

Influence of *Copaifera multijuga hayne* oil-based emulsion on the stability of the dentin matrix

Influência da emulsão à base de óleo de *Copaifera multijuga hayne* na estabilidade da matriz dentinária

Letícia da Silva Soares Gomes^{1*}, Geisy Rebouças Lima², Ana Laura Mendes Mota³, Vanara Florêncio Passos⁴, Maria Fulgência Costa Lima Bandeira⁵, Nikeila Chacon de Oliveira Conde⁶, Carina Toda⁷

Received: 2023-01-11 | Accepted: 2023-02-12 | Published: 2023-03-03

ABSTRACT

The objective of this work was to analyze the elastic response of dentin to the biomodification of the organic matrix with the use of an emulsion based on Copaiba oil. Sound human third molars, 0.5 mm x 1.7 mm x 7 mm, were prepared, 90 samples were obtained, demineralized, radiographed and tested at baseline and immersed for 30 and 60 minutes in the test substances: GC1 (distilled water); GEC (Copaiba oil-based emulsion); GCLX (2% Chlorhexidine). The modulus of elasticity (ME) was evaluated immediately after biomodification and at 3, 7 and 14 days after treatment. The specimens were tested in 3-point flexion with a 5 N load cell. The data were submitted to statistical analysis using parametric test of mixed three-way ANOVA. All groups showed a decrease in ME over time. The immersed specimens from the GEC group showed the highest values after 3 and 7 days. It was concluded that the treatment of collagen with all the test substances at 30 and 60 min of immersion immediately reduced the ME, however the GEC group was the one that presented the highest values of the mean modulus of elasticity, promoting greater stability throughout the period. evaluation time.

Keywords: Dentin; Phytotherapy; Collagen; Chlorhexidine;

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar a resposta elástica da dentina frente à biomodificação da matriz orgânica com a utilização da emulsão à base de óleo de Copaiba. Terceiros molares humanos hígidos, foram preparados 0,5mm x 1,7 mm x 7 mm, sendo obtidas 90 amostras, desmineralizadas, radiografadas e testadas em baseline e imersas durante 30 e 60 minutos nas substâncias teste: GC1 (água destilada); GEC (Emulsão à base de óleo de Copaiba); GCLX (Clorexidina 2%). O módulo de elasticidade (ME) foi avaliado imediatamente após a biomodificação e em 3, 7 e 14 dias após o tratamento. Os espécimes foram testados em flexão de 3 pontos com célula de carga de 5 N. Os dados foram submetidos a análise estatística usando teste paramétrico de ANOVA três fatores mista. Todos os grupos apresentaram uma diminuição no ME ao longo do tempo. Os corpos de prova imersos do grupo GEC apresentaram os maiores valores após 3 e 7 dias. Concluiu-se que o tratamento do colágeno com todas as substâncias-teste em 30 e 60 min de imersão, reduziu imediatamente o ME, no entanto o grupo GEC foi o que apresentou maiores valores das médias de modulo de elasticidade promovendo maior estabilidade ao longo do tempo de avaliação.

Palavras-chave: Dentina; Fitoterapia; Colágeno; Clorexidina;

1. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8040-1255>. Universidade Federal do Amazonas (UFAM). E-mail: leticiasoaresz@gmail.com.*
2. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9200-6375>. Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
3. Universidade Federal do Ceará (UFC)
4. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5121-0436>. Universidade Federal do Ceará (UFC)
5. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-5578>. Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
6. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3756-2085>. Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
7. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1709-0877>. Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

INTRODUÇÃO

O colágeno tipo I compõe de forma principal a matriz dentinária, e está intimamente relacionado ao processo de união resina-dentina. A longevidade clínica da camada híbrida depende diretamente da estabilidade das fibrilas colágenas, da qualidade da matriz polimérica que a compõe, e envolve fatores químicos e físicos que influenciam na criação de uma camada compacta e homogênea (BEDRAN-RUSSO et al., 2014; DELGADO et al., 2015).

Na Odontologia restauradora um grande desafio está relacionado à formação de uma união eficiente entre as estruturas dentais e os compostos resinosos. Em substrato dentinário essa união pode ser prejudicada, pois nessa interface da camada híbrida formada podem ocorrer algumas falhas e mecanismos de degradação a longo prazo devido a alguns fatores como a ação das metaloproteinases da matriz (MMPs), catepsinas (CTPs), a ocorrência de infiltração marginal, forças oclusais, mudanças de temperatura, agentes ácidos no fluido dentinário, entre outras interferências que podem desafiar a estabilidade da interface. É necessário que a rede de fibras colágenas para esta função, apresente condições importantes como estabilidade, maior resistência e insolubilidade (PASHLEY et al., 2011; FRASSETTO et al., 2016; NIU et al., 2014; BRESCHI et al., 2008; BEDRAN-RUSSO et al., 2010).

Dos inúmeros inibidores das MMPs, o Digluconato de Clorexidina 2% (CLX) tem sido o mais estudado e amplamente utilizado na clínica odontológica, por suas propriedades antimicrobianas e ação inibidora de degradação enzimática da matriz colagênica da dentina (BRESCHI et al., 2018). Ligações cruzadas, reticulação polimérica ou cross-links são ligações entre as cadeias laterais de aminoácidos presentes nas moléculas de colágeno. Como resultado dessa reação, as estruturas tendem a perder sua fluidez e tornam-se mais rígidas, aumentando as propriedades mecânicas do colágeno. Quando aplicados junto ao colágeno tipo I, presente em dentina, algumas substâncias com potencial biomodificador tem a capacidade de promover tal reticulação polimérica (BEDRAN-RUSSO et al., 2014).

Considerando os estudos realizados até o momento, o biomodificador dentinário à base de óleo de *Copaifera multijuga Hayne* demonstrou atividade antibacteriana, anti-inflamatória e inibitória de metaloproteinases, podendo auxiliar na adesão de materiais restauradores à estrutura dental, sugere-se que as propriedades biológicas da Emulsão de copaíba 10%, possuem vantagem sobre o Digluconato de Clorexidina 2%, por ser um produto natural e com menor citotoxicidade. Acredita-se que esse produto natural possa colaborar para avanços na qualidade da adesão de materiais restauradores à estrutura dentária (DE BARI et al., 2010; BANDEIRA et al., 2020; MEIRA et al., 2020; ARAÚJO et al., 2021, MOURA et al., 2021).

Considerando tal questão, a análise do módulo de elasticidade da dentina desmineralizada torna-se um método analítico de interesse, uma vez que a rede de fibras colágenas desmineralizada é um componente que integra a interface adesiva, em procedimentos onde utiliza-se condicionamento ácido, e sugere-se que o mesmo tenha correlação com a resistência mecânica e estabilidade (CASTELLAN et al., 2010).

Assim o presente estudo teve por objetivo analisar a resposta elástica da dentina biomodificada com a emulsão à base de óleo de *Copaifera multijuga* Hayne, fornecendo uma contribuição inédita entre os que se propuseram estudar as propriedades relacionadas a emulsão à base de óleo de Copaíba.

METODOLOGIA

O estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), com o número (CAAE14945719.1.0000.5020). A pesquisa foi conduzida na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO-UFAM) e no Laboratório Multidisciplinar em Pesquisa Odontológica (LAMPO) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará - UFC. Terceiros molares hígidos foram fornecidos através de um Biorrepositório, respeitando os aspectos éticos, com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Formulação da emulsão à base de óleo de Copaíba

O óleo resina da *Copaifera multijuga* Hayne, encontrada na Reserva Ducke, no Km 17 da Rodovia Manaus-Itacoatiara, foi catalogado sob o n° 69 pelo Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). A coleta foi realizada e a exsicata foi depositada no herbário do INPA sob o n° 270709 e foi realizado o cadastramento no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio genético e do Conhecimento tradicional associado (SISGEN) do Ministério do Meio Ambiente (n°A1D4687). A emulsão à base de Copaíba foi formulada, obedecendo às orientações da Farmacopeia Brasileira (2010) e seguindo as proporções propostas por De Bari et al. (2016). A emulsão foi mantida em temperatura refrigerada, em frasco de vidro, de cor âmbar, com tampa rosqueável e selado com Parafilm®.

Preparação das amostras

Trinta terceiros molares humanos hígidos extraídos foram coletados após procedimentos cirúrgicos dos doadores do biorrepositório e manuseados para a produção das amostras utilizadas para a análise do módulo de elasticidade, totalizando 90 amostras (n = 15). Os dentes foram

limpos de debris, e seccionados com o auxílio de disco diamantado de 0,5 mm adaptado na máquina de corte Mecatome® P100 (PRESI, Grenoble, França), sob refrigeração, com velocidade de 300 rpm e 200 g de força. A porção radicular foi cortada a 1 mm abaixo da junção esmalte-cemento (JEC) e a raiz descartada. A porção oclusal foi removida expondo dentina coronária através de abrasão com auxílio de lixas d'água (3M) de granulação 600, sob refrigeração constante velocidade de 600 rpm, adaptadas a uma politriz AROTEC® (Aropol 2V, Arotec S.A. Indústria e Comércio, série 040865 Cotia, SP, Brasil), para obter uma superfície plana de dentina. Essa porção coronária foi cortada em fatias de 0,5 mm ($\pm 0,1$) na direção mesio-distal, por meio de disco de diamante 0,5 mm, acoplado novamente a máquina de corte Mecatome® P100 (PRESI, Grenoble, França), sob refrigeração constante. As fatias foram posteriormente desgastadas através de broca cilíndrica de alta rotação e disco de lixa em baixarotação, até se atingir a dimensão retangular padrão final de 0,5mm de espessura x 1,7 mm de altura x 7 mm de comprimento. As dimensões dos espécimes foram mensuradas através de um paquímetro digital (FORTGPRO-FG8331). Uma marcação foi confeccionada em uma extremidade das superfícies para permitir que as medições fossem repetidas na mesma superfície do corpo de prova. (CASTELLAN et al., 2011).

Os espécimes foram imersos em solução de ácido fosfórico a 10%, por um período de 5 horas, em temperatura ambiente, sob agitação constante e posteriormente todos foram radiografados em aparelho de raio X odontológico de parede (Digital 70Kv – X DENT) com tempo de exposição de 0,32 segundos, utilizando películas radiográficas periapicais (E-Speed), para avaliar se houve desmineralização completa do tecido dentinário. Em seguida, foram enxaguados abundantemente com água destilada por 10 minutos, para remoção de qualquer resquício de ácido. (BEDRAN-RUSSO et al., 2008).

Ensaio de estabilidade

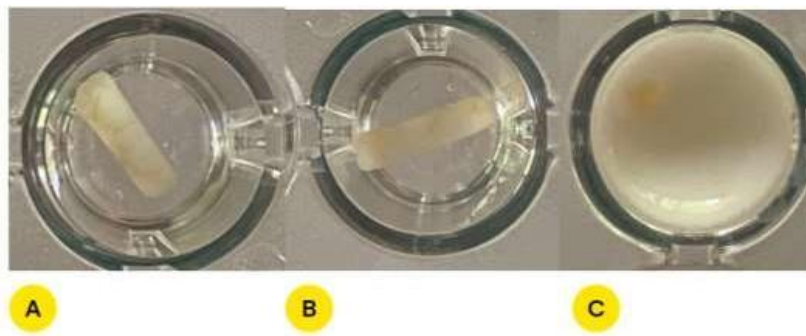
As amostras foram testadas sem nenhum tratamento (*baseline*). Posteriormente, foram alocadas em placa de 96 poços imersas em 20 μ l de sua respectiva solução-teste, de acordo com número de corpos nos seguintes grupos: GC1 (água destilada); GEC (EC 10%); GCLX (Digluconato de Clorexidina 2%) para diferentes avaliações imediatas de tempo de aplicação (30 e 60 minutos) nos períodos de mensuração (Quadro 1 e Figura 10). Após o período das avaliações iniciais T0 (após a biomodificação), para a verificação da estabilidade, os espécimes foram armazenados em saliva artificial com composição seguindo as recomendações do Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (2010), com PH 7,0, em incubadora a 37°C. Após 3, 7 e 14

dias, foram realizadas novas aferições do módulo de elasticidade, nos mesmos espécimes ao longo do tempo.

Tabela 1. Grupos experimentais e tempos de imersão, por solução-teste.

Grupos experimentais	Soluções-teste	Imersão	Imersão	Total por grupo
		TEMPO A 30 min	TEMPO B 60 min	
GCI	Água Destilada	15 cp	15cp	30 cp
GEC	Emulsão Copaiba 10 %	15cp	15cp	30 cp
GCLX	Digl. de CLX 2%	15cp	15cp	30 cp

Figura 1 - Representação de um poço de placa de 96 poços contendo os corpos de prova imersos em seus respectivos grupos-teste. A: Grupo: GCI; B - Grupo: GCLX ; C: Grupo: GEC.



Fonte: Gomes (2021)

Avaliação das propriedades mecânicas

Os espécimes foram testados em flexão de 3 pontos usando uma célula de carga de 5 N montada em uma máquina de teste universal (INSTRON com Laptop Dell Latitude E5510) velocidade de 0,5 mm/min (Figura 2). O Deslocamento (D) durante a compressão foi

exibido em milímetros e calculado com uma deformação máxima de 3% usando a seguinte fórmula (MOREIRA, 2017):

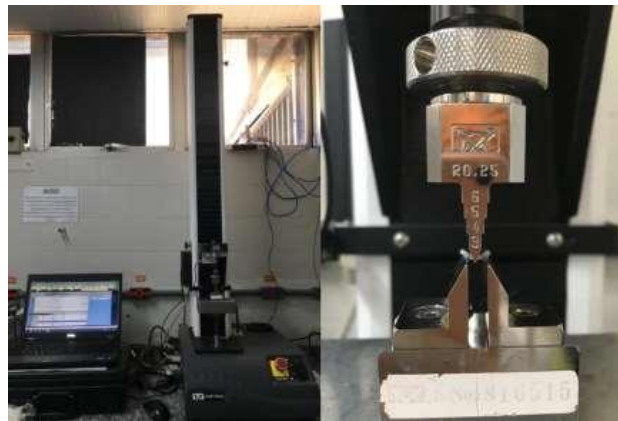
$$D = \varepsilon L^2 / 6T$$

Onde, ε é tensão, L a distância entre os suportes e T é a espessura da amostra. O módulo de elasticidade (ME) dos espécimes foi expresso em MPa (Mega Pascal) e calculada usando a seguinte fórmula:

$$E = PLt / 4DbT$$

Onde, P é a carga máxima, L a distância entre os suportes, D o deslocamento, b é a largura e T a espessura do corpo de prova.

Figura 2. Máquina de teste universal (INSTRON com Laptop Dell Latitude E5510)



Fonte : Gomes (2021)

Análise Estatística

Para avaliar se o tipo de solução, tempo imersão A e B (30 e 60 minutos) e tempo (*baseline*, T0 - após biomodificação, 3 dias, 7 dias e 14 dias) afetam significativamente o módulo de elasticidade da matriz dentinária desmineralizada, recorreu-se ao teste paramétrico de ANOVA três fatores mista para amostras independentes e dependentes. O pressuposto da distribuição normal da variável foi avaliado pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). O pressuposto de homogeneidade de variância foi avaliado com o Teste de Levene ($p < 0,05$) e a esfericidade pelo teste de Mauchly ($p < 0,05$). Utilizou-se um nível de significância de $\alpha = 0,05$ para todas as análises de inferência. Para identificar quais os pares de médias diferem entre si, para a interação entre os fatores e para os momentos avaliados, procedeu-se a comparação

múltipla de médias com correção de Bonferroni. As análises estatísticas descritivas, gráficas e inferências foram executadas com o software PAWS Statics (v. 21, SPSS Inc, Chicado, IL).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 mostra o sumário do teste de ANOVA três fatores para avaliação dos fatores de estudo.

Tabela 2. Teste de Anova três fatores mista para avaliação dos fatores de estudo.

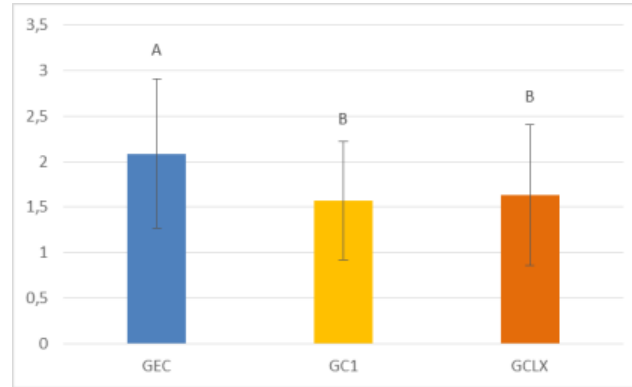
	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Potência observada
Entre Grupos						
Solução	16,070	2	8,035	9,049	,000*	,968
Imersão	13,209	1	13,209	14,877	,000*	,966
Solução*Imersão	1,695	2	,847	,954	,391	,207
Erro	47,946	54	,888			
Dentro dos Grupos						
Tempo	30,602	4	7,651	27,393	,000*	1,000
Tempo*Solução	8,455	8	1,057	3,784	,000*	,987
Tempo*Imersão	2,940	4	,735	2,632	,035*	,730
Tempo*Solução*Imersão	2,962	8	,370	1,326	,232	,600
Erro (tempo)	60,327	216	,279			

*Significante ($p < 0,05$)

Os efeitos principais entre os grupos solução, imersão e tempo, e as interações duplas, Tempo*Solução e Tempo*imersão, apresentaram diferenças estatisticamente significantes com valores de $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$ e $p = 0,035$, respectivamente, com consequente complexidade na interpretação das diferenças entre as médias do ME.

A Figura 3 mostra a média e o desvio padrão para o efeito principal solução. A solução de EC apresentou os maiores valores de ME pós-flexão ($2,09 \pm 0,82$), sendo estatisticamente significativa quando comparados com as soluções de Água destilada ($1,57 \pm 0,65$) e Digluconato de Clorexidina 2% ($1,64 \pm 0,77$), que não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si.

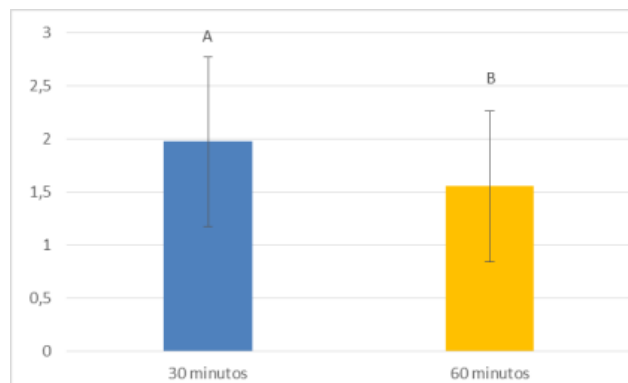
Figura 3. Média e o desvio padrão dos valores de módulo de elasticidade expressos em MPa, para o efeito principal solução. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significantes com $p < 0,05$ (teste de Bonferroni).



Fonte : Gomes (2021)

A Figura 4 mostra a média e o desvio padrão para o efeito principal imersão. O ME expresso em megapascal (MPa) apresentou maiores valores quando os corpos de prova foram imersos durante um período de 30 minutos ($1,97 \pm 0,80$) sendo estatisticamente significante quando comparado com o grupo de 60 minutos ($1,55 \pm 0,71$).

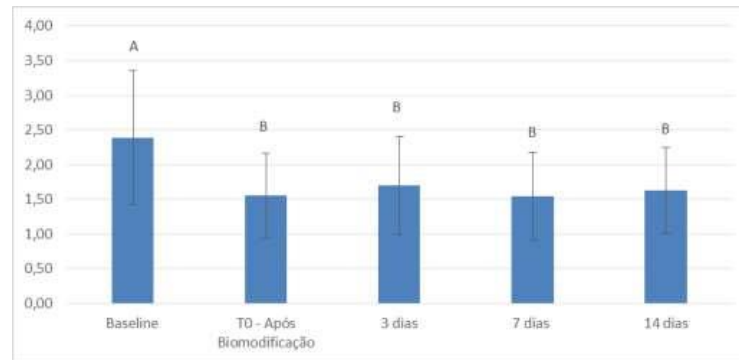
Figura 4. Média e desvio padrão dos valores de módulo de elasticidade em MPa, para o efeito principal imersão. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significantes com $p < 0,05$ (teste de Bonferroni).



Fonte : Gomes (2021)

A Figura 5 mostra a média e o desvio padrão para o efeito principal tempo. Os maiores valores de ME foram obtidos para o grupo *baseline* ($2,39 \pm 0,96$) sendo estatisticamente significante quando comparado com os grupos T0 - biomodificação ($1,55 \pm 0,62$), 3 dias ($1,70 \pm 0,71$), 7 dias ($1,54 \pm 0,63$) e 14 dias ($1,63 \pm 0,62$).

Figura 5. Média e o desvio padrão dos valores de módulo de elasticidade em MPa para o efeito principal tempo. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significantes com $p < 0,05$ (teste de Bonferroni).



Fonte : Gomes (2021)

O efeito do tempo (*baseline*, T0 - após biomodificação, 3 dias, 7 dias e 14 dias) no módulo de elasticidade da dentina desmineralizada, dependeu do tipo de solução (EC 10%, Água destilada e Clorexidina), como demonstra a interação significativa Tempo*Solução ($p < 0,001$). A Tabela 3 demonstra o efeito da interação sobre os dois fatores avaliados.

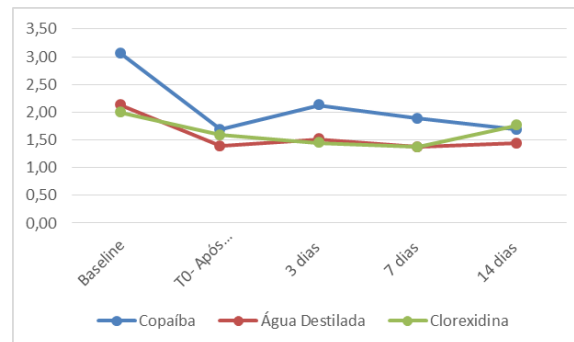
Tabela 3. Comparações múltipla das médias e desvio padrão do ME em MPa nas três soluções testadas em cada um dos 4 períodos avaliados.

	<i>baseline</i>	Após biomodificação	3 dias	7 dias	14 dias
GEC	3,05± 0,92 Aa	1,68± 0,55 Ab	2,13± 0,64 Ab	1,89± 0,44 Ab	1,69± 0,63 Ab
GCI	2,13± 0,73 Ba	1,39± 0,41 Ab	1,51± 0,59 Bb	1,37± 0,66 Bb	1,44± 0,55 Ab
GCLX	2,00± 0,90 Bac	1,59± 0,81 Aabc	1,45± 0,72 Bbc	1,38± 0,66 Bbc	1,76± 0,66 Ac

Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa no sentido vertical. Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa no sentido horizontal (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Todos os grupos apresentaram uma diminuição no ME ao longo do tempo. Os corpos de prova imersos na solução de EC apresentaram os maiores valores após 3 e 7 dias, sendo estatisticamente significante ($p < 0,05$), quando comparado com T0 e 14 dias e entre as soluções de Água Destilada e Digluconato de Clorexidina 2 % no mesmo período (3 e 7 dias). A Figura 6 mostra o comportamento da variável tempo para os três tipos de soluções.

Figura 6. Influência do tratamento com diferentes soluções no módulo de elasticidade em corpos de prova dentina desmineralizada em diferentes tempos de envelhecimento.



Fonte : Gomes (2021)

Em relação ao efeito do tempo (Baseline, T0 – após biomodificação, 3 dias, 7 dias e 14 dias) na resistência a flexão dependeu do tipo de imersão (30 e 60 minutos), como demonstrando interação significativa Tempo*Imersão ($p < 0,001$). A Tabela 4 demonstra o efeito da interação sobre os dois fatores avaliados.

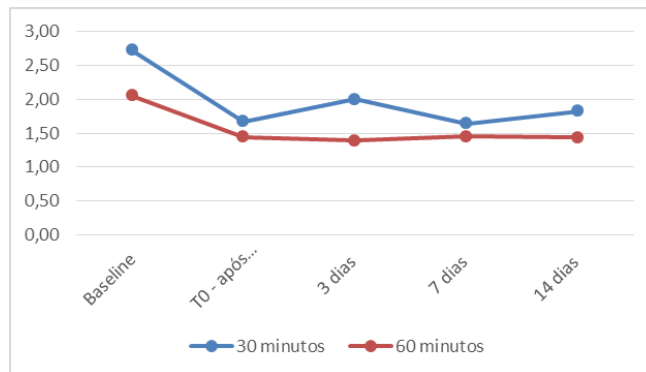
Tabela 4. Comparações múltipla das médias e desvio padrão da resistência a flexão em relação ao tempo de imersão testadas em cada um dos 4 períodos avaliados.

	Baseline	Após biomodificação	3 dias	7 dias	14 dias
30 minutos	2,73± 0,92 Aa	1,67± 0,61 Abcd	2,01± 0,68 Abd	1,64± 0,61 Acd	1,83± 0,65 Ad
60 minutos	2,05± 0,89 Ba	1,44± 0,62 Ab	1,39± 0,62 Bb	1,45± 0,65 Ab	1,44± 0,54 Bb

Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa no sentido vertical. Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa no sentido horizontal (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Todos os grupos apresentaram uma diminuição do ME ao longo do tempo, após os tempos de imersão. Os corpos imersos durante 30 minutos apresentaram os maiores valores durante todos os períodos, sendo estatisticamente significante, quando comparados com a imersão durante 60 minutos, exceto no tempo de 30 minutos e 7 dias. O grupo de *baseline* apresentou os maiores valores quando comparados com os outros tempos. A Figura 7 mostra o comportamento da variável tempo para os três tipos de soluções.

Figura 7. Influência do tratamento com diferentes soluções no ME em corpos de prova de dentina desmineralizada em diferentes tempos de envelhecimento.



Fonte : Gomes (2021)

O presente estudo buscou através de teste de flexão de três pontos analisar a influência da imersão de corpos de prova padronizados sobre o ME na dentina desmineralizada tratada com EC 10%, CLX 2% e água destilada. Os resultados deste estudo foram expressos em Megapascal (MPa) e foram positivos, onde observou-se que os valores das médias encontradas se aproximaram do que é descrito nos diversos estudos na literatura, quanto aos valores de módulo de elasticidade da dentina, em grande parte dos resultados dos testes ao longo do tempo. Sabe-se que quanto maior o módulo de elasticidade atingido para determinado valor de tensão, menor a deformação, determinando assim a dureza ou rigidez relativa. Existe uma variação de valores do módulo de elasticidade da dentina na literatura, onde podemos encontrar valores expressos entre 12 a 25,07 GPa (Gigapascal) o que representa $1,2 \times 10^4$ Megapascal (MPa) a $2,507 \times 10^4$ Megapascal (MPa) (SABBAGH et al., 2002; XU et al., 1998; DOS SANTOS et al., 2011; FARES et al., 2005; ANGKER et al., 2008).

Segundo Bedran- Russo (2008) dentre os diversos métodos de mensuração e teste para analisar o ME da dentina desmineralizada, o ensaio de estabilidade por meio de teste de flexão de três pontos com 3% de deslocamento apresenta vantagem por ser um método que não causa destruição. O que corrobora com o presente estudo, onde utilizando esse método para análise do ME, os corpos de prova que foram testados e não sofreram danos permanentes após a análise inicial no *baseline*, dessa forma, foi possível utilizar o corpo de prova como controle e realizar avaliações após a imersão em agente com potencial de biomodificação repetindo os testes ao longo dos tempos de armazenamento no mesmo corpo de prova.

Bem como este estudo, é necessário avaliar através de testes *in vitro* os valores de ME quando se trata do desenvolvimento de produtos que objetivem melhorias na adesão ao substrato dentinário, os chamados agentes biomodificadores ou agentes de reticulação podem

proporcionar estabilização, resistência à biodegradação e fortalecimento da matriz de colágeno, mantendo os valores de módulo de elasticidade estáveis ou promovendo o aumento ao longo do tempo. A maior estabilidade e resistência das fibras colágenas é muito significativa, por sua função como suporte para infiltração dos sistemas adesivos, podendo contribuir para aumento da longevidade de restaurações em resina composta (BEDRAN-RUSSO et al., 2009; EPASINGHE et al., 2014).

Neste estudo, na análise dos valores do ME, todos os grupos independente de tipo solução e tempo de imersão foram efetivos em manter o ME da dentina, em valores semelhantes aos encontrados na literatura, como mencionado anteriormente. Todos os grupos apresentaram uma diminuição no ME inicial, imediatamente após os tempos de imersão nas soluções com potencial de biomodificação EC 10%, CLX 2% e grupo controle, o ME da dentina tratada em todos os grupos não apresentou aumento imediatamente após a biomodificação, mas sim de forma gradual. Os resultados demonstraram que os corpos de prova imersos na solução de EC apresentaram os maiores valores de módulo de elasticidade após 3 ($2,13 \pm 0,64$) e 7 dias ($1,89 \pm 0,44$), sendo estatisticamente significativa, quando comparado com os valores após a biomodificação e em 14 dias e entre as soluções de Água Destilada e CLX 2% no mesmo período (3 e 7 dias).

O presente estudo mostrou que o grupo-teste CLX 2% apresentou uma redução inicial do ME após a biomodificação, apresentando resultados similares aos encontrados por Kim et al. (2011) que demonstraram em seu estudo a capacidade da CHX de promover a remineralização da dentina desmineralizada a partir do módulo de elasticidade e imagens do MEV, os resultados expressaram que na concentração CHX 2% em 14 dias, houve uma redução inicial do módulo de elasticidade quando comparado ao *baseline*. Os mesmos autores também denotaram aumento significativo no ME nos grupos tratados com CHX após 6 semanas do tratamento biomodificador. Sabe-se que a Clorexidina 2% (CHX) é a substância mais estudada entre os agentes com capacidade de ação inibitória das MMPs e CTPs, além da atividade antimicrobiana, a literatura sugere a utilização da solução de Digluconato de CHX 2% como um passo da técnica operatória anterior a aplicação do sistema adesivo, pela capacidade de inibição em períodos curtos de aplicação e baixa concentração. Porém devido a ligação eletrostática reversível da CHX com a dentina, a longevidade da inibição é dependente da substantividade no substrato, com duração média de 180 meses, no entanto seu potencial citotóxico é conhecido e seu uso em camadas com profundidade próxima a polpa dentária não é indicado (HEBLING, 2005; LAFUENTE, 2012; BETANCOURT et al., 2019; CARRILHO et al., 2007; BRESCHI et al., 2009; BRESCHI et al., 2010; RIOS et al., 2015).

Não existe uma unanimidade ou consenso nos estudos a respeito do agente biomodificador ideal, mas a literatura demonstra um aumento do uso de produtos naturais nas pesquisas visando melhorias na camada híbrida, sendo uma opção favorável para futuras aplicações clínicas. Diversas moléculas de origem natural não tem seu mecanismo de ação como biomodificadores bem elucidado na literatura, em sua maioria os polifenóis. Outros agentes com características análogas são descritos com potencial biomodificador possuindo atividades terapêuticas como propriedade anti-inflamatórias, anticancerígenas e atividade antiproteolítica. (BEDRAN-RUSSO et al., 2014; VIDAL et al., 2014; KARAS et al., 2017). Corroborando com as propriedades terapêuticas do óleo de Copaíba comprovadas em diversos estudos, já mencionados anteriormente no capítulo revisão de literatura.

Analisando os dados de nosso estudo quanto ao fator solução o melhor resultado em relação ao tipo de solução, foi a EC 10% apresentando os maiores valores de ME (Mpa) pós-tratamento ($2,09 \pm 0,82$), sendo estatisticamente significativo ($p < 0,05$) quando comparados aos outros grupos-teste de Água destilada ($1,57 \pm 0,65$) e Digluconato de Clorexidina 2% ($1,64 \pm 0,77$), que não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si. Sendo este um estudo novo em relação ao uso da EC 10% e seu potencial biomodificador e de ação na matriz dentinária desmineralizada, não existe na literatura estudos que possam subsidiar esses achados, em relação a outros estudos relacionados ao ME e o uso da EC.

No entanto, sabe-se que a EC apresenta um PH básico porém, estudos realizados com as emulsões à base Copaíba demonstraram potencial biomodificador semelhante ao da CLX 2% (BANDEIRA et al., 2020). Além de testes evidenciando que essa emulsão não é genotóxica e nem citotóxica, as ECs apresentaram maior porcentagem de viabilidade celular quando comparadas a CLX e atividade inibitória das MMPs -2 e -9 (ARAÚJO et al., 2021). Além de atividade antimicrobiana frente às bactérias encontradas na cavidade oral (DE BARI et al, 2016) e agente bioativo para limpeza cavitária (BANDEIRA et al, 2016) bem como outros estudos relacionados a melhoria na resistência adesiva e na formação da camada híbrida (MEIRA et al., 2020). Por não ter o seu mecanismo de ação ainda bem definido, supõe-se que atividade antiproteolítica das EC sobre as MMPs, possua relação com o alto peso molecular de seu óleo, ocupando assim espaços formados entre as fibras colágenas, pois os solventes dos adesivos não conseguem ocupar essa área, dentre outras hipóteses (BETANCOURT et al, 2019; ARAÚJO et al., 2021)

Nos resultados deste estudo, o grupo controle (Água Destilada) apresentou os menores valores de módulo ME independente do tempo de imersão e ao longo do tempo de envelhecimento, o que corrobora com os estudos de Castellan (2011) e Ferreira (2020) onde

após imersão dos espécimes em água destilada durante 1 hora, observou-se redução do ME imediatamente ao tempo de tratamento e ao longo dos tempos testados. No entanto Bridi (2018), descreve uma redução imediata após o tratamento, porém, um ganho no valor de ME semelhante aos outros grupos após 3 meses e 6 meses.

Os resultados deste estudo com relação ao tempo de imersão, demonstraram que corpos de prova imersos durante 30 minutos apresentaram os maiores valores de ME pós-tratamento, durante todos os períodos de envelhecimento, sendo estatisticamente significante ($p < 0,05$), quando comparados com a imersão durante 60 minutos. Segundo o estudo de Liu Y. (2013), esses longos tempos de imersão nas substâncias-teste são impraticáveis clinicamente, mas podem ser justificados no desenho de estudo pela espessura dos corpos de prova, pois nos testes *in vitro* existe uma diferença das condições clínicas reais objetivando-se apenas analisar o efeito biomodificador, sendo o tempo de imersão não condizente com um tempo clínico passível de aplicação menor, pois clinicamente o colágeno exposto após desmineralização com ácido apresenta-se em escalas micrométricas, sendo esta uma limitação do presente modelo de estudo. Dessa forma pressupõe-se que o potencial de alguns agentes biomodificadores possuirá maior eficiência em zona mais fina de interação.

Apesar de não ser um dos objetivos do estudo, observou-se que após a imersão na EC bem como nos outros grupos, não houve alteração de cor perceptível nos espécimes, o que é favorável tendo em vista aplicação futura na prática clínica, o que não corrobora com o estudo de Moreira (2017) onde após tratamento com PACs e extrato de Aroeira, visualmente notou-se pigmentação dos espécimes com coloração fortemente escura, não sendo desejável essa alteração de cor da dentina.

Embora os corpos de prova de dentina desmineralizada tratados com EC tenham apresentado bons resultados em relação a manutenção do ME, outros estudos são necessários para compreender ao longo do tempo como funciona o mecanismo de variação de massa, interação e formação de ligações cruzadas por esse agente, além da relação com seus componentes químicos, durante maior tempo de armazenamento.

Os resultados deste estudo em conjunto com às pesquisas anteriores relacionadas a Emulsão à base de Copaíba, demonstram evidências do potencial para emprego futuro de um produto amazônico na odontologia, no entanto, testes de longa duração são necessários para compreender o seu mecanismo de ação, e ensaios clínicos randomizados para comprovar a eficácia e eficiência de aplicação clínica à partir dos testes pré-clínicos já realizados.

CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados, concluiu-se que o tratamento do colágeno da matriz dentinária desmineralizada com soluções com potencial biomodificador durante 30 e 60 min, reduziu imediatamente o ME após os tempos de imersão 30 e 60 min, no entanto, a emulsão à base de Copaíba foi o grupo que apresentou maior estabilidade dos valores de ME ao longo tempo de armazenamento avaliado, sendo efetivo em manter o ME da dentina em valores semelhantes aos descritos na literatura, em relação à dentina desmineralizada, melhorando suas propriedades mecânicas do colágeno e mantendo estáveis após 14 dias de armazenamento.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), a equipe do Laboratório Multidisciplina de Pesquisa Odontológica da Univesidade Federal do Ceará (UFC), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), pelo apoio necessário.

REFERÊNCIAS

ANGKER, L. et al. Micro-mechanical characterisation of the properties of primary tooth dentine. **J Dent**, v. 31, n. 4, p. 261-267, 2003. DOI: 10.1016/s0300-5712(03)00045-9

ARAÚJO, E. M. et al. Effect of a Copaiba Oil-Based Dental Biomodifier on the Inhibition of Metalloproteinase in Adhesive Restoration. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2021, p. 1-10, 2021. DOI: 10.1155/2021/8840570

BANDEIRA, M. F. C. L. et al. Adhesive resistance of a copaiba oil-based dentin biomodifier. **Braz. oral res.**, v. 34, p. 1-10, 2020. DOI: 10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0001

BANDEIRA, M.F.C. L. et al. Dentin Cleaning Ability of an Amazon Bioactive: Evaluation by Scanning Electron Microscopy. **The Open Dent J**, v. 10, n.1, p. 182- 87, 2016. DOI: 10.2174/1874210601610010182

BEDRAN-RUSSO, A. K. B. et al. Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. **Journal of dental research**, v. 88, n. 9, p. 807-811, 2009. DOI: 10.1177/0022034509342556

BEDRAN-RUSSO, A. K. et al. Long-term effect of carbodimide on dentin matrix and resindentin bonds. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 94, n.1, p. 250-255, 2010. DOI: 10.1002/jbm.b.31649

BEDRAN-RUSSO, A.K.B. et al. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 86, n. 2, p. 330-334, 2008. DOI: 10.1002/jbm.b.31022

BEDRAN-RUSSO, Ana K. et al. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. **Dental materials**, v. 30, n. 1, p. 62-76, 2014. DOI: 10.1016/j.dental.2013.10.012

BETANCOURT, D.E et al. . Resin-Dentin bonding interface: Mechanisms of degradation and strategies for stabilization of the hybrid layer. **Int J Biomater**, v. 2019, p.1-11, 2019. DOI: 10.1155/2019/5268342

BRESCHI, L. et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2 year in vitro study. **Dental Materials**, v. 26, n. 4, p. 320-325, 2010. DOI: 10.1016/j.dental.2009.11.153

BRESCHI, L. et al. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. **Dental materials**, v. 24, n. 1, p. 90-101, 2008. DOI: 10.1016/j.dental.2007.02.009

BRESCHI, L. et al. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. **Dental Materials**, v. 34, n.1. p. 78-96, 2018. DOI: 10.1016/j.dental.2017.11.005

BRESCHI, L. et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. **J. Adhes. Dent**, v. 11, n. 3, p. 191-198, 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19603582/>

BRIDI, E. C. et al. Long-term evaluation of the stability of dentin matrix following treatments with aqueous solutions of titanium tetrafluoride at different concentrations. **Archives of oral biology**, v. 91, p. 51-56, 2018. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2018.04.006

CARRILHO, M.R.O. et al. Chlorhexidine Preserves Dentin Bond in vitro. **J. Dent. Res**, v.81, n.1, p. 90-94, 2007. DOI: 10.1177/154405910708600115

CASTELLAN, C. S. et al. Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. **J Mech Behav Biomed Mater**. vol. 4, n. 7, p. 1343-1350, 2011. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2011.05.003

CASTELLAN, C. S. et al. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. **Dental Materials**, v. 26, n.10, p. 968-973, 2010. DOI: 10.1016/j.dental.2010.06.001

DE BARI, C.C. et al.; Amazon emulsions as cavity cleansers: antibacterial activity, cytotoxicity and changes in human tooth color. **Rev. bras.farmacogn**, v.26; n.4; p.497-501, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.010>

DELGADO, C. C. et al. Redução da atividade proteolítica da dentina após curtos períodos de aplicação de proantocianidina. **Rev. odontol. UNESP**, v. 44, n. 6, p. 355-359, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-2577.02115>

DOS SANTOS, P. H; KAROI S.; BEDRAN-RUSSO A. K; Nanomechanical properties of biochemically modified dentin bonded interfaces. **J Oral Rehabil**, v. 38, n.7, p. 541-546, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2842.2010.02175.x

EPASINGHE, D. J. et al. Effect of flavonoids on the mechanical properties of demineralised dentine. **Journal of dentistry**, v. 42, n. 9, p. 1178-1184, 2014. DOI: 10.1016/j.jdent.2014.07.002

FARES, N.H. et al. Resistência flexural e módulo de elasticidade da resina composta. **Rev de Clin Pesq Odontol**, v.2, p. 53-5, 2005.

FERREIRA, Andreza Camurça et al. Biomodifying Effect of Different Cross-Linking Agents on the Mechanical Properties of Dentin Collagen. **Rev. Bras. Odontol**, v. 77, p. 1836-1841, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.18363/rbo.v77.2020.e1836>

FRASSETTO, A. et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability—A literature review. **Dental Materials**, v. 32, n. 2, p. 41-53, 2016. DOI: 10.1016/j.dental.2015.11.007

HEBLING, J. et al. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. **J Dent Res**, v. 84, n. 8, p. 741-6, 2005. DOI: 10.1177/154405910508400811

KARAS, et al. Galloylation of polyphenols alters their biological activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 223-240, 2017. DOI: 10.1016/j.fct.2017.04.021

LAFUENTE, D. SEM Analysis of Hybrid Layer and Bonding Interface After Chlorhexidine Use. **Oper Dent**. v.37, n.2, 172-180, 2012. DOI: 10.2341/10-251-L

LIU, Yi et al. Enhancement in dentin collagen's biological stability after proanthocyanidins treatment in clinically relevant time periods. **Dental Materials**, v. 29, n. 4, p. 485-492, 2013. DOI: 10.1016/j.dental.2013.01.013

MEIRA, D. F. J et al. Avaliação histomorfométrica do efeito de um biomodificador de dentina à base de óleo de copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) na camada híbrida. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 65445-65458, 2020. DOI:10.34117/bjdv6n9-104

MOREIRA, M. A. et al. Effectiveness of new natural biomodification agents of Anacardiaceae extracts in dentin collagen cross-linking. **Dental materials**, v.33,n.10, p. 1103-1109, 2017. DOI: 10.1016/j.dental.2017.07.003

MOURA, L. G. et al. . Dentin surface and hybrid layer morphological analysis after use of a copaiba oil- based dentin biomodifier. **Conjecturas**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 78–97, 2021. DOI: 10.53660/CONJ-155-30

NIU, Li-na et al. Biomimetic remineralization of dentin. **Dental materials**, v. 30, n. 1, p. 77- 96, 2014. DOI: 10.1016/j.dental.2013.07.013

PASHLEY, D. H. et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. **Dental materials**, v. 27, n. 1, p. 1-16, 2011. DOI: 10.1016/j.dental.2010.10.016

RIOS, L. F. F. et al. Chlorhexidine does not improve but preserves bond strength to eroded dentin. **American journal of dentistry**, v. 28, n. 1, p. 28-32, 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25864239/>

SABBAGH, J.; VREVEN, J.; LELOUP, G.; Dynamic and static moduli of elasticity of resinbased materials. **Dental Materials**, v. 18, n. 1. p. 64-71, 2002. DOI: 10.1016/s0109-5641(01)00021-5

VIDAL, C.M.P. et al. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plantderived catechins. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 7, p. 3288-3294, 2014. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.03.036

XU, H. H. et al. Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin. **J Dent Res**, v. 77, p. 472-480, 1998. DOI: 10.1177/00220345980770030601