UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

WARLLEY CAMPOS DE OLIVEIRA

COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO E ÁCIDO p-CUMÁRICO COMO BIOMODIFICADORES NO PRÉ-TRATAMENTO DA DENTINA: AÇÃO ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E ANTIOXIDANTE E EFEITO SOBRE A RESISTÊNCIA DE UNIÃO À DENTINA

ARAÇATUBA – SP
2023

WARLLEY CAMPOS DE OLIVEIRA

COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO E ÁCIDO p-CUMÁRICO COMO BIOMODIFICADORES NO PRÉ-TRATAMENTO DA DENTINA: AÇÃO ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E ANTIOXIDANTE E EFEITO SOBRE A RESISTÊNCIA DE UNIÃO À DENTINA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Odontológicas – Área de concentração: Biomateriais.

Orientadora: Profª Dra. Aimée Maria Guiotti

Coorientadora: Profª Dra. Cristiane Duque

Araçatuba – SP

2023

Catalogação na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

O48c

Oliveira, Warlley Campos de.
Compostos derivados do Ácido Cinâmico e Ácido p-Cumárico como biomodificadores no pré-tratamento da dentina: ação antimicrobiana, antibiofilme, antioxidante e efeito sobre a resistência de união à dentina / Warlley Campos de Oliveira. - Araçatuba, 2023
67 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Aimée Maria Guiotti
Coorientadora: Profa. Cristiane Duque

1. Compostos fenólicos 2. Anti-infecciosos 3. Biofilmes 4. Antioxidantes 5. Dentina 6. Materiais biocompatíveis I. T.

Black D15
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dados Curriculares

Warlley Campos de Oliveira

Warlley Campos De Oliveira

Nascimento	20.01.1997 – Porangatu – GO
Filiação	Lucelia Campos Paiva Wilton Ferreira De Oliveira
2016-2021	Curso de Graduação em Odontologia Pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP.
2018-2019	Projeto de Iniciação Científica, com bolsa PIBIC-CNPQ, intitulado como: Citotoxicidade de flavonoides sobre células osteoblásticas humanas.
2019-2020	Projeto de Iniciação Científica, com bolsa PIBIC-Reitoria Unesp, intitulado como: Efeito da combinação de flavonoides sobre a viabilidade e a expressão de marcadores de mineralização em células odontoblastóides.
2020-2021	Projeto de Iniciação Científica, com bolsa CNPQ, intitulado como: Citotoxicidade e potencial antimicrobiano/antibiofilme de ácidos fenólicos sobre microrganismos relacionados com infecções endodônticas.
2021-2022	Desenvolvimento do presente projeto de Mestrado com Auxilio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ.
Associações	CROSP – Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. CROGO – Conselho Regional de Odontologia de Goiás. SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. ABRAHOF – Associação Brasileira de Harmonização Orofacial.

Dedicatória

Dedico este trabalho com muito amor e carinho aos meus pais, Lucelia e Wilton, por todo amor, carinho e respeito com que me criaram. Vocês serão sempre exemplos para mim.

À Stefany Pinheiro, por todo incentivo, paciência, amor e cumplicidade. Você é única, me compreende, me dá forças nos momentos mais difíceis, é meu suporte e minha paixão. Se hoje estou finalizando esta conquista é graças a você que sempre me incentivou a continuar.

Ao meu irmão, Arthur, obrigado por ser tão companheiro. Mesmo distante, você esteve presente durante minha pós graduação. Eu amo você!

Por fim, mas não menos importante, dedico aos meus filhos de quatro patas, Tobias, Cacau e Maria Julia. Vocês são minha cura, me fortalecem e me ensinam a amar.

Nada seria possível sem vocês, espero ser motivo de orgulho para vocês, afinal, esta conquista é nossa.

Agradecimentos

*Sou grato a **Deus**, que com todo seu amor e cuidado me capacitou e me permitiu minha formação em uma universidade pública de excelência. Sempre me deu força nos momentos mais difíceis, me guiou dando discernimento durante as minhas escolhas, abriu portas quando mais necessitava e sempre esteve ao meu lado.*

*A **minha família**, por todo incentivo que me deram para iniciar e continuar essa grande jornada. Sem vocês eu jamais conquistaria tudo isso.*

*À minha orientadora **Profa. Dra**. **Aimée Maria Guiotti**, que é um verdadeiro exemplo de profissional, tenho muita admiração por você. Obrigado por acreditar em mim, por incentivar, aconselhar e se preocupar comigo. Não posso deixar de agradecer sua compreensão e empatia no momento que mais precisei. Obrigado por todos os ensinamentos e por sua paciência.*

*À minha coorientadora **Profa. Dra**. **Cristiane Duque,** gratidão por você ter feito parte de mais uma etapa da minha formação profissional. Obrigado por sempre acreditar em mim, desde a iniciação científica, até agora no mestrado. Acredito que evolui muito profissionalmente ao longo desses anos que estivemos juntos. E parte dessa evolução, devo a você.*

*À **Profa. Dra. Vanessa Rodrigues dos Santos**, sempre serei grato à você. Sua ajuda foi muito importante, obrigado por me auxiliar desde a iniciação até esta etapa. Você merece todas as conquistas realizadas até hoje e sei que ainda tem muito conquistas te aguardando. Obrigado por aceitar o convite de fazer parte da banca avaliadora deste trabalho.*

*Aos meus colegas de laboratório, **Jesse Pereira, Larissa Oliveira, Rafael Rios** e **Gabriel Nunes** que ajudaram quando precisei e tornaram o ambiente de laboratório o mais agradável.*

*Ao **Prof. Dr. Antonio Hernandes Chaves Neto**, que possibilitou a realização dos ensaios para avaliação do potencial antioxidante.*

*Ao **Prof. Dr. Luís Octávio Regasini, seus alunos colaboradores e toda***

***equipe do Departamento de Química e Ciências Ambientais do IBILCE-UNESP**, que desenvolveram os compostos derivados do ácido cinâmico e ácido p-cumárico, que foram por este estudo avaliados.*

*À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba** sou muito grato em poder carregar seu nome em minha formação profissional.*

*Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo auxilio a mim concedido (2021-2022). Graças a esse programa de incentivo a ciência foi possível eu iniciar esta etapa.*

Epígrafe

[...] é preciso fazer a escalada da montanha da vida
removendo pedras e plantando flores.

Cora Coralina

Resumo

OLIVEIRA, WC. **Compostos derivados do ácido cinâmico e ácido p-cumárico como biomodificadores no pré-tratamento da dentina: ação antimicrobiana, antibiofilme e antioxidante e efeito sobre a resistência de união à dentina.** 2023. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração em Biomateriais) Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2023.

RESUMO

Embora a união adesiva tenha uma eficiência imediata, a estabilização a longo prazo da interface compósito-adesivo-dentina representa um grande desafio na prática odontológica restauradora. Atualmente, o uso de compostos fenólicos biomodificadores tem sido proposto para evitar a degradação da camada híbrida. Nesse contexto, este estudo avaliou: 1) a atividade antimicrobiana/antibiofilme, antioxidante e o efeito citotóxico de compostos derivados sinteticamente do ácido cinâmico e ácido p-cumárico; 2) a resistência de união da interface compósito-adesivo-dentina após o tratamento dentinário com a solução teste formulada com o composto derivado de ácido cinâmico e ácido p-cumárico de melhor ação biológica. A atividade antimicrobiana de quatro derivados do ácido cinâmico e quatro derivados do ácido p-cumárico foi avaliada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida/fungicida mínima (CMB/CFM) sobre *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Em seguida os compostos que apresentaram melhor atividade bactericida/fungicida foram avaliados quanto a ação antibiofilme dual-espécies (*S. mutans* + *C. albicans*). O efeito citotóxico dos compostos em concentrações decrescentes (a partir de 0,5 mg/mL) foi analisado em cultura de células odontoblastóides MDPC-23, por meio do ensaio de methyltetrazolium (MTT). A atividade antioxidante das soluções pré-tratamento contendo os novos compostos foi avaliada através do ensaio de capacidade redutora de ferro (FRAP) e os resultados foram expressos em mmol/mL. Para analisar a resistência de união da interface adesiva compósito-adesivo-dentina, o substrato dentinário foi previamente tratado

com a solução teste de melhor desempenho nos testes microbiológicos, 32 dentes naturais humanos foram utilizados. Os dentes tratados e restaurados foram seccionados ao meio, ao longo eixo do dente, sendo uma das metades utilizada na avaliação de resistência de união à microtração 24 horas após o processo adesivo, enquanto a outra metade foi submetida à ciclagem térmica (10.000 ciclos, 5 e 55°C). Após os testes de resistência de união por microtração, as amostras foram analisadas no que se refere ao padrão de fratura. Os dados obtidos com a execução desse estudo foram analisados estatisticamente ($p<0.05$). Todos os compostos fenólicos derivados do CI e p-CA testados apresentaram efeito inibitório para as espécies microbianas testadas com valores de CIM entre 15,6 a 1000 µg/mL, destacando o derivado do CI, o LA11 e o derivado do p-CA, o C-Methyl. O efeito antibiofilme dos compostos que se destacaram (LA11 e C-Methyl) foi avaliado, ambos apresentaram efeito microbicida, em especial o LA11 que reduziu em 100% o biofilme dual-espécies pela contagem microbiana na concentração 10x a CIM. A solução de pré-tratamento contendo o C-Methyl apresentou potente potencial antioxidante, quando comparado com solução de pré-tratamento formulada com LA11. A CHX demostrou o pior potencial antioxidante. Após 24 h de exposição, C-Methyl demostrou citocompatibilidade aos odontoblastos nas concentrações a partir de 125 µg/mL. Já o LA11 não apresentou efeito citotóxico em concentrações inferiores a 3,91 µg/mL. Por sua vez, a clorexidina apresentou citocompatibilidade apenas na menor concentração testada (1,95 µg/mL). Os valores das médias de resistência de união revelaram que não houve diferença estatisticamente significante na resistência de união entre os tempos de realização do teste (antes e depois da termociclagem) ($p>0.05$). A falha adesiva foi a mais prevalente para todos os grupos. Concluiu-se que, o LA11 e C-Mehtyl demonstraram potencial efeito biomodificador, apresentando atividades antimicrobianas e

antibiofilme, potencial antioxidante e citocompatibilidade, nenhum composto prejudicou a resistência de união do sistema adesivo à dentina, apresentando resultados superiores ao da clorexidina.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, anti-infecciosos, biofilmes, antioxidantes, dentina, materiais biocompatíveis.

OLIVEIRA, WC. **Compounds derived from cinnamic acid and p-cumaric acid as biomodifiers in dentin pretreatment: antimicrobial, antibiofilm and antioxidant action and effect on bond strength to dentin.** 2023. 67f. Dissertation (Master of Science, concentration area in Biomaterials) School of Dentistry of Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Although adhesive bonding is immediately effective, the long-term stabilization of the composite-adhesive-dentin interface represents a major challenge in restorative dental practice. Currently, the use of biomodifying phenolic compounds has been proposed to prevent degradation of the hybrid layer. In this context, this study evaluated: 1) the antimicrobial/antibiofilm activity, antioxidant and cytotoxic effect of compounds derived synthetically from cinnamic acid and p-coumaric acid; 2) the bond strength of the composite-adhesive-dentin interface after dentin treatment with the test solution formulated with a compound derived from cinnamic acid and p-coumaric acid with better biological action. The antimicrobial activity of four cinnamic acid derivatives and four p-coumaric acid derivatives was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Then, the compounds that showed the best bactericidal/fungicidal activity were evaluated for dual-species antibiofilm action (*S. mutans* + *C. albicans*). The cytotoxic effect of the compounds in decreasing concentrations (from 0,5 mg/mL) was analyzed in culture of MDPC-23 odontoblastoid cells, using the methyltetrazolium assay (MTT). The antioxidant activity of pretreatment solutions containing the new compounds was evaluated using the iron-reducing capacity assay (FRAP) and the results were expressed in mmol/mL. To analyze the bond strength of the composite-adhesive-dentin adhesive interface, the dentin substrate was previously treated with the test solution with the best performance in

microbiological tests, 32 human natural teeth were used. The treated and restored teeth were sectioned in half along the long axis of the tooth, one of the halves being used in the evaluation of the microtensile bond strength 24 hours after the adhesive process, while the other half was submitted to thermal cycling (10,000 cycles, 5 and 55°C). After the microtensile bond strength tests, the samples were analyzed with regard to the fracture pattern. The data obtained were statistically analyzed ($p<0.05$). All phenolic compounds derived from CI and p-CA tested showed an inhibitory effect for the microbial species tested with MIC values between 15.6 to 1000 µg/mL, highlighting the CI derivative, LA11 and the p-CA derivative, the C-Methyl. The antibiofilm effect of the compounds that stood out (LA11 and C-Methyl) was evaluated, both showed a microbicidal effect, especially LA11, which reduced the dual-species biofilm by 100% by microbial count at a concentration of 10x the MIC. The pre-treatment solution containing C-Methyl showed potent antioxidant potential when compared to the pre-treatment solution formulated with LA11. CHX showed the worst antioxidant potential. After 24 h of exposure, C-Methyl showed cytocompatibility with odontoblasts at concentrations from 125 µg/mL. LA11, on the other hand, did not show a cytotoxic effect at concentrations below 3.91 µg/mL. In turn, chlorhexidine showed cytocompatibility only at the lowest concentration tested (1.95 µg/mL). The average bond strength values revealed that there was no statistically significant difference in bond strength between the test times (before and after thermocycling) ($p>0.05$). Adhesive failure was the most prevalent for all groups. It was concluded that LA11 and C-Mehtyl demonstrated a potential biomodifying effect, showing antimicrobial and antibiofilm activities, antioxidant potential and cytocompatibility.

Keywords: Phenolic compounds, anti-infectives, biofilms, antioxidants, dentin, biocompatible materials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Soluções experimentais de pré-tratamento dentinário após formulação. ..36

Figura 2. Delineamento do pré-tratamento e restauração adesiva para análise em testes mecânicos. 39

Figura 3. Valores da contagem microbiana do biofilme de S. mutans e C. albicans (Log UFC/mL) com 48h de formação e após 24h de tratamento (5x CIM). 43

Figura 4. Valores da contagem microbiana do biofilme de S. mutans e C. albicans (Log UFC/mL) com 48h de formação e após 24h de tratamento (10x CIM). 44

Figura 6. Potencial antioxidante da solução de pré-tratamento dentinário contendo os derivados sintéticos do CI ou p-CA pelo método do poder antioxidante de redução do ferro (mmol Fe2+/L).....46

Figura 5. Média (DP) da porcentagem de odontoblastos MDPC-23 viáveis após 24h de exposição ao LA11, C-Methyl e controle clorexidina. Valores das concentrações dos compostos em µg/mL. 46

Figura 7. Valores de resistência de união à microtração em MPa das amostras submetidas aos diferentes pré-tratamentos dentinários, antes e após a termociclagem. 48

Figura 8. Imagens dos tipos de fraturas analisadas em lupa estereoscópica, independente do grupo e tempos de análise. (A) Fratura Adesiva. (B) Fratura Mista. (C) Fratura Coesiva em Resina composta (RC). (D) Fratura Coesiva em dentina. ...49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da solução de pré-tratamento dentinário hidroetanólica.....36

Tabela 2. Valores de CIM e CBM/CFM (em µg/mL) para os compostos. 42

Tabela 3. Média e desvio padrão dos valores de resistência de união (em MPa) dos grupos de pré-tratamento dentinários e controle, antes e depois da termociclagem.47

Tabela 4. Padrões de fratura (%) de acordo com tipos de pré-tratamento da dentina, antes e depois da termociclagem. 49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Identificação dos materiais em relação a sua classificação e composição química.....30

Quadro 2. Estrutura química dos novos compostos derivados do ácido cinâmico e ácido p-cumárico.....31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
%	Por cento
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ANOVA	Análise de Variância
BHIA	Brain Heart Infusion Agar
C. albicans	*Candida albicans*
CBM	Concentração bactericida mínima
CI	Ácido cinâmico
p-CA	Ácido p-cumárico
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO_2	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle's Medium
DP	Desvio padrão
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
h	Horas
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Exatas
MG	Galato de metila
µg	Micrograma
mg	Miligrama
MH	Miller- Hinton
mL	Mililitro
min	Minutos
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato-salino
rpm	Rotações por minuto
S. mutans	*Streptococcus mutans*
spp	Espécies
UFC	Unidades formadoras de colônia
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VA	Ácido vanílico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22
2 OBJETIVOS 28
2.1. Objetivos gerais.....28
2.2. Objetivos específicos.....28
2.3. Hipóteses nulas: 28
3 MATERIAL E MÉTODOS 30
4 RESULTADOS 42
5 DISCUSSÃO 50
6 CONCLUSÃO.....54
REFERÊNCIAS.....55

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo dos sistemas adesivos consiste em fornecer uma retenção adequada às restaurações de resina composta ou cimentos resinosos. Nesse sentido, não há dúvida de que os sistemas adesivos revolucionaram a Odontologia restauradora. Contudo, embora a união adesiva tenha uma eficiência imediata, a durabilidade a longo prazo de uma restauração adesiva representa um enorme desafio para a Odontologia. A redução da durabilidade da interface dentina-adesivo é causada por um conjunto de fatores, principalmente pela degradação da camada híbrida pela ativação de MMPs, falha durante a infiltração dos monômeros e cárie secundária (Mazzoni et al., 2015; Leme et al., 2015).

A união adesiva é resultado de um processo de dupla adesão. Primeiro, ocorre uma adesão micromecânica do adesivo ao esmalte e à dentina, sendo esse processo denominado de hibridização e segundo, o adesivo se liga ao compósito restaurador por um processo de copolimerização de ligações duplas (-C=C-) na camada de inibição de oxigênio (Van Meerbeek et al., 2001). Com relação aos tecidos dentais, o esmalte é um substrato altamente mineralizado, sendo o procedimento adesivo neste tecido dental bastante eficiente e durável, uma vez que é associado ao condicionamento com ácido fosfórico, responsável por promover a desmineralização superficial e remoção de cálcio da hidroxiapatita, resultando em uma união micromecânica e química com os componentes de alguns sistemas adesivos (Hashimoto et al., 2000; De Munck et al., 2005). No entanto, a dentina ao contrário do esmalte, é um substrato dental úmido e orgânico. Dessa forma, a adesão à dentina torna-se um grande desafio na prática clínica devido às diferenças na composição e histologia complexa desse tecido (Goldberg et al., 2011; Tjäderhane et al., 2012; Perdigão 2020).

O colágeno tipo I é a proteína mais abundante presente na fase orgânica da dentina, além disso, há a presença do fluido dentinário que permeia os túbulos dentinários, tornando esse tecido duro, intrinsecamente úmido em toda sua estrutura interna (Swift et al., 1995). A capacidade de união adesiva em dentina é afetada por muitos fatores, intrínsecos e extrínsecos (Perdigão, 2010; Laske et al., 2016). Concomitante a esses fatores, a diminuição da longevidade de uma restauração adesiva em dentina está frequentemente associada a uma degradação da camada híbrida na interface dentina-adesivo (Tjäderhane et al., 2013).

Um novo conceito odontológico surgiu nos últimos anos, a Odontologia minimamente invasiva. Essa técnica de tratamento concentra-se em minimizar a perda de tecido dental, removendo-se apenas a dentina infectada, sendo um procedimento comumente realizado no tratamento de cáries em pacientes pediátricos (Akyuz et al., 2019). No entanto, o nível de remoção apenas do tecido dentinário cariado, gera algumas preocupações com relação à união adesiva ao substrato (Isolan et al., 2018). Uma vez que a degradação da zona de hibridização pode ser favorecida pela presença de microrganismo, quando comparado com a união adesiva de uma dentina sã (Tjäderhane et al., 2013). Com essa preocupação, muitos estudos têm como objetivo aumentar a durabilidade da união adesiva, buscando ativos que apresentem ação antimicrobiana/antibiofilme (Gou et al., 2018; Lopes et al., 2022).

Além disso, evidências científicas revelam que a degradação da camada híbrida está associada à penetração inadequada e insuficiente do sistema adesivo entre as fibras de colágeno expostas (Breschi et al., 2018; Stewart & Finer, 2019). Essa degradação progressiva e em longo prazo, possui relação com a ação de enzimas proteolíticas como as metaloproteinases de matriz (MMPs) (Perdigão et al., 2013). Nos procedimentos adesivos com falhas na infiltração dos monômeros e

durante o metabolismo microbiano de carboidratos resultante de uma cárie secundária, ocorre uma queda do pH no microambiente dentinário, que por sua vez, contribui para a ativação das MMPs que degradam as fibras de colágeno da camada híbrida reduzindo a longevidade das restaurações adesivas (De Munck et al., 2009; Prakki et al., 2018).

Dessa forma, para reduzir a deterioração da união adesiva à dentina, melhorando o desempenho clínico e a longevidade das restaurações adesivas (Prakki et al., 2018; Dávila-Sánchez et al., 2020), tem sido proposto e defendido por muitos pesquisadores em estudos *in vitro* e *in situ*, o uso de agentes de reticulação exógenos ou inibidores exógenos de MMPs associados com adesivos ou como um pré-tratamento dentinário, chamados de biomodificadores, naturais ou sintéticos (Almahdy et al., 2015; Hass et al., 2016; Seseogullari-Dirihan et al., 2016; Zhang et al., 2016; Mazzoni et al., 2014; Tjäderhane et al., 2013). Nesse contexto, agentes bioativos de ocorrência natural, como os ácidos fenólicos, têm recebido grande atenção devido ao seu promissor uso na Odontologia. Por estarem amplamente presentes nos vegetais, estes compostos fazem parte da dieta humana e apresentam potencial terapêutico ao organismo humano, principalmente como agentes antioxidantes, anti-inflamatórios, anticâncer, antimicrobianos, cardioprotetores e imunomoduladores (Volpi & Bergonzini, 2006; Jucá et al., 2020).

Estudos revelaram que alguns destes compostos fenólicos apresentam ação inibidora de MMPs (Huang et al., 2017; Pandurangan et al., 2014), associando esse potencial inibitório à potente atividade antioxidante dos mesmos, uma vez que certas MMPs podem ser ativadas pelo estresse oxidativo (Ende & Gebhardt, 2004). Estes compostos são considerados potentes antioxidantes, capazes de estabilizar as cadeias de colágeno, aumentando o número de ligações cruzadas das fibrilas de

colágeno e, portanto, promovendo a neutralização da ação de MMPs, sendo úteis para ajudar a melhorar a longevidade da camada híbrida (Porto et al., 2021).

Dentre os biomodificadores sintéticos, pode-se citar a clorexidina (CHX), largamente estudada. Contudo, estudos clínicos de acompanhamento longitudinal relataram pouco ou nenhum benefício associado ao seu uso como inibidor de MMPs (Sartori et al., 2013; Favetti et al., 2017). Além do efeito limitado e de curta duração, apresenta potencial citotóxico e genotóxico, descrito na literatura (Lessa et al., 2010; Botton et al., 2016). Dentre os biomodificadores naturais, encontram-se a galardina, epigalocatequina galato, carbodiimida, riboflavina, extrato de semente de uva, chá verde e outros (Almahdy et al., 2015; Araújo et al., 2015; 2014; Broyles et al., 2013; Castellan et al., 2011; Dündar et al., 2011; Mazzoni et al., 2014; Monteiro et al., 2013; Ozcan et al., 2015; Seseogullari-Dirihan et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Dentro do grupo de ácidos fenólicos, o ácido cinâmico (CI) e seus derivados têm recebido especial atenção dos pesquisadores, devido às suas múltiplas aplicações médicas. Entre elas destacam-se suas atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer (Liao et al., 2012; Song et al., 2013; Sova, 2012; Zhang et al., 2014). O termo “cinâmico” é proveniente da especiaria canela (*Cinnamomum zeilanicum*) que vem sendo usada desde a antiguidade como um agente flavorizante e por suas propriedades estimulantes, carminativas, antissépticas e inseticidas. A casca de várias espécies de *Cinnamomum* contém quantidades consideráveis de (E)-cinnamaldeído, um aldeído volátil responsável pelo sabor pungente e doce da canela. O CI também é encontrado em grãos de café, chá mate, cacau, maçãs e peras, bagas, frutas cítricas, uva, legumes, espinafre, beterraba, alcachofra, batata, tomate, aipo, fava e cereais (Guzman, 2014). Além disso, vale ressaltar que o CI apresentou atividade bactericida contra *Steptococcus mutans* em

condições planctônicas (Ribeiro et al., 2018). Nesse mesmo estudo, foi avaliado o potencial citotóxico desse fitoquímico sobre fibroblastos, revelando que o CI não afetou a linhagem celular avaliada.

O ácido p-cumárico (p-CA) é um ácido fenólico da família dos ácidos hidroxicinâmicos, biologicamente sintetizado através da via do chiquimato com fenilalanina e tirosina como precursores (El-Seedi et al., 2012). O p-CA desempenha um papel central no metabolismo secundário, pois pode ser subsequentemente transformado em outros ácidos fenólicos (por exemplo, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido clorogênico e ácido sinápico), em flavonoides, lignina e outros metabólitos secundários (El-Seedi et al., 2012). Pesquisas mostraram que esses ácidos (especialmente quando conjugados) exibem várias bioatividades, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, anti-úlcera, anti-plaquetária e atividades anticancerígenas, além de atenuar a aterosclerose, dano cardíaco oxidativo, dano induzido pela radiação UV aos tecidos oculares, dentre outras. O p-CA tem apresentado comparativamente maior potencial antibacteriano que o próprio ácido cinâmico, com amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (El-Seedi et al., 2012; Pragasam et al., 2013). Outro estudo mostrou que p-CA rompe a membrana externa das bactérias Gram-negativas aumentando a permeabilidade, além de interagir com o DNA, e portanto, inibe processos bioquímicos essenciais relacionados a ácidos nucleicos (Lou et al., 2012).

Em busca por compostos que apresentem múltiplas aplicações terapêuticas, a hibridação molecular tem sido uma estratégia frequentemente utilizada no planejamento de novas substâncias biologicamente ativas. Essa técnica compreende a união de características estruturais parciais de duas ou mais substâncias bioativas em uma única estrutura. Após a junção dessas duas subunidades, por meio de uma

ligação covalente, obtém-se uma nova substância, a qual pode apresentar propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas diferentes das subunidades parentais (Viegas-Júnior et al., 2007). Outra técnica utilizada no desenvolvimento de novos compostos, é a esterificação de Fischer. Basicamente, as reações de esterificação são aquelas em que um ácido carboxílico reage com um álcool e produz éster e água (Nazaré et al., 2018).

Portanto, com base no que foi exposto, este estudo avaliou compostos derivados do ácido cinâmico e ácido p-cumárico, utilizados como um pré-tratamento da dentina, sugerindo que estes, aumentem na durabilidade das restaurações adesivas**.**

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo geral foi avaliar as propriedades biológicas de compostos derivados do ácido cinâmico e ácido p-cumárico e posterior efeito de uma solução de pré-tratamento dentinário contendo os melhor compostos sobre a resistência adesiva.

2.2. Objetivos específicos

1- Avaliar o efeito antimicrobiano de derivados do ácido cinâmico sobre culturas planctônicas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Candida albicans* (ATCC 10231);

2- Avaliar o efeito desses compostos sobre biofilme misto de *C. albicans e S. mutans* por contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs);

3- Avaliar o potencial antioxidante desses compostos pelo ensaio de capacidade redutora de ferro;

4 – Avaliar o efeito citotóxico desses compostos sobre células odontoblastóides MDPC-23, pelo o de ensaio de MTT;

5- Analisar a resistência de união e padrão de fratura da interface adesiva compósito-adesivo-dentina após o pré-tratamento da dentina com a solução teste do composto derivado de ácido cinâmico ou ácido p-cumárico de melhor ação biológica.

2.3. Hipóteses nulas:

1- Os derivados do ácido cinâmico e ácido p-cumárico não são eficazes sobre culturas planctônicas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) *e Candida albicans*

(ATCC 10231) e não teriam ação antibiofilme sobre biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans*;

2- Os derivados do ácido cinâmico e ácido p-cumárico não apresentariam potencial antioxidante;

3- Os derivados do ácido cinâmico e ácido p-cumárico não apresentariam potencial citotóxico sobre células odontoblastóides MDPC-23, maior do que do grupo controle de clorexidina;

4- Não haveria diferença na resistência de união da interface adesiva entre os diferentes tipos de pré-tratamento da dentina e a termociclagem não causaria alteração na resistência de união utilizando diferentes protocolos adesivos à dentina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (FOA), e após a sua aprovação (108138/2022 – ANEXO A), foram selecionados 32 dentes molares humanos hígidos, extraídos por motivos periodontais ou ortodônticos, doados após exodontia na Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da FOA. Após a extração os dentes foram imersos em Soro Fisiológico de Cloreto de Sódio 0,9% até a coleta. Todos os espécimes coletados foram limpos com cureta, e então armazenados em 0,1% de timol em 4ºC até a utilização.

3.1. Materiais

3.1.1. *Materiais para a confecção das restaurações adesivas*

Para a confecção das amostras de restaurações adesivas, os materiais utilizados neste estudo estão ilustrados no **quadro 1**.

Quadro 1. Identificação dos materiais em relação a sua classificação e composição química.

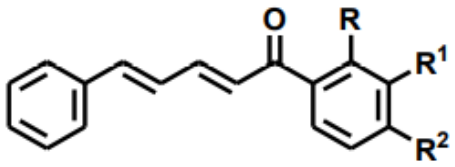
MATERIAL/ FABRICANTE	CLASSIFICAÇÃO	COMPOSIÇÃO QUÍMICA
SINGLE BOND UNIVERSAL/3M ESPE, USA	Adesivo universal fotoativado	Monômero MDP, resinas de dimetacrilato, HEMA, copolímero do ácido polialcenóico modificado com metacrilato, carga, etanol, água, iniciadores e silano.
FILTEK™ Z350 XT/3M ESPE, USA	Compósito microhíbrido	Matriz Orgânica: Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA, PEGDMA e TEGDMA, Agentes Fluorescentes, Pigmentos, Estabilizadores, Iniciadores. Matriz inorgânica (carga): Zircônia/Sílica: 3µm ou menos, Aglomerado de Zircônia/Sílica, Sílica com superfície tratada: 20nm, 67,8% em volume., material a granel.

3.1.2. *Compostos e controles*

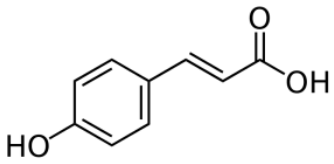
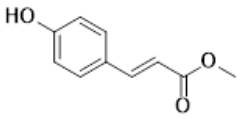
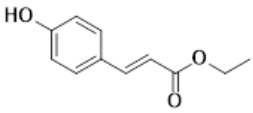
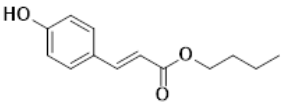
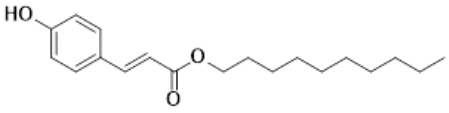
Neste estudo foram utilizados os seguintes compostos: ácido cinâmico (CI), ácido p-cumárico (p-CA), quatro híbridos do CI e quatro ésteres alquílicos derivados do p-CA que foram sintetizados e cedidos pelo grupo de pesquisa orientado pelo Prof. Dr. Luís Octavio Regasini, coordenador do Laboratório de Química Verde e Medicinal, Departamento de Química e Ciências Ambientais, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, São José do Rio Preto. O **quadro 2** mostra a estrutura química dos novos compostos.

Quadro 2. Estrutura química dos novos compostos derivados do ácido cinâmico e ácido p-cumárico

DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO



CÓDIGO	R	R1	R2	Massa molar (g/mol)
TR-2	H	OCH_3	H	264,1
LA-10	H	CH_3	H	248,1
LA-11	H	OH	H	250,1
LA-20	H	CF_3	H	302,1

DERIVADOS DO ÁCIDO P-CUMÁRICO		
		
NOME	Estrutura química	Massa molar (g/mol)
CUM-METHYL	 CUM.Methyl	169,04
CUM-ETYL	 CUM.Etyl	175,04
CUM-BUTYL	 CUM.Butyl	187,04
CUM-DEC	 CUM.DEC	223,04

3.1.3. *Cepas padrão*

Para a avaliação das atividades antimicrobiana e antibiofilme dos compostos foram utilizadas as seguintes cepas padrão: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Candida albicans* (ATCC 10231). As cepas foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Os meios de culturas usados para crescimento de

cada espécie bacteriana foram os seguintes: Mitis Agar Salivarius Agar (Difco, Kansas City, MO, USA) com 0,2U/mL de bacitracina para *S. mutans* e Sabouraud dextrose para *C. albicans*. As placas foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO_2.

3.2. Métodos

3.2.1. Avaliação do efeito antimicrobiano dos compostos

3.2.1.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM)

Os ensaios de CIM foram medidos pelo método de microdiluição, baseados nas normas do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute - M7-A9, 2012) com algumas modificações. Culturas de *S. mutans* foram repicadas em meio caldo Brain Heart Infusion (BHI; Difco) e *C. albicans* em meio caldo Sabouraud Dextrose (SDA; Difco) por 24 h ou mais, dependendo do tempo de crescimento de cada microrganismo, a 37 °C. Quando a cultura atingiu a metade da fase logarítmica, as células foram separadas por centrifugação a 5000xg por 5 minutos a 4 °C. Estas foram lavadas e ressuspendidas em tampão fosfato de sódio – PB (10 mM, pH 6,8). Em seguida, o número de células foi ajustado utilizando-se Mueller Hinton (MH) caldo 2x concentrado para obtenção de 10^5 UFC/mL (Unidades formadoras de colônias/mL). Um inóculo de 100 µL foi então incubado em 100 µl da diluição seriada dos compostos (de 1mg/mL a 0,001mg/mL) e controles dissolvidos em água Mili-Q. Após incubação por 24 h a 37 °C, as placas de microtitulação foram analisadas a 595 nm em um leitor de microplacas modelo 3550-UV (Biorad do Brasil), após a aplicação de uma solução de rezasurina (Sigma) a 5 µg/mL por 3 horas. Suspensões microbianas foram incubadas com CHX ou sem nenhum agente antimicrobiano, como controles positivo e negativo, respectivamente. A CIM foi definida como a menor concentração do

composto ou clorexidina que não houve crescimento detectável (coloração azul da viragem da resazurina). Os meios contendo a CIM e duas concentrações maiores foram diluídos seriadamente e plaqueados em MH ágar e incubados a 37 °C por 48 h. As colônias foram contadas com auxílio de estereomicroscópio binocular (Labomed, USA) e determinado o número de UFC/mL. A Concentração Mínima Bactericida/Fungicida (CBM/CFM) foi considerada quando os compostos testados ou a clorexidina eliminaram mais de 99% das bactérias ou fungos. Somente os compostos que apresentaram melhor efeito bactericida e fungicida foram selecionados para análise nos testes seguintes.

3.2.1.2. Avaliação dos compostos sobre a viabilidade de biofilme dual-espécies por contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

Os ensaios foram realizados com a espécie *C. albicans* combinada em biofilmes dual-espécies com *S. mutans*. Inicialmente, as culturas bacterianas foram ajustadas a 10^6 UFC/mL. Inicialmente as culturas microbianas isoladas foram centrifugadas a 5000 x g a 4ºC por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado duas vezes em solução salina e ressuspendido em BHI caldo. Microplacas de poliestireno estéril de 96 poços de fundo em U, foram pré-tratadas com 150 µL de saliva artificial (Composição: 800 mL de água deionizada, 1,6 g de extrato de levedura, 4 g de peptona, 0,28 g de NaCl, 1,6 g de glicose ou 3,2 g de sacarose, 0,16 g de $CaCl_2$, 0,16 g de KCl e 0,8 g de mucina) durante um período de 4 h a 37° C na estufa de 5% CO_2. Após o período de incubação, a saliva foi removida. 20 µL de cada cultura microbiana foi inoculada em cada um dos poços contendo 160 µL de caldo BHI suplementado com 0,5% de sacarose (*C. albicans* + *S. mutans*). As placas foram incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5% de CO_2 por 48 horas. Após esse período,

o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução salina estéril (NaCl a 0,9%) para subsequente adição de 100 µL dos compostos com os melhores resultados nos testes anteriores (derivados do CI, p-CA e CHX nas concentrações de 5x e 10x superiores à concentração inibitória mínima determinada anteriormente – item– *3.2.1.1*.), em cada poço. Digluconato de clorexidina foi considerado como controle positivo, bem como biofilme em meio de cultura sem agentes antimicrobianos, como controle negativo. As microplacas contendo ou não os agentes antimicrobianos foram incubadas durante 24 h, a 37° C em uma atmosfera de 5% de CO_2. Após incubação com os compostos (5x e 10x CIM), alíquotas de todos os poços foram diluídas seriadamente em solução salina (10^{-7}) e plaqueadas em BHI ágar. As placas foram incubadas durante 24 h para posterior contagem das UFC/mL, com auxílio de estereomicroscópio binocular (Labomed, USA), os experimentos foram realizados em triplicata, em dois ensaios independentes.

3.2.2. Preparo das soluções de pré-tratamento de biomodificação dentinária

As soluções experimentais de pré-tratamento dentinário com os compostos derivados sinteticamente do CI e p-CA foram preparadas em uma concentração de 10x a obtida na CIM. Inicialmente 1 mg dos compostos derivados de melhor resultado bactericida e fungicida foi incorporado em 100 µL de DMSO para o preparo de uma solução mãe em uma concentração de 10 mg/mL do composto. Na formulação de pré tratamento, o cálculo para ajuste da concentração e volume foi realizado, e o volume de 10x a CIM da solução mãe foi incorporado em 300 µL de etanol puro, 10 µL de surfactante Tween 20, e o volume restante para completar 1000 µL da solução de pré-tratamento de água destilada, conforme descrito na tabela de composição abaixo.

Tabela 1. Composição da solução de pré-tratamento dentinário hidroetanólica.

Componente	***Composto***	***Volume (µL)***
Composto Ativo	Derivado do CI ou p-CA	10 x a CIM
Veículo	Etanol puro	300 µL
Surfactante	Tween 20	10 µL
Meio aquoso	Água destilada	Volume restante para solução pré-tratamento completar 1000 µL

Na formulação de pré-tratamento do composto LA11 foi incorporado 156 µg/mL (10x o CIM) e para o C-Methyl foi incorporado 1250 µg/mL (10x o CIM).

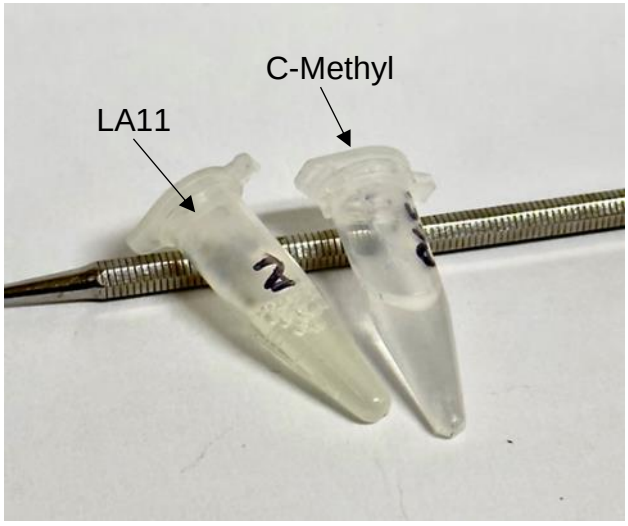


Figura 1. Soluções experimentais de pré-tratamento dentinário após formulação.

3.2.3. Avaliação do potencial antioxidante

A capacidade antioxidante total das soluções de pré-tratamento dentinário com os compostos derivados sinteticamente do CI ou p-CA, bem como o controle CHX e o solvente DMSO foram avaliados pelo ensaio de capacidade redutora de ferro (FRAP) e os resultados foram expressos em mmol/mL (Benzie & Strain, 1996). Esse método mede o poder antioxidante redutor total e foi avaliado baseado na redução do

complexo Fe3+-TPTZ (pentilenotetrazol), de cor amarelada. O reagente FRAP foi preparado por mistura de tampão acetato (0,3 mol/L), TPTZ (10 mmol/L) e $FeCl_3.6H_2O$ (20 mmol/L), numa proporção de 10:1:1. A reação ocorre em baixo valor de pH (3,6), com o intuito de manter a solubilidade (Benzie & Strain, 1996). Para a reação, uma alíquota da amostra (20 µL) foi adicionada ao meio contendo tampão acetato (300 mmol/L, pH 3,6) e a mistura ficou em repouso no escuro por 30 min a 37°C. A absorbância das amostras foi medida em comparação com um branco no comprimento de onda de 595 nm, usando um espectrofotômetro modelo 3550-UV (Biorad do Brasil). A curva de calibração foi preparada usando soluções padrão de sulfato ferroso em concentrações de 0,5-2,5 mmol/L. Todas as medições foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mmol Fe2+ por litro de amostra.

3.2.4. Análise do metabolismo celular (Ensaio de MTT)

O metabolismo celular foi avaliado para os compostos em concentrações decrescentes a partir de 0,5 mg/mL, dependendo dos valores de CIM e CBM obtidos para cada composto, utilizando o ensaio de methyltetrazolium (MTT) sobre células odontoblastóides da linhagem MDPC-23, de acordo com Basso et al. (2013). Este método permite determinar a atividade da succinatodesidrogenase - enzima SDH - representando a respiração celular (mitocondrial) e considerando como a taxa metabólica de células. Após incubação das células em contato com DMEM (grupo controle) ou DMEM contendo os compostos (grupos experimentais) por 24 h, o meio de cultura foi aspirado e substituído por 90 µL de DMEM e 10 µL de solução de MTT (5 mg / mL em PBS) e as células foram incubadas a 37 °C durante 4 h. Após a incubação, o meio de cultura com solução MTT foi aspirado e 200 µL de solução de isopropanol acidificado (HCl 0,04 N) foi adicionado em cada poço por 30 minutos em

agitação, para dissolver o produto resultante da clivagem de cristais violeta de formazan do anel de sal MTT pela atividade da enzima SDH, produzindo uma solução violeta homogênea. A proliferação celular foi avaliada utilizando um espectrofotômetro (Synergy H1 híbrido Multi-ModoMicroplate Reader - BioTekInstrumentsInc, Winooski, EUA) a 570 nm de comprimento de onda.

3.2.5. Avaliação da resistência da interface adesiva compósito-adesivo-dentina após o tratamento com a solução teste do composto derivado de ácido cinâmico de melhor ação antimicrobiana.

3.2.5.1. Delineamento experimental para os testes mecânicos

Foram utilizados 32 dentes naturais humanos que tiveram suas coroas aplainadas ao nível da dentina, nos quais foi realizado um pré-tratamento da dentina por 60 segundos, seguido da aplicação do adesivo na superfície do substrato dentinário, de acordo com as orientações do fabricante. Após este procedimento, um bloco de resina composta (Filtek Z350) foi adicionado em 2 camadas de 2 mm, seguido da fotopolimerização por 20 segundos, a cada camada inserida. Dessa forma, os dentes ficaram com restaurações de 4 mm de profundidade e 11 mm de diâmetro, aproximadamente. Os espécimes foram divididos em 4 grupos, de acordo com os protocolos de pré-tratamento da dentina com o composto de melhor efeito biológico (Fluxograma 1). Em seguida, estão descritas todas as etapas do estudo.



Figura 2. Delineamento do pré-tratamento e restauração adesiva para análise em testes mecânicos.

3.2.5.2. Preparo dos espécimes de dentina

A superfície oclusal de todos os dentes foi desgastada utilizando lixas de granulação 320 e 600 (3M ESPE) sob refrigeração em água, utilizando uma politriz automática Aropol E (Arotec Industria e Comercio Ltda, São Paulo, Brasil) até a obtenção de uma superfície planificada de dentina. A superfície foi avaliada em lupa estereoscópica (Stemi SV11, Zeiss, NY, EUA) para verificar e garantir a ausência de esmalte na superfície dos dentes que foram submetidos aos testes em dentina. Após isso, a superfície dos preparos foi lavada e seca com jatos de ar.

3.2.5.3. Procedimento adesivo

Os dentes foram aleatoriamente divididos em 4 grupos (Fluxograma 1), conforme o tratamento da dentina: GD1 - sem tratamento, apenas aplicação do adesivo universal; GD2 - tratamento com clorexidina a 2% por 1 min, seguido da aplicação do adesivo universal; GD3 - tratamento com solução teste de LA11 por 1 min, seguido do adesivo universal e GD4 – tratamento com solução teste C-Methyl por 1 min, seguido do adesivo universal.

Em todos os grupos, as soluções de pré-tratamento da dentina foram aplicadas de forma ativa por 1 minuto, e o excesso de umidade foi removido com papel filtro estéril, exceto para o grupo controle (sem tratamento). Em seguida, o adesivo universal Single Bond Universal foi aplicado de forma autocondicionante, com auxílio de um aplicador descartável e friccionado por 20 segundos (aplicação ativa), em toda a superfície do substrato, seguido de um leve jato de ar por 5 segundos, visando a evaporação do solvente, fotoativando em seguida por 10 segundos. Após este procedimento, uma camada de resina composta (Z350 XT) foi acomodada sobre o substrato em duas camadas de 2 mm cada, fotoativando cada camada por 20 segundos, de acordo com o fabricante, utilizando o fotopolimerizador VALO® Cordless (Ultradent). Após o processo adesivo, os dentes foram armazenados em água destilada a 37ºC por 24 horas, para permitir a completa polimerização dos materiais (Blumer et al., 2015). Decorrido esse prazo, os dentes foram seccionados para a obtenção de especimes em forma de palitos com uma área adesiva de aproximadamente 1,0 mm^2, com o auxilio de disco diamantado em cortadeira de precisão Isomet 1000 (Buheler, OH, EUA). Uma das metades dos palitos obtidos foi utilizada na avaliação de resistência de união à microtração 24 horas após o processo adesivo, enquanto a outra metade foi submetida a ciclagem térmica (10.000 ciclos, 5 e 55°C, tempo de permanência 28 segundos, tempo de transferência de 2 segundos) utilizando máquina de simulação de ciclos térmicos (Ética - modelo 521.4; Ética Equipamentos Científicos S.A., São Paulo, SP, Brasil), para depois ser submetida ao teste de resistência de união por microtração.

3.2.5.4. <u>Teste de resistência de união por microtração</u>

Para o ensaio de microtração os espécimes foram fixados a um aparato de teste com um adesivo à base de cianocrilato (Super Bonder gel, Loctite, Henkel Corp.,

Rocky Hill, CT, EUA) e submetidos individualmente ao teste de microtração na máquina Microtensile OM100 (Luzerna, SC, Brasil), em velocidade de 0,7 mm por minuto para avaliação da resistência de união. Os valores de resistência de união foram obtidos em MPa por meio da fórmula: Ru = (F/A)

Sendo, Ru (Resistência de união) a divisão da carga necessária para fraturar o espécime em N (F) pela área da interface de união em mm^2 (A).

3.2.5.5. *Avaliação do padrão de fratura*

Os palitos fraturados foram analisados em lupa estereoscópica (STEMI SV11, ZEISS), para análise do modo de fratura. As fraturas serão classificadas em quatro grupos: (1) falha adesiva; (2) falha coesiva em dentina; (3) falha coesiva em resina composta; e (4) falha mista.

3.3. Forma de análise dos dados

Os dados de contagem microbiana obtidos para o ensaio de biofilme foram convertidos em Log (UFC/mL). Todos os dados (contagem microbiana, citotoxicidade, potencial antioxidante) foram analisados quanto a sua homogeneidade (Shapiro Wilks), a fim de determinar se provinham ou não de uma distribuição normal. Como a distribuição dos dados foi paramétrica, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada, seguido do teste de Tukey-Kramer (α=.05). Os mesmos testes foram aplicados para os dados de resistência de união. Para análise do tipo de fratura, foi aplicado o teste Wilcoxon para comparação dos grupos. E o teste de Friedman, para comparação entre os tempos (α=.05), utilizando-se o programa JAMOVI, versão 2.3, 19.0.

4 RESULTADOS

4.1. Resultados dos ensaios para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Mínima Bactericida e/ou Fungicida (CBM/CFM)

O ácido cinâmico, ácido p-cumárico e os seus derivados foram testados quanto à sua ação bactericida e fungicida por meio de ensaios de CIM e CBM/CFM, conforme descrito no item 3.2.1.2. Todos os compostos estudados apresentaram efeito inibitório sobre *S. mutans* e *C. albicans.* A **tabela 2** revela os valores de CIM e CBM/CFM para os microrganismos testados. Os valores encontrados variaram de 0,2 a >1000 µg/mL.

Tabela 2. Valores de CIM e CBM/CFM (em µg/mL) para os compostos.

	S. MUTANS		*C. ALBICANS*	
Composto derivados do ácido cinâmico	**CIM**	**CBM**	**CIM**	**CFM**
LA10	250	1000	125	250
LA11	15,6	31,25	15,6	31,25
LA20	125	250	250	500
TR-2	250	500	125	250
ÁCIDO CINÂMICO	1000	>1000	1000	>1000
CHX	0,2	0,4	0,2	0,4
Composto derivados do ácido p-cumárico	**CIM**	**CBM**	**CIM**	**CFM**
C-METHYL	125	250	250	500
C-ETYL	250	500	250	500
C-BUTYL	250	500	250	500
C-DEC	250	500	500	1000
áCIDO P-CUMÁRICO	1000	>1000	1000	>1000
CHX	0,2	0,4	0,2	0,4

O derivado do ácido cinâmico LA11 e os derivado do ácido p-cumárico C-Methyl apresentaram maior potência contra todas as espécies microbianas testadas e, por este motivo, foram selecionados para os ensaios seguintes.

4.2. Resultados dos compostos sobre a viabilidade de biofilme dual-espécies por contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

As figuras de 3 e 4 mostram o efeito dos compostos LA11 e C-Methyl sobre a viabilidade dos biofilmes mistos de S*. mutans* e *C. albicans* formados por 48h*.* Estes dados foram divididos de acordo com a concentração (5x e 10x CIM) e a contagem de UFC/mL de *S. mutans* ou *C. albicans* após exposição do biofilme aos compostos testados.

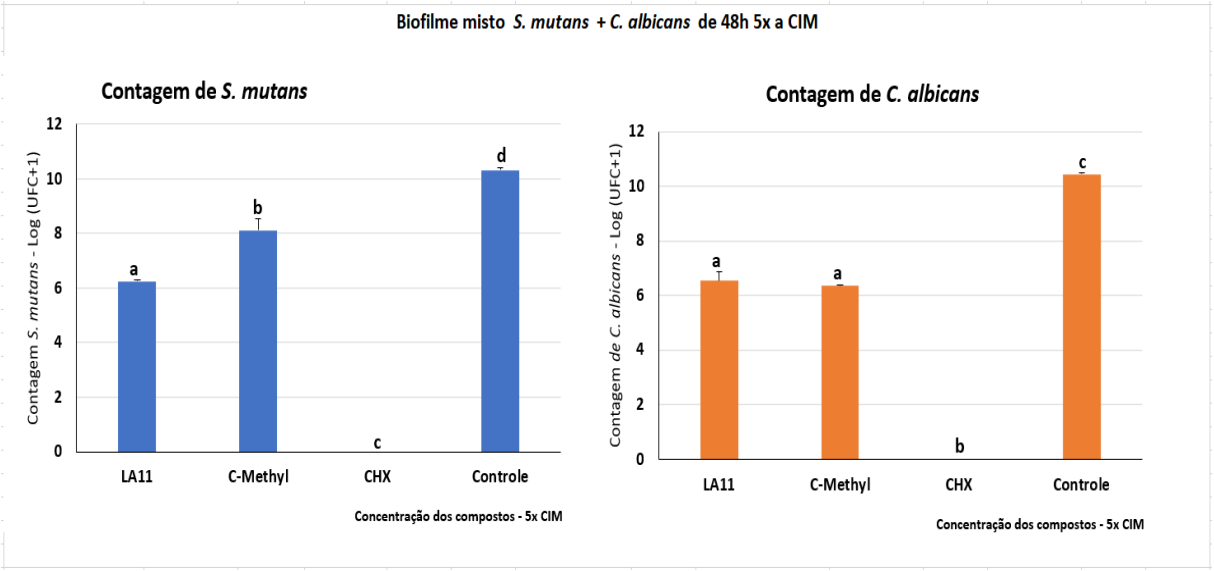


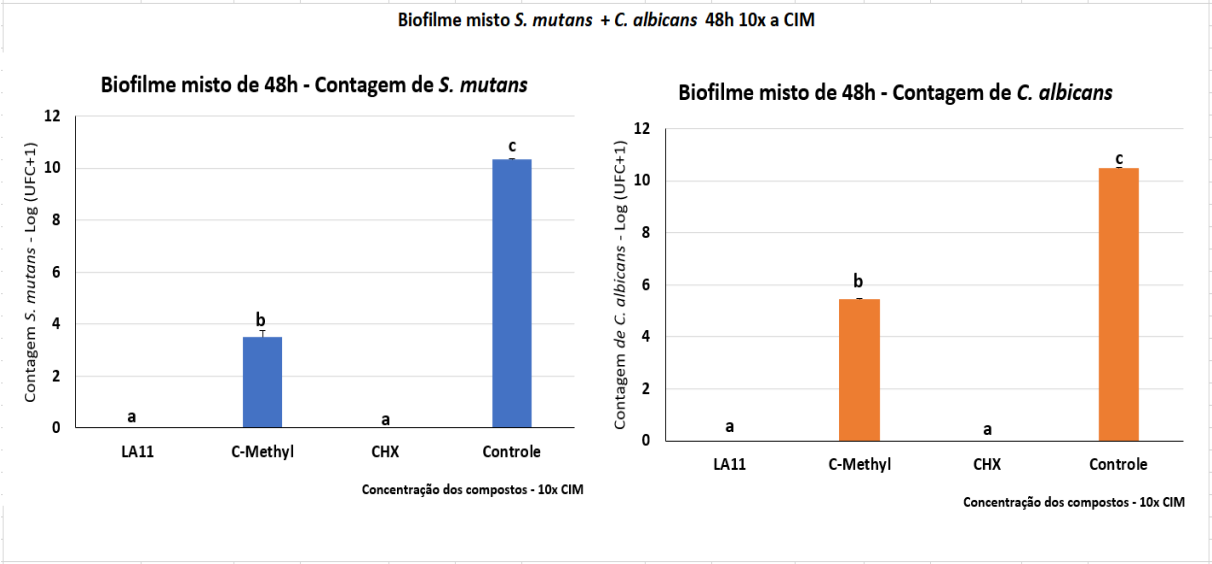
Figura 3. Valores da contagem microbiana do biofilme de S. mutans e C. albicans (Log UFC/mL) com 48h de formação e após 24h de tratamento (5x CIM).

[a] Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes ONE-WAY ANOVA e Tukey, considerando $p<0.05$

A figura 3 mostra o efeito do LA11, C-Methyl e o controle positivo CHX sobre os biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans,* formados por 48 horas, e expostos a 5x a concentração obtida no CIM. Ambos os compostos apresentaram efeito redutor sobre a viabilidade do biofilme. A contagem (Log UFC/mL) revelou que o composto

derivado do ácido cinâmico, LA11, reduziu em 4,06 log (39,3%) o número de *S. mutans* do biofilme quando comparado ao controle. Esse efeito redutor do LA11 foi superior ao obtido para o composto derivado do ácido p-cumárico, C-Methyl, que apresentou redução de 2,2 log (21,3%) para *S. mutans*. A contagem de *C. albicans,* mostrou que o derivado C-Methyl reduziu em 4,07 log (39,9%) o número deste microrganismo. Já a redução de *C. albicans* pelo o derivado do ácido cinâmico (LA11) foi equivalente a 3,9 log (37,4%). Contudo, o efeito redutor da CHX mostrou ser superior, eliminando completamente *S. mutans* e *C. albicans,* nesta concentração.

Figura 4. Valores da contagem microbiana do biofilme de S. mutans e C. albicans (Log UFC/mL) com 48h de formação e após 24h de tratamento (10x CIM).



[a] Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes ONE-WAY ANOVA e Tukey, considerando $p<0.05$

Conforme ilustra a figura 4, o derivado LA11, em uma concentração de 10x o valor da CIM, reduziu em 100% a contagem de microrganismos presentes no biofilme. Assim como o controle positivo CHX que também reduziu completamente o número de *S. mutans* e *C. albicans.* Por outro lado, o composto C-Methyl reduziu o número de *S. mutans* do biofilme em 6,86 log (redução de 66,3%), na contagem de *C. albicans* essa redução foi equivalente a 5 log (51,9%).

A partir desses dados, pode-se observar que houve uma redução estatisticamente significativa na contagem microbiana (Log UFC/mL) em relação ao controle, quando o biofilme misto recebeu o tratamento dos compostos LA11, C-Methyl e CHX nas concentrações de 5x e 10x a CIM. Contudo, quando os compostos foram testados na concentração de 10x o CIM, o LA11 e a CHX reduziram em 100% a contagem microbiana (figura 2). Evidenciado dessa forma, que os melhores resultados de eficácia antibiofilme foram os obtidos na concentração de 10x o CIM, para ambos os compostos.

4.3 Resultados do Potencial antioxidante da solução de pré-tratamento dentinário (Ensaio de FRAP)

Através do método do poder antioxidante de redução de ferro (FRAP), foi avaliada a capacidade antioxidante das soluções de pré-tratamento dentinário, formuladas com os derivados sintéticos LA11 ou C-Methyl, o controle CHX e o solvente DMSO. Como revela a Figura 5, a solução de pré-tratamento contendo o derivado obtido pelo método de esterificação, C-Methyl, apresentou potente potencial antioxidante, quando comparado com solução de pré-tratamento formulada com LA11. A CHX demostrou pior potencial antioxidante entre os grupos avaliados.

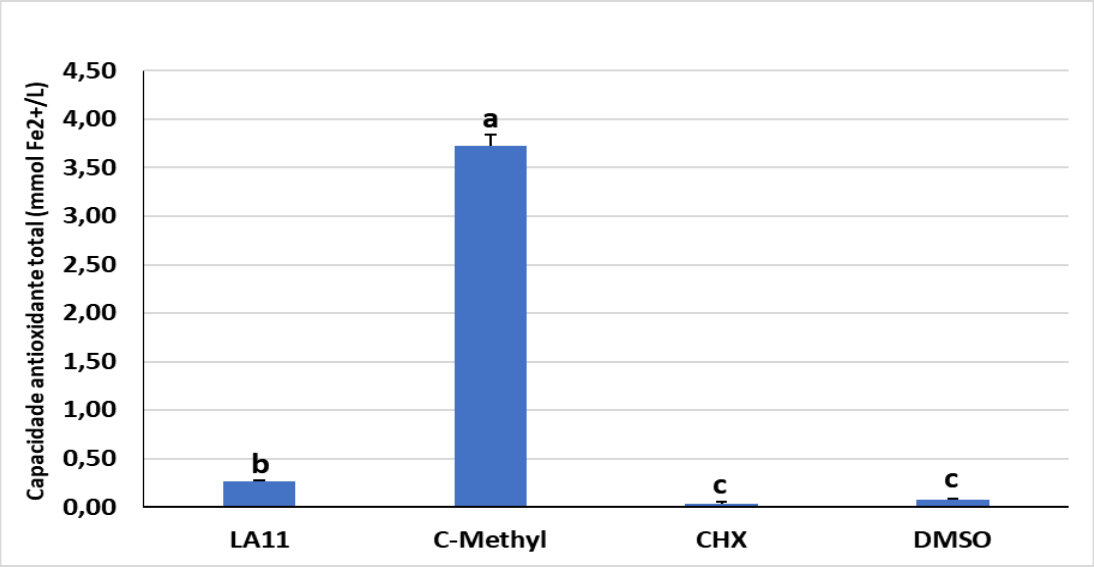


Figura 5. Potencial antioxidante da solução de pré-tratamento dentinário contendo os derivados sintéticos do CI ou p-CA pelo método do poder antioxidante de redução do ferro (mmol Fe2+/L)

[A] Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo ANOVA e teste de Tukey, considerando $p<0.05$.
*$p<0.001$ para todas as comparações.

4.4. Resultados do Metabolismo celular após tratamento com os compostos derivados do CI e p-CA (Ensaio de MTT)

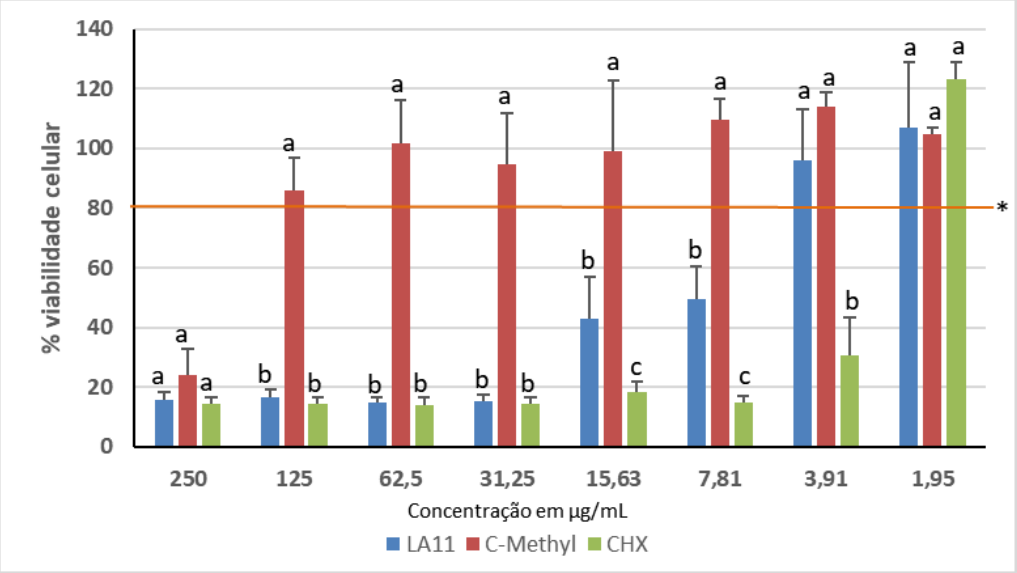


Figura 6. Média (DP) da porcentagem de odontoblastos MDPC-23 viáveis após 24h de exposição ao LA11, C-Methyl e controle clorexidina. Valores das concentrações dos compostos em µg/mL.

[a] Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando cada diluição separadamente, segundo ANOVA e Teste de Tukey (p<0,05)

[*] A linha laranja representa o limite estabelecido pela ISO 10993-12-2012 mostrando que a viabilidade celular acima de 80% mostra que os compostos não foram citotóxicos.

A Figura 6 revela os resultados obtidos pelo ensaio de MTT que avaliou a citocompatibilidade do LA11 e C-Methyl baseado nos valores da CIM e do controle positivo CHX sobre o metabolismo celular de odontoblastos da linhagem MDPC-23 durante o período de 24 h de tratamento. Os compostos foram testados em concentrações seriadas entre 250 µg/mL à 1,95 µg/mL.

Após 24 h de exposição, C-Methyl demostrou citocompatibilidade aos odontoblastos nas concentrações a partir de 125 µg/mL. Já o LA11 não apresentou efeito citotóxico em concentrações inferiores a 3,91 µg/mL. Por sua vez, a clorexidina apresentou citocompatibilidade apenas na menor concentração testada (1,95 µg/mL).

4.5. Resistência da união adesiva à microtração

Os valores médios de resistência de união e o desvio padrão (MPa) de cada grupo experimental estão descritos na tabela 3 e figura 7.

Tabela 3. Média e desvio padrão dos valores de resistência de união (em MPa) dos grupos de pré-tratamento dentinários e controle, antes e depois da termociclagem.

	CONTROLE	***LA11***	***C-Methyl***	***CHX***
BASELINE	44,93 (13,05)	32,36 (13,03)	36,82 (16,4)	36,08 (13,62)
APÓS TERMOCICLAGEM	30,58 (10,83)	35,01 (11,02)	35,76 (12,25)	27,02 (10,12)

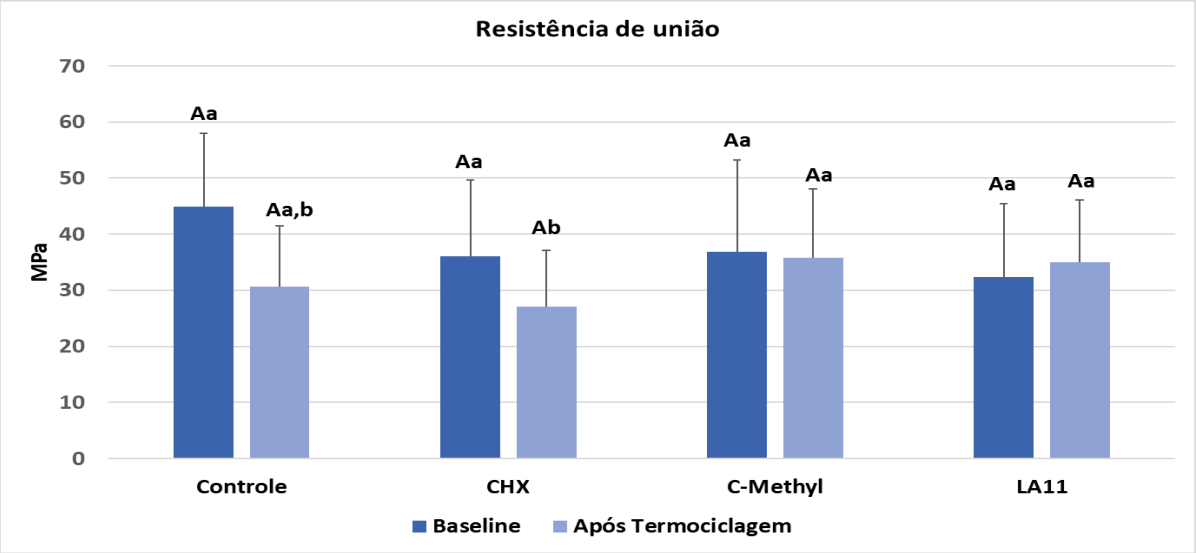


Figura 7. Valores de resistência de união à microtração em MPa das amostras submetidas aos diferentes pré-tratamentos dentinários, antes e após a termociclagem.

[A] Letras maiúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os tempos (baseline e ciclagem), considerando cada grupo separadamente.
[a] Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos (Controle, CHX, C-Methyl e LA11), considerando cada tempo separadamente, de acordo com o teste ANOVA ($p<0,05$).

Os dados obtidos mostram que não houve diferença estatisticamente significante na resistência de união antes e depois da termociclagem ($p>0.05$). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos, no baseline ($p>0.05$). Entretanto, após termociclagem a CHX diferiu do LA11 e do C-Methyl ($p<0.05$).

Na tabela 4 podemos observar a distribuição dos padrões de fratura de acordo com os tipos de pré-tratamento da dentina, antes e depois da termociclagem. Com base nos resultados, o modo de falha predominante para todos os grupos experimentais foi o do tipo adesiva.

Tabela 4. Padrões de fratura (%) de acordo com tipos de pré-tratamento da dentina, antes e depois da termociclagem.

		Adesiva	*Mista*	*Resina*	*Dente*	*Total*
Controle	Baseline	88.2 %	5.9 %	5.9 %	0.0 %	100.0 %
	Ciclagem	80.0 %	11.4 %	8.6 %	0.0 %	100.0 %
CHX	Baseline	80.0 %	8.6 %	5.7 %	5.7 %	100.0 %
	Ciclagem	80.0 %	11.4 %	8.6 %	0.0 %	100.0 %
CMET	Baseline	84.2 %	5.3 %	5.3 %	5.3 %	100.0 %
	Ciclagem	94.6 %	2.7 %	2.7 %	0.0 %	100.0 %
LA11	Baseline	85.3 %	6.6 %	5.1 %	2.9 %	100.0 %
	Ciclagem	86.6 %	5.5 %	4.7 %	3.1 %	100.0 %

Nota: Não houve diferença entre os grupos, nos diferentes tempos, de acordo com o teste de Wilcoxon. Não houve diferença entre os tempos, considerando as fraturas (Friedman test $p<0.05$).

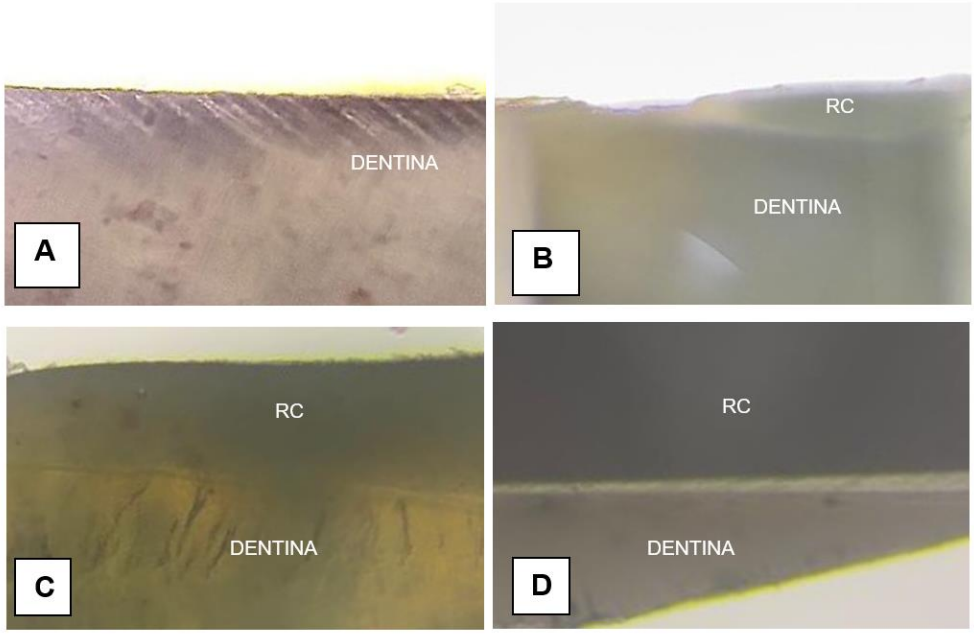


Figura 8. Imagens dos tipos de fraturas analisadas em lupa estereoscópica, independente do grupo e tempos de análise. (A) Fratura Adesiva. (B) Fratura Mista. (C) Fratura Coesiva em Resina composta (RC). (D) Fratura Coesiva em dentina.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os compostos derivados do ácido cinâmico e ácido p-cumárico, com relação ao efeito antimicrobiano e antibiofilme, rejeitando-se a primeira hipótese nula desse estudo, de que os compostos não seriam eficazes sobre as culturas planctônicas de *S. mutans* (ATCC 25175) e *C. albicans* (ATCC 10231) e não teriam ação antibiofilme sobre biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans*. Os resultados revelaram que compostos derivados do CI e p-CA apresentaram potencial antimicrobiano e antibiofilme importante. Destacando-se em especial o híbrido do CI, o LA11 e o C-Methyl, derivado éster alquílico do p-CA.

De acordo com a literatura, para análise dos valores de CIM, considera-se os valores de 50-500 µg/mL, atividade forte/ótima; 600-1500 µg/mL, atividade moderada; acima de 1500 µg/mL, atividade fraca ou produto inativo (Holetz et al., 2002; Sartoratto et al., 2004; Aligi-annis et al., 2001). Assim, de acordo com os dados supracitados, o composto LA11 teve efeito microbicida contra *S. mutans* e fungicida contra *C. albicans*, na concentração 31,25 µg/mL, concentração extremamente baixa. O composto C-Methyl apresentou uma atividade microbicida na concentração 250 a 500 µg/mL, ambos com ótima atividade antimicrobiana.

Corroborando com os resultados deste estudo, Dos Santos et al. (2021) avaliaram os efeitos de híbridos do CI sobre patógenos orais relacionados com infecções endodônticas. Neste estudo, o composto LA11 promoveu potente efeito inibitório contra todas as espécies bacterianas testadas, inclusive para *S. mutans* (CIM=19 µg/mL e CBM=39 µg/mL). Ao avaliar a ação do LA11 sobre biofilmes simples de *S. mutans*, o composto eliminou o biofilme, assim como o controle positivo de CHX.

O uso de agentes antioxidantes é fundamental para o aumento da longevidade das restaurações adesivas em dentina (Kimyai & Valizadeh, 2008; Lima et al., 2011).

Relata-se que ativos que apresentam potencial antioxidante podem interagir e estabilizar espécies reativas de oxigênio (ROS), consequentemente minimizando danos oxidativos a estruturas biológicas importantes, como DNA, proteínas e lipídios. Dessa forma, prevenindo a ativação de MMPs que degradam a camada híbrida da dentina (Beck et al., 2020; Briso et al., 2014; Karadas et al., 2019; Kimay et al., 2008).

Neste sentido, este estudo examinou o potencial antioxidante das soluções de pré-tratamento dentinário tendo como princípio ativo os compostos derivados sinteticamente do CI ou p-CA, assim como o controle positivo de CHX. A solução formulada com C-Methyl apresentou o melhor efeito antioxidante, seguido do LA11, negando a segunda hipótese nula deste estudo, de que os compostos não teriam efeito antioxidante. Segundo os dados obtidos na literatura, entre os compostos do grupo dos ácidos hidroxicinâmicos, o p-CA apresenta menor efeito antioxidante, quando comparado aos seus análogos, como o ácido ferúlico (Pei et al., 2015). Contudo, alterações na estrutura molecular aumenta significativamente a atividade antioxidante (Hammoda et al., 2013), corroborando com o resultado de potente efeito antioxidante da solução de pré-tratamento contendo o composto híbrido C- Methyl, analisada neste estudo.

A terceira hipótese nula do estudo foi aceita, visto que os compostos testados não apresentaram potencial citotóxico maior do que do grupo controle de CHX. O derivado sintético C-Methyl demostrou a melhor citocompatibilidade em relação aos odontoblastos MDPC-23, em concentrações inferiores a 125 µg/mL. Não há relatos na literatura de estudos que analisaram o efeito do C-Methyl sobre a viabilidade de células MDPC-23. Song et al. (2011) examinou o efeito do p-CA e seu derivado C-Methyl sobre a viabilidade de melanócitos epidérmicos humanos, os dados obtidos por ele e seu grupo mostraram que o p-CA exibiu uma citotoxicidade moderada em

altas concentrações (300–1000 μM), por outro lado o C-Methyl não teve efeitos citotóxicos sobre as células testadas. Dos Santos et al. (2021) avaliaram a citotoxicidade do LA11 sobre fibroblastos da linhagem L929, seus achados revelaram que em concentrações inferiores a 39 μg/mL, o LA11 não apresenta efeitos tóxicos sobre a viabilidade das células. No atual estudo, o LA11 demostrou citocompatibilidade com células dontoblastóides MDPC-23 em concentrações menores que 3,91 μg/mL.

O tratamento do substrato dentinário previamente ao protocolo de adesão tem sido estudado devido às peculiaridades deste tecido. No presente estudo, a utilização do pré-tratamento da dentina com os compostos LA11 e C-Methyl não propiciou diferença nos valores de resistência de união comparativamente ao grupo controle e grupo tratado com CHX, no baseline, aceitando-se a quarta hipótese nula deste estudo. Contudo, observou-se valores médios de resistência de união maiores do que aqueles encontrados na literatura, no qual também foram utilizados compostos fenólicos como pré-tratamento da dentina, tanto antes como após termociclagem (Paik et al., 2022).

O envelhecimento dos espécimes foi realizado através da ciclagem térmica (10.000 ciclos, 5 e 55°C, tempo de permanência 28 segundos, tempo de transferência de 2 segundos) para simular as condições da cavidade oral a qual os materiais restauradores são submetidos. Os valores obtidos de resistência de união à dentina após a termociclagem não apresentaram diferença estatisticamente significante para os valores iniciais em todos os grupos experimentais (Figura 3), aceitando-se da mesma maneira, a quarta hipótese nula deste estudo. De acordo com Armstrong et al. (2017) deveria ser realizado no mínimo 10.000 ciclos para produzir algum efeito significante na resistência de união dos materiais. Entretanto, é possível que o número

de ciclos utilizados não tenha sido suficiente para ocorrer a degradação hidrolítica e/ou enzimática das fibrilas colágenas do substrato dentinário em nosso estudo (Bachi et al., 2015).

Um fato interessante foi o de que o grupo CHX diferiu do LA11 e C-Methyl, apresentando valores de resistência de união estatisticamente menores após a termociclagem (27,02 MPa). Esse dado corrobora com estudos clínicos de acompanhamento longitudinal, os quais relatam pouco ou nenhum benefício da clorexidina como inibidor de MMPs (Sartori et al., 2013; Favetti et al., 2017). Além do efeito limitado e de curta duração, apresenta potencial citotóxico e genotóxico, descritos na literatura (Lessa et al., 2010; Botton et al., 2016). Com relação a falha predominante observada em mais de 80% dos espécimes nos testes de microtração, tanto antes como após a termociclagem foi a adesiva para todos os grupos testados. Evidenciando os efeitos deletérios que ocorrem nos componentes da interface resina-adesivo-dentina.

Diante do exposto e dentro das limitações deste estudo, futuras pesquisas devem ser realizadas aumentando o número de ciclos para estimular a degradação hidrolítica da interface adesiva. Ainda, mais estudos devem ser realizados afim de investigar o efeito dos compostos derivados do ácido cinâmico e ácido p-cumárico em substratos afetados por microrganismos em conjunto com protocolos adesivos ao longo do tempo, assim como estudos que avaliem o potencial inibidor destes compostos sobre as MMPs.

6 CONCLUSÃO

A utilização de compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico (LA11) e do ácido p-cumáico (C-Methyl) como princípio ativo do pré-tratamento dentinário se mostrou promissora. Uma vez que esses compostos apresentaram:

- Forte efeito antimicrobiano e antibiofilme;
- Maior citocompatibilidade evidenciada para a solução teste contendo o derivado híbrido C-Methyl, em concentrações inferiores a 125 µg/mL;
- Maior potencial antioxidante também para a solução de C-Methyl;
- Nenhum composto prejudicou a resistência de união do sistema adesivo à dentina, apresentando resultados superiores ao da clorexidina.

REFERÊNCIAS

1. Akyuz S, Moufti O, Ntemir C, Sacan O , Yanardag R, Kalaycı S, Yarat A, Sahin F. Antibacterial and photodynamic effects of some plant extracts for cavity disinfection. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Jun; 26:48-52. PubMed; PMID:30822566.
2. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. J. Agric. Food Chem 2001;49:4168-70.
3. Almahdy A, Koller G, Festy F, Bartsch JW, Watson TF, Banerjee A. An MMP-inhibitor modified adhesive primer enhances bond durability to carious dentin. *Dental Mater*. 2015; 31, 594–602.
4. Araújo MSRG, Souza LC, Apolonio FM, Barros LO, Reis A, Loguercio AD, et al. Two-year clinical evaluation of chlorhexidine incorporation in two-step self-etch adhesive. *Int J Dent*. 2015; 43, 140–148.
5. Armstrong S, Breschi L, Ozcan M, Pfefferkrn F, Ferrari M, Van Meerbeek B. Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μTBS) approach. Dent Mater. 2017;33:133-43.
6. Aydogdu A, Sumnu G, Sahin S. Fabrication of gallic acid loaded hydroxypropyl methylcellulose nanofibers by electrospinning technique as active packaging material. Carboh. Polym. 2019 May;208:241-50.
7. Bacchi A, Abuna G, Babbar A, Sinhoreti MAC, Feitosa VP. Influence of 3-month simulated pulpal pressure on the microtensile bond strength of simplified resin luting systems. J Adhes Dent. 2015;17(3):265-71.
8. Bedran-Russo AK, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. *Acta Biomater*. 2011; 7, 1735–1741.
9. Bedran-Russo AK, Guido FP, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification: Strategies, renewable resources and clinical applications. *Dental Mater*. 2014; 30, 62–76.
10. Blumer L, Schmidli F, Weiger R, Fischer J. A systematic approach to standardize artificial aging of resin composite cements. *Dent Mater*. 2015 Jul;31(7):855-63. PubMed; PMID: 25998485.
11. Botton G, Pires CW, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, Cruz IB, Sagrillo MR, Praetzel JR. Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. *Int Endod J*. 2016 Aug;49(8):746-54. PubMed; PMID:26175042.

12. Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, cadenaro M, Tjäderhane L, et al. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dental Mater*. 2018; 34, (1):78-96.
13. Broyles AC, Pavan S, Bedran-Russo AK. Effect of dentin surface modification on the microtensile bond strength of self-adhesive resin cements. J Prosthodont. 2013; 22, 59–62.
14. Carvalho FG, Goncalves LS, Carlo HL, Soares CJ, Correr-Sobrinho L, Puppin-Rontani RM. Influence of sterlization method on the bond strength of caries-affected dentin. *Braz Oral Res*. 2009; 23, 11-16
15. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Karol S, Pereira PN. Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011; 4, 1343–1350.
16. Dávila-Sánchez A, Gutierrez MF, Bermudez JP, Méndez-Bauer ML, Hilgemberg B, Sauro S, Loguercio AD, Arrais CAG. Influence of flavonoids on long-term bonding stability on caries-affected dentin. *Dent Mater*. 2020 Sep;36(9):1151-1160.PubMed; PMID:32620332.
17. Moraes IQ, do Nascimento TG, da Silva AT, de Lira LM, Parolia A, Porto IC. Inhibition of matrix metalloproteinases: a troubleshooting for dentin adhesion. Restor Dent Endod. 2020 Aug; 45(3):e31.
18. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res.* 2005;(84):118–132.
19. De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Inhibition of enmatic degradation of adhesive- dentin interfaces. *J Dent Res*. 2009; 88, (12): 1101-1106.
20. Dias PG, da Silva EM, Carvalho CM, Miranda MEDS, Portela MB, Amaral CM. Characterization and Antibacterial Effect of an Experimental Adhesive Containing Different Concentrations of Proanthocyanidin. J Adhes Dent. 2020; 22(2):139-147.
21. Dündar M, Ozcan M, Cömlekoglu ME, Sen BH. Nanoleakage inhibition within hybrid layer using new protective chemicals and their effect on adhesion. *J Dent Res*. 2011; 90, 93–98.
22. Ende C, Gebhardt R. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities by selected flavonoids. *Planta Med*. 2004 Oct;70(10):1006-8. PubMed; PMID:15490332.
23. Favetti M, Schroeder T, Montagner AF, Correa MB, Pereira-Cenci T, Cenci MS. Effectiveness of pre-treatment with chlorhexidine in restoration retention: A 36-month follow-up randomized clinical trial. *J Dent*. 2017 May; (60):44-49. PubMed; PMID: 28237629.
24. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci*.2011;3, 711-735.

25. Gou Y, Meghil MM, Pucci CR, Breschi L, Pashley DH. Optimizing resin-dentin bond stability using a bioactive adhesive with concomitant antibacterial properties and anti-proteolytic activities, Acta Biomaterialia. 2018 Jun; 171-182.
26. Guzman JD. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. *Molecules*. 2014; 19, (12):19292-19349.
27. Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H, Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater*. 2000; 16: 406-411.
28. Hass V, Luque-Martinez I, Muñoz MA, Reyes MF, Abuna G, Sinhoreti MA, Liu AY, Loguercio AD, Wang Y, Reis A. The effect of proanthocyanidin-containing 10% phosphoric acid on bonding properties and MMP inhibition. *Dent Mater*. 2016 Mar; 32(3):468-75. PubMed; PMID: 26774680.
29. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97:1027-31.
30. Huang Z, Nong X, Ren Z, Wang J, Zhang X, Qi S. Anti-HSV-1, antioxidant and antifouling phenolic compounds from the deep-sea-derived fungus Aspergillus versicolor SCSIO 41502. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017 Feb 15;27, (4):787-791. PubMed; PMID: 28129981.
31. Isolan CP, Sarkis-Onofre R, Lima GS, Moraes RR. Bonding to Sound and Caries-Affected Dentin: A Systematic Review and Meta-Analysis. .*J Adhes Dent*. 2018;20(1):7-18. PubMed; PMID:29399679
32. Kharouf N, Eid A, Hardan L, Bourgi R, Arntz Y, Jmal H, Foschi F, Sauro S, Ball V, Haikel Y, et al. Antibacterial and Bonding Properties of Universal Adhesive Dental Polymers Doped with Pyrogallol. Polymers. 2021; 13(10):1538.
33. Laske M, Opdam NJ, Bronkhorst EM, Braspenning JC, Huysmans MC. Longevity of direct restorations in Dutch dental practices. Descriptive study out of a practice based research network. *J Dent*. 2016; 46,12-17.
34. Leme AA, Vidal CMP, Hassan LS, Bedran-Russo AK. Potential role of surface wettability on the long-term stability of dentin bonds after surface biomodification, Journal of Biomechanics. 2015; 2067-2071.
35. Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, Giro EM, Hebling J, Costa CA. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci*. 2010 Jan-Feb;18, (1):50-8. PMID: 20379682;
36. Kimyai S, Valizadeh H. Comparison of the effect of hydrogel and a solution of sodium ascorbate on dentin-composite bond strength after bleaching. J Contemp Dent Pract. 2008 Feb 1;9(2):105-12.

37. Liao JC, Deng JS, Chiu CS, Hou WC, Huang SS, Shie PH, Huang GJ. Anti-Inflammatory Activities of Cinnamomum cassia Constituents In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 2012:429320.
38. Lopes SR, Matuda AGN, Campos RP, Mafetano APVP, Barnabé AHM, Chagas GS, Barcelos DC, Niu LN,Tay FR, Pucci CR. Development of an Antibacterial Dentin Adhesive. Polymers 2022 Feb; 14, 2502.
39. Mazzoni A, Apolonio FM, Saboia VPA, Santi S, Angeloni V, Checchi V, et al. Carbodiimide inactivation of MMPs and effect on dentin bonding. *J Dent Res*. 2014; 93, 263–268.
40. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, et al. Role of Dentin MMPs in Caries Progression and Bond Stability. *Journal of Dental Research*. 2015;94(2): 241-251.
41. Monteiro TMA, Basting RT, Turssi CP, França FMG, Amaral FLB. Influence of natural and synthetic metalloproteinase inhibitors on bonding durability of an etch-and-rinse adhesive to dentin International. *Int J Adhes Adhes*. 2013; 47, 83–88.
42. Nazaré AC, Polaquini CR, Cavalca LB, Anselmo DB, Saiki MDFC, Monteiro DA, Zielinska A, Rahal P, Gomes E, Scheffers D-J, Ferreira H, Regasini LO. Design of Antibacterial Agents: Alkyl Dihydroxybenzoates against Xanthomonas citri subsp. citri. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(10):3050.
43. Ozcan S, Seseogullari-Dirihan R, Uctasli M, Tay FR, Pashley DH, Tezvergil Mutluay A. Effect of polyacrylic acid on dentin protease activities. *Dental Mater*. 2015. 31, 901–906.
44. Paik, Y.; Kim, J.-H.; Yoo, K.-H.; Yoon, S.-Y.; Kim, Y.-I. Dentin Biomodification with Flavonoids and Calcium Phosphate Ion Clusters to Improve Dentin Bonding Stability. Materials 2022;15:1494.
45. Pandurangan AK, Esa NM. Luteolin, a bioflavonoid inhibits colorectal cancer through modulation of multiple signaling pathways: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*.2014;15(14):5501-8. PubMed; PMID: 25081655.
46. Perdigão J, Sezinando A, Monteiro PC. Effect of substrate age and adhesive composition on dentin bonding. *Oper Dent*. 2013; 38, (3): 267-274.
47. Perdigao J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater*, 2010; 22,24-37.
48. Perdigão P. Current perspectives on dental adhesion: (1) Dentin adhesion - not there yet. *Jpn Dent Sci Ver*. 2020 Nov;56(1):190-207.PubMed; PMID:34188727.
49. Porto ICCM, Rocha ABB, Ferreira IIS, de Barros BM, Ávila EC, da Silva MC, de Oliveira MPS, Lôbo TLGF, Oliveira JMDS, do Nascimento TG, de Freitas JMD, de Freitas JD. Polyphenols and Brazilian red propolis incorporated into a total-etching adhesive system help in maintaining bonding durability. *Heliyon*. 2021 Feb 19;7(2):e06237. PubMed; PMID:33665421.

50. Prakki A, Xiong Y, Bortolatto J, Gonçalves LL, Bafail A, Anderson G, Stavroullakis AT. Functionalized epigallocatechin gallate copolymer inhibit dentin matrices degradation: Mechanical, solubilized telopeptide and proteomic assays. *Dent Mater*. 2018 Nov;34(11):1625-1633.PubMed; PMID:30201286.
51. Lima AF, Fonseca FM, Freitas MS, Palialol AR, Aguiar FH, Marchi GM. Effect of bleaching treatment and reduced application time of an antioxidant on bond strength to bleached enamel and subjacent dentin. J Adhes Dent. 2011 Dec;13(6):537-42.
52. Ribeiro M, Malheiro J, Grenho L, Fernandes MH, Simões M. Cytotoxicity and antimicrobial action of selected phytochemicals against planktonic and sessile Streptococcus mutans. *PeerJ*. 2018 Jun 4;(6)4872.
53. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Braz J Microbiol 2004;35:275-80.
54. Seseogullari-Dirihan R, Apollonio F, Mazzoni A, Tjaderhane L, Pashley D, Breschi L, Tezvergil-Mutluay A. Use of crosslinkers to inactivate dentin MMPs. *Dent Mater*. 2016 Mar; 32(3):423-32. PubMed; PMID: 26764177
55. Shibata S, Suge T, Kimura T, Ishikawa K, Matsuo T. Antibacterial activity of ammonium hexafluorosilicate solution with antimicrobial agents for the prevention of dentin caries. Am J Dent. 2012 Feb; 25(1):31-4.
56. Song F, Li H, Sun J, Wang S. Protective effects of cinnamic acid and cinnamic aldehyde on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats. *J Ethnopharmacol*. 2013 Oct 28;150(1):125-30.
57. Zhou W, Liu S, Zhou X, Hannig M, Rupf S, Feng J, Peng X, Cheng L. Modificando materiais adesivos para melhorar a longevidade de restaurações resinosas. 2019 Fev 8;20(3):723.
58. Sova M. Antioxidant & antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Rev Med Chem*. 2012 Jul;12; (8):749-67.
59. Sova M. Antioxidant & antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Rev Med Chem*. 2012 Jul;12; (8):749-67.
60. Lou Z, Wang H, Li J, Chen S, Zhu S, Ma C, Wang Z. Antioxidant activity and chemical composition of the fractions from burdock leaves. J Food Sci. 2012 Jun;75(5):C413-9.
61. Stewart CA, Finer Y. Biostable, antidegradative and antimicrobial restorative systems based on host-biomaterials and microbial interactions. *Dent Mater*. 2019 Jan;35(1):36-52. PubMed; PMID:30301624.
62. Swift Jr EJ, Perdigão J, Heymann HO, Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art.

63. Song K, An SM, Kim M, Koh JS, Boo YC. Comparison of the antimelanogenic effects of p-coumaric acid and its methyl ester and their skin permeabilities. J Dermatol Sci. 2011 Jul;63(1):17-22.
64. Pragasam SJ, Venkatesan V, Rasool M. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. Inflammation. 2013 Feb;36(1):169-76.
65. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, 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 Oct;29(10):999-1011.
66. Tjäderhane L, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH. Dentin basic structure and composition—an overview. *Endod Topics*. 2012; 20, 3-29.
67. Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater*. 2013; 29, 116-135.
68. Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P, Vanherle G. Adhesives and Cements to Promote Preservation Dentistry. *Oper Dent J.* 2001; 6: 119-144.
69. Viegas-Junior C, Danuello A, da Silva Bolzani V, Barreiro EJ, Fraga CA. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Curr Med Chem*. 2007;14(17):1829-52. PubMed; PMID:17627520.
70. Volpi N, Bergonzini G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry.*J Pharm Biomed Anal*. 2006 Sep 26;42(3):354-61.
71. Yang H, Li K, Yan H, Liu S, Wang Y, Huang C. High-performance therapeutic quercetin-doped adhesive for adhesive-dentin interfaces. Sci Rep. 2017 Aug 15; 7(1):8189.
72. Zhang J, Xiao A, Wang T, Liang X, Gao J, Li P, Shi T. Effect and mechanism of action of cinnamic acid on the proliferation and apoptosis of leukaemia cells. *Biomed Res J*. 2014; 25:405–408.
73. Jucá MM, Cysne Filho FMS, de Almeida JC, Mesquita DDS, Barriga JRM, Dias KCF, Barbosa TM, Vasconcelos LC, Leal LKAM, Ribeiro JE, Vasconcelos SMM. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. Nat Prod Res. 2020 Mar;34(5):692-705.
74. El-Seedi HR, El-Said AM, Khalifa SA, Göransson U, Bohlin L, Borg-Karlson AK, Verpoorte R. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. J Agric Food Chem. 2012 Nov 7;60(44):10877-95.
75. Karadas M, Demirbuga S. Influence of a short-time antioxidant application on the dentin bond strength after intracoronal bleaching. Microsc Res Tech. 2019 Oct;82(10):1720-1727.

76. Dos Santos VR, Caiaffa KS, Oliveira WC, Pereira JA, Abuna GF, Polaquini CR, Regasini LO, Guiotti AM, Duque C. Cytotoxicity and effects of curcumin and cinnamaldehyde hybrids on biofilms of oral pathogens. Biofouling. 2021 Jul;37(6):591-605.
77. Zhang Z, Beitzel D, Majd H, Mutluay M, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR et al. Effect of carbodiimide on the fatigue crack growth resistance of resin-dentin bonds*. Dent Mater J.* 2016; 32:211–222.
78. Beck F, Ilie N. Antioxidants and Collagen-Crosslinking: Benefit on Bond Strength and Clinical Applicability. Materials (Basel). 2020 Dec 1;13(23):5483.
79. Briso AL, Rahal V, Sundfeld RH, dos Santos PH, Alexandre RS. Effect of sodium ascorbate on dentin bonding after two bleaching techniques. Oper Dent. 2014 Mar-Apr;39(2):195-203.
80. Pei K, Ou J, Huang J, Ou S. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. J Sci Food Agric. 2016 Jul;96(9):2952-62.
81. Hammoda HM, Ghazy NM, Harraz FM, Radwan MM, ElSohly MA, Abdallah II. Chemical constituents from Tribulus terrestris and screening of their antioxidant activity. Phytochemistry. 2013 Aug;92:153-9.

ANEXO A

UNESP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA-CAMPUS DE ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Compostos derivados do ácido cinâmico como biomodificadores no pré-tratamento de dentina: ação antimicrobiana, antibiofilme e efeito sobre a resistência de união à dentina.

Pesquisador: Aimée Maria Guiotti

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 63654222.4.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.977.007

Apresentação do Projeto:

A estabilização a longo prazo da interface compósito-adesivo-dentina representa um grande desafio na prática odontológica restauradora. Nesse contexto, o uso de compostos fenólicos biomodificadores de colágeno, foi proposto para evitar a degradação da camada híbrida. O ácido cinâmico e seus deri-vados são compostos fenólicos que se destacam pelas suas múltiplas aplicações médicas. Entre elas, suas potentes atividades antioxidante e antimicrobiana. Nesse contexto, esse estudo se propõe avali-ar: 1) A atividade antimicrobiana/antibiofilme de compostos derivados sinteticamente do ácido cinâ-mico; 2) Analisar a resistência de união da interface compósito-adesivo-dentina após o tratamento dentinário com a solução teste formulada com composto derivado do ácido cinâmico de melhor ação biológica. A atividade antimicrobiana de quatro derivados do ácido cinâmico será avaliada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida/fungicida mí-nima (CMB/CFM) sobre Streptococcus mutans e Candida albicans. Em seguida, os compostos que apresentarem atividade bactericida/fungicida serão avaliados quanto a ação antibiofilme dual-espécies (S. mutans + C. albicans) por contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Para analisar a resistência de união da interface adesiva, o substrato dentinário será previamente tratado com a solu-ção teste

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONÇA **CEP:** 16.015-050
UF: SP **Município:** ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3234 **Fax:** (18)3636-3203 **E-mail:** cep.foa@unesp.br

com o composto de melhor desempenho nos testes microbiológicos. 24 dentes naturais humanos serão utilizados. O adesivo Single Bond Universal será aplicado e fotopolimerizado, seguido da aplicação de duas camadas de resina composta de 2 mm de espessura (Z250 XT), que serão aco-modadas sobre o substrato e fotopolimerizadas por 20 s cada. Os dentes serão seccionados ao meio, ao longo eixo do dente, sendo uma das metades utilizada na avaliação de resistência de união à mi-crotração 24 horas após o processo adesivo, enquanto a outra metade será submetida a ciclagem tér-mica (6000 ciclos, 5 e 55°C). Após os testes de resistência a união por microtração, as amostras se-guirão para análise do padrão de fratura. Os dados obtidos com a execução desse estudo serão anali-sados estatisticamente, considerando p<0,05.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Este estudo tem como objetivo geral avaliar as propriedades biológicas de compostos derivados do ácido cinâmico e posterior efeito de uma solução de pré-tratamento dentinária sem interferir na resistência adesiva.

Objetivo Secundário:

1- Avaliar o efeito antimicrobiano de derivados do ácido cinâmico sobre culturas planctônicas de Streptococcus mutans (ATCC 25175) e Candida albicans (ATCC 10231);

2- Avaliar o efeito desses compostos sobre biofilme misto de C. albicans e S. mutans por contagem das unidades formadoras de colônia (UFC); 3- Analisar a resistência de união da interface adesiva compósito-adesivo-dentina após o pré-tratamento da dentina com a solução teste do (s) composto (s) derivado de ácido cinâmico de melhor ação biológica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O projeto oferecerá riscos mínimos aos pacientes, uma vez que esta pesquisa visa a utilização de dentes humanos que serão extraídos e que seriam descartados, sem finalidade alguma. Realizada por equipe especializada, portanto, não realizaremos procedimentos cirúrgicos. Assim, a participação nesta pesquisa ocasionará mínimo desconforto e a doação será completamente voluntária. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

Benefícios:

Ao participar desta pesquisa os pacientes não terão nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo resulte em informações científicas importantes para a melhoria dos protocolos restauradores, em que o pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos. O projeto contribuirá com o desenvolvimento de novos biomateriais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todos os termos foram adicionados de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pesquisa apresenta-se apta para a sua realização.

Recomendações:

Não Há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pesquisa apresenta-se apta para a sua realização.

Considerações Finais a critério do CEP:

Salientamos que, de acordo com a Resolução 466 CNS, de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 01/09/2023.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1851026.pdf	15/03/2023 19:03:19		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	15/03/2023 19:02:58	Aimée Maria Guiotti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETODEPESQUISA.pdf	15/03/2023 19:02:22	Aimée Maria Guiotti	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderostoassinada.pdf	21/09/2022 10:25:08	Aimée Maria Guiotti	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

ARACATUBA, 31 de Março de 2023

Assinado por:
André Pinheiro de Magalhães Bertoz
(Coordenador(a))

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONÇA **CEP:** 16.015-050
UF: SP **Município:** ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3234 **Fax:** (18)3636-3203 **E-mail:** cep.foa@unesp.br

Fluxograma 1. Delineamento experimental para os testes mecânico

