JOSÉ GUILHERME NEVES

**Síntese e caracterização de um primer experimental contendo
Nanopartículas de Quitosana- Efeito sobre a inativação de
Metaloproteinases, Atividade Antimicrobiana e
Resistência Adesiva**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Borsato

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

JOSÉ GUILHERME NEVES

Ficha Catalográfica

Neves, José Guilherme

Síntese e caracterização de um primer experimental contendo nanopartículas de Quitosana- Efeito sobre a inativação de Metaloproteinases da Matriz, Atividade Antimicrobiana e Resistência Adesiva. Ribeirão Preto, 2018.

91p. : il.; 30cm

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria. Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: Prof^ª. Dr^a. Maria Cristina Borsatto.

1. Quitosana. 2. Nanotecnologia. 3. Metaloproteinase da matriz.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Neves, JG. **Síntese e caracterização de um primer experimental contendo nanopartículas de Quitosana- Efeito sobre a inativação de Metaloproteinases da Matriz, Atividade Antimicrobiana e Resistência Adesiva**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa: Odontopediatria.

Área de Concentração: Odontopediatria.

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a). Dr.(a): _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a): _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a): _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a): _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

JOSÉ GUILHERME NEVES

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 09 de Março de 1992, Piracicaba, SP

Filiação: Rodinei José Neves e Fernanda Aparecida Cabral Neves

2011 - 2014: Curso de Graduação em Odontologia
Centro Universitário Hermínio Ometto

2013 - 2014: Aperfeiçoamento em Endodontia
Centro Universitário Hermínio Ometto

2015 - 2016: Mestrado em Ciências Odontológicas
Área de concentração: Biomateriais
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- Faculdade de
Odontologia de Araçatuba

2016 – 2018: Doutorado em Ciências
Área de Concentração: Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - SP
Universidade de São Paulo

Trabalho desenvolvido no Departamento de Clínica Infantil - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP e no Laboratório de Nanotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**.

Obrigado Pai, por sempre cuidar de mim e me guiar dentro dos Seus caminhos. Eu O louvarei todos os dias da minha vida, e quero sempre estar no centro da Tua vontade. A Ti toda glória, honra e a minha adoração.

Aos meus **pais**, Rodinei e Fernanda.

Acho que em palavras eu não conseguiria expressar o sentimento que tenho por vocês. Obrigado por me apoiarem, por transmitirem a mim valores, os quais me fizeram uma pessoa melhor. Eu os admiro muito e espero um dia recompensá-los por tudo que me proporcionaram. Eu os amo de todo o meu coração.

Ao meu **irmão** Vinicius,

Obrigado por sempre estar ao meu lado, pela parceria de todos esses anos. Orgulho-me muito ao ver quem você se tornou. Obrigado por ser uma grande referência para mim. Eu te amo.

A minha **avó** Neusa,

Minha grande amiga, obrigado por ser tão incrível. A senhora foi quem sempre esteve ao meu lado, enxugando minhas lágrimas e compartilhando gargalhadas. Meu amor e gratidão pela senhora é algo imensurável. Sempre penso, o quanto gostaria que fosse eterno esse nosso elo. Minha grande parceira de vida, minha cumplice e meu amor. Tenho muito orgulho da sua história e de você. Te amo de todo o meu coração.

Os meus sonhos estão em Tuas mãos, minha herança está em Ti meu Senhor. Os meus planos entrego a Ti, pois sem Ti nada posso fazer, sem Ti nada sou.

Agradecimentos Especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Professora **Maria Cristina Borsato, minha amiga e orientadora,**

Conviver esse tempo ao seu lado foi um grande presente. Sinto-me privilegiado por ter sua companhia, sua orientação e sua amizade. Eu aprendi e aprendo muito com você, Cris, não só Odontologia, mas também sobre a vida. Obrigado por sempre sonhar comigo, por me fazer acreditar no meu potencial, e por me guiar com sua mão amiga. Obrigado por me escolher e por representar tanto na minha vida. Que Deus te abençoe muito e pode ter certeza que sempre estarei por perto e que a nossa parceria vai muito mais além desse Doutorado. A você toda a minha gratidão, respeito e carinho.

Hoje, a sensação presente em minha vida é de intensa gratidão, a tudo e a todos que sempre colaboraram de alguma forma para que os acontecimentos fluíssem sempre. Quanta energia positiva. Meu eterno carinho a minhas amigas, **Chicalé, Fernanda, Giovana, Marjorie, Thaise, Mariana Shorizaki, Renata e Isabela.** Que Deus possa abençoar e cuidar sempre de vocês. Que os seus sonhos sejam realizados e que a gente sempre se lembre dessa fase com muito carinho um dos outros. Sucesso meninas!

Professores **Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva e Priscyla Daniely Marcato Gaspari,**

Obrigado por colaborarem tanto com a realização do meu trabalho, eu tenho grande admiração pelo trabalho e pelas pessoas que são. Que Deus os abençoe muito e que os frutos do imenso esforço de vocês sejam colhidos.

Minhas grandes parceiras **Carolina Paes Torres e Mariana Trevizan,**

Obrigado por terem me ensinado tanto, pelo companheirismo, pelas pessoas e profissionais que são. Esse tempo com vocês foi de muita troca, muita experiência e aprendizagem. Que vocês sejam sempre muito felizes!

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual diretora **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva** e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora **Profª. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** e da Vice-Coordenadora **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.

Aos Professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, **Profª. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Profª. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, **Profª. Dra. Aldevina Campos de Freitas**, **Profª. Dra. Andriara De Rossi Daldegan**, **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho** e **Profª. Dra. Kranya Victória Díaz Serrano**, pela agradável convivência, pelas conversas atenciosas e pelos conhecimentos transmitidos.

Micheli, secretária da Pós-Graduação, pessoa de uma energia ímpar, sempre pronta a nos ajudar. Mi, desde a matrícula tenho um imenso carinho e admiração por você. Obrigado por tudo, de todo meu coração.

Filó e **Matheus**, secretários sempre presentes e dedicados a ajudar. Obrigado por todo esse tempo de convivência, disponibilidade e muitas risadas.

Nilza, uma amiga, além de técnica de laboratório. Pessoa pronta, cheia de energia e um astral lá em cima! Obrigado pelo tempo de convivência, pelos ensinamentos, por esse tempo que apesar de curto, me fez muito bem!

Tais Nader, uma grande parceira que tem grande parte nessa caminhada. Sou muito grato por toda cooperação e ajuda no meu trabalho. Desejo a você muita energia boa, muita luz e felicidade. Você é incrível e eu tenho um imenso carinho por você. Obrigado por tudo!

À secretária do Curso de Especialização em Ortodontia, **Rosemary**, pela amizade, compreensão e carinho.

Aos funcionários da Clínica I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **José Aparecido Neves do Nascimento**, **Vera do Nascimento Scandelai** e **Karina Dadalt Quaglio**, obrigada pela prontidão em me atender, pela alegre convivência, pelo apoio e carinho.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor.

1 Coríntios 13

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Descrição dos resultados da análise de Atividade Antimicrobiana (CIM e CBM).....	65
Tabela 2-	Descrição dos resultados da análise de Resistência a Microtração.....	65
Tabela 3-	Descrição dos resultados da análise de Zimografia <i>In situ</i>	66
Tabela 4-	Descrição dos resultados do Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS).....	67

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Organograma do Delineamento Experimental do Estudo.....	57
Figura 2-	Imagens representativas de Microscopia de Fluorescência da análise de Zimografia <i>In situ</i>	66

Lista de **A**breviaturas e **S**ímbolos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RU- Resistência de União

MMPs- Metaloproteinases da Matriz

EDTA- Ácido Etilenodiaminotetracético

CHX- Clorexidina

Zn- Zinco

Ca- Cálcio

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CBM- Concentração Bactericida Mínima

NLS- Nanopartículas Lípidicas Sólidas

PDI- Índice de Dispersão

DLS- Espalhamento de Luz Dinâmica

°C- Graus Celsius

mV- Milivoltz

mm- Milímetros

ANOVA- Análise de Variância

Resumo

Neves, JG. **Síntese e caracterização de um primer experimental contendo nanopartículas de Quitosana- Efeito sobre a inativação de Metaloproteinases da Matriz, Atividade Antimicrobiana e Resistência Adesiva.** Ribeirão Preto, 2018. 91p. Tese [Doutorado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi sintetizar e caracterizar um primer experimental contendo Nanopartículas (NLS) de Quitosana e avaliar algumas de suas propriedades. Foram utilizados 50 molares humanos os quais foram seccionados no sentido mesio-distal e oclusal. Esses foram polidos com lixas de diferentes granulações. Após foi realizada a síntese e caracterização de primers experimentais contendo nanopartículas de Quitosana. Os grupos experimentais foram determinados por um ensaio de atividade antimicrobiana e alocados da seguinte forma: 1) Sem aplicação de primer experimental, 2) Aplicação de um primer experimental contendo Clorexidina (CHX) 2% 3) Aplicação de um primer experimental de NLS Quitosana 2% 4) Aplicação de um primer experimental de NLS Quitosana 0,6% 5) Aplicação de um primer experimental de NLS Quitosana 0,4%. Os primers experimentais foram aplicados sobre a dentina sadia. Para a análise de Microtração, foi confeccionado um platô de resina composta Z350 (3M Dental Products, St, Paul, MN, EUA), onde foram realizadas secções para a confecção dos palitos. Foi realizada a caracterização dos primers experimentais por meio de espalhamento de luz dinâmica e o ensaio da atividade de MMPs por meio de Zimografia in situ. Para a análise de Microtração foi utilizada a análise de variância (ANOVA) “one way” ($p=0,9054$). Para a análise de Zimografia in situ foi utilizada ANOVA seguido do teste de Holm-Sidak ($p<0,05$). A caracterização das NLS de Quitosana demonstrou sua estabilidade em todos os tempos analisados. No ensaio de atividade antimicrobiana foi observada concentração de 0,4% para CIM e 0,6% para CBM. Na Resistência a Microtração, não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais ($p=0,9054$). O ensaio de Zimografia in situ mostrou que o primer experimental contendo Quitosana 2% apresentou maior atividade de inativação de MMPs comparado com os demais grupos experimentais ($p<0,05$). O primer experimental contendo NLS de Quitosana possui atividade antimicrobiana, não altera a resistência adesiva e possui efeito de inativação de MMPs presentes na dentina.

Palavras-chave: Quitosana. Nanotecnologia. Metaloproteinase da Matriz

Abstract

Neves, JG. **Synthesis and characterization of an experimental primer containing Chitosan nanoparticles - Effect on the inactivation of Matrix Metalloproteinases, Antimicrobial Activity and Adhesive Resistance.** Ribeirão Preto, 2018. 91p. Thesis [Doctorate]. Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

ABSTRACT

The objective of this study was to synthesize and characterize an experimental primer containing Chitosan Nanoparticles (NLS) and to evaluate some of its properties. Fifty human molars were used which were sectioned mesio-distally and occlusally. These were polished with sandpaper of different granulations. After the synthesis and characterization of experimental primers containing chitosan nanoparticles were performed. The experimental groups were determined by an antimicrobial activity assay and were allocated as follows: 1) Without application of experimental primer 2) Application of an experimental primer containing Chlorhexidine (CHX) 2% 3) Application of an experimental primer of NLS Chitosan 2 % 4) Application of an experimental primer of NLS Chitosan 0.6% 5) Application of an experimental primer of NLS Chitosan 0.4%. The experimental primers were applied on the dentin sound. A composite resin plateau Z350 (3M Dental Products, St, Paul, MN, USA) was used for the analysis of Microtration, where sections were made for making the toothpicks. Characterization of the experimental primers was carried out by means of dynamic light scattering and the assay of MMP activity by means of Zimography in situ. The analysis of variance (ANOVA) "one way" ($p = 0.9054$) was used for the analysis of Microtraction. For the analysis of Zimography in situ was used ANOVA followed by the Holm-Sidak test ($p < 0.05$). The characterization of the NLS of Chitosan demonstrated its stability at all times analyzed. In the antimycobrian activity assay, a concentration of 0.4% for MIC and 0.6% for CBM was observed. In the Microtensile Strength, no statistical difference was observed between the experimental groups ($p = 0.9054$). The in situ Zimography assay showed that the experimental primer containing Chitosan 2% presented higher inactivation activity of MMPs compared to the other experimental groups ($p < 0.05$). The experimental primer containing Chitosan NLS has antimicrobial activity, does not alter the adhesive resistance and has an inactivation effect of MMPs present in dentin.

Keywords: Chitosan. Nanotechnology. Matrix Metalloproteinase

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	45
2. PROPOSIÇÃO	51
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1 Delineamento Experimental	57
3.2 Preparação dos Primers Experimentais contendo NLS de Quitosana.....	58
3.3 Caracterização das NLS de Quitosana	58
3.4 Ensaio de atividade antimicrobiana.....	58
3.5 Procedimentos Restauradores.....	59
3.6 Resistência a Microtração de Resina-Dentina	60
3.7 Ensaio de zimografia in situ	60
3.8 Análise Estatística.....	61
4. RESULTADOS	63
4.1 Análise de Atividade Antimicrobiana	65
4.2 Análise de Resistência a Microtração.....	65
4.3 Análise de Zimografia In Situ.....	66
4.4 Análise de Caracterização das NLS de Quitosana.....	67
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS	79
ANEXO	87

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A possibilidade da realização de restaurações utilizando compósitos resinosos representou um grande avanço na Odontologia, tornando-se o material de escolha, dentro de um contexto estético. (Krifka, 2013; Benetti, 2013). Com a finalidade de aumentar a longevidade das restaurações e sua resistência de união (RU) às estruturas dentais, avanços químicos e tecnológicos buscam a melhora das propriedades desses compósitos. (Spencer, 2010, Khan et al., 2018, Ayar et al., 2018)

Os materiais odontológicos, de um modo geral, apresentam falhas assim, a presença de fraturas e lesões de cárie na interface dente-restauração podem alterar essas propriedades, causando uma degradação bioquímica na camada híbrida. Essa biodegradação ocorre dentro de um mecanismo duplo, alterando tanto a matriz adesiva, através do contato com a saliva, bem como a matriz de colágeno presente na dentina pela presença de bactérias através de um processo de microinfiltração bacteriana, havendo a diminuição do pH, liberação de íons ativando proteínas degradadoras (Opdam et al., 2014; Shokati et al., 2010; Bergenholtz et al., 1982; Bourbia et al., 2013; Cox et al., 2006; Tersariol et al., 2010, Porto et al., 2018; Arjmand et al., 2018)

Dentro desse contexto, a integridade dessas estruturas dentárias, como a matriz dentinária, faz com que haja maior longevidade da interface adesiva. A principal composição da matriz dentinária é o colágeno do tipo I, que constitui 90% de sua estrutura, que também é constituída por uma rede complexa de fibrilas, estruturas globulares e proteínas, as quais estão intimamente relacionadas à maturação e mineralização dessa estrutura. (Marshall et al., 1997; Tjäderhane, 2015; Boskey et al., 2001)

Essas proteínas são pertencentes ao grupo de Metaloproteinases da Matriz (MMPs) ou cisteínas catepsinas que são envolvidas por tecido conjuntivo. As MMPs são proteases dependentes de zinco e cálcio e são capazes de degradar o colágeno que constitui a matriz dentinária, tanto na sua forma natural quanto desmineralizada. Algumas MMPs são encontradas na dentina humana, como a MMP 2 e 9 gelatinase, a MMP 8 collagenase e também a MMP 20, a qual possui a capacidade de degradação do esmalte. As MMPs possuem propriedades destrutivas e podem ser ativadas através da solubilização da matriz dentinária, por um processo de cárie ou

por remoção de matérias inorgânicas do substrato (Tjäderhane, 2015; Carrilho et al., 2009; Sulkala et al., 2007; Sulkala et al., 2002; Mazzoni et al., 2006; Pashley et al., 2004; De Munk et al., 2003; Tekçe et al., 2016; Boushell et al., 2011; Kato et al., 2011; Altinci et al., 2017; Seseogullari-Dirihan et al., 2018; Maravik et al., 2018).

Alguns estudos visam a síntese de inibidores de MMPs com o intuito de substituir os inibidores teciduais biológicos, sendo incorporados em materiais ou diluídos para a realização de uma limpeza de cavidade, objetivando o aumento da estabilidade funcional da união adesivo-dentina. Novas abordagens terapêuticas surgiram, utilizando novas substâncias que comprovaram que compostos como o Cloreto de benzalcônio (Sabatini e Patel, 2013, Sabatini e Pashley, 2015), Fluoreto de Sódio (Altinci et al., 2016), Clorexidina (Hebling et al., 2005, Carrilho et al., 2007a, B, Breschi et al., 2010), Galardin (Breschi et al., 2010) e Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Erhardt et al., 2008), possuem efeito sob a inativação das MMPs.

Dentre esses compostos a Clorexidina (CHX) tem se mostrado bastante eficaz quanto à prevenção da degradação da camada híbrida. Em diversos estudos, a incorporação dessa substância a sistemas adesivos obtiveram resultados satisfatórios tanto em pesquisas *in vitro*, bem como em um estudo *in vivo*, mostrando sua alta aplicabilidade clínica. (Tjäderhane et al., 2015; Tjäderhane et al., 2013; Breschi et al., 2009; Loguercio et al., 2009; Carrilho et al., 2007b; Hebling et al., 2005). Os bons resultados obtidos pela CHX se dão pelo fato dessa substância ser um inibidor de gelatinase/colagenase que age pela quelação não específica de cátions como Zn^{2+} e Ca^{2+} ; íons necessários para manter as funções enzimáticas das MMPs (Gendron et al., 1999). O uso de alguns materiais como primers, ácido fosfórico e adesivos com CHX em sua composição demonstraram uma maior preservação da RU e integridade da camada híbrida. (Scaffa et al., 2012; Zhou et al., 2011; Ricci et al., 2010; Carrilho et al., 2007; Stanislawczuk et al., 2011), contudo investigações ainda estão sendo realizadas sobre a eficácia da CHX sobre a inibição de MMPs (Zheng et al., 2015; Breschi et al., 2010).

Dentre as buscas por novos compostos que reforcem a matriz de colágeno dentinária, a Quitosana tem sido amplamente estudada. Esta é um biopolímero policatiónico obtido por meio de desacetilação alcalina da quitina, que é o principal componente do exoesqueleto de crustáceos (Muzzarelli et al., 1973) apresentando biocompatibilidade e habilidade de proliferação de fibroblastos (Tangsadthakun et

al., 2007). Segundo os resultados de Persadmehr et al. (2014) a quitosana inibiu, in vitro, a degradação da matriz de colágeno por *Clostridium histolyticum* e, especulativamente, poderia promover ligações cruzadas entre as fibrilas colágenas, o que melhoraria a integridade estrutural da dentina desmineralizada. Além disso, sabe-se que a Quitosana apresenta baixa toxicidade aos tecidos (Raafat & Sahl, 2009), potente atividade antimicrobiana (Elsaka & Elnaghy, 2012) e capacidade quelante (Silva et al., 2012). Elsaka, 2012, incorporou uma solução de Quitosana em um Sistema Adesivo Universal em diversas concentrações, onde apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *S. Mutans*, e a incorporação a 0,12% apresentou melhores resultados em todas as propriedades físicas, mecânicas e microbiológicas analisadas.

Com o desenvolvimento da Nanotecnologia, muitas partículas que antes eram utilizadas na escala micrométrica apresentaram-se mais reativas quando sintetizadas e utilizadas em escala nanométrica. Nanotecnologia significa a habilidade de manipulação átomo por átomo na escala compreendida entre 0,1 e 100 nm. (Durán et al., 2006). Os materiais e sistemas nanoestruturados exibem propriedades e fenômenos físicos, químicos e/ou biológicos significativamente novos e modificados devido à sua escala nanométrica. Explorar estas propriedades por meio de controle de estruturas em níveis atômico e molecular, mantendo a estabilidade de interfaces e a integração dessas nanoestruturas é a chave para o progresso da nanotecnologia (Durán et al., 2006).

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi sintetizar e caracterizar um primer experimental contendo Nanopartículas de Quitosana

Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos primers experimentais.
- ✓ Avaliar o efeito da aplicação dos primers na Resistência Adesiva.
- ✓ Avaliar a estabilidade das nanopartículas de Quitosana presente nos primers experimentais.
- ✓ Avaliar o efeito dos primers sobre a inativação de MMPs.

3. *M*aterial e *M*étodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Os Primers Experimentais contendo Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) de Quitosana foram sintetizados através de uma emulsão seguida de sonicação. Após isso essas foram caracterizadas por meio de seu tamanho, Índice de Dispersão e Potencial Zeta. Desse modo, foi realizado o ensaio de atividade antimicrobiana a fim de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). A partir dessas concentrações obtidas e baseado em estudo contido na literatura (Loguercio et al., 2016), os grupos experimentais foram alocados da seguinte forma: G1: sem aplicação de Primer (controle negativo), G2: Aplicação de Primer contendo Clorexidina 2% (controle positivo), G3: Aplicação de Primer contendo NLS de Quitosana 2%, G4: Aplicação de Primer contendo NLS de Quitosana 0.6%, G5: Aplicação de Primer contendo NLS de Quitosana 0.4%. Após isso foi realizado o procedimento restaurador sobre o espécime de dentina planificado, onde foram realizadas secções expondo a interface dentina-resina, os quais foram submetidos ao teste de Resistência a Microtração e Atividade de MMPs por meio de Zimografia in situ (Figura 1).

Figura 1. Organograma do Delineamento Experimental.

3.2 Preparação dos Primers Experimentais contendo NLS de Quitosana

A formulação dos Primers Experimentais contendo NLS de Quitosana se deu por meio da confecção de uma emulsão seguida de um processo de sonicação. Na primeira fase do processo, foi preparada uma solução contendo Quitosana de baixo peso molecular (CAS: 9012764 Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) a 6.6 mg/ml, Ácido Acético Glacial PAACS (Labysinth, São Paulo, Brasil) e água deionizada. Desse modo 10 ml dessa solução, foi diluída em 10 ml de água deionizada e acrescentado 0.5% de Pluoronic F68 (Sigma Aldrich, Germany).

A segunda fase desse processo se da por meio da fase oleosa, onde utilizou-se Manteiga de Illipe . O processo se deu por meio do aquecimento das duas fases a 60°C separadamente. Após atingir essa temperatura, a solução aquosa foi adicionada à fase oleosa a 1%, sendo então essa emulsão sonicada por 10 minutos em uma temperatura de 48°C e amplitude de 40% (SonicsVCX750, USA). As NLS de Quitosana foram formados após o resfriamento da dispersão até 25 °C.

3.3 Caracterização das NLS de Quitosana

As aferições de tamanho, índice de dispersão (PDI) e Potencial Zeta das NLS foram realizadas por meio de espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, UK). As aferições foram diluídas em Cloreto de Potássio (1:100) e foram realizadas em triplicata. (Piveta T et al., 2018)

3.4 Ensaio de atividade antimicrobiana

Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas com base em um método de microdiluição em 96 multi-well placas de microtitulação como previamente descrito por Eloff (Eloff et al., 1998). *S. mutans* foi cultivado durante a noite a 37°C em Brain Heart Infusion (BHI) caldo mais 1% de glicose e ajustado para uma densidade final de 10⁴ ufc/mL. A suspensão de células foi inoculada em microplacas contendo uma diluição séries de NLS de Quitosana de 50% a 0.25% (concentrações variando de 1.65 a 0.013 mg/mL), Digluconato de Clorexidina 2% a 0.12% (controle positivo; concentrações variando de 0,05 a 120 mg/mL) ou nenhum tratamento ao controle. As placas em triplicata foram incubadas a 37°C durante 24 h. Como indicador de crescimento

bacteriano, 50 mL de Nitroazul Tetrazólio (NBT) a 0,2 mg/mL, onde foi adicionado aos poços e incubado a 37°C por 30 minutos. A menor concentração do composto que não mostra a mudança de cor foi tomada como sua concentração inibitória mínima. O sal de tetrazólio incolor atua como um aceceptor de elétrons e é reduzido a um produto de Formazano vermelho que é biologicamente demonstra organismos ativos. Onde o crescimento bacteriano foi inibido, a solução no poço permaneceu claro após a incubação com NBT. Triplicatas foram feitas para cada concentração da NLS testada. (D'Àngelis et al., 2012)

3.5 Procedimentos Restauradores

Após aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética (CAAE: 85389417.5.0000.5419, 50 molares humanos hígidos recém-extraídos foram coletados junto ao Biobanco de dentes humanos da unidade FORP-USP, limpos e armazenados à temperatura de -2° C até o uso. As porções radiculares e os terços oclusais foram seccionados utilizando disco diamantado (Struers, A/S, Dinamarca) sob refrigeração em cortadeira metalográfica (Struers, A/S, Dinamarca). Após isso, as superfícies dentinárias foram polidas por 20 segundos, utilizando lixas d'água de granulação #400, #600 e #1200 montadas em uma Politriz (Aropol 2V, Arotec Indústria e Comércio, São Paulo, Brasil) obtendo superfícies planas e lisas de dentina. Após isso, a superfícies dentinárias foram avaliadas em lupa estereoscópica (Carls Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com o aumento de 40 x para assegurar que o esmalte foi totalmente removido. Finalizando essa etapa os dentes permaneceram em água deionizada a 4° C durante 24 horas.

Um protocolo de adesão total foi selecionado utilizando Ácido Fosfórico a 35% (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) por 15 s, seguido de pela aplicação ativa do Adper Single Bond Plus (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA - N561025) nas superfícies dentinária por 15 s. Então, jatos de ar suaves foram aplicados para remover o excesso de solvente, e o adesivo foi fotopolimerizado por 20s usando um Fotopolimerizador Ultralux (Dabi Atlante S/A Ind. Médico Odontológicas, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os Primers experimentais foram utilizados após a etapa de condicionamento ácido, como segue: CHX 2% (Controle positivo), NLS de Quitosana 2%, NLS de Quitosana 0.4% e NLS de Quitosana 0.6%, os primers foram aplicados

nas preparações por 60 s, enxaguados por 60 s o excesso de água removido com papel absorvente (Kimwipes, Kimberly Clark, Irving, TX, EUA).

A seguir os dentes foram restaurados com resina composta X350 XT cor A2 (3M Dental Products, St. Paul, MN, EUA), sendo confeccionado um platô de resina com 4 mm de altura, aplicado em 4 incrementos de 1 mm cada, e fotopolimerizados (Fotopolimerizador Ultralux, Dabi Atlante S/A Ind. Médico Odontológicas, Ribeirão Preto, SP, Brasil) durante 20 segundos após cada inserção de modo contínuo.

3.6 Resistência a Microtração de Resina-Dentina

Para a realização deste teste os corpos de prova foram cortados com disco de diamante (Buehler – Series 15 LC Diamond, Buehler, Lake Buff, IL, USA) montado em máquina de corte ISOMET (Buehler, Illinois, USA) em formato de palito (0,8 x 0,8 mm), de acordo com a técnica de teste de microtração non-trimming (Pashley et al., 1999). Os palitos (n=10) foram adaptados em um dispositivo metálico, composto de duas partes cilíndricas. Foram fixados no centro do dispositivo com éster de cianoacrilato gel (Super Bonder Flex Gel, Henkel Loctite Ltda., São Paulo, Brasil), na união entre as duas partes do dispositivo. Cada segmento foi, então, acoplado às extremidades da Máquina de Teste Universal (Emic - Model 1L-2000, São José dos Pinhais, PR, BR) sendo realizado o teste à velocidade de 0,5 mm/min.

3.7 Ensaio de zimografia in situ

Secções (0,6 mm) provenientes de todos os grupos (n=6) foram cortadas (Buehler – Series 15 LC Diamond), expondo a interface adesiva das restaurações. Em seguida, cada secção foi colada com éster de cianoacrilato gel (Super Bonder Flex Gel) sobre uma lamínula de microscópio (Fisherbrand, Loughborough, LE, UK). A zimografia in situ foi realizada utilizando gelatina de fluorescência conjugada (Kit EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay) como o substrato de MMP. A solução estoque de gelatina fluorescente foi diluída na proporção 1:8 em tampão de diluição (NaCl 150 mM, CaCl 25 mM, Tris-HCl 50 mM, pH = 8,0). Oitenta µL da mistura de gelatina fluorescente (Kit EnzChek) + solução tampão foi aplicada sobre cada secção e coberta com uma lamínula de cobertura (Microscope Cover Slips, Rochester Scientific CO., INC, Rochester, NY, USA). Em seguida, as amostras

foram mantidas protegidas da luz e incubadas em câmara umidificada a 37°C. Imagens foram realizadas após 2 horas de incubação (Mazzoni et al., 2012; Pessoa et al., 2013). A hidrólise do substrato, indicativo de atividade enzimática gelatinolítica, foi avaliada por meio de exame sob um microscópio de fluorescência em aumento de 20 vezes (Leica DMI 6000, Buffalo Grove, IL, USA). A quantificação da fluorescência foi realizada com programa de análise de imagem ImageJ (NIH, Frederick, MD, EUA)

3.8 Análise Estatística

Para a análise de Microtração foi utilizada a análise de variância (ANOVA) “one way” ($p=0,9054$) Na análise de Zimografia in situ foi utilizada ANOVA seguido do teste de Holm-Sidak ($p<0,05$). Foi utilizado o Software R Core Team (2018), adotando nível de significância de 95%.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Análise de Atividade Antimicrobiana

Para a análise de Atividade antimicrobiana foi observado que o CIM de Nanopartículas de Quitosana foi de 0,4%(0,00) e de CBM 0,67% ($\pm 0,2$). Realizado por meio de revelação visual após centrifugação e confirmados por Resazurina (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para células planctônicas de *S. mutans* (n=3).

	<i>S. mutans</i>	
	CIM* (%)	CBM (%)
Nanopartículas	0,4% $\pm$ 0,0	0,67% $\pm$ 0,2
Clorexedina	Nenhum poço viável	Nenhum poço viável

4.2 Análise de Resistência a Microtração

A análise exploratória indicou que os dados atendem as pressuposições de uma análise paramétrica. Foi então aplicada análise de variância (ANOVA) “one way”, considerando o nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no programa R.

Na tabela 2 pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos quanto à Resistência a Microtração ($p=0,9054$).

Tabela 2. Média (desvio padrão) da resistência a microtração (Mpa) em função dos grupos de estudo.

Grupo	Média (desvio padrão)
Controle	33,46 (7,05) a
CHX	32,12 (8,08) a
Quit 2%	32,31 (6,09) a
Quit 0,6%	31,59 (5,68) a
Quit 0,4%	30,46 (7,08) a
p-valor	0,9054

Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si ($p>0,05$)

4.3 Análise de Zimografia In Situ

A análise exploratória indicou que os dados atendem as pressuposições de uma análise paramétrica. Foi então aplicada análise de variância (ANOVA) “one way”, seguido do pós teste de Holm-Sidak considerando o nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no programa R.

Na tabela 3 pode-se observar que o grupo com o Primer contendo Nanopartículas de Quitosana 2% apresentou maior atividade de inibição de MMPs comparado aos demais grupos, porém não diferiu estatisticamente do grupo CHX 2% ($p < 0,05$). O grupo CHX 2% não diferiu estatisticamente do grupo Controle ($p = 0,8639$).

Tabela 3. Quantificação da atividade enzimática gelatinolítica (RFU) na interface dentina-resina por meio de fluorescência e expressa em Unidades Relativas de Fluorescência (RFU).

Grupo	Média (desvio padrão)
Controle	1 (0,00) ab
CHX	0,88 (0,03) bc
Quit 2%	0,75 (0,14) c
Quit 0,6%	0,94 (0,31) a
Quit 0,4%	0,97 (0,02) a

Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$)

Figura 2. Imagens de Microscopia por Fluorescência da atividade de MMPs por meio da análise de Zimografia In situ. (A) Controle; (B) CHX 2%; (C) Quitosana 2%; (D) Quitosana 0,6%; (E) Quitosana 0,4%.

4.4 Análise de Caracterização das NLS de Quitosana

A Tabela 4 apresenta valores da média e desvio padrão das aferições em triplicata de tamanho, índice de dispersão (PDI) e Potencial Zeta das NLS por meio de espalhamento dinâmico de luz (DLS).

Tabela 4. Médias (desvio padrão) de tamanho, potencial zeta e índice de dispersão (PDI) das NLS de Quitosana.

TEMPOS	TAMANHO	POTENCIAL ZETA	PDI
24 HORAS	218,7 (13,1)	30,9 (4,69)	0,179 (0,02)
07 DIAS	265,5 (5,66)	39,9 (3,82)	0,189 (0,02)
14 DIAS	220,4 (5,91)	27,6 (1,87)	0,199 (0,01)
28 DIAS	229,9 (13,1)	30,1 (3,69)	0,207 (0,02)

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

A constante evolução do desenvolvimento de novos Biomateriais tem sido uma grande evolução na área médico-odontológica, abrangendo áreas específicas como engenharia tecidual (Jahan et al., 2018; Hashmi et al., 2017; Gong et al., 2016), controle de microrganismos (Parsa et al., 2018; Ye et al., 2018; Wang et al., 2018) e adesão de materiais poliméricos ao substrato dentário (Altinci et al., 2018; Huang et al., 2018; Serkies et al., 2016). Essa síntese de novos materiais tem sido benéfica e amplamente estudada na atualidade, gerando resultados positivo, e até mesmo novas perspectivas comerciais (Maravik et al., 2018; Altinci et al., 2018; Altinci et al., 2017 Tekçe et al., 2016; Boushell et al., 2011; Kato et al., 2011)

Dentro do contexto de adesão, uma das principais investigações é a de síntese e caracterização de produtos capazes de inibir MMPs, a qual possui o potencial, quando em atividade, de degradar algumas estruturas da interface e principalmente a estrutura colágena da dentina (Tekçe et al., 2016; Boushell et al., 2011; Kato et al., 2011). Essa degradação pode levar ao enfraquecimento da camada híbrida, formando ``gaps`` na interface dentina-resina, podendo gerar o deslocamento do material presente dentro da cavidade dentária, necessitando assim, de um novo procedimento restaurador (Altinci et al., 2016; Loguercio, 2016; Tjäderhane et al., 2015; Tjäderhane et al., 2013).

Desse modo, os primers experimentais têm sido desenvolvidos com o objetivo da inativação de MMPs, preservando a integridade da camada híbrida do sistema resina- dentina (Loguércio et al., 2016; Silva Sousa et al., 2016). Foram desenvolvidos primers contendo Cloreto de benzalcônio (Sabatini & Patel, 2013, Sabatini & Pashley, 2015), Fluoreto de Sódio (Altinci et al., 2016), Clorexidina (Loguércio et al., 2016; Carrilho et al., 2007a, B, Breschi et al., 2010), Galardin (Breschi et al., 2010) e associações com Doxíciclina (Silva Sousa et al., 2016).

No presente estudo foi avaliado o potencial de inativação de MMPs por meio de um primer experimental contendo NLS de Quitosana, um polímero altamente biocompatível, com habilidade de formação de fibroblastos, dentre outras propriedades benéficas (Gu et al., 2018; Kishen et al., 2016; Persadmehr et al. 2014; Tangsadthakun et al., 2007). A metodologia utilizada

para a síntese e caracterização das NLS foi realizada por meio do espalhamento de luz dinâmico (DLS), avaliando as propriedades físico-químicas das partículas (Kauer et al., 2016; Marcato et al., 2008). Por meio do índice de polidispersão foi observada a homogeneidade das dispersões de nanopartículas, sendo considerados ideais valores abaixo de 0,3 (Tomasina et al., 2013; Marcato et al., 2008). Desse modo, no presente estudo observou-se que este índice apresentou valores inferiores e próximos a 0,2 em todos os tempos analisados, mostrando que as NLS de Quitosana apresentavam-se em condições ideais e que sua estabilidade foi preservada dentro desses períodos.

A análise do potencial Zeta verifica a carga superficial das partículas, no qual pôde ser observado no presente estudo que em todos os tempos analisados, essas foram cargas positivas, sendo esse fato explicado pela característica catiônica da partícula de Quitosana (Kishen et al., 2016). Valores de carga superficial iguais ou maiores que 30 mV são necessários para promover estabilidade eletrostática (Freitas; Muler, 1999). Outro fato importante é a estabilidade eletroestérica, devido a partícula de Quitosana e do estabilizante polimérico Pluoronic F68, sendo a forma mais confiável de estabilidade para formulações contendo nanopartículas (Vilinska et al., 2014). No presente estudo, foi observado nos tempos iniciais, cargas acima de 30 mV, sendo menor no tempo de 14 dias, e voltando para ao padrão estável no tempo de 28 dias, demonstrando real caracterização e estabilidade das partículas.

Para a análise de atividade antimicrobiana foi utilizada a técnica *in vitro* realizada por meio de microdiluição (Eloff, 1998), permitindo assim determinar a menor concentração de inibição para microrganismos específicos. No presente estudo, foram avaliadas diferentes concentrações para CIM e CBM, sendo os melhores valores de concentração 0,4% e 0,6% respectivamente, para estreptococos do grupo mutans. A atividade antimicrobiana da Quitosana possui relação com os complexos polieletrólíticos formados, uma vez que seus grupos amínicos se ligam à superfície aniônica dos microrganismos, interferindo na atividade celular e na permeabilidade da membrana, resultando na perda de seus componentes intracelulares, possuindo principalmente, efeito sobre bactérias Gram positivas (Gu et al., 2018; Imani et al., 2018; Elsaka et al., 2012).

Para a análise de Zimografia *in situ*, utilizada para a observação do potencial de inibição de MMPs, o presente estudo mostrou que o primer contendo Quitosana 2% possui efeito positivo sobre esse fenômeno. Esse resultado apresenta uma correlação dose-resposta sobre o efeito de inibição, uma vez que as concentrações menores não demonstraram efeito semelhante a maior concentração analisada. Esse efeito da partícula de Quitosana sobre a inativação das MMPs ocorre provavelmente em função de sua carga catiônica, uma vez que essa consegue neutralizar os domínios ativos, como grupos carboxílicos e zinco, os quais estão presentes nas MMPs (Eckhard et al., 2013). Além disso, a partícula de Quitosana possui grupos reativos livres capazes de interagir diretamente com o colágeno, se tornando um agente reticulador (Taravel et al., 1993; Kishen et al., 2016). O trabalho de Keshen et al., 2016 mostrou o aumento da resistência à degradação do colágeno quando em contato com a Quitosana, sugerindo a direta atividade sobre a colagenase, mesmo na ausência de qualquer agente de reticulação.

A análise de Resistência a Microtração, no presente estudo não apresentou diferença estatística para nenhum grupo experimental analisado ($p=0,9054$). Esse resultado pode ser explicado pelo fato das partículas estarem na escala nanométrica de tamanho não interferindo assim, no escoamento do adesivo nos túbulos dentinários, proporcionando uma retenção mecânica adequada, semelhante ao grupo controle (Elsaka et al., 2012; Kishen et al., 2016; Loguercio et al., 2016). Nesse estudo, foi analisado apenas o tempo inicial, sendo o benefício a não interferência das partículas na formação de uma camada híbrida adequada, onde essas poderiam impedir o escoamento do sistema adesivo para o interior dos túbulos dentinários.

Apesar de existirem diversos estudos avaliando as propriedades da Quitosana, esses utilizaram-na na escala de tamanho micrométrico, o que impossibilita a comparação dos resultados do presente estudo, dificultando dessa forma a discussão deste trabalho, uma vez que esse estudo é pioneiro na avaliação destas propriedades analisadas. Com isso, sugerem-se novos estudos que avaliem períodos posteriores mais longos a aplicação de primers experimentais, analisando o efeito desses também como agentes reticuladores de colágeno, favorecendo assim a integridade estrutural da interface dentina-resina em longo prazo.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

Considerando as limitações de um estudo in vitro, concluiu-se que:

- ✓ Os primers experimentais apresentaram CIM de 0,4% e CBM de 0,6% para estreptococos mutans.
- ✓ Não houve diferença entre os grupos experimentais no ensaio de Resistência a Microtração.
- ✓ O primer experimental contendo NLS de Quitosana 2% possui o efeito de inativação de MMPs presentes na matriz dentinária.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Abdelwahed W; Degobert, G; Fessi, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *Eur J Pharm Biopharm* 2006 (63):87-94. 2006.
2. Altinci P, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, Pashley D, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A. NaF Inhibits Matrix-Bound Cathepsin-Mediated Dentin Matrix Degradation. *Caries Res*. 2016;50(2):124-32. doi: 10.1159/000444222.
3. Altinci P, Mutluay M, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A Effect of calcium fluoride on the activity of dentin matrix-bound enzymes. *Arch Oral Biol*. 2018 Sep 11;96:162-168. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.09.006.
4. Benetti AR, Ribeiro de Jesus VC, Martinelli NL, Pascotto RC, Poli-Frederico RC. Colour stability, staining and roughness of silorane after prolonged chemical challenges. *J Dent*. 2013 (12):1229-35.
5. Bergenholtz G, Cox C, Loesche W, Syed S. Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. *J Oral Pathol Med*, 11 (1982), 439–450.
6. Boskey AL. The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2:369–387.
7. Bourbia M, Ma D, Cvitkovitch DG, Santerre JP, Finer Y. Cariogenic bacteria degrade dental resin composites and adhesives. *J Dent Res*, 92 (2013), 989–994.
8. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnell R, Yamauchi M. Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch Oral Biol*. 2008 53(2):109-16.
9. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Yamauchi M. Distribution and relative activity of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Int J Oral Sci*. 2011 (4):192-9.
10. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Visintini E, Cadenaro M, Tay FR, De Stefano Dorigo E, Pashley DH. Use of a specific MMP-inhibitor (Galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater* 2010;26:571–8.
11. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjaderhane L, Ruggeri A Jr, Tay FR, Dorigo E, Pashley D. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year in vitro study. *Dental Materials* 2010;26(4):320-325.
12. Breschi, L.; Cammelli, F.; Visintini, E.; Mazzoni, A.; Vita, F.; Carrilho, M.; Cadenaro, M.; Foulger, S.; Mazzoti, G.; Tay, F.R.; DI Lenarda, R.; Pashley, D. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent* 2009;11:191–8.

13. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, Breschi L, Foulger S, Pashley DH. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;90:373–380.
14. Carrilho, M.R.; Carvalho, R.M.; DE Goes, M.F.; Di Hipólito, V.; Geraldeli, S.; Tay, F.R.; et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *Journal of Dental Research* 2007a;86:90–94.
15. Carrilho, M.R.; Geraldeli, S.; Tay, F.; De Goes, M.F.; Carvalho, R.M.; Tjäderhane, L.; Reis, A.F.; Hebling, J.; Mazzoni, A.; Breschi L.; Pashley, D. In Vivo Preservation of hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007b;86:529–533.
16. Cox SW, Eley BM, Kiili M, Asikainen A, Tervahartiala T, Sorsa T. Collagen degradation by interleukin-1beta-stimulated gingival fibroblasts is accompanied by release and activation of multiple matrix metalloproteinases and cysteine proteinases. *Oral Dis*, 12 (1) (2006),34–40.
17. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G. Four-year of water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *Journal of Dental Research* 2003;82(2):136-140.
18. Durán, N.; Mattoso, L. H. C.; Morais, P. C. Nanotecnologia: Introdução, preparação, caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber Editora, 2006.
19. Eckhard U, Schonauer E, Brandstetter H. Structural basis for activity regulation and substrate preference of clostridial collagenases. *J Biol Chem* 2013;288:20184–94.
20. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 1998 Dec;64(8):711-3.
21. Elsaka SE, Elnaghy AM. Antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chitosan solutions and the outcomes on the bond strength of RealSeal sealer to radicular dentin. *J Biomed Res.* 2012 (3):193-9.
22. Erhardt MC, Osorio R, Toledano M. Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin. *J Dent.* 2008 (12):1068-73.
23. Franks, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur J Pharm Biopharm* 1998 (45) 221-9.
24. Freitas C, Müller RH. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur J Pharm Biopharm.* 1999 Mar;47(2):125-32.
25. Gendron, R.; Greiner, D.; Sorsa, T.; Mayrand, D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6:437–439.

26. Gong T, Heng BC, Lo EC, Zhang C. Current Advance and Future Prospects of Tissue Engineering Approach to Dentin/Pulp Regenerative Therapy. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9204574. doi: 10.1155/2016/9204574.
27. Gu LS, Cai X, Guo JM, Pashley DH, Breschi L, Xu HHK, Wang XY, Tay FR, Niu LN. Chitosan-Based Extrafibrillar Demineralization for Dentin Bonding. *J Dent Res.* 2018 Oct 16;22034518805419. doi: 10.1177/0022034518805419.
28. Hashmi B, Mammoto T, Weaver J, Ferrante T, Jiang A, Jiang E, Feliz J, Ingber DE. Mechanical induction of dentin-like differentiation by adult mouse bone marrow stromal cells using compressive scaffolds. *Stem Cell Res.* 2017 Oct;24:55-60. doi: 10.1016/j.scr.2017.08.011.
29. Hebling J.; Pashley, D.H.; Tjäderhane, L.; Tay, F.R. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005;84:741–746.
30. Huang Z, Qi Y, Zhang K, Gu L, Guo J, Wang R, Mai S. Use of experimental-resin-based materials doped with carboxymethyl chitosan and calcium phosphate microfillers to induce biomimetic remineralization of caries-affected dentin. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2019 Jan;89:81-88. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.09.008.
31. Imani Z, Imani Z, Basir L, Shayeste M, Abbasi Montazeri E, Rakhshan V. Antibacterial Effects of Chitosan, Formocresol and CMCP as Pulpectomy Medicament on *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. *Iran Endod J.* 2018 Summer;13(3):342-350. doi: 10.22037/iej.v13i3.20791.
32. Jahan K, Mekhail M, Tabrizian M. One-step fabrication of apatite-chitosan scaffold as a potential injectable construct for bone tissue engineering. *Carbohydr Polym.* 2019 Jan 1;203:60-70. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.09.017
33. Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, Carrilho M, Tjäderhane L, Buzalaf MA. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Caries Res.* 2011;45(5):429-34.
34. Kishen A, Shrestha S, Shrestha A, Cheng C, Goh C. Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. *Dent Mater.* 2016 Aug;32(8):968-77. doi: 10.1016/j.dental.2016.05.005.
35. Krifka S, G. Spagnuolo, Schmalz G, Schweikl H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials*, 34 (2013), pp. 4555–4563.
36. Loguercio AD, Hass V, Gutierrez MF, Luque-Martinez IV, Szezs A, Stanislawczuk R, Bandeca MC, Reis A. Five-year Effects of Chlorhexidine on the In Vitro Durability of Resin/Dentin Interfaces. *J Adhes Dent.* 2016;18(1):35-42. doi: 10.3290/j.jad.a35514.

37. Loguercio, A.D.; Stanislawczuk, R.; Polli, L.G.; Costa, J.A.; Michel, M.D.; Reis, A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci* 2009;117:587–96.
38. Marcato PD, Durán N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. *J Nanosci Nanotechnol*. 2008 May;8(5):2216-29.
39. Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. MMP Activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res* 2012;91(5):467-472.
40. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley EL, Tay FR. Reactivation of quenched endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 2006;27:4470–6.
41. Muzzareli RA, Ferrero A, Pizzoli M. Light-scattering, X-ray diffraction, elemental analysis and infrared spectro- photometry characterization of chitosan, a chelating polymer. *Talanta*. 1972 (10):1222-6.
42. Opdam N, van de Sande F, Bronkhorst E, Bottenberg P, Cenci M, Gaengler P, et al. Longevity of posterior composite restorations: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*, 93 (2014), pp. 943–949.
43. Parsa P, Paydayesh A, Davachi SM. Investigating the effect of tetracycline addition on nanocomposite hydrogels based on polyvinyl alcohol and chitosan nanoparticles for specific medical applications. *Int J Biol Macromol*. 2018 Oct 17. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.074.
44. Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakajima M, Yoshijama M, Shono Y, Fernandes CA, Tay FR. The microtensile bond test: a review. *J Adhes Dent* 1999;1:299-309.
45. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83(3):216-21.
46. Persadmehr A, Torneck CD, Cvitkovitch DG, Pinto V, Talior I, Kazembe M, Shrestha S, McCulloch CA, Kishen A. Bioactive chitosan nanoparticles and photodynamic therapy inhibit collagen degradation in vitro. *J Endod*. 2014 40(5):703-9.
47. Pessoa JIC, Guimarães GN, Viola NV, Silva WJ, Souza AP, Tjäderhane L, Line SR, Marques MR. In situ study of the gelatinase activity in demineralized dentin from rat molar teeth. *Acta Histochemica* 2013;115(3),245–251.
48. Raafat D, Sahl HG. Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey. *Microb Biotechnol*. 2009 Mar;2(2):186-201.
49. Ricci HA, Sanabe ME, Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin–dentin bonds. *Eur J Oral Sci* 2010;118:411–416.

50. Sabatini C, Pashley DH. Mechanisms regulating the degradation of dentin matrices by endogenous dentin proteases and their role in dental adhesion. A review. *Am J Dent*. 2014 (4):203-14.
51. Sabatini C, Patel SK. Matrix metalloproteinase inhibitory properties of benzalkonium chloride stabilizes adhesive interfaces. *Eur J Oral Sci*. 2013 (6):610-6.
52. Saez, A., Guzman, M., Molpecers, J., Aberturas, M. R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor. *Eur J Pharm Biopharm* 2000 50(3):379-87.
53. Scaffa, P.M.; Vidal, C.M.; Barros, N.; Gesteira, T.F.; Carmona, A.K.; Breschi, L.; Pashley, D.H.; Tjäderhane, L.; Tersariol, I.L.; Nascimento, F.D.; Carrilho, M.R. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res* 2012;91(4):420-5.
54. Serkies KB, Garcha R, Tam LE, De Souza GM, Finer Y. Matrix metalloproteinase inhibitor modulates esterase-catalyzed degradation of resin-dentin interfaces. *Dent Mater*. 2016 Dec;32(12):1513-1523. doi: 10.1016/j.dental.2016.09.007.
55. Shokati B, Tam LE, Santerre JP, Finer Y. Effect of salivary esterase on the integrity and fracture toughness of the dentin-resin interface. *J Biomed Mater B Appl Biomater*, 94 (2010), 230–237.
56. Silva Sousa AB, Vidal CMP, Leme-Kraus AA, Pires-de-Souza FCP, Bedran-Russo AK. Experimental primers containing synthetic and natural compounds reduce enzymatic activity at the dentin-adhesive interface under cyclic loading. *Dent Mater*. 2016 Oct;32(10):1248-1255. doi: 10.1016/j.dental.2016.07.012.
57. Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, O. Marangos, et al. Adhesive/dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng*, 38 (2010), pp. 1989–2003.
58. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *J Dent* 2011;39:40–7.
59. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res* 2002;81(9):603-7.
60. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2007;52:121–127.
61. Tangsadthakun C, Kanokpanont S, Sanchavanakit N, Pichyangkura R, Banaprasert T, Tabata Y, Damrongsakkul S. The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2007;18(2):147-63.

62. Taravel MN, Domard A. Relation between the physicochemical characteristics of collagen and its interactions with chitosan: I. *Biomaterials* 1993;14:930–8.
63. Tekçe N , Tuncer S, Demirci M, Balci S. Do Matrix Metalloproteinase Inhibitors Improve the Bond Durability of Universal Dental Adhesives? *Scanning* 2016 (9999) 1-10.
64. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, F.D. Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod*, 2010 (3)475–481.
65. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho M, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer - A review. *Dent Mater* 2013;29(10):999-1011.
66. Tjäderhane L. Dentin Bonding : Can We Make it Last ? *Operative Dentistry* 2015;4–18
67. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J DentRes* 1998; 77: 1622–1629
68. Ye H, Cheng J, Yu K. In situ reduction of silver nanoparticles by gelatin to obtain porous silver nanoparticle/chitosan composites with enhanced antimicrobial and wound-healing activity. *Int J Biol Macromol*. 2018 Oct 13;121:633-642. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.056
69. Zheng P, Zaruba M, Attin T, Wiegand A. Effect of different matrix metalloproteinase inhibitors on microtensile bond strength of an etch-and-rinse and a self-etching adhesive to dentin. *Oper Dent* 2015;40(1):80-6.
70. Zhou J, Tan J, Yang X, Xu X, Li D, Chen L. MMP-inhibitory effect of chlorhexidine applied in a self-etching adhesive. *J Adhes Dent* 2011;13(2):111-5.

Anexo

ANEXO A

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP - FORP/USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da incorporação de nanopartículas de quitosana no sistema adesivo universal sobre a inibição de metaloproteinase presentes na matriz dentinária

Pesquisador: Maria Cristina Borsatto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 85389417.5.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.626.256

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores informaram que, serão utilizados

156 molares permanentes recém-extraídos obtidos através do Biobanco de dentes da FORP-USP, onde serão seccionados no sentido méso-distal,

e logo após seccionados no terço oclusal. Os corpos de prova serão polidos sequencialmente, obtendo uma dentina de superfície plana. Após isso

será realizado o condicionamento dessas superfícies utilizando o Ácido Fosfórico a 37% (Scotchbond Universal Etchant Gel – 3M; Neuss, Germany)

durante 15 segundos, lavados com água deionizada e secos com papel absorvente. Após isso, será realizada a aplicação dos Sistemas adesivos experimentais.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de Quitosana ao sistema adesivo universal sobre a inativação de MMPs presentes na dentina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Projeto in vitro. Estudo com dentes que serão doados pelo Biobanco da FORP/USP, após aprovação do projeto pelo CEP da FORP/USP.

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

Continuação do Parecer: 2.626.256

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Documentação adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação adequada.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado conforme deliberado na 215ª Reunião Ordinária do CEP/FORP de 23/04/2018.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_882757.pdf	13/03/2018 15:45:23		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biobanco.pdf	22/12/2017 19:53:09	JOSE GUILHERME NEVES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infraestrutura.pdf	22/12/2017 19:51:25	JOSE GUILHERME NEVES	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	29/03/2017 16:37:28	Maria Cristina Borsatto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	29/03/2017 09:21:29	Maria Cristina Borsatto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP - FORP/USP

Continuação do Parecer: 2.626.256

RIBEIRAO PRETO, 27 de Abril de 2018

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br