômero de vidro modificado (SS White, RJ, BR), manipulado de acordo com as recomendações do fabricante e aplicado com o auxílio de uma seringa Centrix (DFL, RJ, BR). Decorrido o tempo de presa inicial do material restaurador o isolamento absoluto foi removido e a oclusão checada para evitar qualquer alteração nas relações de mordida. As consultas de retorno eram marcadas em cartão de agendamento de acordo com o tempo de preservação sorteado. Nas consultas de retorno, os pacientes eram questionados sobre algum desconforto e a duração. Para avaliar a resposta sintomática foi utilizada uma escala visual de intensidade de dor definida da seguinte forma: sem dor, dor suave, moderada, forte e dor intensa (Figura 5). As respostas dos pacientes eram registradas na ficha clínica e a cirurgia era agendada. Todas as etapas de preparo cavitário, capeamento pulpar e restauração provisória foram realizadas pelo mesmo pesquisador responsável pela intervenção.



Figura 5 - Escala Visual Analógica (EVA)

Procedimento cirúrgico

Decorrido o período de observação aleatoriamente designado, os dentes eram extraídos. Novos exames radiográficos foram realizados imediatamente antes da cirurgia e os pacientes foram novamente questionados sobre a presença ou ausência de dor. A técnica exodôntica II, com uso de alavancas, foi utilizada para minimizar efeitos traumáticos. O paciente foi orientado quanto aos cuidados pós-operatórios, recebendo receituário com a prescrição médica de analgésico local e com o contato do pesquisador principal para qualquer dúvida ou esclarecimento.

4.9. Análise Histológica

Fixação das Amostras

Depois de removido do alvéolo, o dente era lavado em soro fisiológico e seccionado transversalmente ao seu longo eixo para remover os 2/3 apical da(s) raiz(es) com ponta diamantada estéril 3145 (KG Sorensen, SP, BR), em alta rotação e sob refrigeração ar/água destilada. Essa medida objetiva melhorar a penetração da solução fixadora no dente. Na sequência, o dente era imerso em tubos contendo 15 mL de formalina 10% tamponada (pH 7,4) por, no mínimo, 72 horas (Figura 6).

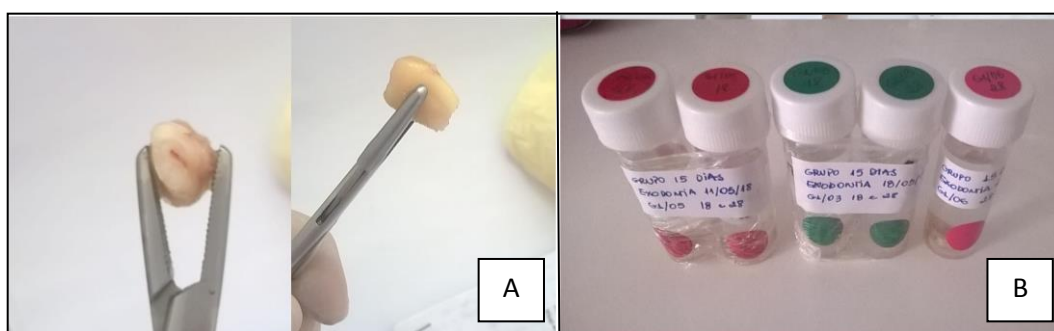


Figura 6 - Secção do terço radicular (A) e fixação da amostras (B).

Processamento das Amostras

Os dentes foram desmineralizados em ácido nítrico a 5% durante 15 dias, renovando-se a solução desmineralizadora duas vezes por semana. Este procedimento de renovação do ácido nítrico permite que a descalcificação se processe mais rapidamente. Os espécimes foram diafanizados em xilol, desidratados em cadeia ascendente de etanol (70, 80, 90, 100%) e emblocados em parafina. A seguir foram obtidos três cortes da região da exposição pulpar semi-seriados de 5 μ m em micrótomo e estendidos em lâminas de vidro, previamente limpas e desengorduradas. Foram confeccionadas duas lâminas de cada espécime: uma corada por Hematoxilina-Eosina (HE) e a outra pela técnica de Gram. Esta última para verificar a presença ou ausência de bactérias e classifica-las segundo os critérios a seguir.

Quadro 4 - Critérios para avaliação bacteriana.

Scores	Bactérias	Tipo	Coloração
1	Ausente	Gram-positivas	Azul
2	Presente	Gram-negativas	Vermelho

Fonte: Adaptado de Brasil (2001); Nowicka et. al (2016).

Critérios de avaliação da morfologia tecidual

As lâminas foram observadas, em microscópio de luz convencional em aumento de 400x e analisadas no local de exposição pulpar quanto à resposta celular inflamatória, à organização do tecido pulpar e à formação de estrutura mineralizada, conforme critérios descrito no quadro 5. Para caracterizar o estudo como triplo-cego, as lâminas foram codificadas para favorecer o cegamento da avaliação do patologista e controle de vieses.

Quadro 5 - Critérios de avaliação histomorfofisiológica.

Scores	Resposta inflamatória	Organização do tecido pulpar	Presença de tecido mineralizado
0	Nenhuma ou poucas células inflamatórias dispersas na área correspondente ao capeamento pulpar, com característica de tecido normal	Morfologia tecidual normal	-
1	Leve infiltrado inflamatório com polimorfonucleares ou leucócitos mononucleares (<10 células)	Camada de odontoblastos desorganizada, mas tecido pulpar normal	Formação contínua de tecido mineralizado
2	Moderado infiltrado de células inflamatórias envolvendo a polpa coronária, sem presença de abscessos (10-30 células)	Completa desorganização do tecido pulpar	Formação não-contínua de tecido mineralizado
3	Severo infiltrado de células inflamatórias envolvendo a polpa coronária, com presença de abscessos (>30 células)	Necrose	Nenhuma evidência de formação de tecido mineralizado

Fonte: Adaptado de Nowicka et. al (2016); Parolia et. al (2010).

Análise estatística

Os dados foram analisados descritivamente através de frequências absolutas e percentuais, e inferencialmente através do teste de Kruskal-Wallis na

comparação entre os tempos de avaliação de cada material e de cada material por avaliação. No caso de diferenças significativas foram utilizadas testes de comparações múltiplas do referido teste.

A escolha do teste foi devido ao uso de escala ordinal e do número de repetições igual a quatro amostras em cada combinação de material e tempo de avaliação. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%. E o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 23.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do processo de nanoprecipitação e secagem por liofilização foram obtidas nanopartículas sólidas puras e carregadas com 30% de própolis vermelha alagoana. O aspecto macroscópico na forma de pó facilitou a dosagem e mistura com o material de capeamento (controle) e os materiais experimentais MTA + NPP50 e MTA + NPP100 apresentaram presa semelhante (figura 7).

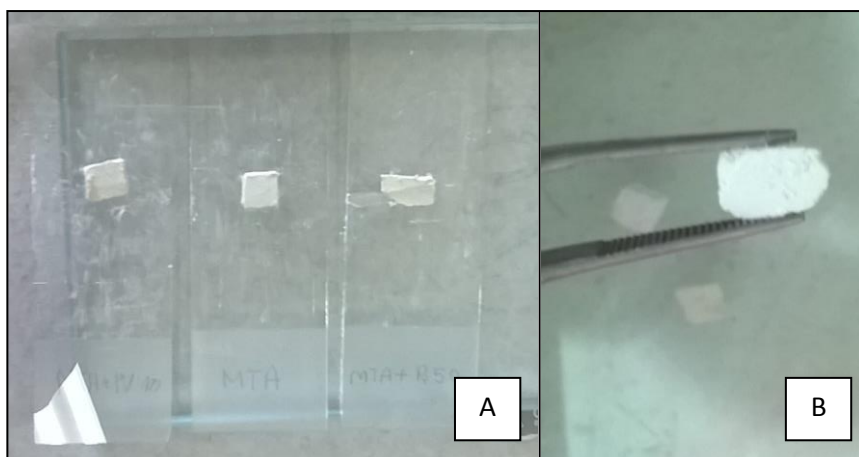


Figura 7 - Manipulação (A) e presa (B) dos materiais experimentais e controle.
Fonte: Autor

O cálculo da dose, possível pelo conhecimento da formulação utilizada, foi padronizado em 3,33mg de D1A ou D1B, ou seja, para diferentes concentrações de EBP a mesma proporção foi utilizada. As misturas MTA + NPP50 e MTA + NPP100, portanto tiveram proporção controlada de (9:1, m/m) e podemos supor que pelo fato de ter acrescentando NPP com o equivalente em peso de 10% de MTA, não foi suficiente para alterar suas propriedades físicas.

Alguns estudos, com o objetivo de melhorar a atividade antimicrobiana do MTA, têm acrescentado substâncias antimicrobianas para agregar esta característica (SHEN *et. al*, 2018). Isto representa uma possibilidade clínica importante para incrementar características biológicas e melhorar as propriedades de produtos ou materiais (SIQUEIRA *et. al*, 2017).

5.1. Análise qualitativa dos espectros de FTIR

Foi possível observar a incorporação de EBP, ao se analisar os espectros FTIR das NPP (Gráfico 1), pela presença de bandas típicas sugestivas de compostos aromáticos, flavonóides, presentes na própolis vermelha. As nanopartículas utilizadas na pesquisa foram previamente caracterizadas em estudo anterior e, portanto, escolhida a formulação que se apresentou melhor, tanto em relação à incorporação da própolis, quanto em relação ao formato e tamanho das partículas. Dessa forma, as caracterizações físicas de FTIR tiveram o intuito de confirmar que a formulação é facilmente reproduzível, obedecendo aos mesmos parâmetros mostrados anteriormente por NASCIMENTO e cols. (2016).

O gráfico 1A mostra deformação axial larga em 3336cm^{-1} , característica de hidroxila e típica de fenóis e bandas de absorção referentes a anéis aromáticos especialmente na região de baixa frequência entre 900 e 675cm^{-1} .

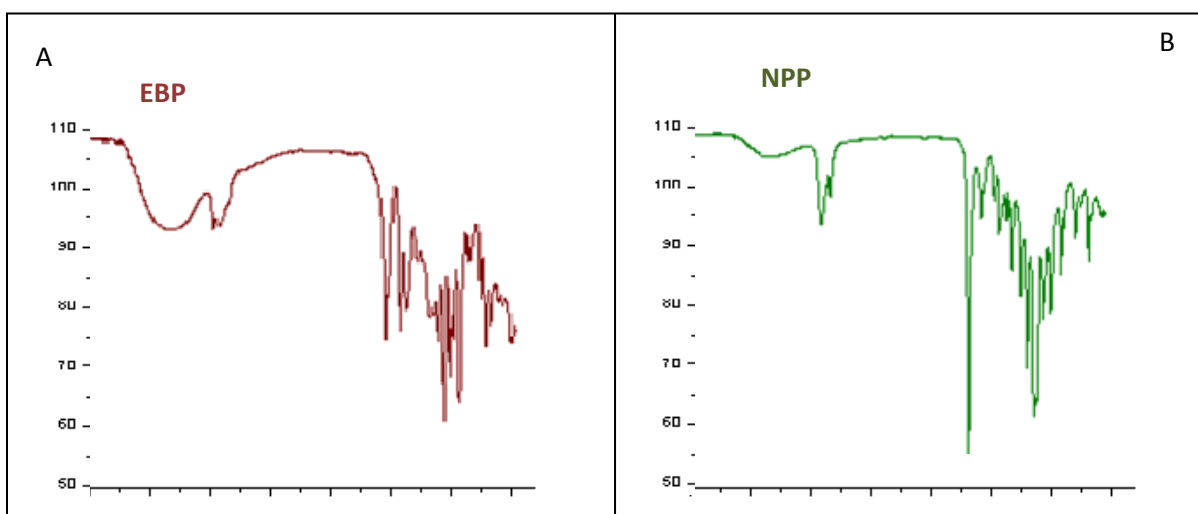


Gráfico 1- Espectros de extrato bruto de própolis vermelha (A) e de nanopartículas carregadas com própolis vermelha (B).

Em 1B, as principais bandas características do polímero foram identificadas, correspondentes aos grupamentos CH_2 , $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CO}$ e $\text{C}=\text{O}$ respectivamente em 2863cm^{-1} , 1464cm^{-1} e 1725cm^{-1} , como encontrado por Azevedo (2016).

Os espectros FTIR comprovaram que a exposição à radiação UV por 15 minutos não alterou as amostras (Gráfico 2). A descontaminação feita através de lâmpadas com comprimento de onda entre 100nm a 280nm tem se tornado uma alternativa para diminuir quantidade de bactérias em diversos produtos. Nesse estudo não foram observadas diferenças nas bandas características e, consequentemente nem antes nem após a exposição à luz UV, o que nos permite afirmar que o processo de descontaminação não alterou o produto (Gráfico 2).

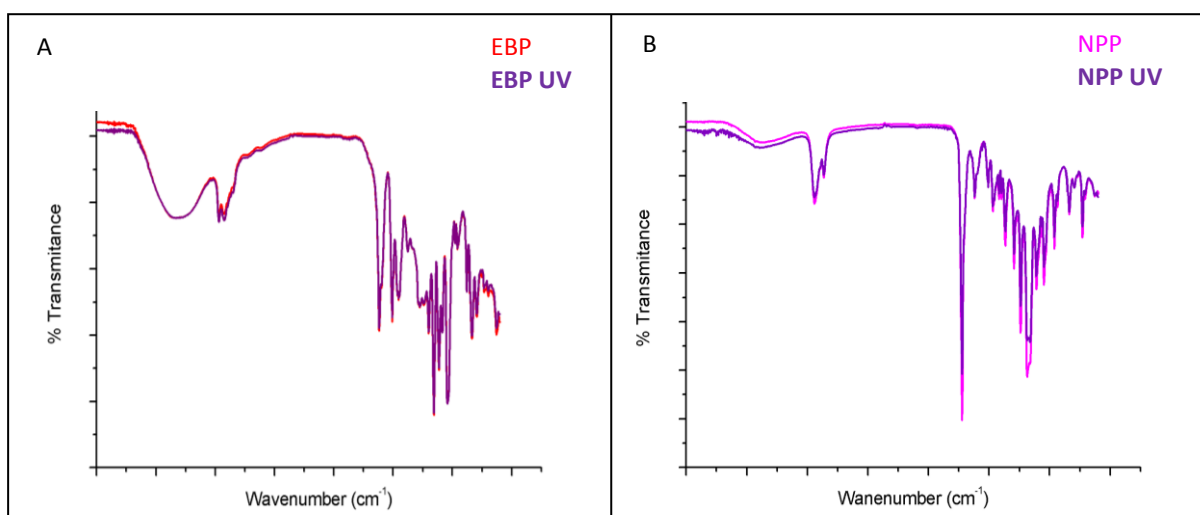


Gráfico 2 - Espectros FTIR de extrato bruto de própolis vermelha (A) e nanopartículas carregadas com própolis vermelha (B) antes e após a exposição à radiação UV.

A mistura MTA + NPP (pó) não interferiu nas características físicas do material como mostra a Figura 3. Mesmo após a manipulação com água destilada (pasta), os espectros do material mostram que também não houve alterações referentes aos picos característicos do MTA. Sugerindo que o acréscimo de NPPs não interferiram nas propriedades físicas após a hidratação necessária para a presa do material, conforme Gráfico 3.

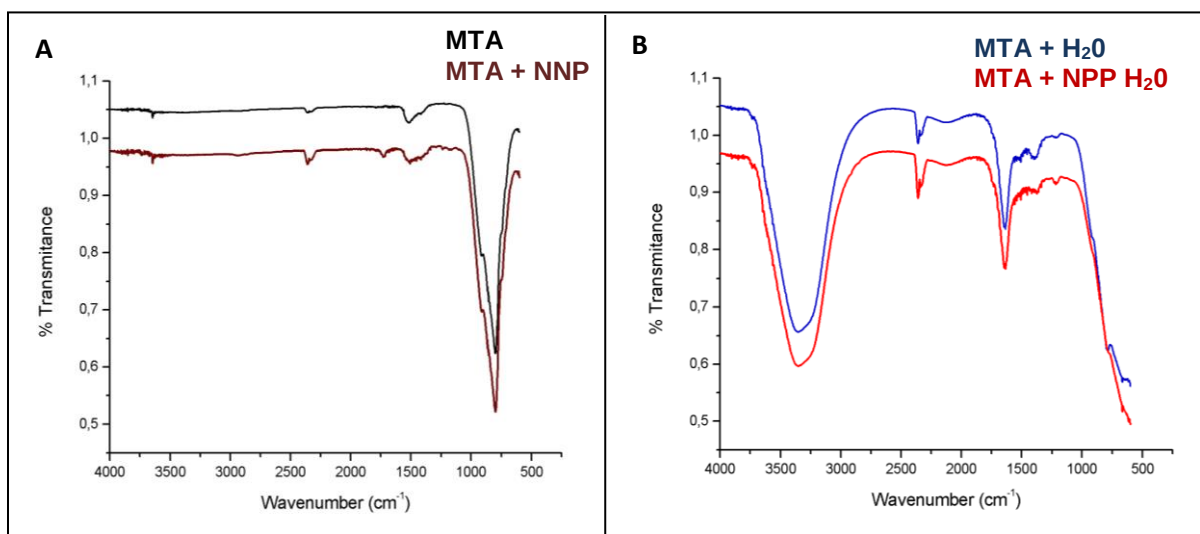


Gráfico 3 - Espectros de FTIR em antes (A) e após (B) manipulação dos agentes capeadores com água destilada.

5.2. Ensaio de citotoxicidade por MTT

O Gráfico 4 mostra a viabilidade celular, expressa em porcentagem, de macrófagos J774 A1. após exposição aos extratos de EBP, NP, MTA, NPP, MTA+NPP por 6h. Tanto o controle negativo (CN), quanto o controle positivo (lise), no qual as células foram expostas à triton para promover morte celular, comportaram-se como esperado, indicando adequabilidade do protocolo de manipulação do material e de exposição das células usados nesse teste.

De modo geral, o MTA induziu proliferação celular em todos os tempos testados confirmando a característica de biocompatibilidade deste material e corroborando com os achados de Araújo (2014) e Scelza *et al.* (2017).

As células expostas às nanopartículas puras também demonstraram o mesmo comportamento, confirmando seu potencial como veículo seguro para fármacos (Nascimento *et al.*, 2016).

Em 6h houve crescimento celular em todos os grupos, exceto CP e MTA + NPP (50:50) (97,69%). O EBP na concentração de 25µg apresentou maior taxa de sobrevivência que o controle, indicando uma possível proliferação celular. Comportamento semelhante ao observado no estudo de Mendonça *et al.* (2015).

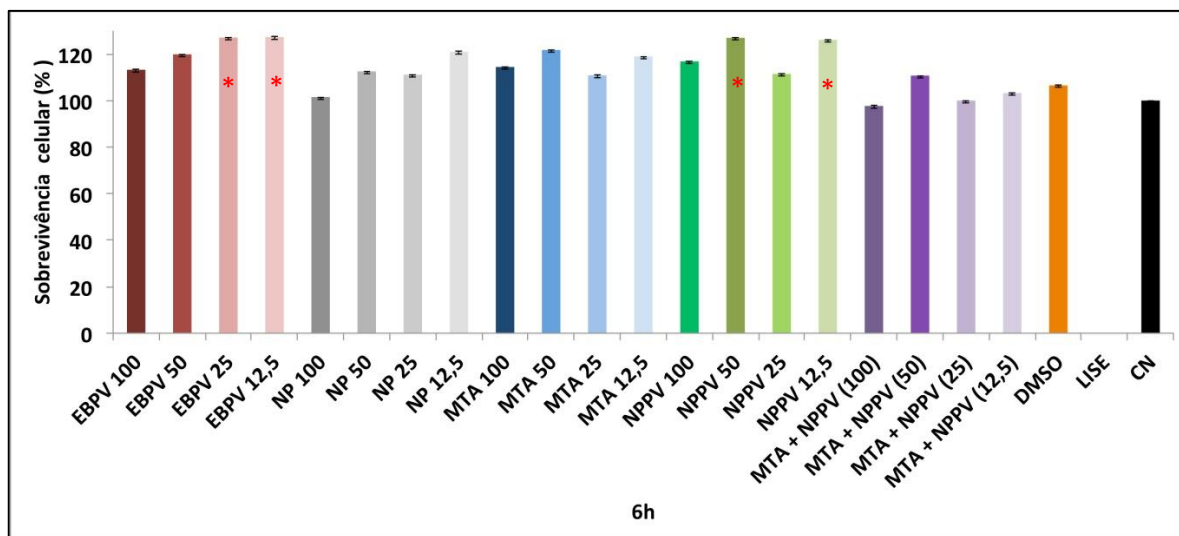


Gráfico 4-Viabilidade celular por MTT de macrófagos J774,A1 expressa em porcentagem de sobrevivência celular após exposição aos extratos de EB, NP, MTA,NPP, MTA+NPP por 6h. Dados submetidos ao teste F de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey, considerados significativos quando $*p<0,05$.

Os resultados após 12h mostraram que o EBP nas concentrações de 100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$ não foram citotóxicos e que, a concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ o EBP estimulou a multiplicação celular. Comportamento semelhante foi observado nos grupos NPP. Nenhum dos grupos associando MTA a NPP apresentou citotoxicidade (Gráfico 5).

Embora os grupos EPP 100 e MTA + NPP (50:50) tenha apresentado redução significativa ($P=0,023$), o percentual de células vivas manteve-se dentro dos limites de não toxicidade (71,67 e 78,49%, respectivamente) determinada pela ISO 10993, que considera citotóxico um material que provoque redução celular maior que 30% (RISS *et. al*, 2013).

Comparando-se com o controle negativo, notou-se que após 24h de contato com as células, somente EBP 100 apresentou toxicidade estatisticamente significativa (35,37% de células vivas). Uma discreta citotoxicidade foi observada nos grupos EBP 50 e NPP 100 que reduziram o percentual de sobrevivência em 33,62% e 31,18% (Gráfico 6). O grupo NPP 50 não foi citotóxico embora tenha sido observada uma redução de 28,75% no percentual de células vivas.

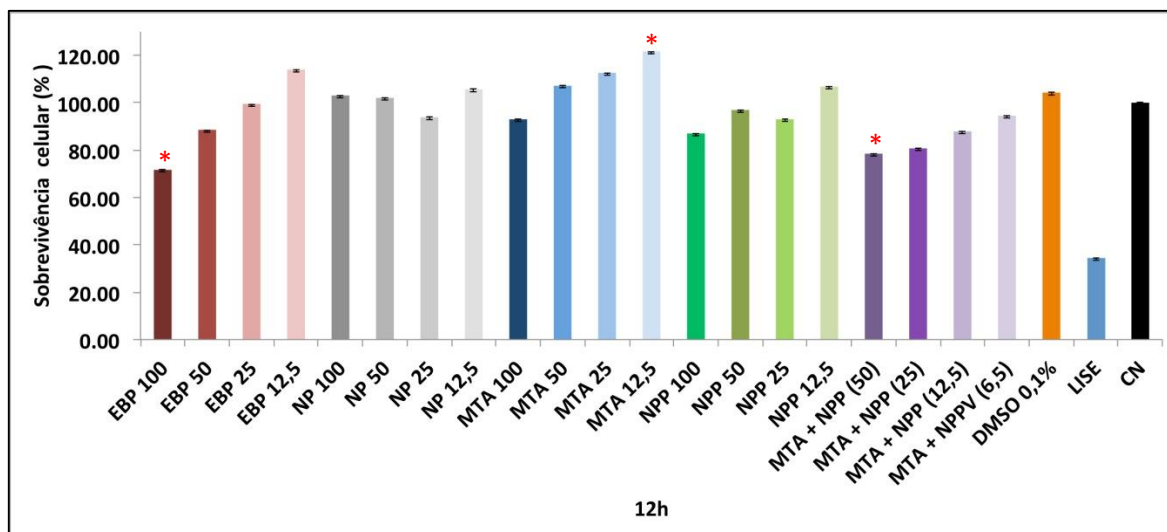


Gráfico 5 - Viabilidade celular por MTT de macrófagos J774, A1 expressa em porcentagem de sobrevivência celular após exposição aos extratos de EB, NP, MTA, NPP, MTA+NPP por 12h.

Dados submetidos ao teste F de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey, considerados significativos quando $*p < 0,05$.

Os resultados citotóxicos dos grupos NPP 100 e 50, moderado e discreto respectivamente, deste estudo não inviabilizam o ensaio clínico com estas concentrações, pois os estudos *in vitro*, embora sejam muito úteis na avaliação do potencial citotóxico dos materiais testados, não são capazes de reproduzir a realidade *in vivo* pela ausência dos componentes biológicos e fisiológicos do corpo humano que são somados às respostas celulares (PORTO *et al.*, 2011) e podem debelar os danos de menor intensidade.

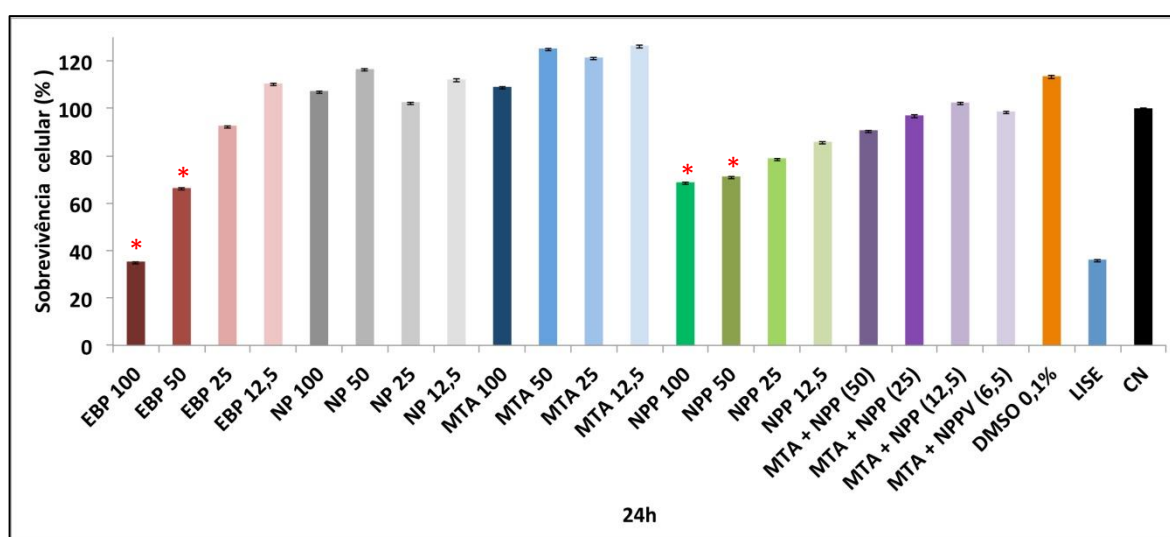


Gráfico 6 - Viabilidade celular por MTT de macrófagos J774, A1 expressa em porcentagem de sobrevivência celular após exposição aos extratos de EBP, NP, MTA, NPP, MTA+NPP por 24h.

Dados submetidos ao teste F de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey, considerados significativos quando $*p < 0,05$.

A avaliação de citotoxicidade é fundamental no processo de desenvolvimento de fármacos e, através de ensaios *in vitro*, é possível expor determinada cultura celular a um produto de interesse e analisar seu efeito direto na viabilidade destas células (VITRAL *et al.*, 2008). Nosso estudo observou a citocompatibilidade pré-clínica de todos os materiais utilizados na pesquisa.

Existe uma grande variedade de métodos para quantificar a viabilidade celular e a maioria dos estudos utiliza a atividade enzimática ou metabólica como marcador de atividade celular. Este estudo utilizou a técnica do metiltetrazolium (ensaio de MTT), largamente adotado e bem descrito na literatura (RISS *et al.*, 2016).

Este é um ensaio que apresenta alto grau de reprodutibilidade, baixo custo e rapidez de execução (VITRAL *et al.*, 2008). Trata-se de uma análise colorimétrica que detecta a atividade da enzima succinato desidrogenase produzida por células viáveis que convertem o sal de tetrazólio (MTT), de coloração amarela, em formazan, um produto de coloração violeta. A quantificação deste produto é diretamente proporcional ao número de células ativas, bem como a perda da habilidade na conversão de MTT em formazan é diretamente proporcional à morte celular. Desta forma, a leitura da coloração em espectrofotômetro serve como marcador de células viáveis (RISS *et al.*, 2016).

A biocompatibilidade é um pré-requisito indiscutível para materiais de capeamento direto, entretanto outras propriedades, como capacidade de estimular o crescimento e diferenciação celular e a formação de tecido mineralizado são também importantes no reparo pulpar.

5.3. Ensaio Clínico

Durante o período de recrutamento de participantes para o ensaio clínico realizado na FOUFAL, cerca de 80 pacientes foram avaliados, sendo considerados elegíveis 39 pacientes. Destes, cinco pacientes desistiram da participação e dois não puderam se adequar às exigências de controle da metodologia.

O tamanho da amostra foi igual a 60 terceiros molares hígidos de 32 pacientes saudáveis que obedeceram aos critérios de inclusão. A frequência quanto ao sexo foi maior de mulheres (68,75%) em relação a homens (31,25%) com idade

dos pacientes variando de 21 a 45 anos em mulheres e 22 a 42 anos em homens. Durante o período de intervenção nenhum paciente reportou sintomatologia ou desconforto.

5.4. Avaliação Histológica

Os resultados das três variáveis analisadas: resposta inflamatória, organização do tecido pulpar e presença de tecido mineralizado, segundo o material e o tempo de avaliação estão dispostos nas Tabelas de 1 a 3 e na figura 8. Não foram evidenciadas bactérias em nenhuma das amostras.

Resposta inflamatória

Na Tabela 1, verifica-se que não houve presença de abscesso em nenhum dos materiais testados em qualquer tempo de avaliação. De modo geral, a resposta inflamatória em 15 dias variou entre leve e moderado infiltrado inflamatório. Amostras com características de tecido normal foram evidenciadas apenas nos grupos contendo própolis e os grupos que mais apresentaram amostras com inflamação moderada foram MTA e NPP50, isoladamente.

Na avaliação com 45 dias, houve considerável melhora na resposta inflamatória, apresentando maior quantidade de amostras com características de tecido normal em todos os grupos, com exceção do MTA que a maioria das amostras ainda apresentava leve infiltrado inflamatório. Em 60 dias a resposta inflamatória manteve-se atenuada com a maior parte das amostras apresentando características de tecido normal. Nos grupos tratados com NPP 100 puro ou associado a MTA, entretanto, metade das amostras apresentaram leve infiltrado inflamatório. Para a margem de erro fixada (5%) se comprova diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de avaliação no material MTA, e através dos testes de comparações múltiplas (dois a dois) se comprova diferenças favorável significativas entre 15 e 60 dias. Não foram registradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os materiais em nenhum dos períodos de avaliação.

Tabela 1 - Avaliação da resposta inflamatória.

Material	Grau	Tempo de avaliação			Valor de p
		15 dias n (%)	45 dias n (%)	60 dias n (%)	
MTA		(A)	(AB)	(B)	$p^{(1)} = 0,045^*$
	0	-	1 (25,0)	3 (75,0)	
	1	1 (25,0)	2 (50,0)	1 (25,0)	
	2	3 (75,0)	1 (25,0)	-	
NPP50	3	-	-	-	$p^{(1)} = 0,073$
	0	1 (25,0)	3 (75,0)	3 (75,0)	
	1	-	1 (25,0)	1 (25,0)	
	2	3 (75,0)	-	-	
MTA + NPP50	3	-	-	-	$p^{(1)} = 0,455$
	0	1 (25,0)	3 (75,0)	3 (75,0)	
	1	3 (75,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	
	2	-	-	-	
NPP100	3	-	-	-	$p^{(1)} = 0,455$
	0	1 (25)	3 (75,0)	2 (50,0)	
	1	2 (50)	1 (25,0)	2 (50,0)	
	2	1 (25)	-	-	
MTA + NPP100	3	-	-	-	$p^{(1)} = 0,766$
	0	1 (25,0)	3 (75,0)	2 (50,0)	
	1	3 (75,0)	1 (25,0)	2 (50,0)	
	2	-	-	-	
Valor de p	3	-	-	-	$p^{(2)} = 0,154$
			$p^{(2)} = 0,442$	$p^{(2)} = 1,000$	

(*) Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1) Através do teste Kruskal-Wallis entre tempos de avaliação por material com comparações múltiplas do referido teste

(2) Através do teste Kruskal-Wallis entre os materiais por tempo de avaliação com comparações múltiplas do referido teste

Obs. Se as letras entre parênteses são todas distintas, comprova-se diferença significativa entre os tempos de avaliação correspondentes.

Organização do tecido pulpar

Dos resultados contidos na Tabela 2 se enfatiza que nenhum dos materiais causou necrose pulpar em nenhuma avaliação. Com 15 dias, a maioria dos grupos apresentou camada desorganizada de odontoblastos, mas tecido pulpar normal. Vale ressaltar que apenas nos grupos contendo própolis houve uma amostra com morfologia tecidual normal.

Na avaliação com 45 dias, todos os grupos apresentaram melhora na organização do tecido pulpar, e nos grupos contendo própolis evidenciou-se um número maior de amostras com melhores condições de reparo tecidual.

Ao final de 60 dias, houve completa reorganização tecidual em 85% das amostras e nos grupos que associaram MTA com NPP, independente da concentração, 100% das amostras apresentaram completa reorganização tecidual.

Entre os tempos avaliados, o grupo MTA foi o único que apresentou diferença significativa entre 15 dias e 45 e 60 dias ($p < 0,05$). Ao se comparar os outros materiais em função do tempo, não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

Tabela 2-Avaliação da organização do tecido pulpar.

Material	Grau	Tempo de avaliação			Valor de p
		15 dias n (%)	45 dias n (%)	60 dias n (%)	
MTA		(A)	(B)	(B)	$p^{(1)} = 0,020^*$
	0	-	1 (25,0)	3 (75,0)	
	1	1 (25,0)	3 (75,0)	1 (25,0)	
	2	3 (75,0)	-	-	
	3	-	-	-	
NPP50	0	1 (25,0)	3 (75,0)	3 (75,0)	$p^{(1)} = 0,073$
	1	-	1 (25,0)	1 (25,0)	
	2	3 (75,0)	-	-	
	3	-	-	-	
MTA + NPP50	0	1 (25,0)	3 (75,0)	4 (100,0)	$p^{(1)} = 0,200$
	1	3 (75,0)	1 (25,0)	-	
	2	-	-	-	
	3	-	-	-	
NPP100	0	1 (25,0)	3 (75,0)	3 (75,0)	$p^{(1)} = 0,358$
	1	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	
	2	1 (25,0)	-	-	
	3	-	-	-	
MTA + NPP100	0	1 (25,0)	3 (75,0)	4 (100,0)	$p^{(1)} = 0,200$
	1	3 (75,0)	1 (25,0)	-	
	2	-	-	-	
	3	-	-	-	
Valor de p		$p^{(2)} = 0,154$	$p^{(2)} = 0,703$	$p^{(2)} = 1,000$	

(*) Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1) Através do teste Kruskal-Wallis entre tempos de avaliação por material com comparações múltiplas do referido teste

(2) Através do teste Kruskal-Wallis entre os materiais por tempo de avaliação com comparações múltiplas do referido teste

Obs. Se as letras entre parênteses são todas distintas, comprova-se diferença significativa entre os tempos de avaliação correspondentes.

Formação de tecido mineralizado

Em relação à presença de tecido mineralizado a Tabela 3 mostra que: na avaliação com 15 dias em nenhum material houve formação completa de dentina reparadora. Entretanto os grupos MTA e MTA + NPP100 a maioria de suas amostras

apresentaram início de formação de barreira dentinária. Enquanto que no grupo MTA + NPP50 todas as amostras tecido mineralizado incompleto.

Tabela 3-Avaliação da presença de tecido mineralizado.

Material	Grau	Tempo de avaliação			Valor de p
		15 dias n (%)	45 dias n (%)	60 dias n (%)	
MTA		(A)	(B)	(B)	$p^{(1)} = 0,024^*$
	0	-	-	-	
	1	-	3 (75,0)	4 (100,0)	
	2	3 (75,0)	1 (25,0)	-	
NPP50	3	1 (25,0)	-	-	$p^{(1)} = 0,012^*$
		(A)	(B)	(B)	
	0	-	-	-	
	1	-	3 (75,0)	4 (100,0)	
MTA + NPP50	2	1 (25,0)	1 (25,0)	-	$p^{(1)} = 0,006^*$
	3	3 (75,0)	-	-	
		(A)	(B)	(B)	
	0	-	-	-	
NPP100	1	-	4 (100,0)	4 (100,0)	$p^{(1)} = 0,006^*$
	2	4 (100,0)	-	-	
	3	-	-	-	
		(A)	(B)	(B)	
MTA + NPP100	0	-	-	-	$p^{(1)} = 0,006^*$
	1	-	4 (100,0)	4 (100,0)	
	2	2 (50,0)	-	-	
	3	2 (50,0)	-	-	
Valor de p		$p^{(2)} = 0,414$	$p^{(2)} = 1,000$	$p^{(2)} = 1,000$	

(*) Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1) Através do teste Kruskal-Wallis entre tempos de avaliação por material com comparações múltiplas do referido teste

(2) Através do teste Kruskal-Wallis entre os materiais por tempo de avaliação com comparações múltiplas do referido teste

Obs. Se as letras entre parênteses são todas distintas, comprova-se diferença significativa entre os tempos de avaliação correspondentes.

Na avaliação com 45 dias em todos os grupos houve formação completa de tecido mineralizado, ocorrendo em 100% das amostras nos grupos MTA + NPP50, MTA + NPP100 e NPP100.

Em 60 dias todas as amostras apresentaram tecido mineralizado completo na região da exposição pulpar. Foram registradas diferenças significativas entre os três tempos de avaliação em cada um dos materiais, sendo verificadas diferenças significativas entre 15 dias e demais tempos de avaliação. Não foram verificadas

diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os materiais em nenhuma das três avaliações.

Ensaio clínicos randomizados e controlados são considerados como a melhor fonte de evidência científica (ESCOSTEGUY, 1999) e a análise de dados clínicos e histológicos representam o padrão de investigação para eficácia de materiais com potencial para capeamento pulpar direto (NOWICKA, 2016).

Por se classificar em estudo clínico Fase I, que visa principalmente garantir a segurança de uso terapêutico propondo uma dose não tóxica, são requeridos de 20 a 80 indivíduos saudáveis (ESCOSTEGUY, 1999), visto que alterações sistêmicas ou teciduais poderiam confundir a resposta terapêutica aos materiais testados.

Em nosso estudo 60 dentes hígidos foram aleatoriamente divididos em 15 grupos. Não foi empregado cálculo amostral, uma vez que, considerando-se a metodologia empregada e a literatura científica para estudos semelhantes (BITTAR, 2010; PAROLIA, 2010), quatro dentes por grupo de investigação é um número suficiente, para proporcionar a dispersão dos dados em torno da média e obter conclusões pertinentes à situação pesquisada.

Tendo em vista as comprovadas atividades biológicas da própolis, este produto tem sido testado quanto ao seu potencial dentinogênico, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* em animais e humanos (BITTAR, 2010; MORADI *et. al*, 20115; ZAREI *et. al*, 2015; EL-TAYEB *et. al*, 2019; KASSUM; RAKESH; RICHA, 2015; PAROLIA, 2010; NOWICKA, 2016).

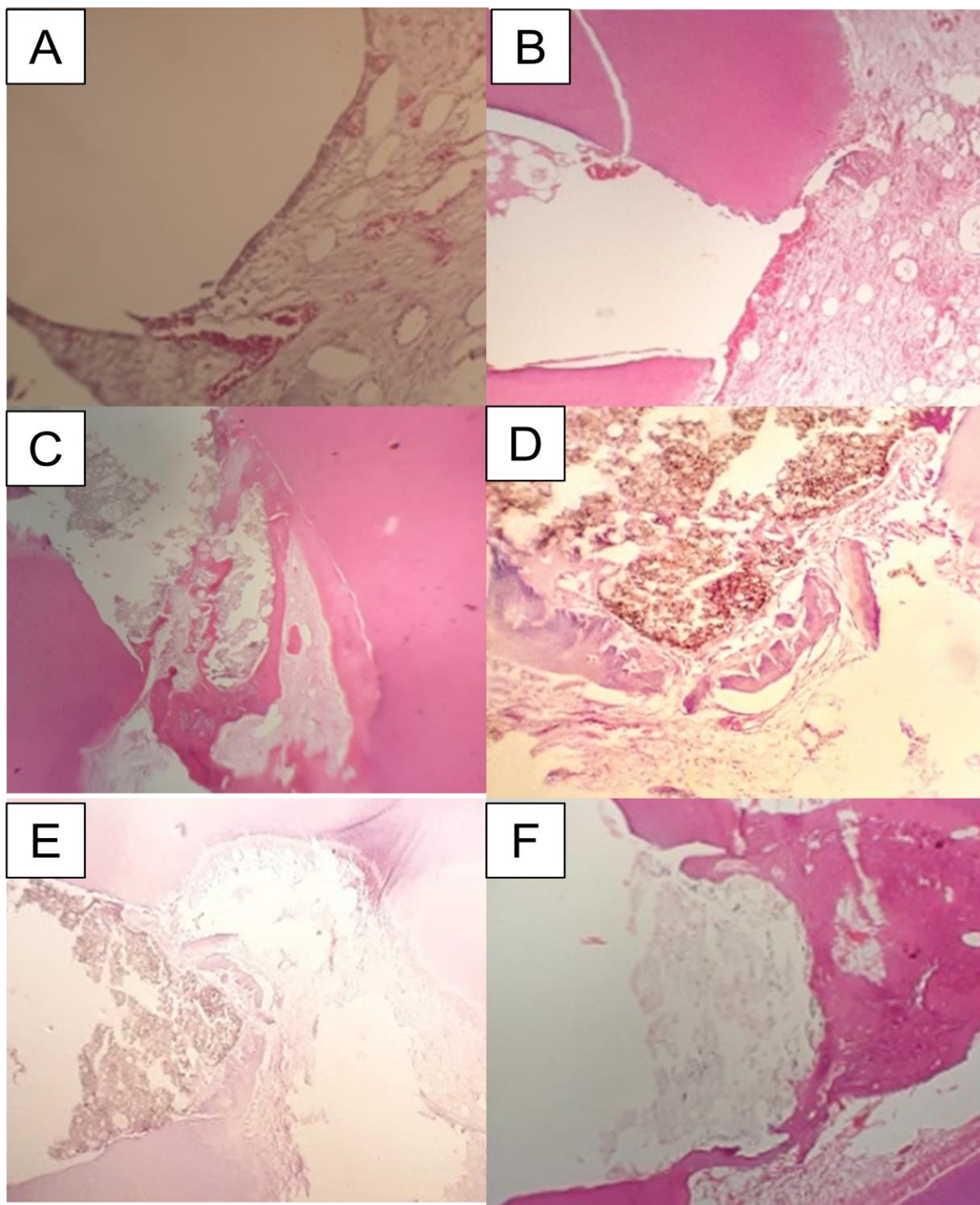
Entretanto, não foi observado na literatura o uso de nanopartículas poliméricas carregadas com própolis vermelha utilizada com este intuito, sendo considerado nosso trabalho inédito por apresentar porção controlada de 100µg e 50µg de EBP através de sistemas nanocarreadores.

Em nosso estudo, as NPP foram capazes de formação de tecido mineralizado apresentando comportamento clínico semelhante ao MTA, padrão-ouro no capeamento pulpar, corroborando com Parolia *et.al*, (2010).

Para selamento provisório durante o tempo de preservação foi utilizado cimento de ionômero de vidro por suas propriedades físicas e, especialmente por sua afinidade química com os tecidos dentários promovendo selamento hermético da cavidade terapêutica (ANUSAVICE, 2013), o que foi confirmado pela ausência de bactérias nas lâminas obtidas.

Futuras pesquisas podem ser desenvolvidas para estudar o mecanismo de ação antiinflamatória e antibiótica das NPP em polpas humanas não saudáveis, visto que foi confirmada a segurança clínica para ensaios *in vivo*.

Figura 8 - Capeamento pulpar direto em dentes humanos



Polpa evidenciando leve infiltrado inflamatório, hiperemia vascular, camada desorganizada de odontoblastos e nenhuma evidência de tecido mineralizado após 15 dias de capeamento com MTA+NPP100 (7A). Moderado infiltrado inflamatório, hiperemia, camada de odontoblastos desorganizada e ausência de tecido mineralizado após 15 dias de capeamento pulpar com MTA (7B). Tecido pulpar normal, camada desorganizada de odontoblastos e tecido mineralizado não contínuo após 45 dias de capeamento com MTA + NPP50 (7C). Leve infiltrado inflamatório, camada de odontoblastos desorganizada e não contínua formação de tecido mineralizado em 45 após capeamento com NPP100 (7D). Formação contínua de tecido mineralizado após 60 dias em polpas tratadas com MTA (7E) e NPP50 (7F).

6 CONCLUSÃO

As nanopartículas poliméricas carregadas com própolis vermelha de alagoas apresentaram comportamento clínico semelhante ao MTA, padrão-ouro no capeamento pulpar, foram biocompatíveis e induziram formação de tecido mineralizado.

Além disso, o uso das NPP's diretamente sobre tecido conjuntivo exposto, sem causar necrose tecidual, amplia as possibilidades de uso terapêutico para além do campo odontológico, comprovando ser este material seguro para uso clínico e oferecer atividades biológicas como antibacteriana e antiinflamatória provenientes da PVB importantes no processo de reparo tecidual.

REFERÊNCIAS

- AGNELLI, P. B. Variação do índice de CPOD do Brasil no período de 1980 a 2010. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 72, n1, p. 10-15, 2015.
- ALMEIDA, E. B. et al. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 419–425, 2013.
- ANUSAVICE, K. **Phillips Materiais Dentários**, 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.
- ARAÚJO, L. B. **Avaliação da proliferação, migração e diferenciação de células tronco pulpares após tratamento com MTA, hidróxido de cálcio ou biodentine**. Dissertação (Mestre em Ciências Odontológicas) – Universidade Federal de Alfenas. Alfenas, 2014.
- AZEVEDO, L. F. **Estudo comparativo de nanocarreadores poliméricos carregados com extrato de própolis vermelha: preparação, caracterização e atividade leishmanicida**. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas, 2016.
- BARRETTO, E. S. Treatment options from our winged friends: a review on propolis and its potential applications in dentistry. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological And Chemical Sciences**, v. 5, n. 3, 2014.
- BATH-BALOGH, M; FEHRENBACH, M. J. **Anatomia, histologia e embriologia dos dentes e das estruturas orofaciais**, 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- BRASIL. **Lei 9.279/96**, de 14 de maio de 1996. Dispõe sobre direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Disponível em: www.inpi.gov.br/legislacao/conteudo/lei.htm. Acesso em: 10 jan. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. I.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. **Técnica de Coloração de Gram**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.
- BITTAR, J. D. **Avaliação da resposta pulpar a diferentes materiais odontológicos após capeamento direto. Estudo ex vivo**. Dissertação (Mestre em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília. Brasília, 2010.
- BURT, B. A.; BAELUM; FEJERSKOV, O. A epidemiologia da cárie dentária. IN: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. 2 ed, p. 123-141. Santos: São Paulo, 2011.
- CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, 1523-1527, 2009.

CARVALHO, C. N.; *et. al.* Possibilidades terapêuticas no tratamento de dentes jovens portadores de polpa viva: uma revisão da literatura. **Rev. Ciênc. Saúde**, v. 1, n. 14, p. 40-52, jan-jun, 2012.

CHEN, C. L. *et al.* Comparative evaluation of the effectiveness of desensitizing agents in dentine tubule occlusion using scanning electron microscopy. **Australian Dental Journal**, v. 60, n. 1, p. 65-72, 2015.

CHIBINSKI, A. C. R.; CZLUSNIAK, G.D. Utilização do agregado trióxido mineral (MTA) em pulpotomias de dentes decíduos: relato de caso. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, v. 9, n. 3, p. 21-27, 2003.

CHISINI, I. A. *et al.* Vital Pulp Therapies in Clinical Practice: Findings from a Survey with Dentist in Southern Brazil. **Brazilian Dental Journal**, v. 26, n. 6, p. 566-571, 2015.

COSTA, A. S. *et al.* Levantamento dos estudos com a própolis produzida no estado da Bahia. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13: 10.13102/scb324, 2014.

FEJERSKOV, O.; NYVAD, B.; KIDD, E. A. M. Cárie dentária: o que é? IN: FEJERSKOV, O; KIDD, E. A. M. **Cárie Dentária: A doença seu tratamento clínico**, 2 ed. São Paulo: Santos, 2011.

FERRARIS, M. E. G.; MUÑOZ, A. C. **Histologia e Embriologia Bucodental**, 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

FERREIRA, C. T. G. **Nanopartículas poliméricas para inclusão de compostos de origem natural**. Monografia (Graduação em Farmácia) – Instituto Federal do Rio de Janeiro. 2013.

GIMÊNEZ, T.; *et. al.* Does the decline in caries prevalence of latin America and Caribbean children continue in the New Century? Evidence from Systematic Review with Meta-Analysis. **Plos one**, v.11, n. 10, p. 1-14, 2016.

HEGDE, S. *et al.* Clinical evaluation of mineral trioxide aggregate and biodentine as direct pulp capping agents in carious teeth. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 20, n. 2, p. 91-95, 2017.

HUMPHREY, L. T., *et. al.* Earliest evidence for caries and exploitation of starchy plant foods in Pleistocene hunter-gatherers from Morocco. **PNAS**, v. 111, n. 3, p. 954–959, 2014.

HARGREAVES, K.; BERMAN, L. H. **Caminhos da Polpa**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

INPI. **Instituto Nacional da Propriedade Industrial**. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br>. Acesso em: 24 abr. 2015.

INOJOSA, I. F. A. J. Isolamento Absoluto em Endodontia. IN: SIQUEIRA, Jr. J.F; LOPES, H.P. **Endodontia: Biologia e Técnica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Guanabara Koogan;p.177-186, 2015.

JACOB, A. *et al.* The effects of Malaysian propolis and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. **BMC Complementary and alternative medicine**, n. 15, 2015.

KASSEBAUM, N.J.; *et al.* Global Burden of Untreated Caries: A Systematic Review and Metaregression. **Journal of Dental Research**, p.1-9, 2015.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral** – texto, atlas e correlações clínicas, 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

LAVÔR, M. L. T. *et al.* Uso de hidróxido de cálcio e MTA na Odontologia: conceitos, fundamentos e aplicação clínica. **SALUSVITA**, v. 36, n. 1, p. 99-121, 2017.

LIU, J. *et al.* Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, 2015. Disponível em: <https://stemcells.journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/stem.1909>. Acesso em: 22 out. 2018.

LUKKO; KETTUNEN; FRISTAD. IN: HARGREAVES, KENNETH M.; BERMAN, LOUIS H. **Caminhos da Polpa**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

MACHADO, A. C. P. **Aplicações do Agregado Trióxido Mineral (MTA) em Endodontia**. Dissertação (Mestre em Medicina Dentária) – Universidade Fernando Pessoa. Porto. 2014.

MENDONÇA, I. C. G. *et al.* Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 357, p. 1-12, 2015.

MOLERI, A.B.; MOREIRA, L.C.; RABELLO D.A. O Complexo dentino-pulpar. In SIQUEIRA, Jr. J.F; LOPES, H.P. **Endodontia: biologia e técnica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

MONARI, V.; ARSATI, Y. B. O. L.; RODRIGUES, J. A. Avoiding pulp exposure in deep caries lesions: step wise excavation technique. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 59, n. 4, p. 633-638, 2011.

NANCI, A. **Ten Cate, Histologia Oral**, 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

NASCIMENTO, T. G. do; Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, p. 301, 2016.

NASCIMENTO, T. G. *et al.* Patentes e apropriação de valor da inovação: o caso da própolis. **Caderno de Prospeção**, v.11, n. 1, p. 87-102, 2018.

NOWICKA, A. *et al.* Clinical and histological evaluation of direct pulp capping on human pulp tissue using a dentin adhesive system. **Biomed Research International**, v. 2016. Disponível em [dx.doi.org/10.1155/2016/2591273](https://doi.org/10.1155/2016/2591273). Acesso em: 22 out. 2018.

OLIVEIRA, R. S.; MORAIS, H. M. M.; GOES, P. S. A. A prática odontológica ontem e hoje: origens e desenvolvimento da assistência odontológica no Brasil. IN: GOES, S. **Gestão da prática em saúde bucal**, p. 13-24, Artes médicas: São Paulo, 2014.

PAROLIA, A. et al. A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. **Australian Dental Journal**, v. 55, p. 59-64, 2010.

PINTO, L. M. A.; PRADO, N. R. T.; CARVALHO, L. B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.8, n. 3, p. 76-100, 2011.

PORTO, I. C.C.M. et. al. Cytotoxicity of current adhesive systems: In vitro testing on cell cultures of primary murine macrophages. **Dental Materials**, v.27, p. 221–228, 2011.

PORTO, I. C. C. M. et al. Mechanical and aesthetics compatibility of Brazilian red Propolis micellar nanocomposite as a cavity cleaning agent. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 219, 2018.

RAMADAN, Y. H.; KOLTERMANN, A. P.; PIOVESAN, C. Cárie dentária em crianças brasileiras: tendência e polarização. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 15, n. 1, p. 137-146, 2014.

REHER, V. G. S.; REHER, P. Introdução à Anatomia Dental Humana. IN: TEIXEIRA, L. M. S.; REHER, P.; REHER, V. G. S. **Anatomia Aplicada à Odontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 246-253, 2008.

RISS, TL, et al. Cell Viability Assays. 2013. In: SITTAMPALAM, GS et al. **Assay Guidance Manual**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

RODAS-JUNCO, B. A. et al. Stem Cells from Dental Pulp: What Epigenetics Can Do with Your Tooth. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5724083/>. Acesso em: 22 de outubro de 2018.

SANKARI SL, B. N. A; RANI, V; PRIYADHARSINI, C; MASTHAN, K. Flavonoids - Clinical effects and applications in dentistry: A review. **J Pharm Bioall Sci**, v. 6, p26-9, 2014;

SCELZA, M. Z. et al. Biodentine is cytocompatible with primary osteoblasts. **Brazilian Oral Research**, v. 31, n. e81, 2017.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potencial for the desenvolvimento of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, n.133, p. 253-260, 2011.

SILVA, P. B. B.; UCHÔA, S. B. B.; TONHOLO, J. Mapeamento Tecnológico da Própolis Vermelha do Estado de Alagoas – PVA. **Caderno de Prospeção**, v.9, n.1, p. 30-37, 2016.

SHEN, Y., *et al.* Mineral trioxide aggregate mixed with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic antimicrobial strategy in hard tissue regeneration. **Materials**, v. 11, n. 1734, 2018.

SIQUEIRA, A. L. *et al.* Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. **Rev Odontol UNESP**, v. 43, n. 6, p. 359-366, nov-dec, 2014.

SIQUEIRA, P.C. *et al.* Propriedades antimicrobianas e físico-químicas do cimento portland associado a diferentes concentrações de óxido de cálcio. **Ver. Odontol. Bras. Central**, v. 26, n. 77, p. 20-25, 2017.

SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS; LOPES, H. P. Biologia Pulpar e Perirradicular. IN: SIQUEIRA, Jr. J.F; LOPES, H.P. **Endodontia: Biologia e Técnica**, 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Guanabara Koogan;p.1-45, 2015.

STRINGHINI JUNIOR, E. *et al.* Evidências científicas atuais sobre a terapia pulpar de dentes decíduos. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**,v. 68, n. 3, p. 259-262, 2014.

USKOKOVIC, V; BERTASSONI, L. E. Nanotechnology in Dental Sciences: Moving towards a finerway of Doing Dentistry. **Materials**, v. 3, p. 1674-1691, 2010.

VITRAL, J. C. A. *et al.* Avaliação da Citotoxicidade de Materiais Odontológicos Através do Método de MTT e Produção de Óxido Nítrico: Descrição de uma Técnica. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 8, n. 3, p. 359-365, 2008.

VIVAN, R. R. *et al.* Ph e liberação de cálcio de materiais forradores. **Rev. Odontol. Bras. Central**, v. 21, n. 58, p. 548-552, 2012.

WEBER, C. M.; ALVES, L. S.; MALTZ, M. M. Treatment decisions for deep carious lesions in the Public Health Service in Southern Brazil. **Journal of Public Health Dentistry**, v. 71, n. 4, 2011.

YADAV, R; YADAV, S. K. Dental disease and its cure: a review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.6, n. 2, p. 16-20, 2013.

ZAFALON, E. J. **Ação anti-inflamatória e citotoxicidade sobre células íntegras e tumorais da apigenina e TT-farnesol**. Dissertação (Doutor em Saúde e Desenvolvimento) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande. 2012.

APÊNDICE A – TERMODE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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"

Eu¹,....., tendo sido convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo "Avaliação das Propriedades Biológicas da Própolis Vermelha no Capeamento Pulpar Direto: ensaio clínico randomizado duplo-cego", que será realizado na Clínica de Odontologia da UFAL, recebi da Profa. Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto², pesquisadora responsável pela pesquisa, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- 1) Que o estudo se destina a investigar a resposta do tecido pulpar humano ao capeamento com nanopartículas poliméricas carregadas com própolis vermelha de Alagoas.
- 2) Que a importância deste estudo é testar se a própolis vermelha alagoana ajuda na recuperação do dente com a polpa exposta, diminuindo a inflamação, a dor e formando dentina (parte interna do dente) no local.
- 3) Que os resultados que se desejam alcançar são aproveitar os benefícios da própolis como produto natural e de baixo custo no tratamento da exposição pulpar, evitando o tratamento de canal e prolongando a permanência do dente na boca.
- 4) Que este estudo começará em março de 2018 e terminará em dezembro de 2018.
- 5) Que eu participei do estudo recebendo uma restauração provisória no dente que foi indicado para extração pelo meu Dentista. Que 15, 45 ou 90 dias depois da restauração, o meu dente que será extraído na Clínica de Odontologia da UFAL. 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 questão;
- 6) Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental são: a) sentir-me constrangido com a presença da pesquisadora dentro do consultório quando for fazer minha extração; b) ficar angustiado em relação ao que vai ser feito com meu dente; c) sentir-me preocupado com a possibilidade de exposição de informações referentes a extração que realizei; e; d) preocupar-me com o risco de vir a sentir dor durante a realização e/ou após a extração de meu dente.
- 7) Que os pesquisadores adotarão medidas para minimizar os riscos: esclarecendo o sujeito da pesquisa que a pesquisadora também é dentista, e caso eu continue constrangido, a pesquisadora se retirará da sala enquanto ocorre o procedimento. A abordagem terapêutica será realizada 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. Serei esclarecido, também, sobre todo o procedimento a ser realizado com meu dente. Os efeitos relativos à cirurgia para remoção do elemento dental não serão dependentes do estudo, uma vez que, esta já estaria 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. Receberei uma receita médica e analgésicos, para usar se sentir dor após a realização do procedimento.
- 8) Que apesar da extração a que serei submetido venha ser realizada por um dentista da clínica de odontologia da UFAL e não pela pesquisadora, terei garantida a assistência por parte da pesquisadora Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto, com telefone e endereço disponibilizado neste documento, para me assegurar assistência sempre que necessário.
- 9) Que não terei benefício imediato, uma vez que a cirurgia para remoção de meu dente já estava planejada, independente, portanto da realização dessa pesquisa. Como benefício direto da pesquisa (após a

intervenção), terei um abrandamento da sensibilidade pós-operatória e um maior conforto pela redução dos sintomas à ela relacionados, uma vez que, comprovadamente, a própolis tem ação antiinflamatória, antimicrobiana e cicatrizante. O provável benefício futuro que poderei esperar com minha participação é, caso os resultados dessa pesquisa sejam favoráveis, poderei me beneficiar e beneficiar a comunidade no futuro. Como benefício indireto, estarei colaborando para o desenvolvimento de um material natural para uso odontológico com alguns princípios ativos que não podem ser sintetizados em laboratório, com propriedades comprovadas em estudos anteriores, com melhor custo e, portanto, mais acessível à população de baixa renda. 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 a Própolis Vermelha Alagoana a partir dos resultados desse estudo;

10) Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo;

11) Que, a qualquer momento, eu poderei me recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;

12) Que as informações conseguidas através de minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais participantes da pesquisa;

Finalmente, tendo eu 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 implica, concordo em dela participar com a doação do meu dente e, para tanto eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO, assinando esse TCLE em duas vias e rubricando todas as folhas.

1

Assinatura ou impressão datiloscópica
d(o,a) voluntário(o,a) ou responsável legal
(rubricar as demais folhas)

2

Assinatura do responsável pelo Estudo
(rubricar as demais folhas)

Maceió, _____ de _____ de _____

Nome e Endereço do Pesquisador Responsável:

Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto
Faculdade de Odontologia - Universidade Federal de Alagoas
Campus AC Simões, Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins, CEP: 57072-970
Maceió, Alagoas, Brasil. Telefone: 55 82 9128 0635

Instituição:

Universidade Federal de Alagoas, Campus AC Simões, Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins,
CEP: 57072-970, Maceió, Alagoas, Brasil. Telefone: 82 3214 6714

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas, dirija-se ao Comitê de Ética em Pesquisa e Ensino (COEPE) da Universidade Federal de Alagoas, Prédio da Reitoria, 1º Andar, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária. Telefone: (82) 3214-1041

1ª via do participante

2ª via do pesquisador

Endereço d(o,a) participante voluntári(o,a):

Domicílio: (rua, praça, conjunto)
Bloco: n°: Complemento:
..... Bairro:
CEP: Cidade: Telefone:
Ponto de referência:

Contato de Urgência d(o,a) participante voluntári(o,a):

Sr(a):
Domicílio: (rua, praça, conjunto)
Bloco: n°: Complemento:
..... Bairro:
CEP: Cidade: Telefone:
Ponto de referência:

APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA ODONTOLÓGICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Pesquisa: Avaliação das Propriedades biológicas da Própolis Vermelha no
Capeamento Pulpal Direto: ensaio clínico randomizado duplo-cego.
Pesquisadora Responsável: Profa. Dra. Isabel C C de Mores Porto

FICHA CLÍNICA

Prontuário nº	Nome		Data de Nascimento
RG/Órgão Expedidor	CPF	Sexo	Naturalidade
Cartão SUS	Profissão	Telefone	

ANAMNESE

Questionário de Saúde	Sim/Qual(is)/Frequência	Não
Sofre de alguma doença?		
Está em tratamento médico atualmente?		
Nome do médico:	Telefone:	
Está fazendo uso de alguma medicação?		
Está grávida?		
Já teve alergia?		
Já foi hospitalizado?		
Já fez transfusão sanguínea?		
Algum problema em relação à anestesia?		
Algum problema em relação à cicatrização?		
Já houve episódio de hemorragia?		
Costuma sofrer desmaios?		
Fuma?		
Bebe?		

Sofre de alguma das seguintes doenças?				Sim	Não
Febre Reumática		Sim	Não		
Diabetes		Problemas Renais		Sim	Não
Anemia		Problemas Respiratórios			
Hepatite		Problemas Cardíacos			
Tuberculose		Problemas Gástricos			
HIV		Problemas Alimentares			
		Hipertensão Arterial			

Declaro que as informações prestadas acima são verdadeiras.

Autorizo os procedimentos odontológicos, fotos e radiografias, necessárias para a realização da pesquisa a qual me voluntariei espontaneamente.

Local e Data

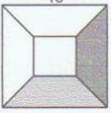
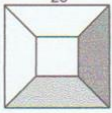
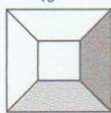
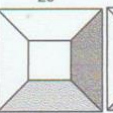
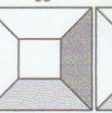
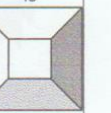
Assinatura do paciente ou responsável

FICHA ODONTOLÓGICA

EXAME FÍSICO

ODONTOGRAMA

PERIOGRAMA

18	28	18	28	38	48
					
48	38				
		PS			
		MV			
		DV			
		ML			
		DL			
		Teste ao frio			

H - hígido;
C - cárie;
MB - mancha branca;
R - restaurado;
EI - exodontia indicada

SG - sangramento gengival à sondagem
PS - profundidade da sondagem
BP - bolsa periodontal
MD - mobilidade dentária

PROCEDIMENTOS CLÍNICOS

DATA	PROCEDIMENTO REALIZADO	RETORNO	DENTE
			CÓDIGO

Assinatura d(o,a) pesquisador(a):

DATA	PROCEDIMENTO REALIZADO	RETORNO	DENTE
			CÓDIGO

Assinatura d(o,a) pesquisador(a):

DATA	PROCEDIMENTO REALIZADO	RETORNO	DENTE
			CÓDIGO

Assinatura d(o,a) pesquisador(a):

DATA	PROCEDIMENTO REALIZADO	RETORNO	DENTE
			CÓDIGO

Assinatura d(o,a) pesquisador(a):

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

ANUP239

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Resposta da polpa dental ao capeamento direto com nanopartículas poliméricas carregadas com própolis vermelha de Alagoas

Pesquisador: ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57993216.3.0000.5013

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.875.464

Apresentação do Projeto:

Resumo:

A base da odontologia restauradora repousa sobre o princípio de que a manutenção do complexo dentina-polpa saudável e resultaria do sucesso do tratamento da polpa exposta. Como outro tecido conjuntivo, a polpa tem o potencial de cicatrização. Características do processo de cicatrização do tecido pulpar exposto incluem reorganização do tecido mole lesionado, diferenciação celular e reparação da dentina perdida com formação da ponte de dentina. Os produtos naturais, como a pópolis, acenam com as vantagens de serem mais baratos e produzirem efeitos adversos mais brandos, como também, o fato de que alguns compostos originários de plantas não podem ou nunca foram sintetizados. Objetivo: Investigar a resposta de tecido pulpar humano ao capeamento com nanopartículas poliméricas carregadas com própolis vermelha de Alagoas. Materiais e métodos: Serão utilizados 72 dentes pré-molares humanos hígidos, extraídos por razões terapêuticas, divididos em grupos (n=4) de acordo com a substância a ser utilizada e o tempo de avaliação: Grupo I- 1 mg nanopartículas poliméricas carregadas com 30 % de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas (300 µg de EEP); Grupo II- 0,66 mg nanopartículas poliméricas carregadas com 30 % de

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A. C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



Continuação do Parecer: 1.875.464

extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas (200 µg de EEP); III-0,33 mg nanopartículas poliméricas carregadas com 30 % de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas (100 µg de EEP); Grupo IV-0,17 mg nanopartículas poliméricas carregadas com 30 % de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas (50 µg de EEP); Grupo V- 0,08 mg nanopartículas poliméricas carregadas com 30 % de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas (50 µg de EEP); Grupo VI Hidróxido de cálcio PA + Hidróxido de cálcio pasta (Dycal, Dentsply). As cavidades serão fechadas com cimento de ionômero de vidro (GC Fuji II LC, GC) O hidróxido de cálcio é a terapia padrão para exposição pulpar e nesse estudo representará o grupo controle. Decorridos 15, 45 e 90 dias após os procedimentos operatórios, os dentes serão extraídos e processados para análise histológica. Serão confeccionadas 2 lâminas de cada espécime e coradas por Hematoxilina-Eosina (H/E) e Brown-Hopps (BH). Serão observadas a resposta celular inflamatória, a organização do tecido pulpar e a presença/ausência de bactérias. As pontuações atribuídas para cada grupo serão submetidas ao teste do qui-quadrado. O valor de $p < 0,05$ será estabelecido para indicar diferença estatisticamente significativa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar a resposta de tecido pulpar humano que foi mecanicamente exposto a um novo material, nanopartículas poliméricas carregadas com própolis vermelha de Alagoas, e compará-lo com dois materiais contendo própolis e com aqueles usados rotineiramente para capeamento pulpar direto (agregado trióxido mineral e hidróxido de cálcio)

Objetivo Secundário:

1 - Avaliar, in vivo, a ação da própolis vermelha de Alagoas, em polpas de pré-molares humanos, nos intervalos de 15, 45 e 90 dias, pela análise das alterações histológicas do tecido pulpar em resposta ao material testado. 2 - Avaliar, in vivo, a ação de dois produtos comerciais contendo própolis (Hoffmann's Pulpine e Hoffmann's Pulpine Mineral, em polpas de pré-molares humanos, nos intervalos de 15, 45 e 90 dias, pela análise das alterações histológicas do tecido pulpar em resposta ao material testado. 3 - Avaliar, in vivo, a ação de dois produtos usados no tratamento rotineiro das exposições pulpares (Hidróxido de Cálcio e Agregado Trióxido Mineral), em polpas de pré-molares humanos, nos intervalos de 15, 45 e 90 dias, pela análise das alterações

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A - C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comiteeteticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



Continuação do Parecer: 1.875.464

histológicas do tecido pulpar em resposta ao material testado.4 - Comparar da ação dos materiais testados observados nos resultados de análises clínica e histológica, nos períodos previstos no estudo (15, 45 e 90 dias).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos aos quais o paciente estará sujeito envolvem a possibilidade de constrangimento durante a abordagem para participação na pesquisa, a possível quebra do sigilo em relação à identidade do paciente e os riscos inerentes ao procedimento cirúrgico.

Benefícios:

O sujeito da pesquisa não terá benefícios imediatos durante a intervenção, uma vez que a cirurgia já estaria indicada e agendada previamente. Além disso, nessa etapa do estudo, a interferência dos pesquisadores limitar-se-á à abordagem para consentimento de participação e assinatura do

TCLE. No entanto, Como benefício direto da pesquisa (após a intervenção), os sujeitos da pesquisa terão um abrandamento da sensibilidade pósoperatória e um maior conforto pela redução dos sintomas à ela relacionados, uma vez que, comprovadamente, a própolis tem ação antiinflamatória,

antimicrobiana e cicatrizante. O provável benefício futuro que o sujeito poderá esperar com sua participação é, caso os resultados dessa pesquisa sejam favoráveis, ele poderá no futuro se beneficiar e beneficiar a comunidade. Como benefício indireto, os sujeitos da pesquisa estarão

colaborando para o desenvolvimento de um material natural para uso odontológico, com alguns princípios ativos que não podem ser sintetizados em laboratório, com propriedades comprovadas, em estudos anteriores, como antibacteriano, antifúngico, antiinflamatório, imunomodulatório e

cicatrizante, mais barato e, portanto, mais acessível à população de baixa renda. 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 a Própolis Vermelha

Alagoana a partir dos resultados desse estudo;

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Resposta à pendência:

O pesquisador foi questionado em relação a sua responsabilidade no procedimento de retirada do dente e responde que não tem responsabilidade nenhuma embora vá utilizar o dente do paciente.

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A. C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS**



Continuação do Parecer: 1.875.464

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos avaliados:

Folha de Rosto Foha_de_rosto.pdf

Declaração de Instituição e Infraestrutura Infraestrutura_UFAL.pdf

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência: TCLE.pdf

Outros DECLARACAO_SOB_E_PUBLICACAO_DOS_RESULTADOS_DO_ESTUDO.pdf

Outros Autorizacao_Clinica.pdf

Outros Autorizacao_uso_Lab.pdf

Cronograma CRONOGRAMA.pdf

Declaração de Manuseio Material Biológico /

Biorepositório / Biobanco

DECLARACAO_DE_BIOREPOSITORIO.pdf

Projeto Detalhado / Brochura Investigador PROJETO_CEP.pdf

Recurso Anexado pelo Pesquisador Resposta_ao_Parecer_CEP_1718139.pdf

Outros Declaracao_de_destino_dos_materiais.pdf

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Protocolo de Pesquisa atende as exigências da Resolução 466/2012, tendo duas pendências devidamente esclarecidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_758960.pdf	03/10/2016 12:25:51		Aceito
Outros	Declaracao_de_destino_dos_materiais.pdf	03/10/2016 12:25:27	ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_ao_Parecer_CEP_1718139.pdf	03/10/2016 12:24:16	ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP.pdf	03/10/2016 12:13:55	ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico /	DECLARACAO_DE_BIOREPOSITORIO.pdf	14/07/2016 14:41:32	ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO	Aceito

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A - C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS**



Continuação do Parecer: 1.875.464

Biorepositório / Biobanco	DECLARACAO_DE_BIOREPOSITORIO.pdf	14/07/2016 14:41:32	ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	14/07/2016 14:37:37	ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO	Aceito
Outros	Autorizacao_uso_Lab.pdf	14/07/2016 13:36:41	ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO	Aceito
Outros	Autorizacao_Clinica.pdf	14/07/2016 13:35:30	ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO	Aceito
Outros	DECLARACAO_SOB_E_PUBLICACAO_DOS_RESULTADOS_DO_ESTUDO.pdf	14/07/2016 13:31:20	ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	14/07/2016 13:21:11	ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura_UFAL.pdf	14/07/2016 13:20:10	ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO	Aceito
Folha de Rosto	Foha_de_rosto.pdf	14/07/2016 13:17:08	ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MACEIO, 20 de Dezembro de 2016

Assinado por:
Luciana Santana
(Coordenador)

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A - C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com