



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**RAQUEL PINTO CAMPOS**

**DESENVOLVIMENTO DE SOLUÇÃO DE DESINFECÇÃO  
CAVITÁRIA ABASE DE NISINA E SUAS IMPLICAÇÕES  
NA INTERFACE ADESIVA**

2022

**RAQUEL PINTO CAMPOS**

**DESENVOLVIMENTO DE SOLUÇÃO DE DESINFECÇÃO CAVITÁRIA A  
BASE DENISINA E SUAS IMPLICAÇÕES NA INTERFACE ADESIVA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Dentística. Linha de Pesquisa: Avaliação clínica e laboratorial de alterações da estrutura dental, de materiais e de técnicas de prevenção e tratamento em dentística.

Orientador: Prof. Associado César Rogério Pucci

São José dos Campos  
2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Campos, Raquel Pinto

Desenvolvimento de solução de desinfecção cavitária a base de Nisina e suas implicações na interface adesiva / Raquel Pinto Campos. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.

83 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022. Orientador: César Rogério Pucci.

1. Desinfecção cavitária. 2. Nisina. 3. Resistência de união. I. Pucci, César Rogério, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr César Rogério Pucci** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof.<sup>a</sup> Dr. Vanessa Cavalli Gobbo**

Faculdade de Odontologia de Piracicaba (Unicamp)

Departamento de Odontologia Restauradora

Piracicaba

**Prof. Dr. Carlos Rocha Gomes Torres**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 18 de novembro de 2022.

## **DEDICATÓRIA**

À minha família que que nunca titubeou ao me dar forças e me incentivar a buscar o caminho que me trouxesse mais felicidade. Vocês são a materialização da presença de Deus na minha vida.

Nada seria possível sem vocês.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todos os Seus planos para minha vida serem sempre maiores que os meus sonhos.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos ICT-UNESP, na pessoa da diretora **Profa. Associada Rebeca Di Nicoló** e do vice-diretor **Prof. Associado Cláudio Antonio Talge Carvalho**.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora área Dentística, na pessoa do coordenador **Prof. César Rogério Pucci** e vice-coordenadora **Profª.**

**Taciana Marco Ferraz Caneppele**.

Ao meu orientador **César Rogério Pucci**, pela oportunidade de ter sido sua orientada. Obrigada por acreditar no meu trabalho e engrandecer minha formação profissional.

Ao meu grupo de pesquisa, formado por mulheres incríveis, **Ana Paula Valente Pinho Mafetano, Gabriela da Silva Chagas, Stephanie Ribeiro Lopes** e em especial a amiga **Amanda Guedes Matuda** que me ensinou muito mais do que eu precisava para realizar meus testes sempre com carinho e paciência. Você foi imprescindível para que eu realizasse esse projeto. Obrigada.

Aos amigos **Taiana Paola Prado, Jefferson Moreira e Victoria Carvalho**, por terem dividido essa jornada comigo desde o início e sido fonte de apoio e compreensão inesgotáveis.

Às alunas de iniciação científica **Fernanda Labiapari Senefonte, Natália de Souza Rocha, Sarah Coutinho Andria, Vivian Maria Cedotte Ribeiro e Beatriz Samara de Sousa Lima** pelo respeito, carinho e dedicação.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora área Dentística.

Ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), da Universidade do Vale do Paraíba (Univap), nas pessoas das bióloga **Priscila Maria Sarmeiro Correa Marciano Leite e Cristina Pacheco Soares**, por terem nos cedido o espaço e os

equipamentos, além de nos auxiliarem na elaboração de testes, agradeço imensamente.

Aos professores participantes da Banca Examinadora do Exame Geral de Qualificação **Marcelo Taveira Barbosa e Alessandra Buhler Borges** muito obrigada por aceitarem o convite, vocês são exemplos de pessoas e profissionais acadêmicos, tenho muita admiração por vocês.

Aos professores participantes da Banca Examinadora, **Carlos Rocha Gomes Torres e Vanessa Cavalli Gobbo**, muito obrigada por aceitarem o convite prontamente e fazerem parte desse dia tão especial para mim, vocês têm todo meu carinho e admiração.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado, através do processo nº 33004145070P8/2021- 02 no período de 01/07/2021 a 31/07/2022.

Agradeço a todos que contribuíram com esse trabalho, pela ajuda e incentivo. Muito obrigada!

*“O sucesso nasce do querer, da  
determinação e persistência em se chegar  
a um objetivo. Mesmo não atingindo o  
alvo, quem busca e vence obstáculos, no  
mínimo fará coisas admiráveis.”*

(José de Alencar)

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Desinfecção cavitária.....	14
2.2 Nisina.....	19
3 PROPOSIÇÃO.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
3.3 Hipóteses nulas.....	22
4 CÁLCULO AMOSTRAL.....	24
5 MATERIAL E MÉTODO.....	25
5.1 Comitê de ética.....	25
5.2 Delineamento experimental.....	25
5.2.1 Unidades experimentais.....	25
5.2.2 Fatores de estudo.....	25
5.3 Variável de resposta.....	25
5.4 Materiais utilizados.....	26
5.5 Seleção das amostras.....	26
5.5.1 Preparo das amostras.....	27
5.6 Divisão dos grupos experimentais. confecção das soluções.....	29
5.7 Confecção das soluções.....	31
5.8 Aplicação de solução e técnica restauradora.....	32
5.9 Envelhecimento.....	33
5.10 Teste de resistência a microtração.....	35
5.11 Atividade antibacteriana.....	37
5.11.1 Teste de difusão em ágar.....	38
5.12 Teste de penetrabilidade.....	39
5.13 Zimografia in situ.....	39
5.14 Análise ilustrativa por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	40
6 RESULTADOS.....	41

<b>6.1 Resistência de união.....</b>	<b>41</b>
<b>6.2 Teste de difusão em Ágar.....</b>	<b>47</b>
<b>6.3 Teste de penetrabilidade.....</b>	<b>49</b>
<b>6.4 Zimografia in situ.....</b>	<b>53</b>
<b>6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....</b>	<b>56</b>
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>70</b>

Campos RP. Desenvolvimento de solução de desinfecção cavitária à base de nisina e suas implicações na interface adesiva [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

## RESUMO

Este trabalho desenvolveu uma solução de desinfecção cavitária à base de Nisina, um peptídeo utilizado para conservação de alimentos, avaliou a consequência dessa aplicação nas propriedades mecânicas e biológicas da interface adesiva. Utilizou-se 100 dentes humanos hígidos e recém-extraídos, divididos em 2 grupos: **I** (Corte Imediato), **C** (Ciclagem Termomecânica). Os espécimes foram submetidos envelhecimento mecânico (120.000 ciclos) e térmico (5.000 ciclos) para avaliar os resultados da resistência de união de maneira imediata e pós ciclagem. Foram subdivididos de acordo com a concentração de Nisina aplicada (n=10): controle (sem aplicação de solução de Nisina – **SB**), controle positivo (aplicação de Digluconato de Clorexidina 0,12% - **CP**), solução de Nisina com concentração **0,5% (N05)**, solução de Nisina com concentração **1,0% (N1)** e solução de Nisina com concentração **1,5% (N1,5)**. A superfície de esmalte foi removida dos espécimes, expondo a superfície dentinária. A Nisina, assim como a Clorexidina, foi aplicada após condicionamento ácido e antes da aplicação do adesivo (Single Bond). A resina composta (Filtek Z250) foi aplicada através da técnica incremental. Foram avaliadas a resistência de união, através de teste de microtração, de maneira imediata e longitudinal, e a atividade antibacteriana através do teste de difusão em ágar. Utilizou-se a microscopia confocal laser para avaliar a penetrabilidade da Nisina modificada por Rodamina na dentina e a atividade gelatinolítica por meio da zimografia *in situ*. Os espécimes resultantes da microtração foram avaliados em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste estatístico de normalidade, e ao teste ANOVA, seguido do teste de Tukey (5%). Os resultados do teste de microtração ( $p=0,0016$ ) foram, em Mpa: **I**  $26,04\pm 2,11^A$  e **C**  $25,24\pm 1,08^B$ . Nos subgrupos foram: **SB**  $26,69\pm 3,56^{AB}$ , **CP**  $25,09\pm 3,43^a$ , **N05**  $25,09\pm 3,43^A$ , **N1**  $25,54\pm 2,24^A$ , **N1,5**  $24,44\pm 1,49$ . Na microscopia confocal laser, foi confirmada a penetrabilidade da Nisina no substrato a partir da análise das imagens. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, sendo eles: **CP**  $119,98\pm 12,17^a$ , **N05**  $124,13\pm 12,47^a$ , **N1**  $176,37\pm 7,04^B$ , **N1,5**  $233,50\pm 9,87^C$ . A inibição de MMPs foi submetida a teste estatístico: **SB**  $226,70\pm 14,85^D$ , **CP**  $171,78\pm 4,97^C$ , **N05**  $129,96\pm 3,97^B$ , **N1**  $120,31\pm 3,74^B$  e **N1,5**  $109,54\pm 4,21^a$ . Observou-se que a Nisina não causou diminuição significativa da resistência de união, enquanto o grupo C apresentou resultados menores comparados ao grupo I. Observou-se que a Nisina possui capacidade de inibição de *Streptococcus* através do teste de difusão em ágar. A Nisina também foi capaz de penetrar no substrato e inibir metaloproteinases, sem alterar o modo de fratura das restaurações. Sendo assim, os resultados obtidos demonstram que a Nisina possui características interessantes para a evolução de estudos posteriores envolvendo desinfecção cavitária.

Palavras-chave: Desinfecção cavitária. Nisina. Resistência de união

Campos RP. Development of a nisin-based cavity disinfection solution and its implications for the adhesive interface [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

## ABSTRACT

This work developed a cavity disinfection solution based on Nisin, a peptide used for food preservation, evaluated the consequence of this application on the mechanical and biological properties of the adhesive interface. 100 healthy and recently extracted human teeth were used, divided into 2 groups: I (Immediate Cutting), C (Thermomechanical Cycling). The specimens underwent mechanical aging (120,000 cycles) and thermal aging (5,000 cycles) to evaluate bond strength results immediately and after cycling. They were subdivided according to the applied Nisin concentration ( $n=10$ ): control (no application of Nisin solution - SB), positive control (application of 0.12% Chlorhexidine Digluconate - CP), Nisin solution with 0.5% concentration (N05), Nisin solution with 1.0% concentration (N1) and Nisin solution with 1.5% concentration (N1.5). The enamel surface was removed from the specimens, exposing the dentin surface. Nisin, like Chlorhexidine, was applied after acid etching and before application of the adhesive (Single Bond). Composite resin (Filtek Z250) was applied using the incremental technique. The bond strength was evaluated through microtensile test, immediately and longitudinally, and the antibacterial activity through the agar diffusion test. Confocal laser microscopy was used to assess the penetrability of Nisin modified by Rhodamine in dentin and the gelatinolytic activity by means of *in situ* zymography. The specimens resulting from microtraction were evaluated in scanning electron microscopy (SEM). The results obtained were submitted to the statistical test of normality, and to the ANOVA test, followed by the Tukey test (5%). The results of the microtensile test ( $p=0.0016$ ) were, in Mpa: I  $26.04\pm 2.11A$  and C  $25.24\pm 1.08B$ . The subgroups were: SB  $26.69\pm 3.56AB$ , CP  $25.09\pm 3.43^a$ , N05  $25.09\pm 3.43A$ , N1  $25.54\pm 2.24A$ , N1.5  $24.44\pm 1.49$ . In confocal laser microscopy, the penetrability of Nisin in the substrate was confirmed based on image analysis. The results obtained were submitted to statistical analysis, as follows: CP  $119.98\pm 12.17^a$ , N05  $124.13\pm 12.47^a$ , N1  $176.37\pm 7.04B$ , N1.5  $233.50\pm 9.87C$ . The inhibition of MMPs was submitted to a statistical test: SB  $226.70\pm 14.85D$ , CP  $171.78\pm 4.97C$ , N05  $129.96\pm 3.97B$ , N1  $120.31\pm 3.74B$  and N1.5  $109.54\pm 4.21a$ . It was observed that Nisin did not cause a significant decrease in bond strength, while group C showed lower results compared to group I. It was observed that Nisin has the ability to inhibit *Streptococcus* through the agar diffusion test. Nisin was also able to penetrate the substrate and inhibit metalloproteinases, without altering the fracture mode of the restorations. Thus, the results obtained demonstrate that Nisin has interesting characteristics for the evolution of further studies involving cavity disinfection.

Keywords: Cavitary disinfection. Nisin. Bondstrength.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o sucesso dos tratamentos dentários conservadores concentra-se na longevidade da união entre o substrato dental e a restauração propriamente dita (Gou et al., 2018). Esse desenvolvimento se deu a partir da descoberta de que era possível condicionar os tecidos dentais para que se tornassem mais suscetíveis a ação de primers e adesivos. A desmineralização dos tecidos e formação de microporosidades que serão preenchidas por monômeros resinosos presentes no adesivo garantem a formação da camada híbrida e a resistência de união necessária para a longevidade desta restauração (Nakabayashi, 1982). Porém, a microinfiltração de bactérias na interface dente- restauração pode acarretar em contaminação do substrato dental, desenvolvimento de cárie recidiva e falha restauradora, como por exemplo a descoberta de Bränstorm e colaboradores em 1986, que demonstrou que as bactérias têm a capacidade de penetrar em alguns “gaps” originados da contração de polimerização inerente à fotopolimerização das resinas compostas, podendo gerar sensibilidade pós- operatória, e se manterem por muito tempo, podendo acarretar em recidivas de cárie. Portanto, a prática conservadora envolvendo condicionamento dos tecidos, aplicação de sistema adesivo e restauração utilizando resina composta, trouxe novos desafios para a aplicabilidade clínica e a longevidade das restaurações realizadas tem se demonstrado um fator extremamente relevante para a prática clínica atual.

Buscando a manutenção desse equilíbrio, diversos pesquisadores passaram a explorar os parâmetros necessários para garantir o sucesso restaurador dos tratamentos, tanto em relação às características mecânicas quanto biológicas (Perdigão et al., 2003; Hashimoto et al., 2000; Sano et al., 1999; Pucci et al., 2018). Após o condicionamento ácido, fibrilas colágenas passam a ficar expostas no substrato dentinário, sendo, posteriormente, envolvidas pelos monômeros presentes no sistema adesivo. Porém, caso essa união não ocorra de maneira efetiva, metaloproteinases (MMPs) capazes de degradar colágeno, atuam nessas fibras, resultando na deterioração da camada híbrida ao longo do tempo (Osorio et al., 2011; Frassetto et al., 2016; Tay et al., 2006).

Observando essas limitações nas práticas clínicas e visando minimizar os possíveis efeitos deletérios causados pela degradação dessa interface, estudiosos passaram a

buscar métodos eficazes de potencialização da ação antimicrobiana e inibição de MMPs, como Gou e colaboradores, em 2018, que realizaram estudos envolvendo amônia quaternária para verificar a possibilidade de aumento da qualidade e longevidade das restaurações através da sua aplicação durante o protocolo restaurador. Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação desta substância não causou diminuição na resistência de união.

Substâncias com capacidade desinfetante e antiproteolíticas têm se mostrado extremamente benéficas para a prevenção de novas lesões de cárie e preservação da camada híbrida. Pesquisadores realizaram testes de desinfecção cavitária utilizando a Clorexidina, e observou-se que não houve diminuição na resistência de união. Porém, a substância em si apresenta algumas limitações, como a coloração escurecida e o sabor desagradável, além de sua instabilidade ao longo do tempo, interferindo na longevidade das restaurações (Carrilho et al., 2009). Em 2022, Lopes e colaboradores realizaram um estudo onde incorporaram a Nisina pura em um sistema adesivo, obtendo excelentes resultados em relação a resistência de união e atividade antimicrobiana.

A Nisina é um peptídeo amplamente utilizado na indústria alimentícia, devido a sua característica antibacteriana. Isso ocorre devido a formação de poros transmembrana aquosos nas membranas citoplasmáticas das bactérias presentes no local, que acarreta na despolarização dessas membranas, levando a bactéria a iniciar um processo de lise e, conseqüentemente, a morte, como explicado por Buchaman GW em 1988. Além disso, existem trabalhos na literatura que comprovam a atividade de espectro e a baixa citotoxicidade da Nisina (Shin et al., 2015) assim como estudos em que observaram a atuação da Nisina incorporada ao adesivo possui capacidade antibacteriana frente ao *Streptococcus mutans* sem causar diminuição na resistência de união, principalmente em baixas concentrações, como 05% e 1% (Lopes, 2022). Em relação a ação das metaloproteínases, existe apenas o trabalho de Shin et al. (2016) que comprovou a supressão de processo metastático sobre MPP2 e MPP9, mas ainda não tinham sido realizados estudos sobre a ação da Nisina diretamente na interface adesiva dente-restauração.

Diante do exposto, utilizando como justificativa as características de amplo espectro de ação e baixa toxicidade da substância em questão, como também o fato de ser uma substância amplamente utilizada na indústria alimentícia, comprovadamente segura para ser utilizada por seres humanos em concentrações

pré-estipuladas, o presente trabalho desenvolveu soluções aquosas contendo diferentes concentrações do peptídeo antibacteriano (Nisina pura). Em suma, essas soluções com diferentes concentrações de Nisina foram utilizadas como uma alternativa no que diz respeito à desinfecção das cavidades dentinárias preparadas e a atuação na inibição da ação das metaloproteinases. Adicionalmente, diante da contextualização apresentada torna-se importante a avaliação da capacidade desinfetante das soluções em relação ao *Streptococcus mutans*, a interferência dessa aplicação na resistência de união longitudinal e a penetrabilidade das soluções no substrato dentinário.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Essa revisão não pretende esgotar o assunto, mas dar embasamento teórico para a compreensão do desenvolvimento do trabalho. Para facilitar a compreensão, a revisão de literatura será dividida em dois tópicos principais: Desinfecção cavitária e Nisina.

### 2.1 Desinfecção cavitária

A doença cárie se propaga através de lesões dentárias, onde a presença de bactérias causa a desmineralização do tecido dentário. Em alguns casos, essa desmineralização pode ser revertida através de procedimentos conservadores, como aplicação de fluoretos. Porém, existem lesões onde a atuação invasiva do cirurgião-dentista se mostra necessária, quando existe comprometimento de tecido dental sem possibilidade de remineralização ou presença de cavitação, por exemplo, como descrito por Silva e colaboradores em 2017. Para isso, o dentista deve eliminar o tecido cariado, condicionar o substrato para que seja capaz de receber o sistema adesivo de maneira eficiente e, por fim, confeccionar uma restauração das estruturas que foram perdidas no processo.

Durante a confecção do preparo, fragmentos de esmalte e dentina, além de bactérias decorrentes da lesão, podem formar uma “lama dentinária” denominada de *smear layer*, que contém tanto material orgânico quanto inorgânico (Eik, 1970). Cameron (1984) demonstrou as partes constituintes da *smear layer*, onde encontrou, além de partículas dentárias, também partículas de matriz de colágeno, saliva, sangue e bactérias.

Além disso, Brännström (1984) diferenciou camadas presentes na lama dentinária, determinando que a mais externa seria denominada “*smear on*”, localizada sobre a superfície dentinária, e a mais interna, “*smear in*”, que é composta por partículas menores que podem se infiltrar no interior dos túbulos dentinários, formando o “*smear plug*”. A presença dessa lama dentinária tem demonstrado fatores positivos, como a proteção natural do complexo dentino-pulpar, mas também negativos, como a diminuição da força de união entre resina e dentina, além da permanência dessas

bactérias no interior dos túbulos, com a possibilidade de causar toxicidade local em circunstâncias específicas (Bower, 2002). Essas limitações trouxeram a necessidade de se desenvolver um protocolo clínico que se utilizasse de materiais com ácidos mais fracos em sua composição, em comparação com o ácido fosfórico empregado nos sistemas adesivos convencionais, limitando o condicionamento da superfície de maneira planejada e estratégica, especialmente no substrato dentinário. Além disso, pesquisadores defendem que a manutenção dessa camada de partículas no substrato dental pode abrigar microorganismos com capacidade de produzir substratos bacterianos nocivos à saúde dental, podendo promover a reinstalação de lesões de cárie e inflamação pulpar (Pashley, 1984). Em suma, ainda não foi esgotado o completo entendimento da relevância desta camada para a longevidade dos tratamentos restauradores, de modo que sua remoção pode causar tanto benefícios quanto malefícios a curto, médio e longo prazo.

Sabe-se que o *Streptococcus mutans* é um dos principais fatores etiológicos para a evolução de lesões de cárie (Edwardsson, 1986). Portanto, torna-se de extrema relevância atuar de maneira a limitar seu desenvolvimento em meio bucal. Bactérias presentes na propagação da lesão de cárie ativa que possivelmente não forem totalmente removidas pelo preparo cavitário e tratamentos de superfície podem se manter alojadas no interior dos túbulos dentinários por muito tempo após finalizado o tratamento. Por exemplo, Besic (1943) observou que alguns microorganismos, em especial o *Streptococcus*, permaneciam no interior da cavidade em um período de 12 meses. Já em 1985, Anderson, Loesche e Charbeneau, puderam verificar que entre 15 e 40% das lesões de cárie tratadas continham bactérias no interior de seus túbulos dentinários.

Após esse momento, diversos pesquisadores passaram a estudar possíveis agentes de desinfecção dessa cavidade, o que fez com que Nagem Filho definisse em 1985 duas categorias de agentes de limpeza: os agentes condicionantes (que causam desmineralização do tecido através de ataque ácido) e os não condicionantes (que são antimicrobianos e alcalinizantes). Com isso, surgiram os sistemas adesivos autocondicionantes, que permitem contato íntimo com a “lama dentinária”, sem agredir diretamente a dentina, garantindo a manutenção de sua integridade e umidade (Giannini et al., 2015; Cardoso et al., 2019; Ozer et al., 2013). Portanto, uma solução de limpeza “ideal” deve ser capaz de se relacionar intimamente com a “smear layer” de maneira favorável ao preparo e a futura restauração, sem agredir à polpa e os

tecidos adjacentes ao dente. Além disso, também deve facilitar a eliminação de microrganismos patogênicos que, por ventura, possam ainda estar alojados nas paredes cavitárias, com potencial de interferir negativamente na longevidade do tratamento. Neste trabalho, a partir de estudos onde foi relatada uma maior força de união em dentes restaurados com sistemas adesivos convencionais em comparação à autocondicionantes, quando utiliza-se agentes desinfetantes (Celik et al., 2010; De Campos et al., 2009; Ercan et al., 2009) durante a execução da técnica, optamos por avaliar a presença da Nisina em um protocolo utilizando sistema adesivo convencional, onde utiliza-se da dentina previamente condicionada para fazer aplicação do peptídeo de forma ativa, garantindo, assim, a eliminação do smear layer previamente ao contato com a solução estudada e a posterior penetração da mesma no tecido dentinário.

Em 1955, Buonocore desenvolveu um método capaz de limpar, condicionar e aumentar a adesão das resinas restauradoras à superfície do esmalte, através da aplicação do ácido fosfórico. A partir deste momento, foi observada a necessidade de buscar por substâncias capazes não somente de desinfetar os tecidos dentários mas também potencializar a adesão entre dentina e material restaurador, tendo em vista todas as limitações decorrentes do condicionamento ácido deste tecido, diferentemente da aplicação em esmalte.

A partir da constatação da necessidade de tratar, limpar e condicionar a dentina, diversas pesquisas empregando substâncias desinfetantes após o condicionamento ácido foram realizadas (Francischone, 1984). Como exemplo de substância desinfetante não condicionante (com capacidade alcalinizante), semelhante à Nisina, podemos citar os estudos sobre o Digluconato de Clorexidina. Diversos pesquisadores realizaram estudos envolvendo a aplicação de Clorexidina previamente ao sistema adesivo, entre eles Machado em 2002, Piva, Martos e Demarco em 1999, Costa em 1999 e Gomes em 1998, obtendo resultados favoráveis à utilização da Clorexidina em relação à diminuição da microinfiltração, sem interferir na resistência de união.

Além da Clorexidina, existem diversos produtos no mercado atual que podem ser utilizados para realização da limpeza cavitária, cuja ação e indicação variam de acordo com a indicação de cada caso, por exemplo: digluconato de clorexidina a 2%, (Cav Clean, Consapsis, Cavity Cleanser), peróxido de hidrogênio a 3% ou 10 volumes, solução de hidróxido de cálcio (água de cal), detergentes (Tergensol, Tergidrox) e soluções fluoretadas (Vitashield, Tubulicid). Porém, cada um desses produtos possui

suas indicações e limitações, o que torna o assunto referente à desinfecção cavitária ainda não esgotado. Por exemplo, em alguns estudos foram observados efeitos adversos em relação à utilização de digluconato de clorexidina, como manchamento dos dentes e alteração de paladar à longo prazo, principalmente quando utilizado em forma de enxaguante bucal por período prolongado (Flotra, 1973) além de reações causadas por contato direto com a mucosa bucal e os tecidos adjacentes, como dermatite, gengivite descamativa e reações alérgicas (Mohammadi, 2009; Chang, 2010).

Nesse sentido, a Nisina possui diversas características em comum com as substâncias já relatadas, mas ainda alguns benefícios que tornam interessante o aprofundamento de pesquisas, como suas características inodora e insípida, além de seu vasto histórico de utilização na indústria alimentícia, demonstrando a segurança em sua ingestão e/ou contato em concentrações adequadas.

Além dos fatores relacionados à presença de bactérias potencialmente nocivas nas cavidades preparadas, outro fator que pode levar ao insucesso do tratamento restaurador é a degradação das fibras colágenas presentes na camada híbrida (Lobo, 2013). Durante o condicionamento ácido, ocorrem processos diferentes nos tecidos dentinários. Devido a aplicação de um ácido forte em esmalte (um tecido mais inorgânico e homogêneo), ocorre uma penetração mais profunda dos monômeros resinosos, originando os *tags* resinosos. Porém, em dentina, a união adesiva ocorre através da formação da camada híbrida. O ácido, geralmente fosfórico, expõe as fibrilas colágenas durante a desmineralização do tecido.

Portanto, para que a camada híbrida ocorra de maneira efetiva, os monômeros resinosos presentes nos adesivos que serão aplicados posteriormente ao condicionamento, devem ser capazes de envolver as fibrilas expostas. Caso estas fibrilas permaneçam expostas no interior da interface, estarão mais susceptíveis à degradação através de metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) presentes na dentina (Navarro, 2006; Hashimoto, 2000; Carrilho, 2012).

Metaloproteinases (MMPs) são enzimas (endopeptidases) capazes de degradar colágeno que estão presentes na dentina de forma latente. Elas podem se ativar a partir da diminuição do pH local (pH = 4,5) e tornarem-se funcionais, seja pela presença de ácidos advindos de processos cariosos ou de condicionamento intencional do tecido seja por ácidos em sistemas adesivos convencionais ou autocondicionantes (Santana, 2017; Li et al., 2015). A partir desta ativação, as MMPs podem iniciar a

degradação das fibrilas colágenas que tenham sido expostas pelo condicionamento ácido, mas não foram envolvidas pelos monômeros resinosos presentes nos adesivos (Pashley et al., 2010). Esta degradação acarretará na formação de poros nanométricos na interface adesiva, causando a deterioração da camada híbrida e, conseqüentemente, perda de retenção, possibilidade de infiltrações, desenvolvimento de novas lesões de cárie e hipersensibilidade, culminando no insucesso do tratamento restaurador (Li et al., 2015). Portanto, visando a diminuição da degradação da interface adesiva através da ação das MMPs, seria interessante que os sistemas adesivos pudessem envolver todas as fibrilas expostas pelo condicionamento ou que estas enzimas fossem inibidas nas áreas desmineralizadas (Liu et al., 2011). A Nisina, assim como a clorexidina, possui capacidade de inibição destas metaloproteinases e, portanto, é capaz de reduzir a velocidade da degradação da camada híbrida, proporcionando, dessa forma, manutenção da resistência da adesão à longo prazo (Tay, 2006; Carrilho, 2012; Buchman, 1988). Em suma, torna-se de extrema relevância o estudo de novas substâncias desinfetantes para serem utilizadas no interior das cavidades preparadas, garantindo a assepsia efetiva e o sucesso do tratamento restaurador de maneira conservadora. Portanto, para atingirmos a excelência no desenvolvimento dessas substâncias é essencial ter em mente que a solução deve possuir características inofensivas para todos os tecidos bucais, desde os tecidos duros, como esmalte e dentina, e tecidos moles, como gengiva e língua, além de não causar agressões ao tecido pulpar ou alterações estéticas/sensoriais ao paciente e, principalmente, demonstrar potencial significativo de desinfecção e não interferir na resistência de união. A Nisina tem demonstrado um potencial muito interessante no que diz respeito à desinfecção das cavidades, além de possuir essas características necessárias já citadas e ter atuação sobre metaloproteinases. Além disso, a Nisina também apresenta menores efeitos adversos, podendo vir a ser uma substância ainda mais aplicável na rotina clínica, o que justifica a relevância deste trabalho.

## 2.2 Nisina

A Nisina é uma bacteriocina naturalmente produzida em vários alimentos fermentados devido a presença de bactérias lácteas, como *Lactococcus lactis*, e possui capacidade de inibir ou retardar o crescimento de outras bactérias. Consumida na dieta humana há anos, o FDA (Food and Drug Administration) concedeu-a o título de GRAS ("Generally Recognized As Safe"), em 1988, devido a sua baixa toxicidade e alta eficiência na conservação de alimentos. Após diversos testes toxicológicos e de resistência cruzada, foi considerada um aditivo seguro para o consumo humano, devido a sua digestão através da enzima  $\alpha$ - quimotripsina (Cleveland et al., 2001), apesar de não haver consenso em relação a quantidade de ingestão diária aceitável. Enquanto Cleveland e colaboradores sugerem 2,9mg/dia por pessoa, Moreno et al. defendem em torno de 58mg/dia/pessoa (Cleveland et al., 2001; Moreno et al., 1999).

A solubilidade, a estabilidade e a atividade biológica da Nisina são diretamente dependentes das alterações de pH, temperatura e substrato, porém se demonstra estável em tratamentos térmicos, de alta pressão e exposição a ambientes ácidos, enquanto a presença de fosfato e concentração de proteínas no solvente interfere na solubilidade da molécula (Bower et al., 2002; Brandao, 2001).

Peptídeo amplamente utilizado na indústria alimentícia, vários estudos tem demonstrado características extremamente interessantes que justificam sua aplicação na odontologia. Dentre elas, está a capacidade inibitória em relação a diversas bactérias, como *Lactococcus lactis*, *Listeria spp*, *Micobacterium spp* e *Streptococcus mutans*, este último comumente encontrado em cavidades cariadas, além de se demonstrar inodora, insípida e inofensiva para os tecidos bucais (Buchaman et al., 1988).

O mecanismo de ação desta bacteriocina está relacionado à capacidade de aumentar a permeabilidade das membranas citoplasmáticas, além de inibir biossíntese de DNA, RNA, proteínas e polissacarídeos que culminam com a morte celular (Cleveland et al., 2001). Especificamente em relação às bactérias gram-positivas, a Nisina demonstra uma ação inibitória realizada em duas etapas (Moreno et al., 1999). Durante a primeira etapa, ocorre um processo reversível de adsorção não específica sobre a parede celular. Já na segunda etapa, a Nisina modifica sua sensibilidade em relação às proteases e passa a ser atraída pelos fosfolípidos e lisossomos da membrana da célula-alvo, produzindo poros de 0,2 até 1,0nm de

diâmetro, além de causar despolarização da membrana, permitindo um efluxo de íons essenciais, como K, aminoácidos e ATP, desorganizando a célula e culminando com sua lise celular. Além disso, a Nisina possui capacidade bacteriostática em relação aos esporos das bactérias gram-positivas. A partir da ligação dos grupos Dha e Dhb com grupos sulfidril vitais localizados nas membranas de esporos recém-germinados, inibindo a formação de novos esporos (Moreno et al., 1999). Já em bactérias gramnegativas, a efetividade da Nisina foi comprovada quando associada à ácido láctico (Cleveland et al., 2001).

Em 2008, Le Lay e colaboradores, optaram por avaliar especificamente a eficácia da Nisina em relação à *Candida albicans*. Tendo isso em mente, cultivaram o fungo na presença do peptídeo, em diferentes concentrações (1000, 500 e 100 µg ml<sup>-1</sup>). Os pesquisadores observaram através de microscopia óptica a transição da levedura da forma de blastóporo para a forma hifal, além de análises de microscopia eletrônica de varredura de transmissão. Os resultados obtidos demonstram que a Nisina foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* em concentrações a partir de 500 µg ml<sup>-1</sup>, em uma relação intimamente dependente do tempo e da dose aplicados. Além disso, a Nisina também foi capaz de inibir significativamente a transformação de *C. albicans* de blastóporo para a forma hifal. Portanto, determinaram que a Nisina possui também potencial antifúngico.

Em 2011, Pepperney e Chikindas realizaram um estudo onde avaliaram o potencial de peptídeos antibacterianos em relação à prevenção de cárie e sugeriram candidatos a estudos posteriores e mais aprofundados, além de discutir considerações práticas para o seu desenvolvimento em tratamentos envolvendo a cavidade bucal. A Nisina demonstrou potencial antibacteriano e relevância para novas pesquisas. Concluíram que, se os tratamentos com peptídeos antibacterianos forem realizados concomitantemente à higiene oral satisfatória e cuidados profissionais frequentes, observa-se resultados satisfatórios tanto no tratamento quanto na prevenção da cárie dentária.

Heunis e colaboradores, em 2013, optaram por avaliar a capacidade da Nisina em relação às infecções cutâneas causadas por *Staphylococcus aureus*. Para isso, os pesquisadores desenvolveram um curativo antimicrobiano feito a partir de nanofibras de Nisina, gerado por eletrospinning (Nisaplin) em uma mistura de poli(óxido de etileno) e poli(D, L-lactídeo) (50:50). Estes curativos reduziram significativamente *S. aureus* *in vivo* e números de células viáveis em um modelo de infecção cutânea excisional,

assim como foram capazes de estimular o fechamento de feridas excisionais, sem nenhuma observação de feito adverso. Em suma, o resultado que os pesquisadores obtiveram demonstrou que o curativo de nanofibra contendo Nisina para feridas têm o potencial de tratar infecções de pele por *S. aureus* e potencialmente acelerar a cicatrização de feridas excisionais. Em 2014, Tong e colaboradores realizaram um estudo comparativo das propriedades antibacterianas do fluoreto de sódio e da clorexidina, com a Nisina. Em relação ao fluoreto, ambas as drogas apresentaram efeito sinérgico sobre o patógeno cariogênico *Streptococcus mutans*. Já comparada à clorexidina, ambas demonstraram ampla gama de atividade antibacteriana sobre bactérias gram-positivas e capacidades de alteração das membranas celulares das bactérias em questão relativamente semelhantes. Porém, em relação aos efeitos adversos, a Nisina se mostrou superior. O uso recorrente de clorexidina pode causar manchamento de língua e dentes e hiperssensibilidade dentária, enquanto a Nisina não demonstrou potencial para ambos os efeitos, devido as suas características inodora, insípida e baixa toxicidade aos tecidos bucais.

Em 2015, Shin e colaboradores realizaram uma pesquisa onde buscavam avaliar os reais efeitos da aplicação da Nisina em diferentes bactérias presentes na cavidade oral humana, além de analisar seu potencial de toxicidade. Para isso, inocularam esse peptídeo com saliva humana e mantiveram sob incubação por 22 horas à 37° C. Como resultado, puderam observar que a Nisina foi capaz de inibir o crescimento bacteriano oral, além de diminuir a proliferação de múltiplas espécies presentes no biofilme, reduzindo sua massa e espessura.

Nos últimos anos, as bacteriocinas vem sendo alvo de grande interesse científico, inclusive com o registro de novas patentes (Siragusa et al., 1999). Sabe-se que as potencialidades da Nisina são interessantes tanto em relação à inibição e controle de crescimento de microorganismos, quanto na inibição de MMPs que degradam as fibrilas colágenas presentes na interface adesiva. Além disso, a utilização da Nisina pretende minimizar os efeitos adversos presentes em outras soluções desinfectantes atualmente utilizadas. Portanto, sua aplicação na odontologia tende a se demonstrar promissora no que diz respeito à eliminação de bactérias potencialmente nocivas aos tratamentos restauradores e diminuição da degradação de colágeno presente na interface adesiva, ampliando sua longevidade e eficiência, diminuindo, assim, a necessidade de trocas de restaurações por cáries recidivas ou degradação da camada híbrida.

### **3 PROPOSIÇÃO**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliação da desinfecção cavitária causada pela aplicação de soluções contendo diferentes concentrações de Nisina pura previamente à aplicação do sistema adesivo e após a utilização do condicionamento ácido.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Analisar as alterações na resistência de união causadas pela aplicação das soluções de Nisina pura em diferentes concentrações em espécimes envelhecidos e não envelhecidos por meio de teste de microtração.
- b) Avaliar a capacidade antibacteriana das soluções de Nisina frente ao *Streptococcus mutans* por meio da formação de halo de inibição no teste de difusão em Ágar.
- c) Avaliar a penetrabilidade das diferentes soluções contendo Nisina no tecido dentinário.
- d) Avaliar a atividade gelatinolítica através da zimografia *in situ* para observar a ação da Nisina em relação a inibição das metaloproteinases.

#### **3.3 Hipóteses nulas**

As hipóteses nulas testadas foram:

H01 - A solução de Nisina em diferentes concentrações aplicada previamente ao sistema adesivo não interfere na resistência de união longitudinalmente

H02 – A solução de Nisina em diferentes concentrações não possui ação antimicrobiana frente ao *Streptococcus mutans*

H03 – As diferentes concentrações de Nisina não interferem na penetrabilidade no substrato dentinário.

H04 – A solução de Nisina em diferentes concentrações não interfere na ação das metaloproteinases da camada híbrida

#### 4 CÁLCULO AMOSTRAL

Os dados foram obtidos através de estudo bibliográfico da literatura disponível atualmente. Foi utilizado o programa G\*Power 3.1 (DriverPack solution) disponível na internet, para fazer o cálculo amostral onde foram obtidos os efeitos de F de 1,25;  $\alpha$  de 0,05 e o  $\beta$  de 0,8 e o número de grupos 2. O valor crítico de F foi de 5,98 e o total do número de exemplares foi de 9 e o poder de 0,84. Dessa forma como o número total de exemplares foi de 10 pelo cálculo (ampliando um espécime por grupo considerando possível perda), se justifica o número de exemplares que será utilizado por subgrupo no presente estudo ( $n=10$ ), considerando a primeira divisão em dois grandes grupos e divisões posteriores em subgrupos contendo 10 elementos.

## **5 MATERIAL E MÉTODO**

### **5.1 Comitê de ética**

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de ética e Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP, através da Plataforma Brasil do Ministério da Saúde, CAAE: 58831821.6.0000.0077 conforme Anexo A, B e C.

### **5.2 Delineamento experimental**

#### **5.2.1 Unidades experimentais**

Espécimes de dentina obtidos de molares humanos hígidos e recém extraídos.

#### **5.2.2 Fatores de estudo**

Solução de Nisina em 4 diferentes concentrações + controle Single Bond e controle Positivo (Clorexidina – Riohex Gard 0,12%, Rioquímica):

- Controle (Single Bond 2 – sem aplicação da solução contendo Nisina - SB)
- Controle Positivo (Digluconato de Clorexidina 0,12% - CP)
- Nisina 0,5% - N05
- Nisina 1,0% - N1
- Nisina 1,5% - N1,5

### **5.3 Variável de resposta**

- a) Resistência de união através da microtração (Mpa)
- b) Atividade antibacteriana através de halo de inibição

- c) Penetrabilidade da solução através da contagem de pixels vermelhos utilizando o programa ImageJ
- d) Atividade gelatinolítica através da contagem de pixels verdes analisadas no programa imageJ em obtidas na zimografia in situ

#### 5.4 Materiais utilizados

Quadro 1 - Materiais utilizados, marca comercial, fabricante e composição

Material	Marca Comercial	Fabricante	Composição
Ácido fosfórico	Etch-37%	Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA	Ácido fosfórico 37%
Sistema Adesivo	Single Bond 2	3M ESPE, St. Paul, MN, EUA	Bis-GMA, HEMA, dimetacrilato, água, etanol, fotoiniciador, nanopartículas de sílica, copolímero funcional de metacrilato de ácidos poliacrílico e polialcenóico
Resina Composta	Filtek-Z 350XT	3M ESPE, St. Paul, MN, USA	Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, Bis-EMA, zircônia/ partículas de sílica.
Nisina pura	Pure Nisin	Handary, Belgium	Nisina pura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 5.5 Seleção das amostras

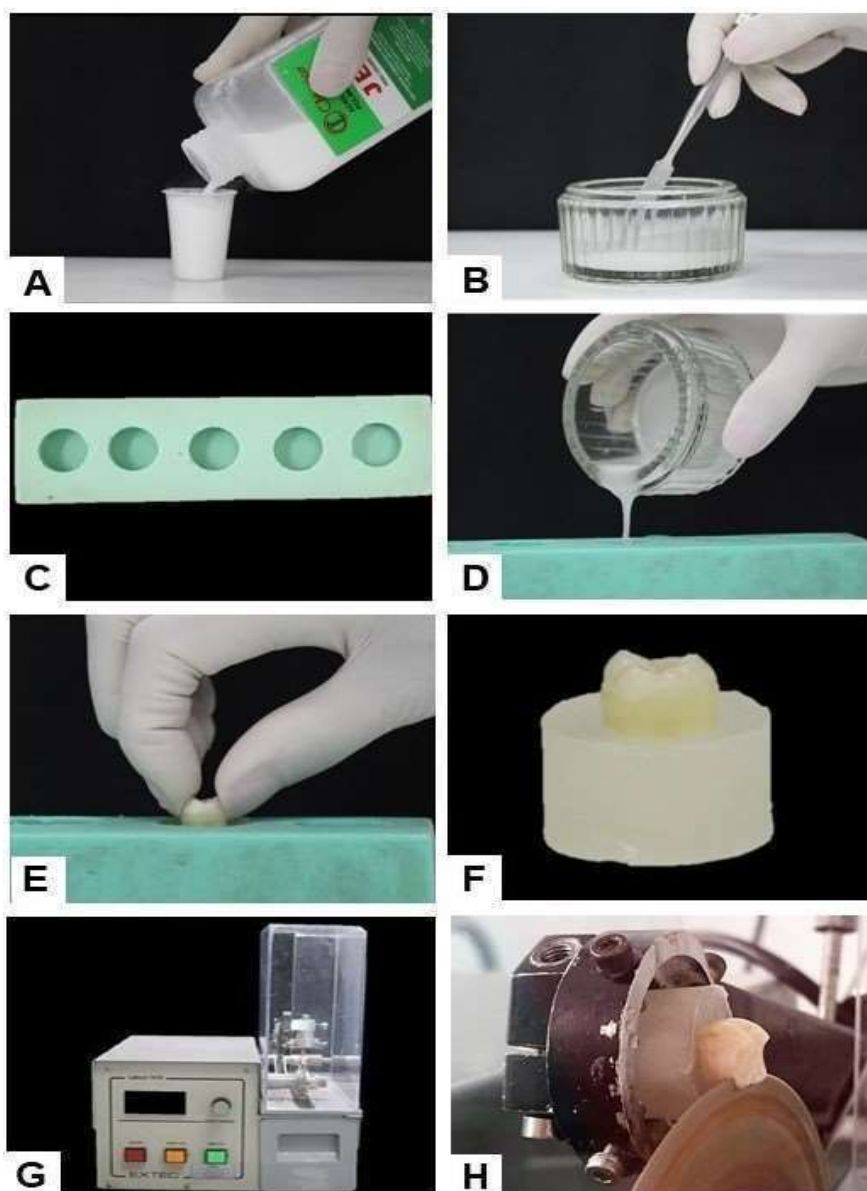
Os espécimes foram obtidos de 100 molares humanos extraídos e doados por consentimento livre e esclarecido dos pacientes, para teste de microtração, divididos em dois grandes grupos (I e C) contendo 50 espécimes cada, e subdivididos (SB, CP, N05, N1 e N1,5) com 10 espécimes por grupo. Além disso, espécimes adicionais foram

obtidos para análise de teste de penetrabilidade (12 dentes divididos em 4 grupos, sendo eles CP, N05, N1 e N1,5, cada grupo contendo 3 espécimes) e zimografia in situ (15 dentes divididos em 5 grupos SB, CP, N05, N1 e N1,5, cada grupo contendo 3 espécimes). Os dentes precisavam estar hígidos e livres de alterações em esmalte e dentina e foram armazenados em água destilada a 4° C até o momento do uso.

### **5.5.1 Preparo das amostras**

Os dentes foram armazenados em água destilada à temperatura de 4°C até o momento da sua utilização, e então fixados a uma base de resina acrílica com seu longo eixo paralelo à superfície através de cera pegajosa. Então, para a remoção do esmalte oclusal e consequente exposição do tecido dentinário, com o auxílio de uma cortadeira de precisão sob constante refrigeração (Labcut, Extec, Enfield, CT, EUA) os espécimes foram seccionados à aproximadamente 4 milímetros acima da junção amelo-cementária.

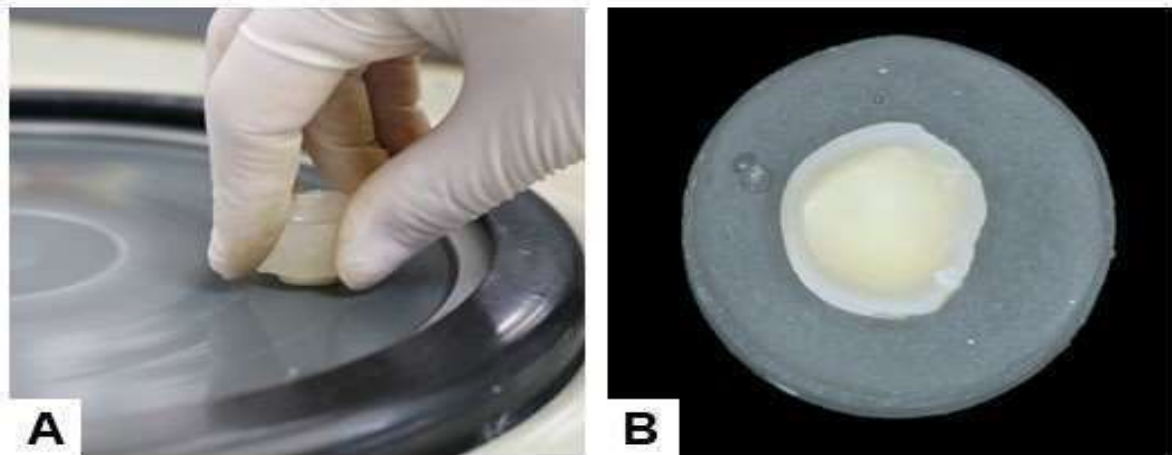
Figura 2 – Preparo das amostras



Legenda: a) resina acrílica autopolimerizável; b) representação do preparo da resina acrílica autopolimerizável; c) molde de silicone; d) representação do preenchimento do molde com a resina acrílica; e) fixação do dente na resina acrílica; f) dente fixado na resina acrílica com a coroa exposta e a superfície oclusal paralela à base da resina acrílica; g) máquina de cortes seriados; h) representação do corte paralelo aproximadamente 4 mm acima da junção amelo-cementária para expor a dentina. Fonte: Elaborada pelo autor.

A dentina exposta foi polida em uma politriz (Pantec Polipan 2, Panambra, São Paulo, SP, BR) com lixa d'água de granulação P600 (Fepa-P, Panambra, São Paulo, SP, Brasil) e o tecido pulpar removido cuidadosamente com curetas, evitando possíveis danos à superfície da pré-dentina. Portanto, espécimes contendo espessura mínima de 2 milímetros foram obtidos e divididos em grupos de acordo com as suas variações.

Figura 3 - Finalização do preparo das amostras



Legenda: a) espécime em contato com a superfície da lixa; b) espécime pronto.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.6 Divisão dos grupos experimentais

Para a realização dos procedimentos restauradores, os dentes foram inicialmente divididos em dois grandes grupos, sendo eles:

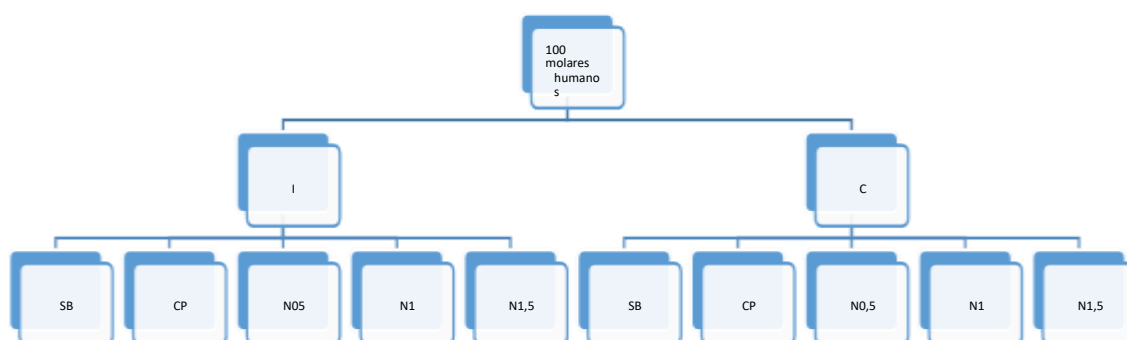
- **I:** Corte imediato
- **C:** Ciclagem termomecânica

Então, estes grupos foram subdivididos de acordo com a concentração da solução a ser aplicada:

- **SB** – Sem aplicação da solução contendo Nisina (somente protocolo restaurador padrão utilizando adesivo Single Bond Convencional).
- **CP** – Sem aplicação da solução contendo Nisina e com aplicação de Digluconato de Clorexidina 0,12%
- **N05** - aplicação de solução de Nisina 0,5%
- **N1** - aplicação de solução de Nisina 1%
- **N1,5** - aplicação de solução de Nisina 1,5%

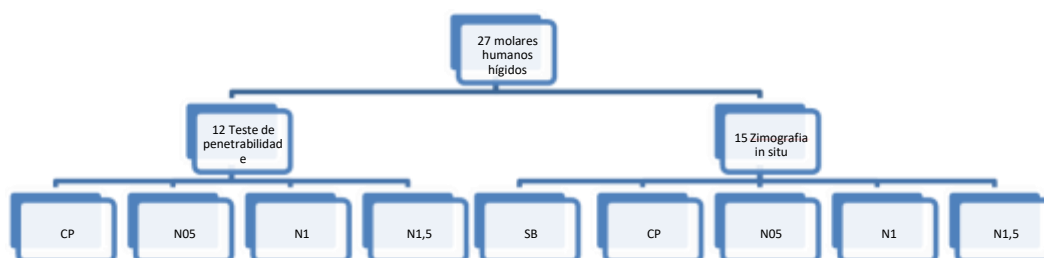
As concentrações utilizadas foram definidas com base em estudos prévios presentes na literatura. Durante a execução do projeto piloto, foram utilizadas concentrações de 1%, 3% e 5%, assim como o protocolo estipulado por Su et al., em 2018, foi observada relevante ação antimicrobiana porém com diminuição da adesividade. Durante os testes iniciais, foi observada diminuição significativa da resistência de união e aumento do desvio padrão em elevadas concentrações, justificando a eliminação dos grupos 3% e 5% e sua substituição pelos grupos 0,5% e 1,5%. Além disso, espécimes adicionais foram obtidos para a realização dos testes de penetrabilidade e zimografia in situ.

Figura 4 – Divisão dos grupos – Teste de microtração



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 5- Divisão dos grupos - Teste de penetrabilidade e Zimografia in situ



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.7 Confeção das soluções

A Nisina pura ( $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ ) (Handary, Belgium) é um peptído antibacteriano amplamente utilizado na indústria alimentícia e, atualmente, encontramos sua comercialização em um pó que se demonstra solúvel em etanol ou água, portanto, foi dissolvida em diferentes concentrações (0,5%, 1% e 1,5% - peso) em água. As partículas de Nisina pura (Handary, Belgium) foram minuciosamente pesadas com o auxílio de uma balança de precisão (Mettler, Toledo, Suíça). Estas, então, foram misturadas à água destilada, sempre apoiadas em vibrador (Maxi Mix II VortexMixer, Thermo Fisher Scientific, Langensfeld, Alemanha) para garantir a incorporação completa da substância. Após o preparo, as soluções foram armazenadas em frascos à temperatura ambiente. No momento do uso, as partículas foram levadas para agitação novamente.

Figura 6 - Desenvolvimento das soluções



Legenda: a) balança analítica de precisão; b) representação da pesagem das partículas em vidro âmbar; c) representação dos componentes no frasco no vibrador; d) representação do frasco em agitador.

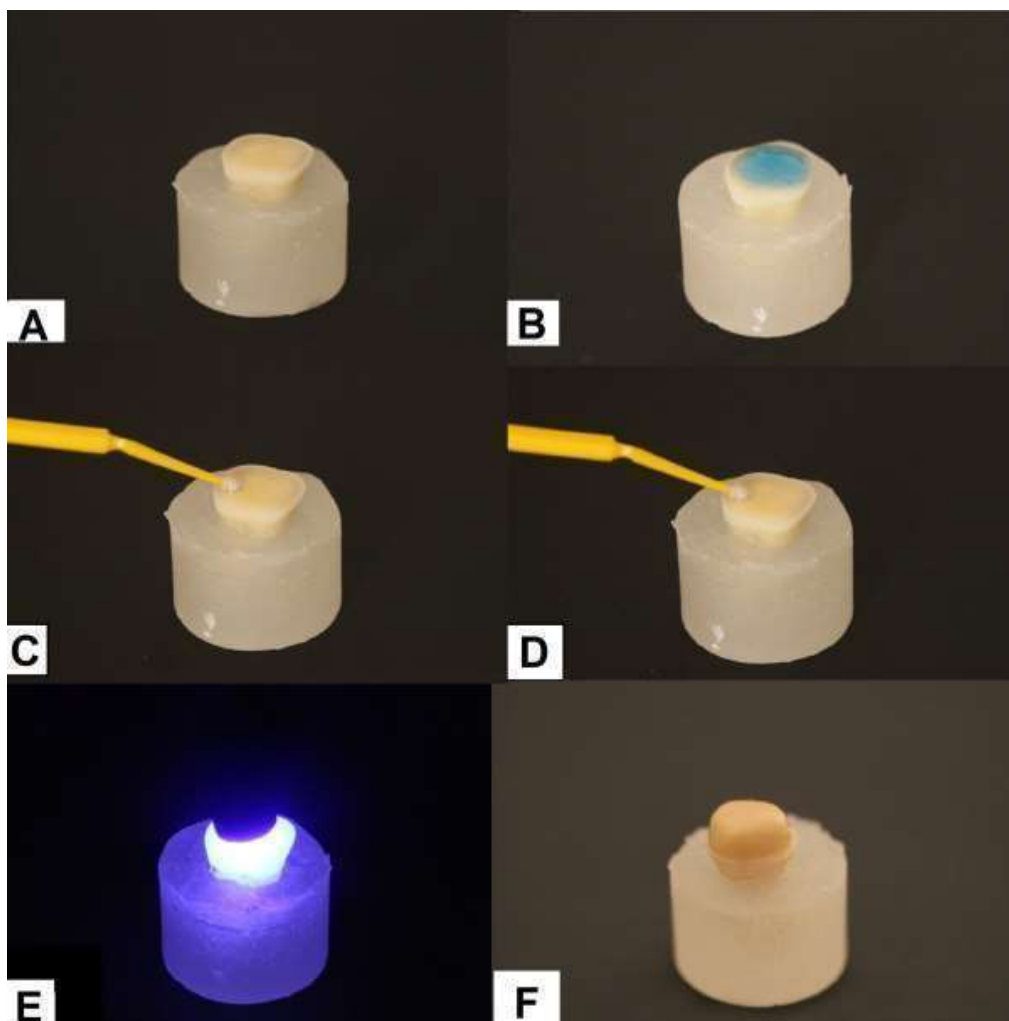
Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.8 Aplicação de solução e técnica restauradora

Em todos os dentes, a dentina foi condicionada com gel de ácido fosfórico com concentração de 37%. Em seguida, lavada por 15 segundos e o excesso de água removido com papel absorvente. A aplicação da solução contendo diferentes concentrações de Nisina foi realizada de acordo com o respectivo grupo, de maneira ativa e durante 30 segundos, seguido de remoção do excesso com papel absorvente, com exceção dos grupos SB em que a aplicação do adesivo foi imediatamente após o condicionamento ácido e no grupo CP em que foi aplicada a solução de clorexidina após o condicionamento ácido por 30 segundos, sem aplicação da solução contendo Nisina.

Então, foi realizada a aplicação do sistema adesivo Single Bond Convencional em todos os grupos ativamente por 20 segundos, seguido de secagem com jato de ar leve por 5 segundos e fotopolimerização com aparelho fotopolimerizador de LED com comprimento de onda entre 440nm e 480nm e densidade de potência de 1200 mW/cm<sup>2</sup> (Radium-cal, SDI, Victoria, Austrália), emitindo luz azul, por 10 segundos. Após a aplicação do sistema adesivo, foram adicionados 3 incrementos de 1,5 mm de espessura de resina composta Filtek Z250, fotoativados por 20 segundos à uma distância padronizada, utilizando mesmo aparelho fotopolimerizador.

Figura 7 - Aplicação da solução e técnica restauradora



Legenda: a) espécime previamente polido; b) condicionamento ácido (lavagem e secagem); c) aplicação da solução contendo Nisina pura (evaporação da água destilada com jato de ar); d) aplicação do sistema adesivo (evaporação do solvente com jato de ar); e) fotopolimerização; f) restauração finalizada utilizando técnica incremental e resina composta Z350 Filtek.  
 Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.9 Envelhecimento

Os espécimes pertencentes ao grupo Corte Imediato, não sofreram envelhecimento. Já em relação aos espécimes do subgrupo Ciclagem Termomecânica, foi necessário submetê-los à desgaste termomecânico visando mimetizar o envelhecimento da resina na cavidade oral. Portanto, os espécimes deste grupo foram submetidos a desgaste termomecânico utilizando a máquina de ciclagem Termomecânica ER37000 (Erios). As amostras foram submetidas a 120.000 ciclos

mecânicos e 5.000 ciclos térmicos com banhos em água por 30 segundos para cada temperatura ( $5 \pm 2$  C,  $37 \pm 2$  C e  $55 \pm 2$  C). Estes valores foram definidos com base em testes preconizados na literatura e são equivalentes a 6 meses clínicos.

Figura 8 - Máquina de desgaste termomecânico ER 37000



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9- Espécime acoplado no dispositivo da máquina de ensaios termomecânicos



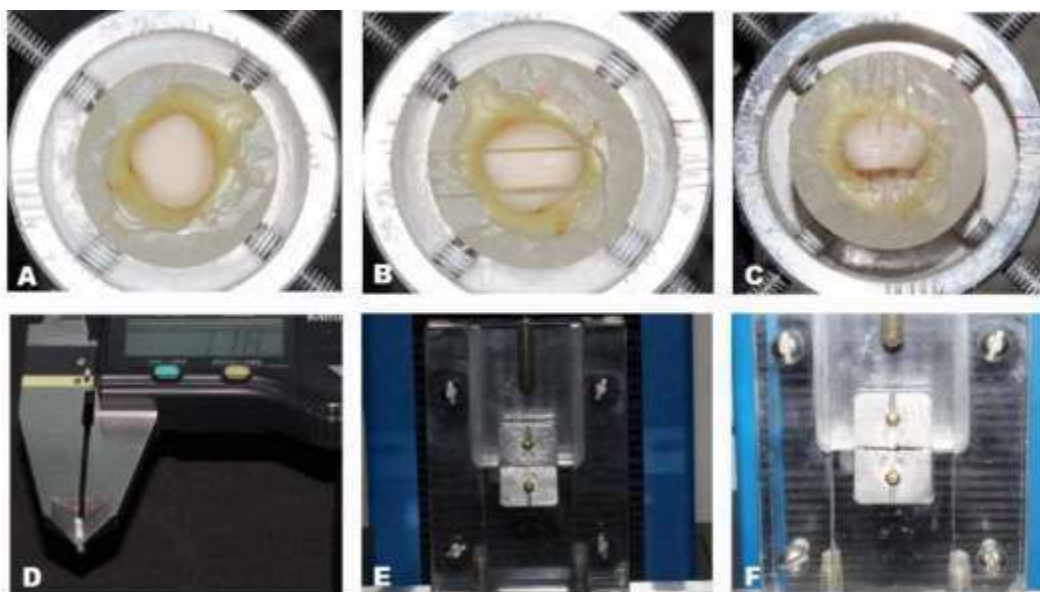
Legenda: espécime posicionado no centro do suporte, onde recebe carga mecânica e fluxo de água sobre a superfície da restauração, mimetizando o envelhecimento bucal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.10 Teste de resistência a microtração

Para avaliar a resistência de união às tensões de microtração, foi utilizada uma máquina de ensaio universal EMIC DL2000 com célula de carga de 10 kg. Esta máquina possui um terminal de computador acoplado, preparado para a leitura dos dados transmitidos pelo ensaio mecânico, através de seu programa. Os corpos-de-prova foram fixados e seccionados com auxílio de cortadora de precisão Labcut sob irrigação com água, em prismas de seção quadrangular, denominados “palitos”, com dimensões de aproximadamente 1 mm x 1 mm. Esses palitos foram fixados individualmente no dispositivo de microtração metálico para realização do teste de microtração na máquina de ensaio, a uma velocidade de 0,5 mm/min.

Figura 10 - Teste de microtração



Legenda: a) amostra fixada sobre resina acrílica; b) corte longitudinal da amostra; c) corte transversal da amostra; d) paquímetro medindo palito; e) palito colado no dispositivo de metal na máquina de testes universais; f) palito fraturado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A resistência de união foi calculada em MPa através da seguinte fórmula:

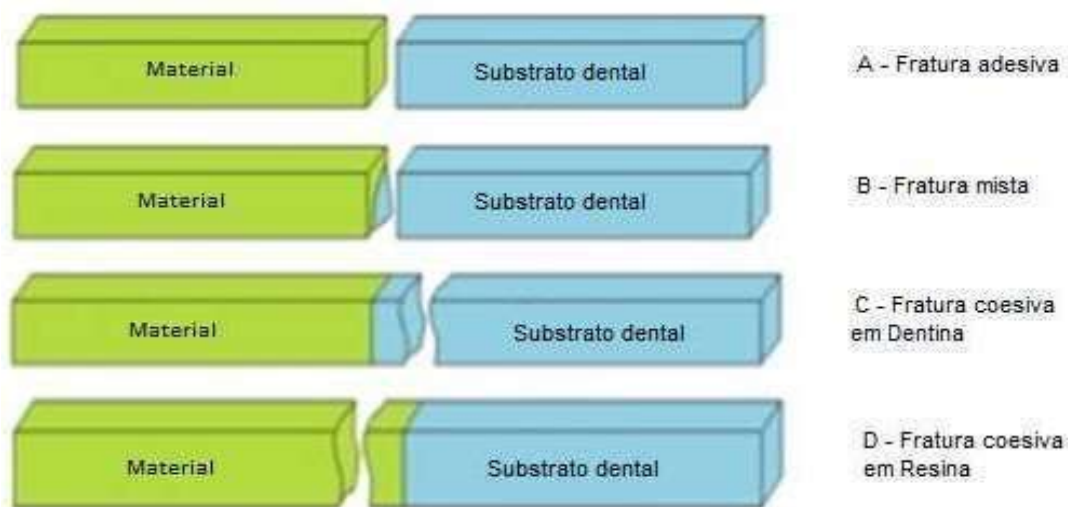
$$\delta = F/A$$

Onde,  $\delta$  é a força de união a microtração, F é a força aplicada e A é a área de união entre resina – adesivo – dentina.

No momento da fratura, o teste é interrompido automaticamente e os fragmentos obtidos, definidos através de visualização microscópica, como:

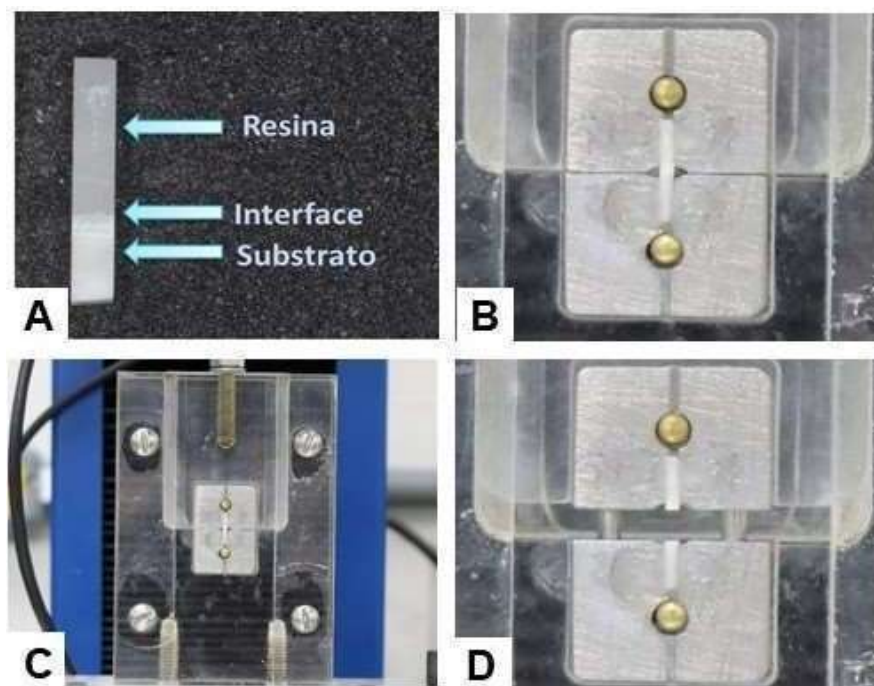
- fratura coesiva da resina: a falha ocorreu predominantemente dentro da resina composta, cerca de 75%;
- fratura de dentina coesiva: uma falha ocorreu predominantemente no interior da estruturadental, cerca de 75%;
- fratura adesiva: a falha ocorreu na interface adesivo-estrutura dentária ou entre o adesivo e a resina composta, em mais de 75% da área analisada;
- fratura mista: não houve predominância maior que 75% de qualquer tipo de falha da fratura.

Figura 11 - Tipos de fratura



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12 - Fratura dos palitos



Legenda: a) palito pronto; b) palito fixado no dispositivo de microtração metálico; c) máquina EMIC com a carga de célula; d) palito fraturado após o teste de microtração.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

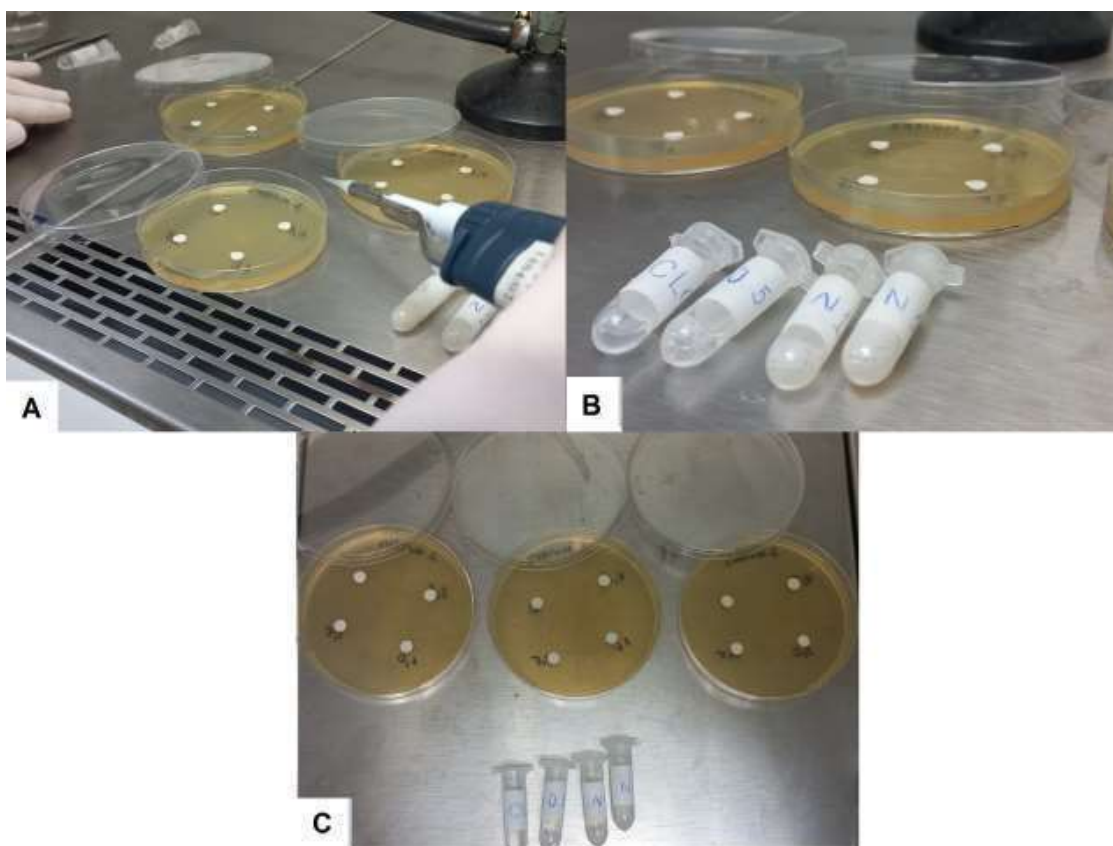
### 5.11 Atividade antibacteriana

O teste para avaliar atividade antibacteriana foi realizado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (P & D), da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), em São José dos Campos, sob supervisão da bióloga Priscila Maria Sarmento Correa Marciano Leite. Utilizando amostras de *Streptococcus mutans* (ATCC 700610) cultivados aerobicamente em caldo Brain Heart Infusion (BHI; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) recolhidas através de centrifugação e lavadas com solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS) 3 vezes seguidas, foi avaliada a atividade bacteriana das soluções com diferentes concentrações de Nisina, com adição de soluções aplicadas sobre placas de agar, para observar a formação de halo de inibição. Após a lavagem, as bactérias foram suspensas em BHI e diluídas em uma concentração de  $1,0 \times 10^7$  unidades formadoras de colônia (UFC/ML).

### 5.11.1 Teste de difusão em ágar

As suspensões bacterianas ( $1,0 \times 10^7$  UFC / mL; 100 mL) foram colocadas em placas contendo ágar BHI através de uma pipeta e foi feito o espalhamento na placa com uma alça de Drigalski. Gotas contendo as soluções à base Nisina foram injetadas numa placa de ágar inoculada com bactérias e incubadas a 37 °C durante 24 h. Depois deste período, foi observada a formação de halo de inibição e os resultados analisados de acordo com o preconizado pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards Institute, 2005), onde a formação de halo indica que o microorganismo é sensível ao agente testado e a não formação de halo indica que o microorganismo é resistente ao agente testado. O teste foi realizado em triplicata.

Figura 13 - Teste de difusão em Ágar



Legenda: a) pipetagem das soluções; b) placas distribuídas de acordo com os respectivos grupos; c) placas contendo as diferentes soluções de Nisina + clorexidina

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.12 Teste de penetrabilidade

Para teste de penetrabilidade foram utilizados 3 dentes paracada grupo. Os espécimes foram preparados de acordo com a técnica da Zimografia in situ Mazzoni et al. (2021) para a observação em Microscopia Confocal Laser (MCL). Porém, um grão de Rodamina B foi aplicado nas soluções de Nisina e de Digluconato de Clorexidina. As mesmas foram aplicadas posteriormente ao condicionamento ácido e anteriormente a aplicação do adesivo. Então, os espécimes foram preparados da mesmamaneira que a utilizada para o teste de microtração. Nenhum espécime deste grupo sofreu envelhecimento termomecânico. As fatias seccionadas foram coladas em uma lâmina de vidro e desgastadas com lixas 1200 ate 4000 (Fepa-P, Extec, Enfield, CT, USA), na politriz circular (Ecomet 3 - Buehler USA) visando obter uma espessura de 0,5 mm. Os espécimes foram avaliados por exame sob um microscópio confocal multi-fóton, ex: 488 nm e em: Ip530 nm (Zeiss, LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Secções ópticas de 10  $\mu$ m de espessura foram adquiridas a partir de diferentes planos focais, e as imagens empilhadas foram analisadas, quantificadas e processadas com o software ZEN 2010 (Carl Zeiss, Alemanha). Dessa forma foi possível observar a penetração das diferentes soluções de Nisina e de Clorexidina por meio da presença da Rodamina nos túbulos dentinários na superfície da dentina.

### 5.13 Zimografia in situ

Os espécimes também foram preparados para a observação em Microscopia Confocal Laser (MCL) utilizando a técnica da zimografia “in situ” de acordo com Mazzoni et al. (2012). Porém, foi aplicado um grão de Rodamina B no adesivo com a finalidade de identificar a interface adesiva e facilitar a observação da atividade gelatinolítica. A zimografia “in situ” foi realizada com utilização da gelatina conjugada com Fluoresceína (EnzCheck kit, Sigma Aldrich, EUA) como substrato para MMP seguindo as instruções do fabricante (E-12055, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). A solução de gelatina foi diluída 1:8 com a solução tampão de diluição (NaCl 150 mM,

CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0), e adicionou-se um agente antidesvanecedor (Meio de Montagem com DapiH-1200, Vectashield, Vector Laboratories LTD, Cambridgeshire, Reino Unido). Foi colocada uma quantidade de 50 µl da mistura fluorescente de gelatina sobre cada espécime e coberta com uma lamínula. As lâminas foram protegidas contra a luz e incubadas em câmaras umidificadas a 37°C por 3 h, 24 h e 48 h. Em suma, a hidrólise do substrato de gelatina conjugada com fluoresceína, indicativa de atividade enzimática gelatinolítica endógena. As imagens foram obtidas na microscopia confocal laser onde também foram analisadas e processadas com o software Zen 2010 (Carls Eiss, Alemanha). Para a zimografia in situ foram utilizados 3 dentes para cada grupo.

Observou-se uma intensa fluorescência na base da camada híbrida (CH) após 24 h de incubação, indicando que a gelatina conjugada com fluoresceína foi hidrolisada nesses locais pelas metaloproteinases (MMPs). As MMPs que estão presentes digerem a gelatina com fluoresceína e se tornam verdes, sendo possível assim identificar as áreas com maior e menor atividade.

#### **5.14 Análise ilustrativa por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Para avaliação em MEV foram utilizados palitos fraturados no teste de resistência à microtração, posicionados em “stubs” de alumínio, cobertos com ouro/paládio (Desk II – Denton Vacuum) e examinados em microscópio eletrônico de varredura (JMS 5310 – Jeol) onde foi possível realizar a análise do padrão de fratura.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Resistência de união

Para efeito de análise estatística, foi realizada uma média calculada com os espécimes (palitos) testados para cada dente humano preparado. As médias em MPa foram submetidas à análise estatística por meio dos programas computacionais: MINITAB (Minitab, version 14.12, 2004) e STATISTIX (Analytical Software, version 8.0, 2007). Os dados de resistência de união (MPa) foram analisados estatisticamente, sendo avaliados quanto à sua normalidade. Como estes apresentaram distribuição normal, realizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) paramétrica dois fatores e o teste de Tukey, sendo adotado o nível de significância de 5% para a tomada de decisões. Dessa forma observaram-se diferenças estatisticamente significantes para o fator Ciclagem Termomecânica, considerando um nível de significância de 5% (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise de variância (ANOVA) - Resistência de união

<b>Fatores</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Grupos</b>	48,27	1	48,27	5,964	0,0016
<b>Interação</b>	144,23	4	36,06	4,455	0,0024
<b>Ciclagem</b>	154,98	4	38,75	4,787	0,0015

Legenda: (SQ): soma dos quadrados (GL): grau de liberdade; (QM): quadrado médio; (F): razão; (P): valor. \*p < 0,05

Fonte: Elaborada pelo autor.

Aplicou-se o teste de Tukey (5%) com a finalidade de observar as diferenças significativas entre os fatores avaliados. Inicialmente, avaliamos as diferenças entre os dois grupos I e C buscando identificar as consequências do envelhecimento frente a resistência de união.

Os resultados se encontram na tabela abaixo.

Tabela 2 – Teste de Tukey – Resistência de união

<b>Grupos</b>	<b>Valores de MPa±Dp</b>
<b>I</b>	26,04±2,11 <sup>A</sup>
<b>C</b>	25,24±1,08 <sup>B</sup>

Legenda: Análise descritiva para os diferentes grupos em ordem decrescente quanto à resistência de união(MPa).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Tabela 3 encontram-se os valores de média e desvio padrão referentes a variação dos subgrupos de acordo com as diferentes concentrações de Nisina aplicadas.

Tabela 3 - Análise descritiva quanto a resistência de união para os diferentes subgrupos de acordo com a concentração de Nisina (Mpa)

<b>Grupos</b>	<b>Valores de Mpa</b>
<b>SB</b>	26,69±3,56 <sup>AB</sup>
<b>CP</b>	25,09±3,43 <sup>A</sup>
<b>N05</b>	26,95±3,12 <sup>B</sup>
<b>N1</b>	25,54±2,24 <sup>a</sup>
<b>N1,5</b>	24,44±1,49 <sup>AB</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 – Análise descritiva quanto a resistência de união para os diferentes subgrupos pertencentes ao grupo I de acordo com a concentração de Nisina (Mpa)

<b>Grupos</b>	<b>Valores de Mpa</b>
<b>SB</b>	29,41±2,16 <sup>B</sup>
<b>CP</b>	25,06±1,81 <sup>AB</sup>
<b>N05</b>	29,06±3,26 <sup>B</sup>
<b>N1</b>	25,53±3,14 <sup>AB</sup>
<b>N1,5</b>	23,58±3,29 <sup>A</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 5 - Análise descritiva quanto a resistência de união para os diferentes subgrupos pertencentes ao grupo C de acordo com a concentração de Nisina (Mpa)

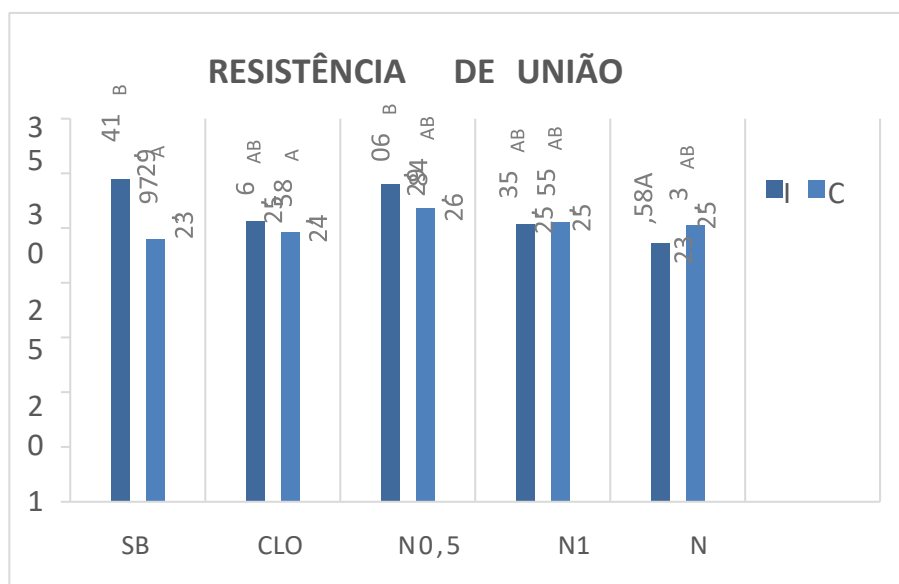
<b>Grupos</b>	<b>Valores de Mpa</b>
<b>SB</b>	23,97±3,56 <sup>A</sup>
<b>CP</b>	24,58±3,43 <sup>A</sup>
<b>N05</b>	26,84±3,12 <sup>AB</sup>
<b>N1</b>	25,57±2,24 <sup>AB</sup>
<b>N1,5</b>	25,30±1,49 <sup>AB</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com os resultados obtidos, a maior média foi observada no grupo I, com os subgrupos  $N1,5 \geq CP = N1 \geq SB = N05$ , havendo diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos. Em relação ao grupo C, os resultados obtidos foram  $SB = CP \geq N05 = N1 = N1,5$ . Portanto, os resultados demonstram que o fator ciclagem termomecânica causou diminuição significativa da resistência de união. Além disso, a concentração de Nisina utilizada alterou significativamente os valores de resistência, com o grupo N05 demonstrando resultados superiores que o SB na média geral, sendo  $SB = N05$  no grupo I e  $N05 \geq SB$ .

O gráfico abaixo apresenta a análise descritiva das médias de resistência de união (MPa) dos diferentes grupos de maneira interrelacionada.

Gráfico 1 - Análise comparativa da resistência de união em todos os grupos

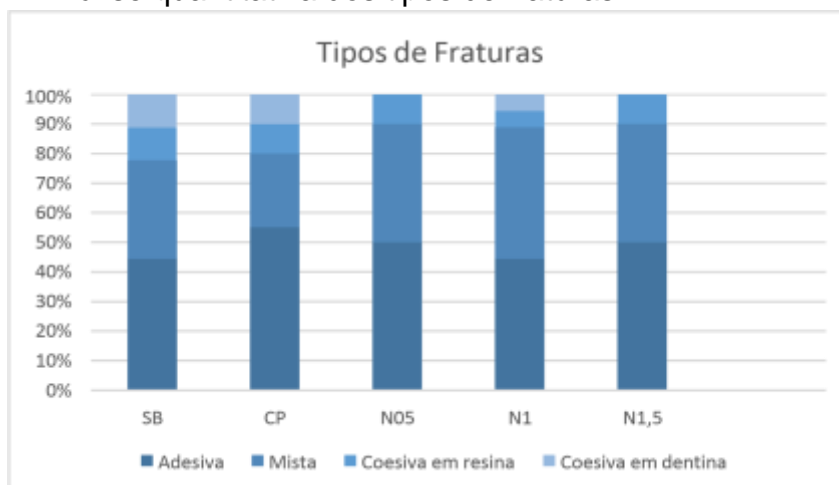


Legenda: gráfico das médias dos diferentes grupos evidenciando as diferenças obtidas entre os subgrupos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O gráfico a seguir mostra a porcentagem de tipos de fratura dos palitos após o teste de microtração para cada grupo.

Gráfico 2 - Análise quantitativa dos tipos de fraturas



Fonte: elaborada pelo autor.

Observa-se que houve predominância dos tipos de fraturas adesiva e mista, sobre os tipos coesivas. As imagens obtidas pelo estereomicroscópio óptico (Stemi 2000-C, ZEISS, Oberkochen, Alemanha) da análise do padrão de fratura dos palitos fraturados seguem abaixo.

A figura 14 mostra a imagem de um palito fraturado do grupo Controle - SingleBond em um aumento de 132x, observa-se que houve fatura do tipo mista.

Figura 14 - Imagem de estereomicroscopia de palito com fratura mista pertencente ao grupo SB



Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura abaixo mostra a imagem de um palito fraturado do grupo Nisina 1% em um aumento de 132x onde se observa uma fratura do tipo mista.

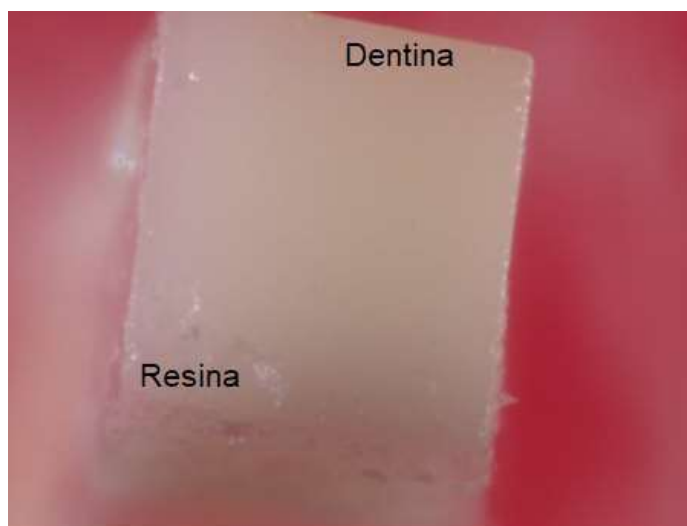
Figura 15 - Imagem de estereomicroscopia de palito com fratura mista pertencente ao grupo N1



Fonte:Elaborada pelo autor.

A figura abaixo mostra a imagem de um palito fraturado do grupo Nisina 1,5% em um aumento de 132x onde se observa uma fratura do tipo mista.

Figura 16 - Imagem de estereomicroscopia de fratura mista de palito pertencente ao grupo N1,5



Fonte: Elaborada pelo autor

## 6.2 Teste de difusão em Ágar

Após infecção da placa de Ágar com a suspensão bacteriana, posterior aplicação das soluções contendo diferentes concentrações de Nisina e incubação, pode-se observar a formação de halo independentemente do aumento da concentração, utilizando uma gota de digluconato de clorexidina para análise comparativa, como demonstrado nas imagens a seguir.

Figura 17 - Análise antibacteriana



Legenda: Formação de halos de inibição de acordo com as diferentes concentrações de Nisina (0,5%, 1% e 1,5% + digluconato de clorexidina 0,12%) - placa única.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18 - Análise antibacteriana em triplicata



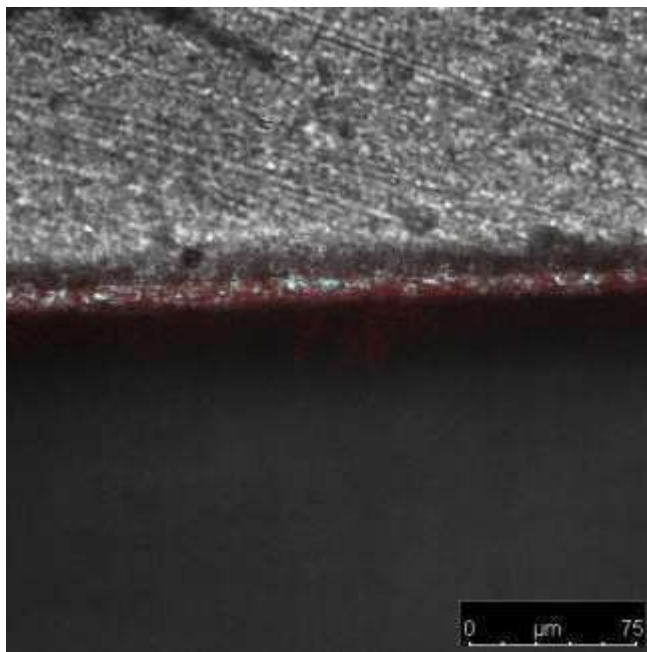
Legenda: Formação de halos de inibição de acordo com as diferentes concentrações de Nisina (0,5%, 1% e 1,5% + digluconato de clorexidina 0,12%) em triplicata.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Pode-se observar nas figuras 17 e 18 a formação de 4 halos de inibição bacteriana após incubação bacteriana por 24 horas. Foram aplicadas soluções contendo as diferentes concentrações de Nisina além de digluconato de clorexidina 0,12% para comparação. O teste foi realizado em triplicata. A formação de halo de inibição demonstra a capacidade de diminuição/inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* devido a ação da solução utilizada. Portanto, é possível observar que com a aplicação de uma solução contendo pequenas concentrações de Nisina, no caso especificamente 0,5%, já existe uma inibição do crescimento bacteriano no local. Sendo assim, pode-se observar que a concentração de Nisina não influencia diretamente na dimensão de formação do halo de inibição, comprovando que o peptídeo possui capacidade antibacteriana frente ao *Streptococcus* independente da concentração aplicada. Por outro lado, também observou-se o mesmo comportamento para o grupo Clorexidina.

### 6.3 Teste de penetrabilidade

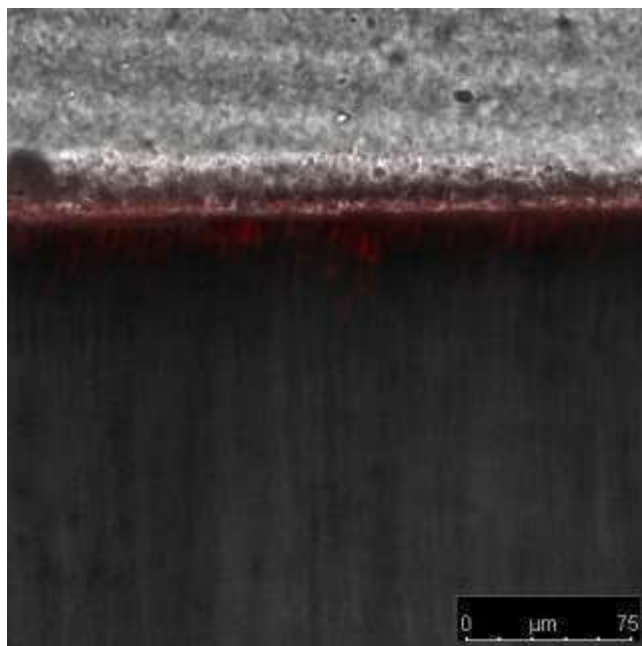
Os espécimes preparados foram analisados em microscopia confocal laser afim de garantir a penetração das moléculas de Nisina através do substrato dental, mais especificamente na dentina, através da presença da Rodamina. O teste foi realizado em triplicata. Pode-se observar que a Nisina possui capacidade de penetração no tecido, e que esta tem relação com a concentração aplicada.

Figura 19 - Imagem demonstrativa da penetrabilidade da Nisina no substrato dental através da observação da Rodamina - grupo CP



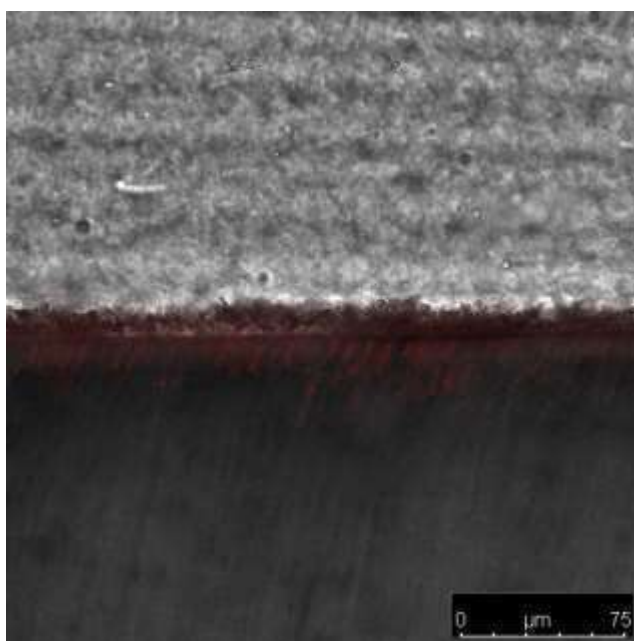
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 - Imagem demonstrativa da penetrabilidade da Nisina no substrato dental através da Rodamina - grupo N05



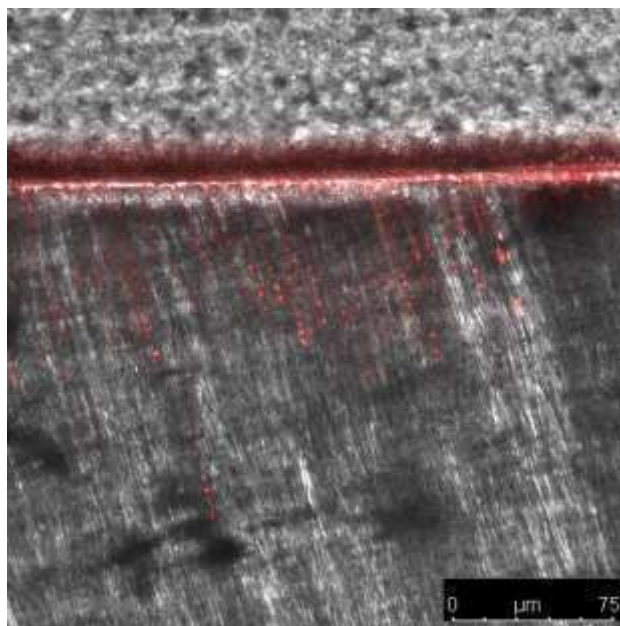
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 21 - Imagem demonstrativa da penetrabilidade da Nisina no substrato dental através da observação da Rodamina - grupo N1



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 22 - Imagem demonstrativa da penetrabilidade da Nisina no substrato dental através da observação da Rodamina - grupo N1,5



Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir destas imagens, foi utilizado o programa ImageJ para cálculo de pixels vermelhos (Nisina corada com rodamina) e realizado análise estatística obtendo-se resultados quantitativos dessa penetração. Os resultados foram submetidos a teste de variância (ANOVA), considerando nível de significância 5%. Os resultados obtidos se encontram na tabela a seguir.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) - Teste de penetrabilidade

<b>Fatores</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Grupos</b>	96807	1	24202	103,660	0,00
<b>Interação</b>	1214442	1	1214442	5201,648	0,00

Legenda: (SQ): soma dos quadrados (GL): grau de liberdade; (QM): quadrado médio; (F):razão; (P): valor. \*p < 0,05

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 7 - Análise estatística da penetração de Nisina no substrato dental - Teste de penetrabilidade (Pixels)

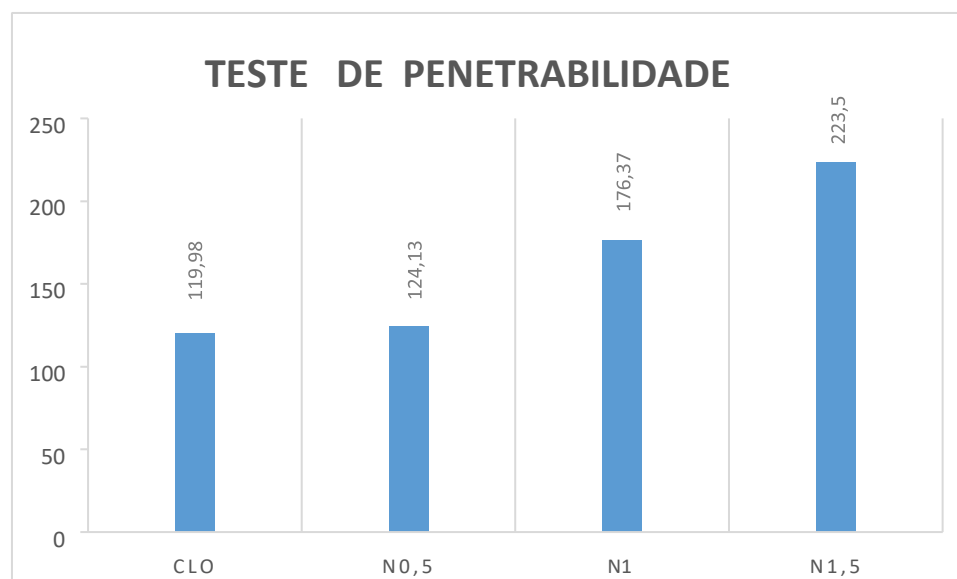
Grupos	Valores de Mpa em pixels
CP	119,98±12,7 <sup>A</sup>
N05	124,13±12,47 <sup>A</sup>
N1	176,37±7,04 <sup>B</sup>
N1,5	233,50±9,87 <sup>C</sup>

Legenda: Análise estatística dos resultados obtidos a partir da análise das imagens no programa ImageJ, onde foi calculado a penetração de Nisina no substrato dental através da contagem de pixels corados (Nisinacorada com rodamina).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pode-se observar que a concentração de Nisina utilizada está diretamente relacionada à capacidade de penetração no substrato dentinário, a medida que os resultados obtidos aumentam respectivamente nos grupos. Além disso, no grupo CP os resultados não demonstraram diferença estatística em relação ao grupo N05. Os dados obtidos encontram-se no gráfico a seguir.

Gráfico 3 – Teste de penetrabilidade



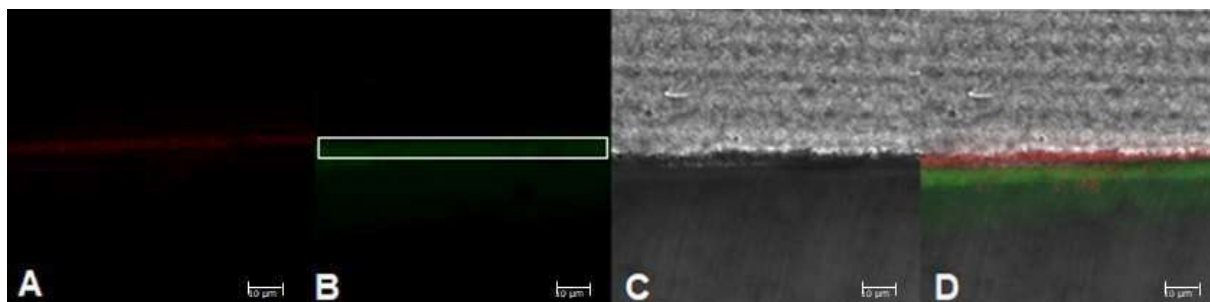
Legenda: Resultados obtidos através da análise quantitativa da presença de rodamina na interface adesiva por meio de microscopia confocal laser.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 6.4 Zimografia in situ

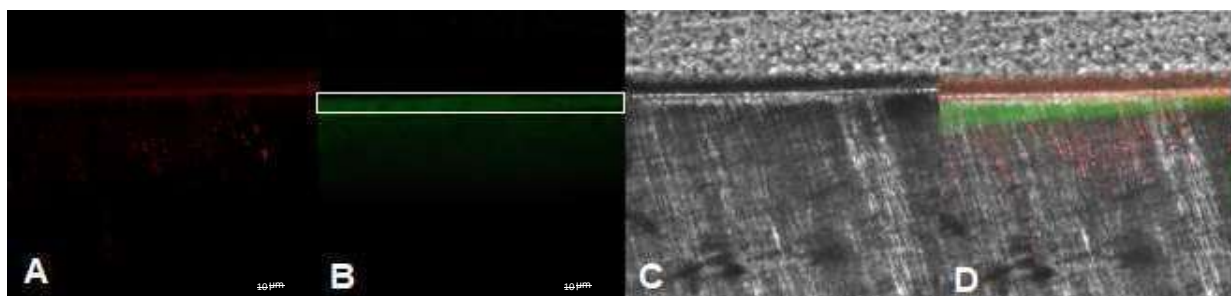
Para análise da zimografia in situ, foi escolhida uma área específica com limite superior na base da camada híbrida, onde tem-se a representação do adesivo com a rodamina em vermelho e altura 5  $\mu$ metros abaixo da camada híbrida. Essa marcação foi realizada em todos os espécimes (marcação em branco). O teste foi realizado em triplicata. Foi avaliada a atividade gelatinolítica através da zimografia in situ, onde pixels verdes representam as metaloproteinases coradas após a hidrólise da gelatina conjugada presente na interface. As imagens obtidas a partir da zimografia in situ realizada com microscopia confocal laser, aumento de 63x em imersão à óleo estão dispostas a seguir.

Figura 23 - Zimografia in situ - grupo SB



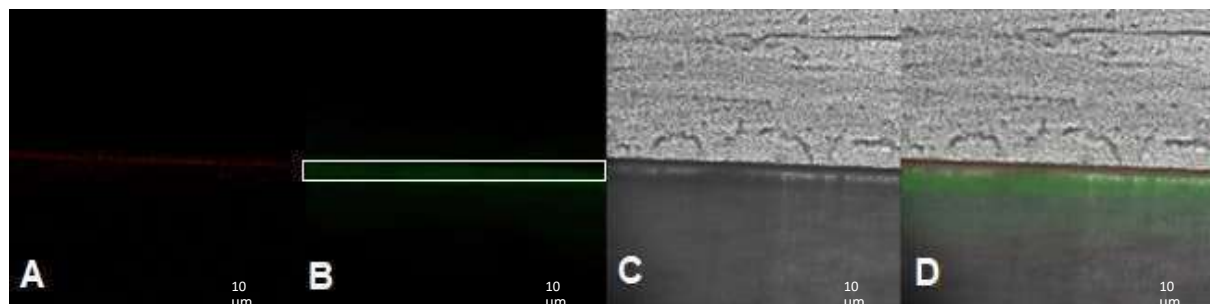
Legenda: A) Rodamina B) Atividade gelatinolítica C) Zimografia in situ D) Imagens sobrepostas. - SB  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 24 - Zimografia in situ - grupo CP



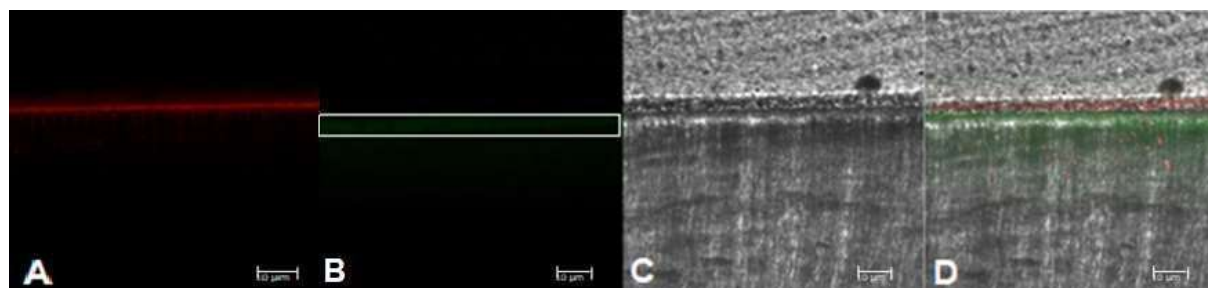
Legenda: A) Rodamina B) Atividade gelatinolítica C) Zimografia in situ D) Imagens sobrepostas.- CP  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 25 - Zimografia in situ - grupo N05



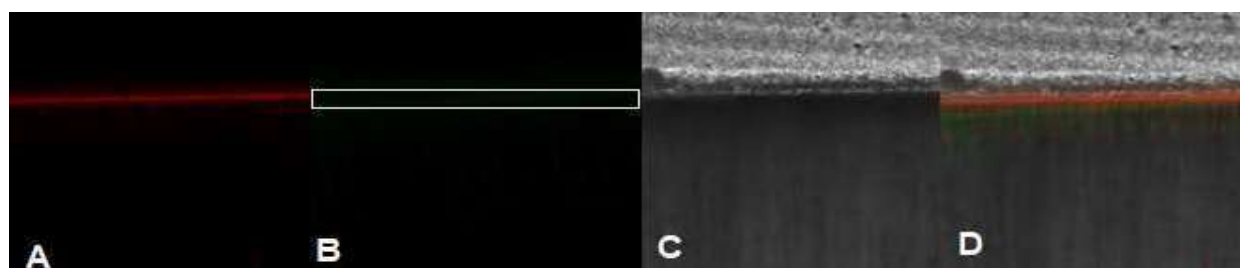
Legenda: A) Rodamina B) Atividade gelatinolítica C) Zimografia in situ D) Imagens sobrepostas.- N05  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 26 - Zimografia in situ - grupo N1



Legenda: A) Rodamina B) Atividade gelatinolítica C) Zimografia in situ D) Imagens sobrepostas – N1  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 27 - Zimografia in situ - grupo N1,5



Legenda: A) Rodamina B) Atividade gelatinolítica C) Zimografia in situ D) Imagens sobrepostas – N1,5  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados obtidos (através de análise utilizando o ImageJ) demonstram a ação da Nisina na inibição das metaloproteinases presentes na interface adesiva. Estes dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), para análise de normalidade. Os dados estão dispostos na tabela a seguir.

Tabela 8 Análise de variância (ANOVA) - Atividade gelatinolítica

<b>Fatores</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Grupos</b>	92634	4	23159	395,35	0,00
<b>Interação</b>	1150065	1	1150065	19633,04	0,00

Legenda: (SQ): soma dos quadrados (GL): grau de liberdade; (QM): quadrado médio; (F):razão; (P): valor. \*p < 0,05

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na tabela 9 observam-se os resultados do teste de Tukey (5%) para fator atividade gelatinolítica. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 9 - Análise estatística da atividade gelatinolítica no substrato dental (Pixels)

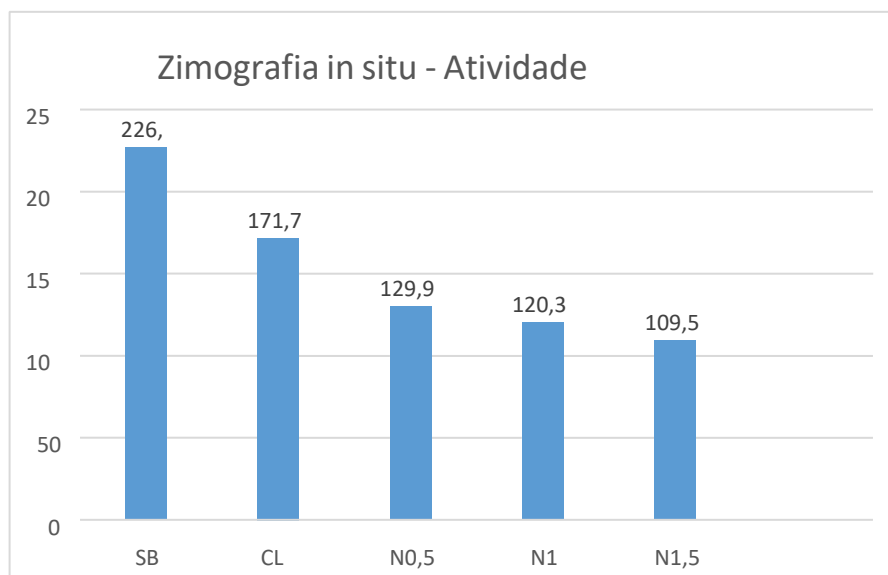
<b>Grupos</b>	<b>Valores de Mpa em pixels</b>
<b>SB</b>	226,70±14,85 <sup>D</sup>
<b>CP</b>	171,78±4,97 <sup>C</sup>
<b>N05</b>	129,96±3,97 <sup>B</sup>
<b>N1</b>	120,31±3,74 <sup>B</sup>
<b>N1,5</b>	109,54±4,21 <sup>a</sup>

Legenda: Análise estatística dos resultados obtidos a partir da análise das imagens no programa ImageJ, onde foi calculada a atividade gelatinolítica dos espécimes na zimografia in situ.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, onde  $SB > CP > N05 = N1 > N1,5$ . Os resultados encontram-se no gráfico a seguir.

Gráfico 4 - Zimografia in situ - Atividade gelatinolítica



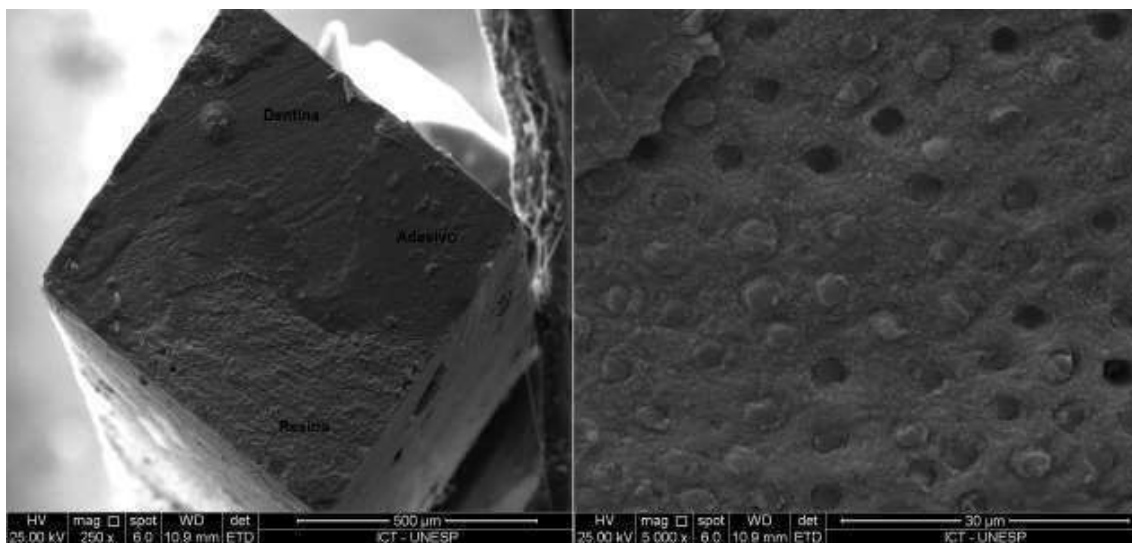
Legenda: Resultados obtidos através da análise quantitativa da zimografia in situ.

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

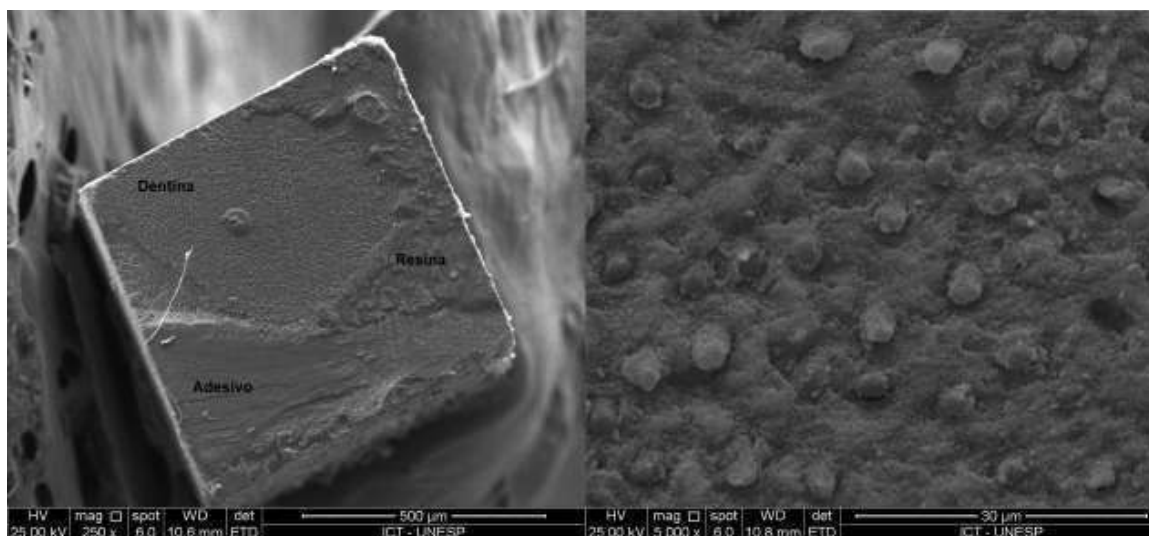
Os espécimes foram encaminhados à microscopia eletrônica de varredura utilizando o mesmo padrão de amplificação para todas as imagens (3000) e 15, 20 ou 25 KV de potência, onde se obteve as imagens apresentadas a seguir.

Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura – SB



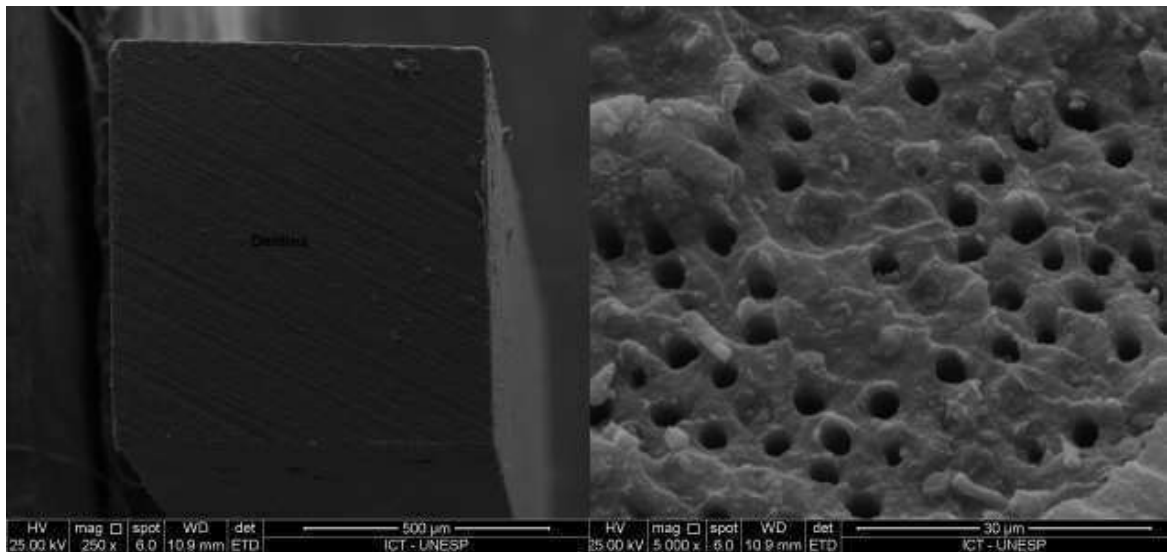
Legenda: Fotomicrografia de MEV da superfície do grupo Controle SB  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 29 - Microscopia eletrônica de varredura - CP



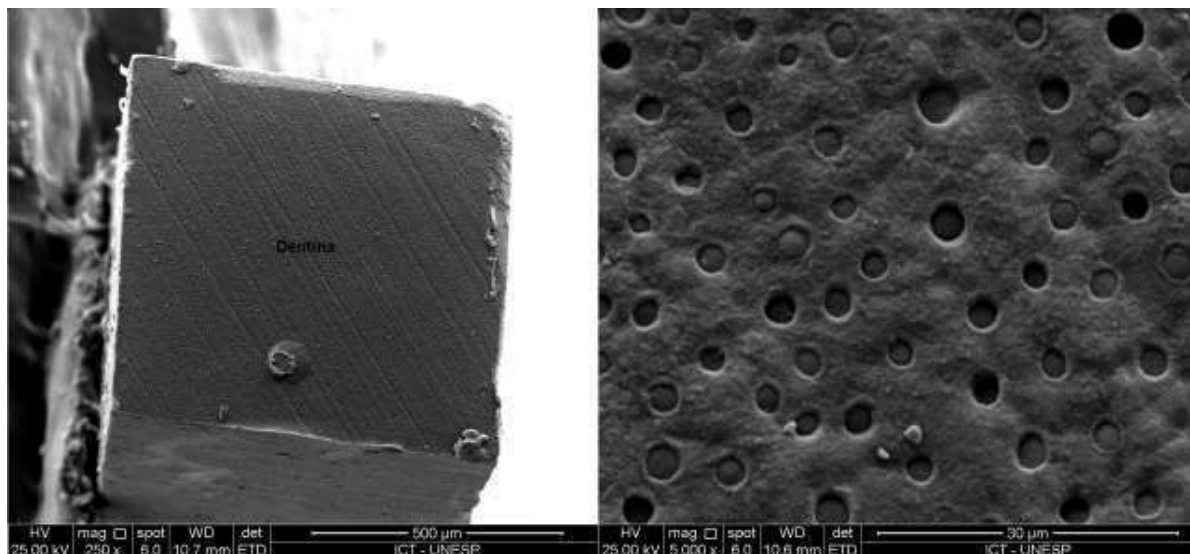
Legenda: Fotomicrografia de MEV da superfície do grupo CP.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 30 – Microscopia eletrônica de varredura – N05



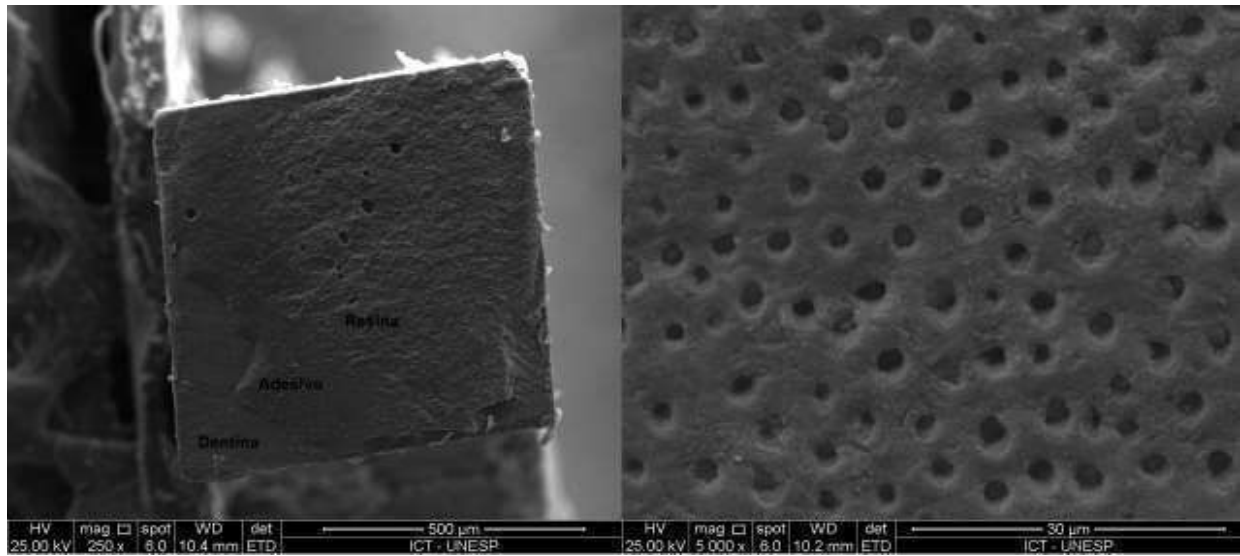
Legenda: Fotomicrografia de MEV da superfície do grupo Nisina 0,5%  
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 31 - Microscopia eletrônica de varredura - N1



Legenda: Fotomicrografia de MEV da superfície do grupo Nisina 1,0%.  
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 32 - Microscopia eletrônica de varredura - N1,5



Legenda: Fotomicrografia de MEV da superfície do grupo Nisina 1,5%  
Fonte: Elaborada pelo autor.

## 7 DISCUSSÃO

Na prática clínica, é de extrema importância que o protocolo restaurador garanta resistência de adesão considerável dos materiais restauradores à dentina, para evitar que as restaurações não retentivas se desloquem durante a função. O teste utilizado para avaliar as propriedades físico-mecânica após a adição da Nisina neste protocolo foi o de resistência de união, pois é o teste mais importante quando se trata das propriedades de um adesivo, o qual se obtido um resultado desfavorável, invalida a continuidade do trabalho, pois é a união efetiva e duradoura entre os materiais restauradores e a estrutura dentária é imprescindível.

Entretanto, a adição de agentes antibacterianos, principalmente confeccionados em uma solução a base de água, pode interferir diretamente na redução da resistência mecânica destas restaurações, visto que os materiais restauradores são, em sua maioria, hidrófobos. Zhao e colaboradores (2020), realizaram avaliação da resistência de união de restaurações contendo diferentes concentrações de Nisina (1%, 2% e 3%), porém o peptídeo foi adicionado ao sistema adesivo e não aplicado diretamente sobre a superfície dentinária, como neste trabalho. Como resultado, foi observada uma diminuição significativa na resistência de união em todos os grupos. Entretanto, no presente estudo, a incorporação de uma solução contendo 1,5% de concentração de Nisina não influenciou na resistência de união. Já com aplicação contendo 0,5% de concentração de Nisina, foi observado resultado superior ao controle (SB), enquanto nos grupos CP e N1 houve diminuição da resistência. Além disso, o envelhecimento também foi responsável por alterar de maneira significativa a força de união dentina-resina, rejeitando parcialmente a hipótese H01 testada.

Diversos trabalhos mostram a efetividade da atividade antibacteriana da Nisina, com sua ampla atividade de espectro e baixa citotoxicidade, demonstrando, assim, enorme potencial preventivo em relação à manutenção da integridade da interface adesiva (Shin et al., 2016) e inibição de crescimento bacteriano oral, como a *Candida albicans* (Le Lay et al., 2008) e *Enterococcus faecalis* (Turner et al., 2004), demonstrando sua atuação também na redução da formação de biofilme bucal. *Streptococcus* constituem parte fundamental da microbiota necessária para a formação da lesão de cárie dental, sendo, portanto, o principal agente etiológico da doença (Gou, 2018; Cleveland, 2010). Sendo assim, a aplicação de um peptídeo

antibacteriano, como a Nisina, eficaz no combate ao desenvolvimento do *Streptococcus*, também se demonstra útil na desinfecção da cavidade preparada.

Dentre os agentes microbianos mais relacionados ao desenvolvimento das lesões de cárie, o *Streptococcus mutans* é um dos principais. Portanto, essa bactéria foi utilizada para avaliar as propriedades antibacterianas das soluções desenvolvidas. Os compostos de Nisina possuem propriedades antimicrobianas capazes de inibir ou até mesmo causar lise bacteriana através de atividade por contato e, durante a execução deste trabalho, os resultados do teste de difusão em ágar confirmaram este mecanismo. Shin e colaboradores (2015) avaliaram a capacidade de desinfecção da Nisina frente a agentes microbianos, especialmente *Streptococcus mutans*, onde obtiveram como resultado uma diminuição significativa no crescimento de colônias a partir do contato com o peptídeo. Assim como neste trabalho, nos locais onde houve aplicação das soluções contendo Nisina sobre a superfície impregnada com *Streptococcus*, foi observada a formação de halo de inibição independentemente da concentração utilizada, o que condiz com os resultados obtidos pelos pesquisadores em relação ao comprovado potencial da Nisina como agente antimicrobiano, rejeitando a hipótese 02.

A capacidade de uma substância de penetrar no substrato dental é um fator de extrema importância para sua aplicabilidade clínica, principalmente quando se relaciona a inibição da ação de MMPs. A maior parte da degradação da camada híbrida ocorre justamente em sua base, por conta das fibras colágenas possivelmente expostas (Nakabayashi, 1982; Tay, 1996). Portanto, avaliar a capacidade da Nisina de penetrar nessa área se demonstrou de extrema relevância para a evolução do trabalho. Neste estudo, a Nisina demonstrou a capacidade de penetração relativa à concentração aplicada. Portanto, nos grupos CP e N05 não foi observada diferença estatística, enquanto nos grupos N1 e N1,5, houve diferença. O grupo com maior resultado de penetrabilidade foi N1,5 e os menores CP=N05, demonstrando que existe uma relação entre a penetrabilidade e a concentração utilizada, rejeitando a hipótese 3.

A camada híbrida continua sendo o elo mais fraco em toda a formação do sistema dentina-resina. Neste trabalho, foi utilizada a zimografia in situ com dupla fluorescência para permitir a localização do peptídeo utilizado e das MMPs ativas. Os resultados obtidos foram analisados a partir da delimitação de um espaço a partir da base da camada híbrida, até 5µm abaixo, levando em consideração que esta é a área

com a provável maior ação das MMPs devido a possibilidade de fibras colágenas expostas após condicionamento ácido que podem não ter sido envolvidas pelos monômeros presentes no adesivo. Estudos *in vitro* e *in vivo*, como de Carrilho e colaboradores (2012), já observaram a aplicação de substâncias capazes de inibir a ação das MMPs na base da camada híbrida, como a Clorexidina 0,02%. Os resultados obtidos nestes estudos demonstram que a aplicação de um agente com ação sobre as MMPs tem diversos benefícios para a manutenção da integridade da interface adesiva, reduzindo a velocidade da degradação e aumentando a longevidade das restaurações. Durante o teste de zimografia *in situ*, foi possível observar a inibição destas MMPs através da análise da atividade gelatinolítica. O grupo SB apresentou os maiores valores, com resultados decrescentes nos grupos SB>CP>N05≥N1>N1,5 confirmando a capacidade da Nisina de inibir a ação das metaloproteinases e rejeitando a hipótese 04.

As imagens obtidas pelo MEV demonstram que a Nisina não interferiu no substrato dentinário de maneira a prejudicar sua estrutura. Pode-se observar durante análise dos tipos de fratura, que estes se mantiveram normais mesmo após a aplicação da substância, o que também impacta positivamente em estudos posteriores que aprofundem a utilização deste peptídeo.

Estudos futuros são necessários para avaliar a aplicação das soluções contendo Nisina durante as etapas do protocolo restaurador, bem como sua concentração ideal, no entanto, o presente estudo deixa claro que as soluções de Nisina (Handary, Belgium) apresentaram atividades antibacterianas em relação aos *Streptococcus mutans* no teste de difusão em agar, alteraram a resistência de união em maiores concentrações e foram capazes de inibir a ação das metaloproteinases.

Embora os resultados obtidos por este estudo não possam ser aplicados diretamente em uma situação clínica, podemos sugerir-lo para o desenvolvimento de novas estratégias a fim de garantir a desinfecção das cavidades a serem restauradas, mantendo a resistência de união da interface adesiva ao longo do tempo, aumentando assim a durabilidade das restaurações adesivas, além de inibir a ação de degradação das metaloproteinases, sendo um indicador para novas pesquisas sobre o assunto.

## 8 CONCLUSÃO

De acordo os resultados obtidos neste estudo, a aplicação de soluções contendo diferentes concentrações de Nisina após o condicionamento ácido:

- A resistência de união foi afetada pelo período de avaliação, ou seja, os resultados observados nos grupos ciclados foram menores do que nos grupos com corte imediato.
- A solução de Nisina aplicada possui ação antimicrobiana em relação ao *Streptococcus mutans*.
- A solução de Nisina possui capacidade de penetração no substrato dentinário.
- A solução de Nisina é capaz de inibir a ação de metaloproteinases.

## REFERÊNCIAS

Anderson MH, Loesche WJ, Charbeneau GT. Bacteriologic study of a basic fuchsin caries-disclosing dye. *J Prosthet Dent*. 1985 Jul;54(1):51-5. doi: 10.1016/s0022-3913(85)80069-x. PMID: 3860658.

Bauer JG, Henson JL. Microleakage: a measure of the performance of direct filling materials. *Oper Dent*. 1984 Winter;9(1):2-9. PMID: 6587324.

Besic FC. The fate of bacteria sealed in dental cavities. *J Dent Res* 1943 Feb; 22(2):349-54.

Bower CK, Parker JE, Higgins AZ, Oest ME, Wilson JT, Valentine BA, et al. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. *Colloids Surf B*. 2002;25(1):81-90.

Brännström M. Smear layer: pathological and treatment considerations. *Oper Dent Suppl*. 1984;3:35-42. PMID: 6401152.

Brännström M. The cause of postrestorative sensitivity and its prevention. *J Endod*. 1986 Oct;12(10):475-81. doi: 10.1016/S0099-2399(86)80202-3. PMID: 3537190

Buchman GW, Banerjee S, Hansen JN. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J Biol Chem*. 1988 Nov 5;263(31):16260-6. PMID: 3141403.

Cameron JA. The use of ultrasonics in the removal of the smear layer: a scanning electron microscope study. *J Endod*. 1983 Jul;9(7):289-92. doi: 10.1016/S0099-2399(83)80119-8. PMID: 6579185.

Cardoso GC, Nakanish L, Isolan CP, Jardim PDS, Moraes RR. Bond stability of universal adhesives applied to dentin using etch-and-rinse or self-etch strategies. *Braz Dent J*. 2019 Oct 7;30(5):467-75.

Carlsson J. A numerical taxonomic study of human oral streptococci. *Odontol Rev*. 1969 Mar;19(2):137-60.

Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Jul;90(1):373-80. doi: 10.1002/jbm.b.31295. PMID: 19090493; PMCID: PMC2694224.

Carrilho MR. Can exogenous protease inhibitors control dentin matrix degradation? *J Dent Res* 2012;91(12):1099-102

Celik C, Ozel Y, Bağış B, Erkut S. Effect of laser irradiation and cavity disinfectant application on the microtensile bond strength of different adhesive systems. *Photomed Laser Surg* 2010 Apr;28(2):267-72.

Chang YE, Shin DH. Effect of chlorhexidine application methods on microtensile bond strength to dentin in class I cavities. *Oper Dent* 2010 Nov-Dec;35(6):618-23.

Chen Y, Ludescher RD, Montville TJ. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl Environ Microbiol*. 1997 Dec;63(12):4770-7. doi: 10.1128/aem.63.12.4770-4777.1997. PMID: 9406395; PMCID: PMC168800.

Chrysanthakopoulos NA. Placement, replacement and longevity of composite resin-based restorations in permanent teeth in Greece. *Int Dent J*. 2012 Jun;62(3):161-6. doi: 10.1111/j.1875-595X.2012.00112.x. Epub 2012 Mar 9. PMID: 22568742; PMCID: PMC9374902.

Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol*. 2001 Dec 4;71(1):1-20. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00560-8. PMID: 11764886.

de Almeida Neves A, Coutinho E, Cardoso MV, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Current concepts and techniques for caries excavation and adhesion to residual dentin. *J Adhes Dent*. 2011 Feb;13(1):7-22.

De Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Pizzatto E, Morais EC. Influence of chlorhexidine concentration on microtensile bond strength of contemporary adhesive systems. *Braz Oral Res.* 2009 Jul-Sep;23(3):340-5.

De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res.* 2003 Feb;82(2):136-40. doi: 10.1177/154405910308200212. PMID: 12562888.

Edwardsson S. Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *S. mutans*. *Arch Oral Biol.* 1968 June;13(6):637-46.

Eick JD, Wilko RA, Anderson CH, Sorensen SE. Scanning electron microscopy of cut tooth surfaces and identification of debris by use of the electron microprobe. *J Dent Res.* 1970 Nov-Dec;49(6):Suppl:1359-68. doi: 10.1177/00220345700490063601. PMID: 5274362.

Ercan E, Erdemir A, Zorba YO, Eldeniz AU, Dalli M, Ince B, et al. Effect of different cavity disinfectants on shear bond strength of composite resin to dentin. *J Adhes Dent.* 2009 Oct;11(5):343-6. PMID: 19841759.

Flotra L. Different modes of chlorhexidine application and related local side effects. *J Periodontal Res.* 1973;12(1):41-4.

Francischone CE, Cândido MSM, Berbert A, Mondelli J, Pereira JC. Efeito de alguns agentes de limpeza sobre a dentina, observado através de microscopia eletrônica de varredura. *Estomatol Cult.* 1984;14(1/2):49-56.

Franco APG, Santos FA, Martins GC, Pilatti G, Gomes OMM, Gomes JC. Desinfecção de cavidades com clorexidina. *Ci Biol Saúde.* 2007 Jun;13(1/2): 53-8

Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability--A literature review. *Dent Mater.* 2016 Feb;32(2):e41-53. doi: 10.1016/j.dental.2015.11.007. Epub 2015 Dec 29. PMID: 26743967.

Gama-Teixeira A. Cárie secundária adjacente a restaurações de cimento de ionômero de vidro, resina composta e amálgama induzida por *Streptococcus mutans* in vitro. *Braz Oral Res.* 2007;21(4):368-4.

Giannini M, Makishi P, Ayres AP, Vermelho PM, Fronza BM, Nikaido T, et al. Self-etch adhesive systems: a literature review. *Braz Dent J.* 2015 Jan-Feb;26(1):3-10.

Gonzalez MR, Fernandes PM, Suarez AVG, Filho HRS. Avaliação da tensão de contração durante a polimerização de uma resina em função da área aderida. *Rev Bras Odontol.* 2012 Jun;69(1):21-4.

Gou Y, Jin W, He Y, Luo Y, Si R, He Y, et al. Effect of cavity cleanser with long-term antibacterial and anti-proteolytic activities on resin-dentin bond stability. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Nov 19;11:784153. doi: 10.3389/fcimb.2021.784153. PMID: 34869081; PMCID: PMC8641795.

Gou YP, Li JY, Meghil MM, Cutler CW, Xu HHK, Tay FR, et al. Quaternary ammonium silane-based antibacterial and anti-proteolytic cavity cleanser. *Dent Mater.* 2018 Dec;34(12):1814-27. doi: 10.1016/j.dental.2018.10.001. Epub 2018 Oct 17. PMID: 30342771.

Gou YP, Meghil MM, Pucci CR, Breschi L, Pashley DH, Cutler CW, et al. Optimizing resin-dentin bond stability using a bioactive adhesive with concomitant antibacterial properties and anti-proteolytic activities. *Acta Biomater.* 2018 Jul 15;75:171-82. doi: 10.1016/j.actbio.2018.06.008. Epub 2018 Jun 6. PMID: 29883811.

Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res.* 2000 Jun;79(6):1385-91. doi: 10.1177/00220345000790060601. PMID: 10890717.

Heunis TD, Smith C, Dicks LM. Evaluation of a nisin-eluting nanofiber scaffold to treat *Staphylococcus aureus*-induced skin infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Aug;57(8):3928-35. doi: 10.1128/AAC.00622-13. Epub 2013 Jun 3. PMID: 23733456; PMCID: PMC3719752.

Le Lay C, Akerey B, Fliss I, Subirade M, Rouabhia M. Nisin Z inhibits the growth of *Candida albicans* and its transition from blastospore to hyphal form. *J Appl Microbiol*. 2008;105(5):1630–9.

Lima JEO. Cárie dentária: um novo conceito. *R Dent Press Ortodon Ortop. Facial*. 2007 Dez;12(6):119-30.

Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res*. 2011 Oct;90(8):953-68.

Lopes SR, Matuda AGN, Campos RP, Mafetano APVP, Barnabe AHM, Chagas GS, et al. Development of an antibacterial dentin adhesive. *Polymers (Basel)*. 2022 Jun 19;14(12):2502. doi: 10.3390/polym14122502. PMID: 35746077; PMCID: PMC9229334.

McAuliffe O, Ross RP, Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev*. 2001 May;25(3):285-308. doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00579.x. PMID: 11348686.

Norouzi Z, Salimi A, Halabian R, Fahimi H. Nisin, a potent bacteriocin and anti-bacterial peptide, attenuates expression of metastatic genes in colorectal cancer cell lines. *Microb Pathog*. 2018 Oct;123:183-9. doi: 10.1016/j.micpath.2018.07.006. Epub 2018 Jul 11. PMID: 30017942.

Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley D, Tay F, et al. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci*. 2011 Feb;119(1):79-85. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00789.x. PMID: 21244516; PMCID: PMC3824249.

Pashley DH, Zhang Y, Agee KA, Rouse CJ, Carvalho RM, Russell CM. Permeability of demineralized dentin to HEMA. *Dent Mater*. 2000 Jan;16(1):7-14. doi: 10.1016/s0109-5641(99)00077-9. PMID: 11203527.

Perdigão J, Duarte S Jr, Lopes MM. Advances in dentin adhesion. *Compend Contin Educ Dent*. 2003 Aug;24(8 Suppl):10-6; quiz 61. PMID: 14692213.

Pucci CR, Gu LS, Zhang HY, Song Q, Xia VW, Davis LB, et al. Water-associated attributes in the contemporary dentin bonding milieu. *J Dent*. 2018 Jul;74:79-89. doi: 10.1016/j.jdent.2018.04.016. Epub 2018 Apr 24. PMID: 29702152.

Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, et al. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res*. 1999 Apr;78(4):906-11. doi: 10.1177/00220345990780041101. PMID: 10326735.

Santos ACR, Mendes TO. Sistemas adesivos resinosos: uma revisão de literatura. *Interciência*. 2018;489(20):313–35

Schulein TM. The smear layer on dentin. A status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent*. 1988 Dec;1(6):264-70. PMID: 3077990.


Shin JM, Ateia I, Paulus JR, Liu H, Fenno JC, Rickard AH, et al. Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells. *Front Microbiol*. 2015 Jun 18;6:617. doi: 10.3389/fmicb.2015.00617. PMID: 26150809; PMCID: PMC4471743.

Siragusa GR, Cutter CN, Willet JL. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiol*. 1999;16(3):229-35

Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod*. 2006 Sep;32(9):862-8. doi: 10.1016/j.joen.2006.04.005. Epub 2006 Jun 30. PMID: 16934629.

## ANEXO A – 1ª Folha do comitê de ética


Figura x – Parecer consubstanciado do CEP – 1ª folha

<p>INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP</p> 
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>
<b>Título da Pesquisa:</b> DESENVOLVIMENTO DE SOLUÇÃO DE DESINFECÇÃO CAVITÁRIA A BASE DE NISINA E SUAS IMPLICAÇÕES NA RESISTÊNCIA DE UNIÃO DE RESTAURAÇÕES ESTÉTICAS
<b>Pesquisador:</b> CESAR ROGERIO PUCCI
<b>Área Temática:</b>
<b>Versão:</b> 2
<b>CAAE:</b> 58831821.6.0000.0077
<b>Instituição Proponente:</b> Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP
<b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio
<b>DADOS DO PARECER</b>
<b>Número do Parecer:</b> 5.582.542
<b>Apresentação do Projeto:</b>
Texto extraído do documento: "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1751751 (1)", projeto de pesquisa denominado "Desenvolvimento de solução de desinfecção cavitária à base de nisina e suas implicações na resistência de união de restaurações estéticas".
<b>Objetivo da Pesquisa:</b>
Texto extraído do documento: "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1751751(1)". "O objetivo deste estudo será avaliar a capacidade de desinfecção cavitária ao aplicarmos soluções contendo diferentes concentrações de nisina, um peptídeo amplamente utilizado para conservação de alimentos, sobre a superfície dentinária e sua relação com a resistência de união entre resina e dentina".
<b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b>
Segundo o Autor (texto extraído do texto: "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1751751 (1)"
<b>RISCOS:</b> Não há riscos para os pacientes, pois serão utilizados dentes já extraídos, podendo somente em sua manipulação sofrer quebra ou perda do espécime.
<b>BENEFÍCIOS:</b> Se os resultados forem satisfatórios, a solução poderá ser produzida em larga escala e disponibilizada, através de patente, para consultórios odontológicos, visando a desinfecção dos preparos cavitários, diminuindo a possibilidade de cárie recidiva.
<p><b>Endereço:</b> Av Engº Francisco José Longo 777 - Ramal 9028  <b>Bairro:</b> Jardim São Dmas      <b>CEP:</b> 12.245-000  <b>UF:</b> SP      <b>Município:</b> SAO JOSE DOS CAMPOS  <b>Telefone:</b> (12)3947-9078      <b>Fax:</b> (12)3947-9000      <b>E-mail:</b> ceph.ict@unesp.br</p>

Fonte: Elaborado pelo autor.

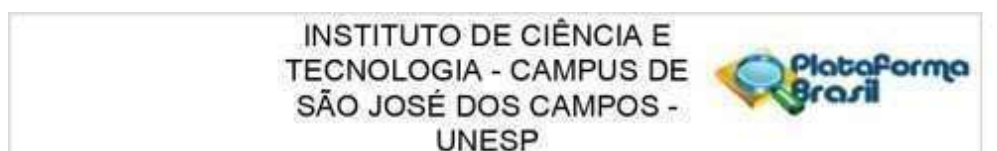
## ANEXO B -2ª Folha do comitê de ética

Figura x – Parecer consubstanciado do CEP – 2ª folha

<p><b>INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP</b></p> 																
<p><small>Continuação do Parecer: 5.582.542</small></p>																
<p><b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b> Tamanho da Amostragem 80. Seleção das amostras 03/10/2022 à 30/10/2022.</p> <p><b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b> "Vide campo Conclusões ou Pendências"</p> <p><b>Recomendações:</b> "Vide campo Conclusões ou Pendências"</p> <p><b>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</b> As recomendações solicitadas pelo CEP foram reformuladas, apesar de ter sido inserido no formulário de resposta de pendência:-</p> <p>1 - Não avaliamos pesquisas já em desenvolvimento. Verificar as datas do Cronograma de Execução no arquivo anexado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1751751" inicia em 13/05/2022 a termina em 31/10/2022 Resposta Alterado o cronograma para 01/09/2022 a 30/08/2023 CEPH:- Atendido</p> <p>2 - Tamanho da Amostra (80) no arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1751751". No projeto de Pesquisa cita (70 molares humanos) "Projeto CEP_RaquelPintoCampos", Esta relacionada ao número de indivíduos participantes ou número de dentes humanos? Arrumar no texto, alguns momentos cita 40 dentes humanos. Resposta:- Alterado no projeto e informações básicas para 80(oitenta) dentes CEPH:- atendido</p> <p>3. Termos de Cessão de material biológico de Fábio da Silva Matuda está sem assinatura. Resposta:- Documento reformulado, com a inserção de assinatura CEPH:- atendido</p>																
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="4"><small>Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777 - Ramal 9028</small></td> </tr> <tr> <td colspan="2"><small>Bairro: Jardim São Dimas</small></td> <td colspan="2"><small>CEP: 12.245-000</small></td> </tr> <tr> <td><small>UF: SP</small></td> <td colspan="3"><small>Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS</small></td> </tr> <tr> <td><small>Telefone: (12)3947-9078</small></td> <td><small>Fax: (12)3947-9000</small></td> <td colspan="2"><small>E-mail: caph.icl@unesp.br</small></td> </tr> </table>	<small>Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777 - Ramal 9028</small>				<small>Bairro: Jardim São Dimas</small>		<small>CEP: 12.245-000</small>		<small>UF: SP</small>	<small>Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS</small>			<small>Telefone: (12)3947-9078</small>	<small>Fax: (12)3947-9000</small>	<small>E-mail: caph.icl@unesp.br</small>	
<small>Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777 - Ramal 9028</small>																
<small>Bairro: Jardim São Dimas</small>		<small>CEP: 12.245-000</small>														
<small>UF: SP</small>	<small>Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS</small>															
<small>Telefone: (12)3947-9078</small>	<small>Fax: (12)3947-9000</small>	<small>E-mail: caph.icl@unesp.br</small>														

## ANEXO C – 3ª Folha do comitê de ética

Figura x – Parecer consubstanciado do CEP – 1ª folha



Continuação do Parecer: 5.582.542

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado acata o parecer do(a) Relator(a).

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site <https://www2.ict.unesp.br/> – Sobre o ICT – Comissões e Comitês - Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1751751.pdf	12/07/2022 07:00:29		Aceito
Outros	formularioesppend.doc	12/07/2022 07:00:12	CESAR ROGERIO PUCCI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeCessao.pdf	17/06/2022 11:37:46	CESAR ROGERIO PUCCI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.docx	17/06/2022 11:37:02	CESAR ROGERIO PUCCI	Aceito
Cronograma	Cronograma_CEP.docx	17/06/2022 11:35:06	CESAR ROGERIO PUCCI	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	10/03/2022 18:07:48	CESAR ROGERIO PUCCI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeCessao1.pdf	10/05/2021 15:42:46	CESAR ROGERIO PUCCI	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Av. Eng.º Francisco José Longo 777 - Ramal 9028  
 Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000  
 UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
 Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9000 E-mail: coph.ict@unesp.br

