

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO MULTIDISCIPLINAR EM
PATOLOGIA TROPICAL**

**AVALIAÇÃO DO GEL DE BROMELINA NA REMOÇÃO
QUÍMICO-MECÂNICA DA CÁRIE**



GISELLE DESIDERI TINO BARBOSA FERREIRA

**Manaus
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA TROPICAL

GISELLE DESIDERI TINO BARBOSA FERREIRA

AVALIAÇÃO DO GEL DE BROMELINA NA REMOÇÃO
QUÍMICO-MECÂNICA DA CÁRIE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração em Etnomedicina e Biodiversidade e Linha de Pesquisa em Princípios Bioativos Pró-saúde em Recursos Naturais Amazônicos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ângela Delfina Bittencourt Garrido

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Rosa Lozano Borrás

Manaus

2008

GISELLE DESIDERI TINO BARBOSA FERREIRA

AValiação DO GEL DE BROMELINA NA REMOÇÃO QUÍMICO-MECÂNICA DA CÁRIE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração em Etnomedicina e Biodiversidade e Linha de Pesquisa em Princípios Bioativos Pró-saúde em Recursos Naturais Amazônicos.

Aprovada em 26 de Setembro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr.^a Ângela Delfina Bittencourt Garrido
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dr.^a Ila Maria Aguiar de Oliveira
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Diego Ferreira Regalado
Universidade do Estado do Amazonas

Este trabalho é dedicado com muito carinho:

Aos meus filhos Isabella e Vinicius, por fazerem o meu mundo melhor, pela compreensão pela minha ausência, em todos os momentos desse projeto.

Ao meu esposo, Antenor Filho, pela leveza, humor e companheirismo.
Aos meus pais, Othilio e Graça, pelo amor incondicional, por toda dedicação e carinho, cuidados e sacrifícios que fizeram (e ainda fazem) por mim.

A minha irmã Joyce, pela sua presença alegre em nossa família, pelo seu carinho e incentivo à realização desse projeto.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus,

por ter me inspirado coragem, perseverança e determinação na realização desse projeto científico, tão almejado, e principalmente me fazendo perceber que depois das dificuldades percorridas vêm as bênçãos tão necessárias ao meu crescimento espiritual.

Aos meus queridos mestres:

Profa. Dra. Ângela Delfina Bittencourt Garrido e

Profa. Dra. Maria Rosa Lozano Borrás,

por terem tão generosamente me acolhido, sendo mais que orientadoras de uma dissertação, mas orientadoras de vida. Sou muito grata a Deus pelo convívio com pessoas tão generosas em compartilharem os conhecimentos científicos com modéstia e simplicidade, engrandecendo o projeto. Vocês têm muito a contribuir com a ciência não somente, pela capacidade técnica e intelectual, mas também pela forma dedicada e ética que conduziram a pesquisa. Agradeço a vocês profundamente com muita admiração, respeito, carinho e amizade.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Ila Maria, professora da Faculdade de Farmácia- UFAM, pelo grande incentivo e conhecimentos na área de Enzimologia. Agradeço sua enorme paciência, atenção e grande contribuição a esse projeto.

À Universidade Federal do Amazonas, e especialmente, ao Prof. Mcs. Jeconias Câmara e a Profa. Dra. Tatiana Libório, professores do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML), por me orientarem na análise histopatológica.

Ao Prof. Dr. Nelson Fraiji, Coordenador do Curso de Mestrado Multidisciplinar em Patologia Tropical – UFAM, pelo incentivo e apoio à realização desse projeto.

À Profa. Dra. Júlia Salem, pela confiança e incentivo, sempre demonstrados, e por todo o conhecimento científico compartilhado.

Às Profas. Dra. Maria Menezes e Dra. Maria Fulgência da Costa Bandeira pela orientação metodológica concedida na Banca de Qualificação desse projeto e pelo incentivo sempre demonstrado por ambas.

Às amigas Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto e Ellen Regina da Costa Paes, professoras da Faculdade de Medicina e de Farmácia da UFAM, pelo grande incentivo à realização desse projeto. Agradeço de coração a demonstração de apreço e amizade nos momentos difíceis.

À Biomedicinal, especialmente, ao Dr. José Carlos Baranda mostrando-se tão generoso e acessível, também a Lívia, farmacêutica, pela sua disponibilidade, ajuda e simpatia.

À Faculdade de Farmácia (UFAM), em especial, ao Allan Roberto, que me acompanhou durante grande parte do projeto sempre com boa vontade, compartilhando os conhecimentos; ao Sr. José Maria pela disponibilização do espectrofotômetro para a realização dos experimentos.

À Profa. Mcs. Izabella, professora da Faculdade de Farmácia da UFAM, pela imensa colaboração na execução dos experimentos.

À colega Carolina Queiroga, pelo companheirismo durante o projeto.

Ao Antonio Fabio, do Laboratório de Pesca da UFAM, que realizou a liofilização do extrato, sempre acessível quando eu precisava.

Às funcionárias do Laboratório de Patologia do DPML, em especial a Maria de Fátima Barbosa e D. Yolanda, pelo auxílio na disponibilização dos blocos de material parafinado, na microtomia dos mesmos e na realização das colorações histológicas. Pela amizade e carinho, incentivando-me sempre; às estagiárias Fabíola, Kelly e Priscila, por me ajudarem também, durante toda a realização do histopatológico.

Ao Dr. Plínio Monteiro, que analisou e aprovou o projeto com seriedade e profissionalismo, pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFAM, incentivando-me a sua realização.

Ao Centro Educacional Pinocchio, em especial, a Tia Marta, Tia Marcelly, Tia Jô, Tia Kátia, Tia Cris e Tia Suelane, por cuidarem tão bem da minha filha Isabella, durante os anos de 2006 e 2007, deixando-me tranqüila para me dedicar a essa jornada científica.

Ao colégio Martha Falcão, em especial, a Tia Lucia Barbosa, Tia Leiva, Tia Graça, Tia Leine, Tia Carla, pela atenção e carinho com a Isabella, agora em 2008, ajudando-me nesse término do mestrado.

Ao meu marido e companheiro Antenor Filho, por todo o seu amor, paciência e cumplicidade nos momentos difíceis.

À minha mãe Graça e minha tia Auxiliadora, por auxiliarem, com os cuidados com os meus filhos, durante o projeto, fazendo com muito amor e carinho.

À minha irmã Joyce, por corrigir ortograficamente, com muito afincamento e dedicação a dissertação.

Ao meu pai Othilio, pelo seu exemplo, e seu carinho com a família toda.

À minha avó Elorah e minha tia Odalea, educadoras, e fonte de inspiração.

À minha sogra Isabel, por me ajudar com os cuidados com os meus filhos, em especial na busca da Isabella na escola e por ser sempre solícita.

À minha prima Márcia Leão, que mesmo distante, me incentivou com muito amor e carinho na realização desse projeto.

À Vivi, Etelvina e Claudia, pelo carinho e cuidado com o meu filho Vinicius, que nasceu durante o mestrado, deixando-me tranqüila para a realização desse projeto.

Ao meu amigo Lioney Nobre Cabral, que tanto me incentivou a retomar o mestrado e realizar esse projeto com dedicação.

Aos funcionários da secretaria do Curso de Mestrado, Rafaela, Ronaldo e Dulce, sempre dispostos a ajudar e a colaborar nesse empreendimento científico.

Ao SESI, em especial a amiga Suely Bezerra de Sousa por tornar muito acessível o contato com os profissionais dessa instituição, em especial, à Neide Mussa pela obtenção dos dentes.

À amiga Kelia Barreto pela obtenção dos dentes extraídos, sempre me ajudando com muito carinho e também à Tricia Simone da Silva, pelos dentes coletados, fundamentais para a realização desse projeto.

Ao colega Luis Eduardo Martinho, pela radiografia digital dos dentes, sempre disposto a colaborar.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização dessa dissertação de Mestrado, meus sinceros agradecimentos.

*“O Senhor é meu pastor e nada me faltará.
Deita-me em verdes pastos e guia-me mansamente em
águas tranqüilas.
Refrigera minha alma, guia-me pelas veredas da justiça
por amor ao seu nome.
Ainda que eu ande pelo vale das sombras da morte, não
temerei mal algum, porque Tu estás comigo, a Tua vara e
o teu cajado me consolam.
Prepara-me uma mesa perante aos meus inimigos, unge a
minha cabeça com óleo, e o meu cálice transborda.”*

Salmo 23.

RESUMO

A dentística contemporânea preconiza a máxima conservação com o mínimo de intervenção para remover o tecido cariado. A remoção químico-mecânica da cárie enquadra-se no atual perfil de promoção de saúde bucal, pois objetiva a remoção seletiva da camada externa e infectada da cárie e a permanência da camada interna, remineralizável. A sua eficácia tem sido amplamente investigada, nas última três décadas, e devido aos satisfatórios resultados novos produtos que ajam quimicamente sobre o tecido cariado estão sendo investigados. O objetivo deste estudo *in vitro* foi analisar a superfície dentinária remanescente após a remoção de tecido dentinário cariado utilizando o gel do extrato liofilizado de bromelina. A bromelina é uma enzima proteolítica similar à papaína extraída da polpa, folhas, caule e cascas do abacaxizeiro, *Ananas cosmosus* (L) Merrill. O extrato enzimático foi obtido das cascas do abacaxizeiro e liofilizado para preservação de suas características proteolíticas. A atividade colagenolítica foi determinada pelo método do “cup-plate”. A atividade proteolítica do extrato liofilizado foi quantificada pelo método de Kunitz e a concentração de proteína pelo método de Lowry. Testaram-se três concentrações (1, 2 e 3%) do extrato liofilizado no gel de carboximetilcelulose (CMC) em quinze (15) molares permanentes cariados, divididos em três grupos de cinco dentes: grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3). Cada dente foi seccionado ao meio, os lados mesiais e vestibulares (lado A) receberam o gel com o extrato e os lados distais e palatinos (lado B) receberam o gel de CMC sem o extrato, grupo controle. Os lados A do G1, G2 e G3 receberam, respectivamente, as concentrações 1, 2 e 3% do extrato liofilizado de bromelina. O gel foi aplicado na cavidade, por 60 segundos e depois o tecido cariado foi removido com uma cureta sem corte, repetindo-se três vezes consecutivas o procedimento, também realizado com o gel controle (lados B). Cortes longitudinais semi-seriados de 5µm de espessura foram corados com hematozilina e eosina e, por microscopia óptica, a superfície dentinária remanescente foi avaliada qualitativamente e comparativamente entre os lados A e B. Com os dados obtidos observou-se: no G1(lado A) 80% das amostras apresentaram remoção da cárie, no G2 (lado A) 60% das amostras apresentaram remoção de cárie, no G3 não houve remoção de cárie. Comparando-se os lados A e B houve remoção significativa de cárie no G1 e G2 em relação ao grupo controle e no G3 não houve remoção significativa. Concluiu-se que, nas amostras analisadas, o gel do extrato liofilizado de bromelina a 1 e 2% apresentou remoção químico-mecânica significativa em relação ao grupo controle.

Palavras-Chave: *A. cosmosus*, gel de carboximetilcelulose, remoção químico-mecânica da cárie.

ABSTRACT

The contemporary dentistry indicates the maximal conservation with minimal intervention to remove the carious tissue. The chemomechanical caries removal fits in the oral health promotion profile, because objectives the selective removal of the external and infected layer of carious and the permanence of the internal layer, remineralizable layer. Its efficiency has been widely investigated, in the latest three decades, by satisfactory results new products that act chemically over the carious tissues have been investigated. The purpose of this *in vitro* study was to analyse the residual dentinal surface following caries removal using a bromelain gel. The bromelain is a proteolytic enzyme, papain similar, extracted from the fruit and pineapple plants, *Ananas cosmosus* (L) Merrill. The enzymatic extract was obtained from the pineapple shell and lyophilized, to preserve its proteolytic characters. The collagenolytic activity was qualified by the cup-plate's method. The enzymatic activity of the bromelain lyophilized extract was quantified by Kunitz's method, its protein concentration by Lowry's method. Three concentrations (1, 2 and 3%) of the lyophilized extract was added in a carboxymethylcellulose gel (CMC) and was tested in fifteen (15) carious molars, divided in three groups of five teeth, group 1 (G1), group 2 (G2) and group 3 (G3). Each tooth was half cutted, the mesial and the vestibular sides (side A) received the bromelain lyophilized extract gel and distal and palatal sides received a CMC gel without the extract, control, (side B). The side A of G1, G2 and G3 received, respectively, 1, 2 and 3% of the bromelain lyophilized extract. The gel was applied into the cavity for 60 seconds, and later removed with a sharpness instrument, this procedure was repeated three following times and also realized in the control gel (sides B). Semi-series longitudinal cuts of 5 µm thick were stained with hematoxylin and eosin and the residual dentinal surface was analysed and qualified by optic microscopy. With the data obtained it was noticed that: in G1 (side A), 80% of the samples were caries removal, in G2 (side A) 60% of the samples were caries removal, in G3 there was no removal. In sides A and B, there were significant caries removal in G1 and G2 comparing with the control and in G3 there was no caries removal. One concludes that, in the analysed samples, 1 and 2% of the bromelain lyophilized extract gel presents significant chemoremoval comparing with control group.

Key words: *A. cosmosus*, carboxymethylcellulose gel, chemomechanical caries removal.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µm	Micrômetro
mL	Mililitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
IDAM	Instituto de Desenvolvimento Agropecuário do Estado do Amazonas.
TRA	Tratamento Restaurador Atraumático
CMC	Carboximetilcelulose
<i>A. cosmosus</i>	<i>Ananas cosmosus</i> (L) Cerril
NMG	N-monocloroglicina
NMAB	Ácido-aminobutírico-3N-monocloro-DL-2
FDA	Food and Drug Administration
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
mm	milímetro
nm	nanômetro
DP	Desvio Padrão
UA	Unidade de Atividade
h	Horas
rpm	Rotações por minuto
Km	Kilômetros
Am	Amazonas
Br	Brasil

kg	kilograma
mg	miligrama
g	grama
PL	Presença de Lesão
AL	Ausência de Lesão
°C	Celsius
DS	Grau de Substituição
M	Mol
mM	Milimol
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da celulose, destacando-se a unidade de anidroglicose.....	38
Figura 2 - Estrutura idealizada do CMC.....	39
Figura 3 - Cascas do abacaxi congeladas por 24 horas.....	48
Figura 4 - Centrífuga caseira “Fun kitchen”.....	48
Figura 5 - Modelo Centrífuga.....	48
Figura 6 – Centrifugação das Cascas (1.º dia).....	48
Figura 7 – Extrato Bruto.....	48
Figura 8 – Filtração com algodão e pano de viscosa.....	48
Figura 9 – Filtração.....	49
Figura 10 – Solução Tampão-fosfato + Extrato Bruto (1:1).....	49
Figura 11 – Precipitado desprezado.....	49
Figura 12 – Sobrenadante + álcool etílico 96% na proporção (1:1) com 24 horas de repouso a 10°C.....	49
Figura 13 – Centrifugação com 3.500 rpm a 4° C, por 20 minutos (2.º dia).....	49
Figura 14 – 1.ª Precipitação.....	49
Figura 15 – Sobrenadante + álcool etílico 96% (1:1), com 24 horas (2.º para o 3.º dia).....	50
Figura 16 – Centrifugação 3.º dia.....	50
Figura 17 – 2.º Precipitado.....	50
Figura 18 – 2.º Precipitado em placa de Petri.....	50
Figura 19 – Liofilização do 2.º precipitado.....	50
Figura 20 – Liofilização do 2.º precipitado.....	50
Figura 21 - Dentes seccionados.....	59

Figura 22 – Manipulação do gel de bromelina a 1%.....	59
Figura 23 – Manipulação do gel de bromelina a 2%.....	59
Figura 24 – Manipulação do gel de bromelina a 3%.....	59
Figura 25 - Curetagem após a aplicação do gel a 1%.....	59
Figura 26 - Remoção do tecido cariado.....	59
Figura 27 – Remoção do tecido cariado, após as aplicações do gel a 1%.....	60
Figura 28 - Curetagem com o gel sem bromelina (controle).....	60
Figura 29 – Pouca remoção de tecido cariado.....	60
Figura 30 - Comparação dos métodos de remoção.....	60
Figura 31 – Aplicação do gel com 2 % de bromelina.....	60
Figura 32 – Lado que recebeu o gel (A) com o seu controle (B).....	60
Figura 33 – Histopatologia da dentina após remoção da cárie, apresentando ausência de lesão (AL).....	62
Figura 34 – Ausência de Lesão (AL) caracterizada por prolongamentos odontoblásticos regulares e eosinófilos.....	62
Figura 35 – Ausência de lesão (AL) com discretas linhas basofílicas de permeio e infiltrado bacteriano.....	63
Figura 36 – Discreto infiltrado bacteriano com linhas basofílicas em região com remoção de cárie (AL).....	63
Figura 37 – Ausência de lesão com infiltrado bacteriano com discretas linhas basofílicas de permeio.....	64
Figura 38 – Presença de Lesão com acentuada área basofílica.....	64
Figura 39 – Presença de Lesão observou-se infiltrado bacteriano basofílico.....	65
Figura 40 – Presença de Lesão, com áreas basofílicas de aspecto granuloso.....	65
Figura 41 – Presença de Lesão representada por prolongamentos odontoblásticos espessos.....	66

Figura 42 - Presença de Lesão, amostra 15, dente 17, G3.....66

Figura 43– Diâmetro do halo (10 mm) com 1% da solução de extrato liofilizado de bromelina.....69

Figura 44 – Diâmetro do halo (12 mm) com 2% da solução de extrato liofilizado de bromelina.....69

Figura 45 – Diâmetro do halo (15 mm) com 3% da solução de extrato liofilizado de bromelina.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação da atividade colagenolítica dos extratos liofilizados de bromelina pela medição do diâmetro do halo.....	51
Tabela 2- Distribuição dos grupos, das amostras e numeração dos elementos dentários.....	56
Tabela 3 –. Atividade colagenolítica das soluções do extrato liofilizado de bromelina.....	67
Tabela 4- Atividade proteolítica das soluções do extrato liofilizado de bromelina, expressa em unidade de atividade (UA).....	70
Tabela 5- Média e desvio padrão da atividade enzimática dos extratos liofilizados de bromelina.....	70
Tabela 6- Teor de proteína das soluções do extrato liofilizado de bromelina.....	71
Tabela 7- Média e desvio padrão da concentração de proteína do extrato liofilizado de bromelina.....	71
Tabela 8- Atividade específica das soluções do extrato liofilizado de bromelina.....	72
Tabela 9- Resultados obtidos da atividade colagenolítica, atividade enzimática, teor de proteínas e atividade específica das soluções do extrato liofilizado de bromelina.....	72
Tabela 10- Resultados dos cortes histológicos da amostra n ^o .1, dente 16 (primeiro molar superior direito), lados A e B do grupo 1 (G1).....	73
Tabela 11- Resultados dos cortes histológicos da amostra n ^o .2, dente 47 (segundo molar inferior direito), lados A e B do grupo 1 (G1).....	73
Tabela 12- Resultados dos cortes histológicos da amostra n ^o .3, dente 46 (primeiro molar inferior direito), lados A e B do grupo 1 (G1).....	74
Tabela 13- Resultados dos cortes histológicos da amostra n ^o .4, dente 36 (primeiro molar inferior esquerdo), lados A e B do grupo 1 (G1).....	74
Tabela 14- Resultados dos cortes histológicos da amostra n ^o .5, dente 37 (segundo molar inferior esquerdo), lados A e B do grupo 1 (G1).....	74

Tabela 15- Resultados dos cortes histológicos da amostra nº.6, dente 16 (primeiro molar superior direito), lados A e B do grupo 2).....	75
Tabela 16- Resultados dos cortes histológicos da amostra nº.7, dente 17 (segundo molar superior direito), lados A e B do grupo 2 (G2).....	75
Tabela 17- Resultados dos cortes histológicos da amostra nº.8, dente 37 (segundo molar inferior esquerdo), lados A e B do grupo 2 (G2).....	76
Tabela 18- Resultados dos cortes histológicos da amostra nº.9, dente 38 (terceiro molar inferior esquerdo), lados A e B do grupo 2 (G2).....	76
Tabela 19- Resultados dos cortes histológicos da amostra nº.10, dente 48 (terceiro molar inferior direito), lados A e B do grupo 2 (G2).....	76
Tabela 20- Resultados dos cortes histológicos da amostra nº.11, dente 38 (terceiro molar inferior esquerdo), lados A e B do grupo 3 (G3).....	77
Tabela 21-Resultados dos cortes histológicos da amostra nº.12, dente 16 (primeiro molar superior direito), lados A e B do grupo 3 (G3).....	77
Tabela 22-Resultados dos cortes histológicos da amostra nº.13, dente 47 (segundo molar inferior direito), lados A e B do grupo 3 (G3).....	77
Tabela 23-Resultados dos cortes histológicos da amostra no. 14, dente 26 (primeiro molar superior esquerdo), lados A e B do grupo 3 (G3).....	78
Tabela 24- Resultados dos cortes histológicos da amostra nº.15, dente 17 (segundo molar superior direito), lados A e B do grupo 3 (G3).....	78
Tabela 25- Percentual de ausência de lesão (lado A) em relação ao controle (lado B) em amostras de dentes que receberam gel de extrato de bromelina a 1, 2 e 3%.....	79
Tabela 26- Comparação da ausência de cárie entre os lados A (gel com o extrato de bromelina) e B (controle- gel sem o extrato) das amostras.....	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Objetivos.....	22
1.1.1 Geral.....	22
1.1.2 Específicos.....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 Aspectos histológicos da dentina.....	23
2.2 Cariologia e histopatologia da cárie.....	25
2.3 Remoção químico-mecânica da cárie.....	29
2.4 Remoção mecânica da cárie.....	37
2.5 Carboximetilcelulose.....	38
2.5 Bromelina.....	39
2.6 Liofilização.....	44
3. METODOLOGIA.....	44
3.1 Modelo de estudo.....	44
3.2 Obtenção e extração da bromelina.....	44
3.2.1 Matéria-prima.....	44
3.2.2 Coleta das partes do abacaxizeiro.....	44
3.2.3 Processo de extração da enzima.....	45
3.2.4 Liofilização do extrato de bromelina.....	45
3.3 Atividade colagenolítica em meio sólido.....	49
3.4 Determinação da atividade proteolítica.....	51
3.5 Determinação do teor de proteína presente no extrato liofilizado de bromelina.....	51
3.6 Formulação do gel à base de carboximetilcelulose (CMC).....	51
3.7 Preparação do gel de bromelina.....	52
3.8 Considerações éticas.....	52
3.9 Padronização dos elementos dentários envolvidos na análise histopatológica.....	53
3.10 Procedência dos dentes.....	53
3.11 Seleção e acondicionamento dos dentes.....	53
3.12 Teste do gel da bromelina nos grupos de molares permanentes.....	58
3.13 Análise histopatológica dos dentes.....	62
3.14 Análise estatística.....	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 Atividade colagenolítica em meio sólido.....	69
4.2 Determinação da atividade proteolítica	70
4.3 Determinação do teor de proteína.....	71
4.4 Atividade específica.....	71
4.5 Análise histopatológica.....	73
4.5.1 Grupo 1.....	73

4.5.2 Grupo 2.....	75
4.5.3 Grupo 3.....	77
4.6 Análise estatística.....	81
CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS.....	85
OBRAS CONSULTADAS.....	94
APÊNDICES.....	95
ANEXOS.....	102

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a Odontologia busca uma filosofia preventiva por meio de promoção de saúde baseada na máxima atitude de prevenção, máxima preservação e intervenção mínima (BUSATO et al., 2005).

Para remoção do tecido cariado evita-se a abertura das lesões restritas ao esmalte, nas quais é possível o controle do biofilme dental. Nas lesões cavitadas preconiza-se uma conduta mais conservadora, com menor remoção de tecido dentinário. A viabilidade desses princípios está respaldada pelo diagnóstico mais acurado do risco da doença cárie e de sua progressão resultando em uma menor intervenção operatória possível quando isso for inevitável (CORRÊA, 2006; BARATA, 2007).

A lesão cariosa consiste em duas camadas: a mais externa, infectada e necrótica, sem capacidade de remineralização, e a mais interna, menos infectada e com potencial remineralizador. O tratamento tradicional, com uso de instrumentos rotatórios, pode levar a remoção da camada mais interna, resultando em maior destruição da estrutura dentária. Essa melhor compreensão da doença cárie, baseada em princípios biológicos, levou a mudança de paradigmas em relação ao ato de remoção do tecido cariado, desenvolvendo métodos minimamente invasivos, como o da remoção químico-mecânica da cárie (MARAGAKIS et al., 2001; KIDD, 2004).

O objetivo da remoção químico-mecânica é remover a camada mais externa da cárie (infectada), deixando a camada mais interna, a qual é passível de remineralização e reparo (PORTO et al., 2001; TONAMI, et al., 2003; SILVA, et al., 2005; CORRÊA, 2006; BARATA, 2007).

Os estudos vêm avançando para que produtos conservadores, com a capacidade de remoção químico-mecânica da cárie sejam lançados no mercado, visando superar inconvenientes, como a fobia gerada pela alta e baixa rotação, a dor, o alto custo do tratamento odontológico e a remoção desnecessária da camada mais interna da lesão cariosa (BERGMANN et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2006).

Nos anos noventa (90), um produto para remoção químico-mecânica da cárie, denominado Carisolv[®], foi desenvolvido na Suécia. O Carisolv[®] é constituído de três aminoácidos (lisina, leucina e ácido glutâmico); cloreto de eritrosina; carboximetilcelulose; água destilada; hidróxido de sódio e uma solução de hipoclorito de sódio em baixa concentração (0,5%). Os aminoácidos atenuavam o efeito tóxico do hipoclorito sobre o tecido dentinário cariado (CEDERLUND et al., 1999; BANERJEE et al., 2000a; BANERJEE et al., 2000b; MARAGAKIS et al., 2001).

Estudos clínicos e laboratoriais comprovaram a efetividade do Carisolv[®] pela sua capacidade de remover seletivamente a camada necrótica, infectada e não remineralizável das lesões cariosas (CEDERLUND et al., 1999; FURE et al., 2000; BANERJEE et al., 2000a; BANERJEE et al., 2000b; MARAGAKIS et al., 2001; FURE; LINGSTROM, 2004; BERGMANN et al., 2005; BARATA, 2007). Tal produto vem sendo utilizado no mercado odontológico, porém apresenta alto custo (PORTO et al., 2001; CORRÊA, 2006).

No Brasil, pesquisadores desenvolveram um produto, já comercializado, o Papacárie[®], à base da papaína. A papaína é uma enzima proteolítica proveniente do látex das folhas e frutos do mamão verde adulto, *Carica papaya*. Sua formulação, além da papaína, conta com a presença da cloramina. O Papacárie[®] vem mostrando efetividade clínica satisfatória (SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2005; GUIA ODONTO, 2005; BUSSADORI et al., 2005; CÔRREA, 2006).

A bromelina, outra enzima proteolítica, oriunda de várias partes do abacaxizeiro, vem sendo estudada em inúmeras situações como em queimaduras de terceiro grau; solubilização de mucos;

como anti-inflamatório; na inibição de células cancerígenas, entre outras (MAURER, 2001; FREIMAN, 2001; HALE et al., 2005; CESAR, 2005; FERREIRA, 2007).

Na Odontologia, a aplicação da bromelina foi investigada por via oral em cirurgias odontológicas, como potencializador de antibióticos. Gabriel (1968) observou clinicamente melhor cicatrização em alvéolos após exodontias no grupo de pacientes que haviam feito o uso da bromelina industrializada e antibióticos, por via oral, em comparação ao grupo de pacientes que fizeram o uso apenas de antibióticos. Nesse estudo constatou-se que a associação da bromelina potencializou a ação de antibióticos.

O estado do Amazonas, por suas características geográficas, apresenta uma comunidade ribeirinha extensa, carente de tratamento odontológico especializado. Por meio de um produto capaz de remover quimicamente a cárie, o tratamento restaurador poderia se tornar mais acessível, melhorando a qualidade de vida dessa população.

Devido à escassez de estudos sobre a bromelina com aplicabilidade clínica na Odontologia, o presente trabalho visa a investigar *in vitro* a ação do extrato liofilizado de bromelina (1, 2 e 3%), sobre a remoção químico-mecânica da cárie, utilizando o gel de carboximetilcelulose (CMC) como veículo.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Formular um gel à base de extrato liofilizado de bromelina, em diferentes concentrações, capaz de atuar na remoção químico-mecânica da cárie, testando as seguintes hipóteses nulas (H0): 1. gel a 1% não remove tecido cariado, 2. gel a 2% não remove tecido cariado, 3. gel a % não remove tecido cariado.

1.2. Específicos

- Proceder à extração e obtenção da bromelina a partir da casca do abacaxi *Ananas cosmosus*(L) Merrill.
- Realizar teste de degradação do colágeno, atividade proteolítica e específica dos extratos liofilizados de bromelina.
- Elaborar o gel do extrato liofilizado de bromelina em três concentrações (1, 2 e 3%) e do grupo controle (sem a enzima).
- Aplicar os géis dos extratos liofilizados, e o gel controle em dentes cariados extraídos.
- Avaliar histopatologicamente, em microscopia óptica, a efetividade das três concentrações do gel e do grupo controle.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos histológicos da dentina.

A dentina é um tecido conjuntivo avascular, mineralizado, especializado e pertencente ao complexo dentina-polpa. Forma o maior volume do dente, suportando e compensando a fragilidade do esmalte. O complexo dentina-polpa tem íntima relação topográfica, embriológica e funcional, apresentando características biológicas comuns (MONDELLI, 1998; TORNECK, 2001; SMITH, 2003).

A dentina madura é composta por aproximadamente 65% em peso de matéria inorgânica sendo seu componente principal a hidroxiapatita. A matéria orgânica da dentina é basicamente composta de 20% de colágeno, 2% de proteoglicanas, glicosaminoglicanas, glicoproteínas, lipídios e 13% de água. Em volume essa relação é de 45% de matéria inorgânica, 33% de conteúdo orgânico e 22% de água (PEREIRA et al., 2005).

A célula responsável pela produção de matriz é o odontoblasto, situado na periferia da polpa. As suas projeções citoplasmáticas (prolongamentos) ocupam um espaço na matriz da dentina, que são os túbulos dentinários, ramificando-se próximo ao limite amelodentinário por toda a sua extensão (PÉCORA, 2008). Os túbulos ou canalículos dentinários são mais largos junto à polpa (2,5 μm) e tornam-se mais estreitos nas suas extremidades externas (1 μm). O número de túbulos por unidade de superfície varia segundo a região da dentina considerada. Próximo à polpa existem cerca de 65.000 túbulos/ mm^2 ; na parte central, cerca de 35.000 túbulos/ mm^2 e na periferia cerca de 15.000 túbulos/ mm^2 . Há mais canalículos por unidade de superfície na coroa do que na raiz. Na porção coronária do dente maduro, os odontoblastos apresentam-se dispostos em paliçada, contendo de três a cinco células de profundidade. A morfologia dessas células reflete a sua atividade funcional e varia de uma fase ativa de síntese a uma de repouso. Uma célula ativa pode ser observada apresentando um

núcleo evidente, citoplasma muito basófilico e uma zona de golgi proeminente. A célula em repouso é achatada, com citoplasma relativamente escasso, de acordo com microscopia óptica (TORNECK, 2001).

Graças a sua natureza tubular, os estímulos químicos aplicados à dentina podem alcançar rapidamente a polpa. A permeabilidade dentinária varia ainda de acordo com a idade do dente, o grau de mineralização dos túbulos e as modificações teciduais na dentina, por exemplo, a desmineralização causada pelas bactérias acidogênicas da placa durante o processo de cárie (AGUIAR; ARANA-CHAVES, 2007; PÉCOR, 2008).

O grau de mineralização da dentina implica em diferentes tipos distintos de dentina: peritubular e intertubular. A dentina peritubular circunda os túbulos dentinários. Apresenta menor conteúdo de colágeno e maior concentração mineral do que a dentina intertubular, devido à atividade odontoblástica contínua ao seu redor. A dentina intertubular localiza-se entre os anéis de dentina peritubular e compõem a massa dentinária propriamente dita. Apesar do seu alto grau de mineralização, é rica em matriz orgânica composta de fibras colágenas envolvidas por substância amorfa (PEREIRA et al., 2005).

A presença de fatores de crescimento é importante, na matriz dentinária. A sua liberação, durante procedimentos clínicos ou como resultado da progressão de lesões cariosas, pode atuar como moléculas de sinalização de reparo. A identificação dessas moléculas destaca a relação íntima entre o comportamento celular da polpa e da matriz dentinária. Os fatores de crescimento estão relacionados com a mediação das respostas pulpares a injúrias, preparos cavitários e procedimentos restauradores (MJÖR; FERRARI, 2002; SMITH, 2003).

2.2 Cariologia e histopatologia da cárie

A cárie caracteriza-se por ser uma doença infecto-contagiosa, oportunista, de caráter multifatorial, fortemente influenciada pelos carboidratos da dieta e pela ação dos componentes salivares. Resulta na perda localizada de miligramas de minerais dos dentes afetados, causada por ácidos orgânicos provenientes da fermentação microbiana dos carboidratos da dieta (WEYNE; HARARI, 2002; BUSATO, 2005; LIMA, 2007). As destruições, localizadas nos tecidos duros (esmalte, dentina e cemento), representam os sintomas da doença (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1988). A lesão cariiosa é geralmente vista como um processo exclusivamente destrutivo das estruturas dentárias. O processo representa em parte a proliferação bacteriana e destruição dos tecidos e, por outro lado, pela reação do complexo dentinopulpar ao ataque da lesão (MONDELLI, 1998).

A teoria quimioparasitária, teoria da placa não-específica, proposta por Miller em 1890, começou a ser cientificamente contestada a partir da década de sessenta (60). Estudos posteriores mostraram que certas placas são odontopatogênicas e outras não, independentemente da sua quantidade, teoria da placa específica, (LOESCHE, 1979; LOESCHE, 1986). As bactérias cariogênicas do biofilme são simultaneamente acidogênicas e acidúricas, produzem ácido e continuam executando seu ciclo vital nesse ambiente de pH crítico (abaixo de 5,7). Entre os microrganismos cariogênicos, os “estrategistas de pH”, estão principalmente o *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (KLEIN et al., 2004; FRANCO et al., 2007). Presentes, também, certos lactobacilos, como o *Lactobacillus casei*, usualmente encontrado nas lesões de cáries que apresentam cavitação e o seu número na saliva, geralmente, mantém uma correlação positiva com a experiência de cárie, especialmente em termos de grupos de pessoas. O *Actinobacillus viscosus* está relacionado

com a cárie radicular (WEYNE; HARARI, 2002). A infecção precoce pelo *S. mutans* aumenta significativamente o risco de ocorrência de lesões cariosas na dentina de dentes decíduos, sendo que a origem dessa colonização precoce tem forte correlação com o binômio materno-infantil (BARBOSA; MEDEIROS, 2000; BONECKER et al., 2004; GROISMAN et al., 2007).

O aparecimento de lesões de cárie é o sinal patognomônico da atividade dessa doença, que é mediada pela presença do biofilme, o qual só será considerado cariogênico se ocorrer em, durante um determinado período de tempo, interações dos fatores em condições críticas. Os fatores são classificados como fatores primários (essenciais) e secundários (moduladores). Os fatores essenciais que influenciam são: os microorganismos, o hospedeiro e o substrato (dieta). Os fatores secundários ou moduladores são: a saliva e o flúor. Com isso, o processo carioso apresenta uma dinâmica em que há períodos de remineralização e desmineralização (MALTZ, 2000; CURY, 2001; WEYNE; HARARI, 2002; ZANIN et al., 2003; MARINHO et al., 2004; CÔRREA, 2005; LIMA, 2007).

O processo carioso pode ser paralisado pela promoção de saúde, ou seja, pelo controle da dieta, uso adequado de fluoretos e hábitos de higiene oral corretos (TENUTA et al., 2003; BUSATO, 2005; CELESTE et al., 2007).

A dentina sofre todo um processo de alteração estrutural após invasão bacteriana. A lesão cariosa, que se inicia no esmalte torna-se tão desmineralizada que o tecido se quebra e invade a dentina periférica que se encontra desmineralizada (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1988).

A microbiota local produz uma variada gama de enzimas hidrolíticas com potencial para destruição dentinária, formando o que se denomina de “área de destruição”. Os túbulos dentinários localizados no centro da dentina desmineralizada encontram-se vazios e são denominados de “tratos mortos”, ou seja, sem conteúdo protoplasmático dos prolongamentos dos odontoblastos. A microbiota nessa zona de penetração é primariamente acidogênica. Entre essa zona e a dentina

esclerótica existe sempre uma desmineralização em andamento, como resultado da produção de ácidos pela massa microbiana dentro da cavidade cariosa (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1988).

A remoção completa da dentina infectada é fundamental para o tratamento das lesões cariosas e continua sendo um desafio para o cirurgião-dentista. Apesar de serem utilizados, para o diagnóstico, os critérios de coloração e/ou a dureza da dentina, são parâmetros que ainda geram controvérsias e mostram falhas para uma indicação clínica definitiva (FUSAYAMA, 1997; BANERJEE et al., 2000a; BANERJEE et al., 2000b; PORTO et al., 2001; KID, 2004; CORRÊA, 2006; BARATA, 2007).

Baseando-se nessas dificuldades, desde a década de 70 estudos, vêm buscando analisar de forma detalhada as camadas dentinárias que sofreram a ação da cárie. Fusayama & Ohgushi (1975) realizaram uma análise histopatológica, através da microscopia eletrônica de varredura, da 1.^a e 2.^a camada de tecido cariado e também da dentina saudável adjacente. Observaram na camada de dentina saudável, uma substância inorgânica (matriz dentinária) presente ao redor da dentina peritubular. Na dentina intertubular, observaram numerosos cristais de hidroxiapatita com o formato de agulhas dispostos em forma de franja nas fibras colágenas. Na segunda camada, adjacente a dentina saudável, observaram a mesma substância inorgânica, na dentina peritubular, porém devido ao alargamento dos túbulos, a sua espessura está diminuída. Os cristais de hidroxiapatita, da dentina intertubular, apresentam-se de forma semelhante à dentina saudável, contudo em menor quantidade, expondo as fibras colágenas. Na primeira camada, mais externa, os raros cristais de hidroxiapatita mostraram-se em forma de folha espalhados irregularmente na dentina intertubular. A dentina peritubular desaparece deixando os túbulos alarguecidos cheios de bactérias, porém com cristais granulados espalhados preenchendo os túbulos, total ou parcialmente, formando uma cavidade no centro dos túbulos havendo uma precipitação de cristais em forma de folhas nessa cavitação. Concluíram que, apesar da segunda camada de tecido cariado apresentar alterações histológicas

consideráveis, encontrou-se matriz orgânica e odontoblastos em atividade, diferente da camada mais externa (1.^a camada) com grande alteração histológica, apresentando necrose do tecido.

Sequencialmente a esse trabalho, Kuboki et al. (1977) avaliaram a estrutura bioquímica do colágeno das duas camadas de dentina cariada, juntamente com a dentina sadia. A dentina cariada consiste em duas camadas. A primeira, a mais externa, é totalmente descalcificada, infectada, necrótica, contendo essencialmente fibras colágenas degeneradas e não remineralizáveis. A segunda camada, abaixo da camada externa, é menos descalcificada, livre de bactérias, contendo colágeno remineralizável e prolongamentos dos odontoblastos com vitalidade. Em tal estudo, observaram-se as ligações moleculares do colágeno e a composição dos aminoácidos por microscópio eletrônico de varredura nas camadas das lesões de cárie. Concluíram que, em termos de composição de aminoácidos, a segunda camada não apresentou destruição na sua estrutura.

No entanto, houve um pequeno decréscimo de ligações intermoleculares dos aminoácidos, na segunda camada, ao se comparar com a dentina saudável. A primeira camada apresentou grande destruição de colágeno, alteração nas ligações intermoleculares e presença de hexitolizina, sacarídeo protéico relacionado ao metabolismo bacteriano. Uma das razões para que ocorra remineralização da segunda camada, é devido à presença de processos odontoblásticos não degenerados e ausência de bactérias. Nessa camada houve um decréscimo de interligações do colágeno, como já foi citado, porém houve um aumento de precursores do colágeno, em relação à camada saudável. Tais mudanças do colágeno tendem a ser uma retrogressão da forma normal em uma forma prematura, que possui um grande potencial regenerativo. Devido às características supracitadas da segunda camada de tecido cariado, a mesma tem a capacidade regenerativa, não devendo ser removida nos procedimentos clínicos (KUBOKI et al., 1977).

Os estudos de Fusayama & Ohgushi (1975) e Kuboki et al. (1977) elucidaram a histopatologia das lesões de cárie proporcionando um entendimento científico no seu tratamento.

Consequentemente, as pesquisas na área de Odontologia vêm avançando, buscando meios alternativos que preservem ao máximo a estrutura dentinária, como o da remoção químico-mecânica. Os procedimentos de instrumentos rotatórios muitas vezes levam o profissional a remover estruturas da dentina que teriam chances de sofrerem remineralização. Com isso, a dentística e a área de materiais dentários enfrentam constantes desafios na busca de produtos que ajam de forma seletiva no tecido cariado, promovendo um tratamento, atraumático, holístico e com intervenção mínima (CEDERLUND et al., 1999; FURE et al., 2000; BANERJEE et al., 2000a; BANERJEE et al., 2000b; MARAGAKIS et al., 2001; PORTO et al., 2001; SILVA et al., 2004; CORRÊA, 2006; MAGALHÃES et al., 2006; BARATA, 2007).

2.3 Remoção químico-mecânica da cárie

Desde a década de 1970, os pesquisadores vêm investigando substâncias capazes de agir quimicamente no tecido cariado. Utilizaram o hipoclorito de sódio a 5% para remover a matéria orgânica dentinária cariada, havendo remoção do tecido cariado (HABIB et al., 1975; KUROSAKI et al., 1977; SCHUTZBANK et al., 1978; GOLDMAN et al., 1987).

O hipoclorito era instável e agressivo aos tecidos saudáveis, dessa forma incorporou-se posteriormente a solução de Sorensen, a qual continha uma mistura de hidróxido de sódio, cloreto de sódio e glicina. Essa formulação inicial, denominada GK 101[®], consistia de N-monocloroglicina (NMG) e provou ser menos agressiva que o hipoclorito de sódio sozinho, tendo sido desenvolvida por Habib et al. (1975).

O GK-101[®] foi primeiro produto patenteado com a proposta de remover química e mecanicamente a cárie. Essa solução teria a capacidade de romper a organização fibrilar do colágeno, convertendo a hidroxiprolina, um aminoácido importante na estabilidade das fibras colágenas e o seu

peptídeo glicíneo, em ácido carboxílico-2 e ácido carboxiglicínico, ocorrendo um fenômeno denominado clorinação. A clorinação consiste no rompimento das ligações de Hidrogênio afetando a estrutura secundária e quaternária do colágeno (HABIB et al., 1975).

O teste inicial para avaliar a efetividade do NMG foi realizado por Kronman et al. (1977) em colágeno de tendões bovinos. Observou-se que a solução causava diferentes níveis de degradação do colágeno.

Sequencialmente, o FDA aceitou comercialmente o Caridex[®], também com o nome de GK-101E[®]. Nesse produto o N-monocloroglicina, foi substituído pelo ácido-aminobutírico-3N-monocloro-DL-2 (NMAB) (MARAGAKIS et al., 2001).

Segundo Kurosaki et al. (1977), Schutzbank et al. (1978), Goldman et al. (1987) o GK-101[®] e o GK-101E[®] (Caridex[®]) a 37°C apresentavam a capacidade de remover a dentina cariada satisfatoriamente quando comparados ao grupo controle (solução salina).

Roth et al. (1989) avaliaram a eficácia do Caridex[®] na remoção de tecido cariado em trinta e sete (37) dentes extraídos. O sistema Caridex[®] envolvia um aparato com um aparelho aquecedor, para deixar o material na temperatura de 37°C, mais uma peça de mão para a remoção do tecido cariado. O produto permanecia na cavidade por 30 segundos e em seguida o tecido cariado era removido com uma peça de mão. Os elementos dentários eram lavados com peróxido de Hidrogênio, secos e macroscopicamente examinados. Os dentes foram fixados em formol a 10%, longitudinalmente seccionados, e utilizado azul de toluidina para coloração. Foi realizado exame histopatológico com microscopia óptica. Macroscopicamente, apenas dois elementos dentários (5,4%) estavam livres de cárie e a análise histológica demonstrou apenas 4 elementos (10,8%) estavam sem cárie, mostrando haver diferença entre as duas análises. Baseando-se nesses dados, concluíram que o sistema Caridex[®] não produzia os efeitos adequados e não havia remoção químico-mecânica do tecido cariado suficiente.

Em 1990, a empresa sueca Medi-Team lançou um novo produto, o Carisolv[®], um sistema químico-mecânico de remoção da cárie com preservação máxima do tecido dental sadio (PORTO, et al., 2001; MEDI-TEAM, 2005). Foi desenvolvido a partir do Caridex[®], porém dispensando o uso de máquinas e aquecimento, utilizando-se em pequeno volume. Apresenta-se na forma de gel e foi desenvolvido para ser usado com instrumentos não cortantes. O Carisolv[®] é composto por dois géis à base de carboximetilcelulose: um gel vermelho contendo 0.1 M de aminoácidos (ácido glutâmico, leucina e lisina), NaCl, NaOH, eritrosina; e o segundo gel incolor contendo hipoclorito de sódio (NaCl a 0,5%). Após a mistura o gel resulta, quimicamente, na formação de outro produto, a cloramina. A cloramina é composta pela combinação de hipoclorito de sódio e aminonitrogênio, tornando o efeito do hipoclorito menos agressivo e mais prolongado (TONAMI et al., 2003). O gel é preparado em duas partes iguais, levado à lesão cariada e deixado por 30 a 60 segundos e posteriormente remove-se o tecido cariado com curetas sem corte. A solução tem um pH em torno de 11 e supõe-se que as diferentes cargas elétricas reajam diferentemente na dentina favorecendo o processo de cloração (BANERJEE et al., 2000b; PORTO et al., 2001; MEDI-TEAM, 2005).

O sistema Carisolv[®] não necessita de todo o aparato mecânico presente no Caridex[®], utilizam-se apenas curetas não cortantes, que fazem uma suave escavação na cavidade. De acordo com o fabricante, o gel durante a escavação torna-se turvo devido à dentina dissolvida. A superfície é considerada sem cárie quando o gel mostra-se claro (CEDERLUND et al., 1999). A maior diferença entre o sistema Caridex[®] e Carisolv[®] é que o ácido aminobutírico foi substituído por três aminoácidos: ácido glutâmico, lisina e leucina (FURE et al., 2000).

Ericson et al. (1998) concluíram que os aminoácidos atenuam o efeito tóxico do hipoclorito, fazendo com que o Carisolv[®] aja de forma seletiva não alterando a dentina sadia e promovendo o efeito da cloração no colágeno do tecido cariado.

Cederlund et al. (1999) avaliaram *in vitro* a efetividade do Carisolv[®]. Foram utilizados dez (10) elementos cariados extraídos (molares), devido à extensa presença de cáries, nove (9) dos dez (10) elementos estavam com comprometimento pulpar. A solução do Carisolv[®] foi utilizada de acordo com as instruções do fabricante. Após a sua aplicação observaram que a superfície dentinária de todas as amostras estavam sem lesão de cárie. Na microscopia eletrônica de varredura observaram a superfície dentinária com aparência de “ondas”, recoberta por uma homogênea camada de *smear layer* (lama dentinária). Na microscopia óptica observaram infiltrado bacteriano discreto, em seis (6) elementos dentários, nos dentes com remoção de cárie.

Um estudo *in vivo* avaliou a eficiência, o tempo de remoção da cárie e a aceitação do paciente frente ao Carisolv[®]. Estipularam um estudo de grupo controle, contendo trinta e oito (38) pacientes com um total de sessenta (60) lesões cariosas radiculares primárias. Em trinta e quatro (34) lesões utilizou-se o Carisolv[®] e vinte e seis (26) a alta rotação para a remoção do tecido cariado. As lesões incluídas nesse estudo eram primárias, radiculares, com pelo menos 2 mm de diâmetro, não apresentavam envolvimento pulpar e nenhuma alteração patológica periapical de acordo com os exames radiográficos. Das trinta e quatro (34) cavidades que receberam o tratamento com Carisolv[®], apenas quatro (4) solicitaram anestesia. No grupo de alta rotação, seis (6) cavidades das vinte e seis (26) solicitaram anestesia; doze (12) pacientes, do mesmo grupo, que não utilizaram anestesia queixaram-se de algum tipo de dor durante a remoção do tecido cariado. No entanto, as demais cavidades do grupo do Carisolv[®] não relataram dor na remoção do tecido cariado. Os elementos dentários envolvidos no estudo receberam um acompanhamento após um ano, onde foram avaliados os seguintes critérios: responderam aos testes de vitalidade pulpar positivamente e apresentavam boa adaptação das restaurações. Os autores concluíram que as restaurações apresentavam boas condições clínicas após um ano, tanto no método rotatório de remoção da cárie, como no método químico-

mecânico com o Carisolv[®]. A maior aceitação do tratamento por parte dos pacientes foi no método do Carisolv[®] (FURE et al., 2000).

O método de remoção químico-mecânica da cárie mostrou ser o mais seletivo e preservador da estrutura dentária, de acordo com Banerjee et al. (2000a). Foram avaliados *in vitro* dois critérios importantes: a efetividade (remoção adequada do tecido cariado) e eficiência (tempo) de cinco métodos de remoção do tecido cariado. As técnicas avaliadas foram: escavação mecânica manual (curetas), baixa rotação, jato de alumínio (alumina+hidroxiapatita), ultrassom e remoção químico-mecânica (Carisolv[®]).

Para a avaliação do tecido dentinário cariado utilizaram a microscopia eletrônica de varredura. Em termos de eficiência (tempo) foram classificados: 1º. baixa rotação; 2º. remoção manual; 3º. ultrassom; 4º. jato de alumínio e, por último, o Carisolv[®]. Em termos de efetividade (seleção de remoção adequada do tecido cariado), o método de remoção química mostrou ser o mais efetivo devido a sua seletividade e adequação na formação do preparo cavitário, conforme a microscopia eletrônica de varredura. A baixa rotação tende a remover mais tecido que necessário, já o ultrassom tende a não remover todo o tecido cariado necessário. Concluíram que, em termos de qualidade do preparo e remoção adequada do tecido cariado o método químico-mecânico é o mais adequado (BANERJEE et al., 2000a).

Pinheiro et al. (2004) investigaram clinicamente e em microscopia eletrônica de varredura, a morfologia dentinária após a remoção de tecido cariado, em molares decíduos, utilizando três métodos: alta e baixa rotação, tratamento restaurador atraumático (TRA) e remoção químico-mecânica (Carisolv[®]). Cada grupo era formado por três crianças com lesões de cárie oclusal, sem comprometimento pulpar. No grupo dos instrumentos rotatórios a remoção foi repetida até que a dentina não se apresentasse corada, após evidenciação. A dentina remanescente foi esfarelada com uma broca e coletada com cureta para posterior observação. No grupo do TRA, a dentina infectada

foi removida com cinzéis e curetas afiados e, posteriormente, coletada com o auxílio de um aparelho coletor (*micropunch*). No grupo do Carisolv[®] a dentina infectada foi removida de acordo com as instruções do fabricante e a remanescente coletada com o *micropunch*. Observou-se que no grupo da alta e baixa rotação a dentina remanescente apresentou uma coloração branca, firme, com organização de túbulos dentinários e ausência de contaminação bacteriana. No grupo do TRA observou-se a preservação da dentina afetada com coloração marrom-escura, manutenção dos prolongamentos odontoblásticos, organização dentinária peritubular e intertubular, e pequena contaminação bacteriana. No grupo do Carisolv[®], houve manutenção parcial da dentina afetada, ausência de prolongamentos odontoblásticos e pequena contaminação bacteriana.

Com o intuito desenvolver um produto de custo inferior ao Carisolv[®], em 2003, Silva et al. (2005) testaram a citotoxicidade *in vitro* do novo biomaterial, o Papacárie[®]. Foram avaliadas diferentes concentrações de papaína em culturas de fibroblastos (2, 4, 6, 8 e 10%) e concluiu-se que em qualquer concentração da enzima o produto é biocompatível. Após realização da fase 1 de estudos *in vitro* e resultados efetivos nesses testes, lançaram uma fórmula devidamente aprovada pela ANVISA e com patente nacional e internacional para ser utilizada na remoção químico-mecânica da cárie. A fórmula consiste de cloramina, papaína, azul de toluidina, sais, conservantes, espessante e veículo qsp (GUIA ODONTO, 2005).

A composição do produto visa à ação sinérgica da papaína e da cloramina no amolecimento da porção necrosada do tecido cariado, facilitando a sua retirada e preservando a dentina sadia e a camada dentinária passível de remineralização. A papaína interage com o colágeno parcialmente degradado do tecido necrosado da lesão da cárie provocando um amolecimento adicional de tal tecido. A ação proteolítica dá-se apenas no tecido necrosado, pois tecidos sadios contém alfa-1 anti-tripsina, uma antiprotease que impede a ação de enzimas proteolíticas (BUSSADORI et al., 2005; SILVA et al., 2005).

Assim, a dentina não necrosada, com a possibilidade de regeneração, é preservada pelo produto que atua somente nas fibras colágenas desnaturadas, seja pela ação proteolítica da papaína, e pela ação da cloramina, onde ocorre a cloração (SILVA et al., 2004; GUIA ODONTO, 2005).

Não há necessidade do uso de nenhum instrumento especial para a utilização do produto: a dentina amolecida é retirada por raspagem com cureta comum, sem corte, de maneira que apenas a dentina amolecida e o gel sejam retirados e a dentina sadia seja preservada, sem ser cortada pelo instrumento (GUIA ODONTO, 2005; BUSSADORI et al., 2005).

Supondo que o Papacárie[®] possa ter uma ação tóxica na polpa, por meio de seu uso em cavidades profundas e contato pulpar direto, Miyagi et al. (2004), avaliaram a citotoxicidade do produto em linhagem de fibroblastos pulpaes humanos. As células foram submetidas ao contato direto (meio de cultura), por meio de lamínulas de vidro contendo o produto. Para simular o contato indireto, as células foram submetidas à ação sobre o meio de cultura previamente condicionado pelo Papacárie[®]. No contato direto o biomaterial apresentou citotoxicidade por 50 segundos. No contato indireto, não houve citotoxicidade nas células cultivadas. Os autores enfatizaram a importância de outros estudos para identificação do componente do gel responsável pela citotoxicidade.

Bortoletto et al. (2004) avaliaram a capacidade antimicrobiana do Papacárie[®], por técnica de difusão em ágar. Utilizaram cinco placas de Petri, de 20x100mm contendo 15 mL de meio de cultura BHI-ágar acrescidos de 300 mL de suspensão de *Streptococcus mutans* previamente cultivados a 37°C por 24 horas por microanaerofilia, com turvação semelhante ao número 3 da escala de Mac Farland. Em cada placa foram confeccionados seis poços removendo-se o meio de cultura BHI-ágar, com canudos plásticos. Inseriu-se o Papacárie[®] alternadamente com clorexidina a 1% (controle positivo) com seringas de insulina até o preenchimento do poço. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por duas horas, para pré-difusão do material, que foi posteriormente incubado

por 24 horas a 37°C. O halo de inibição foi medido com paquímetro digital. Constatou-se que no biomaterial não houve presença de halo inibitório e o controle positivo apresentou uma média de 9,75mm. Concluíram que, embora haja na sua composição material bactericida, o Papacarie[®] não apresentou *in vitro* atividade antimicrobiana para o *S. mutans*, porém este resultado não é considerado um aspecto negativo do produto, pois a sua aplicabilidade é relativa à remoção químico-mecânica do tecido cariado.

A aceitabilidade e o efeito do Papacarie[®] foram avaliados em um estudo em humanos. Foram realizados duzentos e setenta (270) procedimentos, dos quais noventa e dois (92) contemplaram a aplicação do gel sem anestesia local. Observaram a fácil utilização do produto pelos profissionais e a grande acessibilidade pelos pacientes. Concluíram que a técnica apresenta resultados positivos, promovendo a melhoria da qualidade de vida da população de forma simples e econômica, favorecendo regiões distantes dos centros urbanos desprovidas de recursos tecnológicos (MOTTA et al, 2004).

Goldberg & Keil (1989) investigaram a remoção da dentina cariada por enzimas bacterianas. Conseguiram com sucesso remover o tecido cariado dentinário usando enzimas da bactéria *Achromobacter collagenase*, a qual não afetou a camada saudável da dentina. Porém, não foram encontrados estudos posteriores utilizando tal metodologia.

Em 1996, utilizou-se a enzima pronase, uma enzima proteolítica não específica originária do *Streptomyces griseus*, para remoção do tecido cariado. Contudo, a sua efetividade na remoção do tecido cariado não foi comprovada, sendo necessários novos estudos para validação dessa técnica (BANERJEE et al., 2000b).

2.4 Remoção mecânica da cárie

O alto custo de um tratamento odontológico representa um desafio à Odontologia moderna. Baseando-se nesses paradigmas surgiu o Tratamento Restaurador Atraumático (TRA), visando à remoção manual (mecânica) do tecido cariado com curetas ou cinzéis com corte e posterior fechamento da cavidade com material restaurador, como o cimento ionômero de vidro (FRENCKEN et al., 1996; FRENCKEN et al., 1997).

O TRA foi idealizado, inicialmente, para ser aplicado em campos de refugiados, em países subdesenvolvidos, onde a exodontia seria a única opção de tratamento. Caracteriza-se pelo baixo custo, pode ser realizado em locais sem energia elétrica, pois dispensa a utilização de motores de alta e baixa rotação (FRENCKEN et al., 1997; BAÍA; SALGUEIRO, 2000; SAKAMOTO; MIOMAZ, 2001; MANDARI et al., 2003).

A técnica vem apresentando resultados clínicos satisfatórios em vários países, inclusive no Brasil e sua aplicação estende-se, atualmente, aos consultórios odontológicos particulares e na rede pública por seu caráter atraumático (PHANTUMVANIT et al., 1996; FRENCKEN et al., 1996; RAMOS et al., 2001; VONO et al., 2003; BARATA, 2007).

O TRA se enquadra perfeitamente no conceito atual de tratamento odontológico, que se baseia na prevenção e interceptação precoce do processo de cárie através do uso do fluoreto nas suas diferentes formas, e, quando necessário, em uma intervenção o mais conservadora possível, preservando mais estrutura dentária sadia (CEFALY et al., 2005; PORDEUS et al., 2006).

O inconveniente do TRA refere-se à fadiga muscular causada pela tensão muscular durante a curetagem dentinária, levando muitas vezes à remoção ineficaz, podendo ser deixado tecido infectado cariado na cavidade. Pode-se observar essa situação, no setor público, onde a demanda de pacientes é muito grande, dificultando a aplicação do TRA com eficácia (AMERONGEN, 1996).

2.5 Carboximetilcelulose

A formulação farmacêutica gel é largamente utilizada em produtos tópicos ou cosméticos, devido a sua capacidade de absorção de água. O carboximetilcelulose de sódio (CMC) é um polímero aniônico, derivado de celulose, solúvel em água. Na indústria farmacêutica pode ser utilizado em xaropes, suspensões, comprimidos, cremes e pomadas. Suas funções são a de agente de suspensão, agente estabilizante, espessante, formador de filme; promovendo a emulsão dos componentes. Fisiologicamente inerte, sem valor calorífico e apresenta compatibilidade com a glicerina. O CMC pode ser usado em: creme dental, gel e loções. A estrutura química do CMC é caracterizada por ser um polímero derivado da celulose, obtido pela seguinte reação:

As figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, as estruturas da celulose e do CMC.

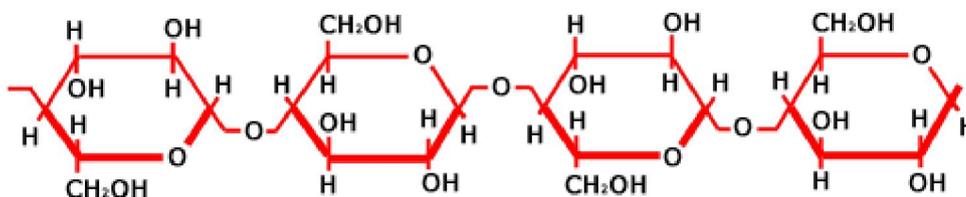


Figura 1 – Estrutura da celulose, destacando-se a unidade de anidroglicose.

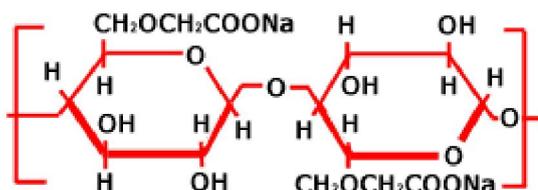


Figura 2 - Estrutura idealizada do CMC.

Observando-se as estruturas da celulose e do CMC verifica-se que o CMC é obtido pela substituição dos Hidrogênios das hidroxilas da celulose por grupos carboximetil ($\text{ClCH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$). O número médio de hidroxilas substituídas por unidade de anidroglicose é denominado Grau de Substituição (DS). Nesse caso, a figura 2 representa um CMC com DS 1,00. Considerando outro exemplo, se o DS de determinado CMC é 0,7 isso significa que temos, em média, sete grupos carboximetil por dez unidades de anidroglicose (DENVERCOTIA, 2005).

O CMC de grau purificado apresenta-se como um pó branco levemente amarelado, higroscópico, inodoro, insípido e não tóxico. É facilmente solubilizado em água e sua solução é incolor, podendo em função do tipo apresentar um certo nível de turbidez. O pH da solução situa-se na faixa de 6,5 a 8,5. Tais características tornam esse composto ideal para a elaboração de um fitoterápico na forma de gel (PAES, 2004; ALENCASTRE et al., 2006).

O CMC foi o veículo escolhido para ser incorporado ao extrato liofilizado de bromelina, devido às características supracitadas e os estudos demonstrarem a sua utilização no Carisolv[®] e Papacárie[®] (BANERJEE et al., 2000b; GUIA ODONTO , 2005).

2.6 Bromelina

Enzimas são moléculas orgânicas presentes nas células de organismos vivos com a função específica de catalisar reações químicas (FERREIRA, 2007). A bromelina é uma enzima proteolítica presente na polpa, talo, caule, casca, coroa e folhas do abacaxizeiro *Ananas cosmosus* (L) Merrill. Planta pertencente à família botânica *Bromeliaceae*, que compreende aproximadamente 46 gêneros e cerca de 1.700 espécies de plantas herbáceas, epífitas e terrestres. O fruto, parte comestível e

comercializável, representa apenas 22,5% do abacaxizeiro, sendo 77,5%, restantes compostos por folhas, caules, raízes consideradas resíduos agrícolas. Tais resíduos agrícolas possuem uma composição química rica, destacando-se em altos teores de amido, proteína e enzimas proteolíticas (bromelina). A bromelina é encontrada em todas as partes do abacaxizeiro e também em várias espécies da família *Bromeliaceae* (PIZA et al., 2002).

O Brasil tem uma grande produção de abacaxi, com mais de 700 mil toneladas anuais, perdendo no início dos anos noventa (90) para os países da Ásia. As principais plantações brasileiras encontram-se nos estados da Paraíba, Minas Gerais e São Paulo. Apesar de manter uma área de cultivo bem maior que a dos outros produtores, o Brasil não detém totalmente as técnicas que permitem a alta produtividade dos abacaxizais asiáticos. Basicamente, no Brasil são cultivadas as variedades tipo Pérola, *Smooth Cayenne* e Havaiana (WIKIPEDIA, 2008).

No estado do Amazonas o fruto é cultivado durante todo o ano sendo o município de Itacoatiara, em especial Novo Remanso (BR-010, Km 165), a maior produtividade de todo o Estado. O município produziu 24.600 frutos com uma área plantada de 1.600,00 (ha) no período de janeiro a julho de 2006. No total, no estado do Amazonas existem 5.890 produtores, com 4.999,75 (ha) de área plantada, com uma produção de 46.430,00 frutos dentro do período citado (IDAM, 2006).

O perfil do mercado externo brasileiro de enzimas entre os anos de 1998 a 2005 foi traçado por meio da análise de dados relativos aos produtos com o código NMC (Nomenclatura Comum do MERCOSUL). A cada enzima ou produto que contém enzimas corresponde um código NCM, específico de oito dígitos, a numeração da bromelina é 3507.90.22. No ano de 2005, o Brasil importou 21.848,00 de dólares (US\$) de bromelina e no mesmo ano não houve exportação (BON et al., 2008).

A bromelina tem apresentado inúmeras aplicações na indústria de alimentos: no amaciamento de carnes, fabricação de pães e biscoitos, clarificação de cerveja, refinação de óleos e gorduras,

curtição de couro entre outras (FREIMAN; SABAA-SRUR, 1996; FREIMAN; SABBA-SRUR, 1999; PIZA et al., 2002; CESAR, 2005; CAMPOS, 2007).

Na Medicina e na indústria farmacêutica são inúmeras as aplicações. A bromelina tem demonstrado ter um potente efeito anti-inflamatório, ação mucolítica em queimaduras, efeito na solubilização de mucos, sendo já utilizado no Brasil na forma de um xarope fitoterápico com efeito mucolítico (VENTURA et al., 2006). É um potente anti-agregante plaquetário, estimulador imunológico e promove o aumento de absorção de outras drogas. Estudos *in vitro* demonstram uma ação anticancerígena e ação fibrinolítica entre outras (KELLY, 1996; MAURER, 2001; HALE et al., 2005).

A bromelina é uma protease do tipo cisteína, é uma proteína ácida oligossacarídea composta por moléculas ligadas covalentemente na cadeia peptídica, apresentando peso molecular de aproximadamente 35.000 daltons. Possui um grupo sulfidril reativo que é essencial a sua atividade catalítica (VENTURA et al., 2006).

O seu mecanismo de ação proteolítica é baseado na hidrólise de proteínas em oligopeptídeos e aminoácidos. As proteases clivam as ligações peptídicas por ataque nucleofílico. Quando a sua fração proteolítica é purificada e extraída o resultado é uma potente atividade proteolítica *in vitro*. Oito subfrações proteolíticas da bromelina do talo foram detectadas. As duas maiores foram F4 e F5 e a mais ativa foi a F9, a qual compõe 2% do total das proteínas. É estimado que 50% das proteínas em F4 e F5 são glicosiladas e a F9 é não glicosilada, o que teoricamente justificaria seu maior potencial proteolítico. O pH ótimo de F4 e F5 é entre 4.0 e 4.5 e o de F9 é próximo ao neutro. O extrato completo de bromelina mostra atividade de pH 4,5 a 9,8 (KELLY, 1996). Além da bromelina, existem duas proteases do tipo cisteína no talo do abacaxizeiro: a ananina e a cosmosina, porém a protease em maior quantidade consiste na bromelina (ROWAN et al., 1990).

Atualmente, a bromelina comercial é obtida tanto do fruto como de outras partes do abacaxizeiro, é preparada pela centrifugação do extrato, ultrafiltração e liofilização. O processo resulta em um pó amarelo, cuja atividade enzimática pode ser determinada em diferentes substratos como a caseína, gelatina ou tripeptídeos cromogênicos. Em solução aquosa a bromelina rapidamente se deteriora por autodigestão (MAURER, 2001).

Com o avanço da área de enzimologia, surgiram várias técnicas de extrações de enzimas. As técnicas baseiam-se, principalmente, no poder de precipitação das substâncias albuminóides por sais e solventes orgânicos como o sulfato de amônio, álcool etílico, metanol, isopropanol e acetona. A acetona é o precipitante mais conveniente na preparação industrial, pois a mesma é recuperada, destilando-se o sobrenadante resultante da centrifugação (FREIMAN, 2001).

Greenberg & Winnick (1940) precipitaram a bromelina do suco de abacaxi filtrado pela adição de cloreto de sódio, sulfato de amônio, acetona e álcool, no entanto esse processo foi considerado dispendioso na época, pelo elevado custo de recuperação dos agentes de precipitação e baixo rendimento de bromelina.

Rojahn & Giral (1942) realizaram uma associação de dois agentes precipitantes, o sulfato de amônio e a acetona, adicionando nessa mistura, para evitar a oxidação da enzima e ao mesmo tempo ativá-la, o cianeto de sódio durante a operação de extração.

Omar et al. (1978) promoveram a obtenção da enzima extraída da polpa da fruta prensada e filtrada em gaze de algodão, pela adição de sulfato de amônio até a saturação, após ajustar o pH do extrato para 6.0. A purificação parcial foi conduzida pela dissolução da enzima bruta em cianeto de sódio e nova precipitação foi feita, primeiramente pelo uso de sulfato de amônio e completada com acetona. O precipitado foi lavado com acetona e desidratado sob vácuo. Para a enzima do talo do abacaxi, os autores primeiramente obtiveram o extrato por prensagem e filtração, por meio de gaze de algodão, e posteriormente, foi adicionada acetona ao extrato e o precipitado formado foi

descartado. Em seguida, a acetona foi novamente adicionada ao sobrenadante, precipitando a fração principal da enzima que foi coletada por centrifugação. A enzima foi lavada com acetona e dietil-éter e desidratada a vácuo.

Dev & Ingle (1982), na Índia, patentearam um processo de extração de bromelina a partir de frutos, com o auxílio de solução dibásica de fosfato de sódio ou potássio ou solução tampão de fosfato de potássio, pH 5,5-7,5, seguida pela precipitação com álcool etílico, acetona ou *n*-butanol à temperatura de 5-15°C e secagem por pressão reduzida.

Lima & Romanelli (1977) estudaram os principais ativadores e os inibidores da enzima, a faixa de estabilidade quanto ao pH e à temperatura da bromelina obtida do fruto e do caule do abacaxi. Os principais ativadores são a L-cisteína, com um aumento de 30% da atividade com concentração de 10mM e o EDTA com apenas 7,5%. A bromelina é uma enzima que possui grupos-SH no centro ativo, sendo, portanto, inibida por compostos que reagem com esses grupos e por metais pesados. Os inibidores empregados foram: o cloreto de mercúrio, ácido 5-5 ditiobis-2-nitrobenzóico, ácido iodoacético e ácido sórbico. O cloreto de mercúrio mostrou ser o inibidor mais eficiente da atividade proteolítica. Quanto à estabilidade térmica, a 25°C a bromelina mostrou ser estável durante 1 hora, ao passo que a 60°C sua meia vida foi de 15 minutos. A temperatura ótima de atividade da enzima é de 50°C.

Freiman & Sabaa-Srur (1999) determinaram o padrão de aminoácidos de bromelinas extraídas das várias partes do abacaxizeiro (casca, folha, caule, coroa e polpa), com duas precipitações subseqüentes, utilizando-se como agente precipitante, o etanol p.a. O processo utilizado possibilitou obter dentre as várias partes da planta estudada, o maior teor de proteínas para a bromelina da coroa (23,26%), na 1.^a precipitação quando comparada com a bromelina comercial (45%), com diferença significativa entre as duas extrações.

Em vários aspectos a produção de bromelina, a partir das partes não comestíveis do abacaxi, poderia ser um exemplo clássico de um subproduto ideal. O pico de coleta dos resíduos ocorre quando a colheita do fruto já está geralmente reduzida. Assim, parte do pessoal e equipamento destinado ao transporte da fruta poderia também ser utilizado no transporte dos resíduos agroindustriais, otimizando o uso da mão de obra para a redução dos custos. As plantações de abacaxi são culturas altamente padronizadas que se desenvolvem em áreas sujeitas às variações climáticas mínimas. Para o comprador dessa enzima, tal dado é muito importante, pois assegura um fornecimento constante e uniforme da enzima a um custo relativamente estável (PARK, 2001).

2.7 Liofilização

O processo de liofilização é o ideal para preservação da atividade proteolítica da bromelina (LIMA; ROMANELLI, 1977). Por ser uma protease de origem vegetal, a mesma sofre autodigestão perdendo sua atividade proteolítica. A liofilização evita a autodigestão, devido à diminuição do índice de água na enzima. O resultado é um pó branco ou amarelo conservando as características citadas (MAURER, 2001).

A liofilização é um processo de desidratação usado tipicamente para preservar um material perecível ou tornar o material mais conveniente para o transporte, pois congela o material reduzindo a pressão circunvizinha permitindo que a água congelada sublima diretamente da fase líquida ao gás. O índice de água extremamente reduzido inibe a ação dos microorganismos e de outras enzimas que normalmente estragam ou degradam a substância. Se uma substância desidratada por tal processo for selada para impedir a reabsorção da umidade, ela pode ser armazenada na temperatura ambiente sem refrigeração, e estará protegida da degradação por muitos anos (GUERRA et al., 2004; ASSUNÇÃO DA SILVA, 2006).

As soluções líquidas desidratadas por esse processo podem ser reidratadas (reconstituídas) muito mais rapidamente e facilmente porque deixam poros microscópicos no pó resultante. Os poros são criados pelos cristais de gelo que sublimaram, deixando aberturas ou poros em seu lugar. Isso é especialmente importante quando o uso é farmacêutico. A liofilização aumenta também a vida útil das drogas por muitos anos (GARCIA et al.,2007).

3. METODOLOGIA

3.1 Modelo de Estudo

Delineamento: estipulou-se um estudo prospectivo, primário, experimental, com delineamento do tipo farmacológico pré-clínico.

3.2 Obtenção e Extração da Bromelina

3.2.1 Matéria prima

Foram utilizadas partes do abacaxizeiro (cascas), aproximadamente 3 kg do tipo Perola, *A. comosus*.

3.2.2 Coleta das partes do abacaxizeiro

Os abacaxis foram adquiridos em uma plantação no município de Novo Remanso (Am), Km 174 da Br- 010 (Manaus-Itacoatiara). As cascas do abacaxizeiro foram provenientes sempre do mesmo lote semanal. Os frutos foram lavados, descascados e as cascas congeladas em freezer a -18°C , por 24 horas (figura 3) (FREIMAN; SABBA-SRUR, 1996).

3.2.3 Processo de extração da enzima

O método utilizado foi o descrito por Freiman & Sabaa-Srur (1996). No primeiro dia, as cascas congeladas foram centrifugadas, sequencialmente o extrato bruto foi filtrado e incorporado a solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na proporção 1:1 a 4°C (figuras 4 a 10). A solução obtida foi centrifugada a 3.500 rpm, durante 20 minutos a 4°C , obtendo-se assim um precipitado, que foi desprezado, e um sobrenadante (figura 11). Adicionou-se sobrenadante álcool etílico comercial a 96% a 10°C na proporção de 1:1, ficando em repouso por 24 horas em geladeira a 10°C (figura 12). No 2º dia, foi centrifugado a 3.500 rpm a 4°C por 20 minutos obtendo-se o **1.º Precipitado** (figuras 13 e 14). Ao sobrenadante dessa centrifugação, foi adicionado álcool etílico a 96% na proporção 1:1 permanecendo em repouso por 24 horas em geladeira a 10°C (figura 15). No 3º dia foi centrifugado a 3.500 rpm a 4°C por 20 minutos obtendo-se o **2.º Precipitado** que foi armazenado em temperatura -10°C para ser liofilizado posteriormente (figuras 16 a 18).

3.2.4 Liofilização do Extrato de Bromelina

O processo de liofilização foi realizado no laboratório da Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Amazonas. Utilizou-se o aparelho da marca Terroni, modelo 3000

(Figura 19). O extrato liofilizado apresentou um aspecto de um pó granulado branco (Figura 20). Foi armazenado em placa de Petri estéril acondicionada em papel filme em refrigerador a 0°C (LIMA; ROMANELLI, 1977; FREIMAN; SABAA-SRUR, 1996; MAURER, 2001).



Figura 3 – Cascas do abacaxi congeladas por 24 horas.



Figura 4 – Centrífuga caseira “Fun kitchen”.



Figura 5 – Modelo Centrífuga.



Figura 6 – Centrifugação das Cascas (1.º dia).





Figura 9 – Filtração.



Figura 10 – Solução Tampão-fosfato + Extrato Bruto (1:1).



Figura 11 – Precipitado desprezado.



Figura 12 – Sobrenadante + álcool etílico 96% na proporção (1:1) com 24 horas de repouso a 10°C.





Figura 15– Sobrenadante + álcool etílico a 96% (1:1), por 24 horas (2.º para o 3.º dia).



Figura 16– Centrifugação 3.º dia.



Figura 17 – 2.º Precipitado.



Figura 18– 2.º Precipitado em placa de Petri.



Figura 19 – Liofilização do 2.º precipitado.



Figura 20 – Liofilização do 2.º precipitado.

3.3 Atividade colagenolítica em meio sólido

Para determinação da atividade proteolítica foi utilizado o colágeno solúvel como substrato. Nessa análise qualitativa o meio de cultura ágar-colágeno-leite (apêndice C) foi distribuído em placas de Petri de 15mm/100mm, formando uma camada de aproximadamente 4mm em câmara de fluxo laminar. Após solidificação à temperatura ambiente, as placas foram armazenadas sob refrigeração (4°C), por uma hora. Na superfície do ágar solidificado foram feitos orifícios, com um tubo perfurador de rolha com 8 mm de diâmetro. Cada orifício foi preenchido com 100µL do extrato enzimático formando poços (cup-plates) e incubado a 37°C durante 18 horas. Para evitar a evaporação do filtrado da cultura, as placas foram protegidas com papel alumínio durante a permanência em estufa microbiológica (TEIXEIRA et al., 1996; NEVES, 2004).

Teixeira et al. (1996) e Neves (2004) classificaram a atividade colagenolítica de acordo com o diâmetro do halo em milímetros formado ao redor do poço medindo-se pelo reverso da placa de Petri com paquímetro, conforme a tabela 1:

Atividade colagenolítica	Classificação do Halo	Diâmetro do Halo (mm)
Zero	(-)	Sem formação de halo
Baixa atividade	(+)	10-14 mm
Moderada atividade	(++)	15-20 mm
Alta atividade	(+++)	> 20 mm

Tabela 1: Classificação da atividade colagenolítica dos extratos liofilizados de bromelina pela medição do diâmetro do halo.

A escolha da metodologia foi em virtude da presença do colágeno na composição química da matriz orgânica da dentina (TORNECK, 2001; PÉCORRA, 2008). Como não foi encontrado na literatura nenhum método quantitativo utilizando o colágeno como substrato, optou-se pela determinação qualitativa de proteases pelo método de “cup-plate” descrito por Teixeira et al. (1996) e Neves (2004).



3.4 Determinação da atividade proteolítica

Para avaliação da atividade proteolítica foi aplicado um método quantitativo. O método proposto por de Kunitz (1947) no qual a caseína foi utilizada como substrato. A caseína foi dissolvida a 1% em solução tampão acetato 0,1M pH 6,0. A cada 1mL de solução de bromelina (1, 2 e 3%) foi adicionado 2 mL de caseína. Em seguida, as soluções foram incubadas a 35°C por 10 minutos, a reação foi paralizada com 5 mL de ácido TCA em cada solução, em seguida sofreram banho de gelo por 5 minutos, foram filtradas em papel Whatman n°. 41 e finalmente foi feita a leitura em espectrofotômetro

Os peptídeos solúveis foram detectados por leitura de absorbância a 280 nm. Uma unidade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto e por mL da enzima (LIMA; ROMANELLI, 1977; FREIMAN; SABAA-SRUR, 1996).

3.5 Determinação do teor de proteína presente no extrato liofilizado de bromelina.

O teor de proteína presente nas amostras de extrato liofilizado de bromelina foi determinado pelo método de LOWRY (Lowry et al., 1951).

3.6 Formulação do gel à base de carboximetilcelulose (CMC)

Foram testadas três concentrações do gel de CMC, contendo bromelina liofilizada.

O gel foi preparado na concentração previamente padronizada de 3% de CMC, em lote único de 100g, conforme a fórmula a seguir:

CMC.....3%

Metilparabeno	0,1%
Propilparabeno.....	0,1%
Glicerina.....	5%
Água destilada.....	100%

Foram utilizados os conservantes preconizados pela Farmacopéia Brasileira (1988), o metilparabeno e o propilparabeno. A glicerina foi utilizada como adjuvante.

3.7 Preparação do Gel de Bromelina

Foram testadas as concentrações de CMC a 1, 2 e 3 % introduzindo-se o gel sem a enzima na cavidade cariada com uma seringa de 3mL, com o objetivo de constatar a melhor consistência do gel dentro da cavidade dentária. O gel de CMC a 3% apresentou boa estabilidade na cavidade, as concentrações de 1 e 2% apresentaram alta fluidez escoando exageradamente para fora da cavidade dentária.

A bromelina liofilizada foi incorporada ao gel de CMC (3%) imediatamente antes da aplicação do gel nos dentes cariados extraídos, objetivando avaliar a ação proteolítica imediata da enzima. As formulações apresentam as concentrações de 1, 2 e 3% do extrato liofilizado de bromelina.

3.8 Considerações Éticas

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas, seguindo as recomendações da Res. CNS 196/96 e complementares (anexo B). Foi solicitada a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visto que os dentes

utilizados nesse projeto são produtos de descarte e estão sob a responsabilidade do diretor da instituição (anexo A).

3.9 Padronização dos elementos dentários envolvidos na análise histopatológica.

Foram escolhidos quinze (15) molares permanentes com indicação clínica prévia de exodontia, tratando-se de produtos de descarte (CEDERLUND et al., 1999; TONAMI et al., 2003).

Critérios de Inclusão: molares permanentes com dentina cariada profunda comprometendo a face oclusal, podendo estender-se as faces mesiais, distais, vestibulares e linguais, com ou sem envolvimento endodôntico (CEDERLUND et al., 1999). Os critérios foram confirmados por avaliação radiográfica digital (RVG Throphi) através da técnica do paralelismo (apêndice A) (ENNIS, 1960).

Critérios de exclusão: restos radiculares, dentes decíduos e demais elementos dentários que não sejam molares permanentes. Também foram excluídos elementos dentários com pólipos pulpar.

Grupo Controle: cada dente foi seccionado ao meio, no sentido proximal. Os lados mesiais dos molares inferiores e vestibulares dos molares superiores receberam o gel de bromelina, com a nomenclatura de lado A. Os lados distais dos molares inferiores e palatinos dos superiores receberam o gel de CMC sem a enzima, grupo controle, com a nomenclatura de lado B.

3.10 Procedência dos dentes

Os dentes extraídos foram fornecidos pelo Ambulatório Odontológico do SESI (Serviço Social da Indústria).

3.11 Seleção e Acondicionamento dos Dentes

Após a extração os dentes foram lavados em água corrente para remoção de restos orgânicos (como sangue, saliva e ligamento periodontal). Em seguida, foram armazenados individualmente em copos descartáveis imersos em solução de cloreto de sódio a 0.9%, em refrigerador a -5°C (IMPARATO, 1999; FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA, 2008). Evitou-se utilização de produtos como o hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio. Os dentes, por estarem contaminados, foram sempre manipulados por profissionais com EPIS (equipamentos de proteção individual).

3.12 Teste do gel de bromelina nos grupos de molares permanentes

Os quinze molares foram divididos em três grupos de cinco: grupo 1 (G1) recebeu o gel a 1% com o extrato liofilizado de bromelina, grupo 2 (G2) recebeu o gel a 2% e grupo 3 (G3) recebeu o gel a 3%. Cada dente recebeu um nº. de amostra, por exemplo, no grupo 1 (G1) os dentes foram enumerados de 1-5, no grupo 2 (G2) de 6-10 e no grupo 3 de 11-15, de acordo com a tabela 2:

Grupos	Nº. de amostra	Nº.do dente
G1 (1%)	1	16
	2	47
	3	46
	4	36
	5	37
G2 (2%)	6	16
	7	17
	8	37
	9	38
	10	18
G3 (3%)	11	38
	12	16
	13	47
	14	26
	15	17

Tabela 2: Distribuição dos grupos, das amostras e numeração dos elementos dentários.

Cada grupo foi posicionado em um troquel de gesso com 17 cm de comprimento e 8,5 cm de largura, com 2/3 das raízes imersas no gesso. Em seguida, os dentes foram seccionados ao meio com disco flexível diamantado marca KG, em peça de mão com refrigeração.

Os molares inferiores foram seccionados, longitudinalmente, no sentido vestibulo-lingual e os molares superiores no sentido méσιο-distal, acompanhando a anatomia radicular (figura 21).

Os géis, nas concentrações 1, 2 e 3% e o controle, foram manipulados para incorporação da enzima (figura 22 a 24), colocados em quatro seringas distintas de 3mL identificadas por cores, em um estudo mono cego.

Aplicou-se o gel do extrato liofilizado de bromelina a 1, 2 e 3% nos lados A de cada grupo (G1, G2 e G3), respectivamente por 60 segundos, e seqüencialmente removeu-se o tecido cariado com cureta sem corte da marca Duflex nº. 2, repetindo-se o procedimento por três vezes consecutivas (MEDI-TEAM, 2005). Nos lados B de cada grupo (G1, G2 e G3) aplicou-se o gel sem o extrato de bromelina utilizando o método citado, por um único operador (figuras 25 a 32).

Estipulou-se que cada grupo receberia uma numeração conforme a concentração do gel de bromelina, por exemplo:

Grupo 1 (lado A): lados mesiais de molares inferiores e/ou vestibulares dos molares superiores que receberam o gel de bromelina a 1%.

Grupo 2 (lado A): lados mesiais de molares inferiores e/ou vestibulares dos molares superiores que receberam o gel de bromelina a 2%.

Grupo 3 (lado A): lados mesiais de molares inferiores e/ou vestibulares dos molares superiores que receberam o gel de bromelina a 3%.

Grupo 1 (lado B): lados distais de molares inferiores e/ou palatinos dos molares superiores, cada uma correspondente ao seu respectivo elemento dentário do grupo 1 (lado A), receberam o gel de CMC sem bromelina.

Grupo 2 (lado B) : lados distais de molares inferiores e/ou palatinos dos molares superiores, cada uma correspondente ao seu respectivo elemento dentário do grupo 2 (lado A), receberam o gel de CMC sem bromelina.

Grupo 3 (lado B) : lados distais de molares inferiores e/ou palatinos dos molares superiores, cada uma correspondente ao seu respectivo elemento dentário do grupo 3 (lado A), receberam o gel de CMC sem bromelina.

Todos os grupos foram submetidos à análise histopatológica em microscopia óptica corados por hematoxilina e eosina para avaliação da efetividade do gel (CEDERLUND et al., 1999; YIP et al., 1999).



Figura 21 - Dentes seccionados.



Figura 22 – Manipulação do gel de bromelina a 1%.



Figura 23 – Manipulação do gel de bromelina a 2%.



Figura 24 – Manipulação do gel de bromelina a 3%.



Figura 25 - Curetagem após a aplicação do gel a 1%.



Figura 26 - Remoção do tecido cariado.



Figura 27 - Remoção do tecido cariado, após as aplicações do gel a 1%.



Figura 28 - Curetagem com o gel sem bromelina (controle).



Figura 29 - Pouca remoção de tecido cariado.

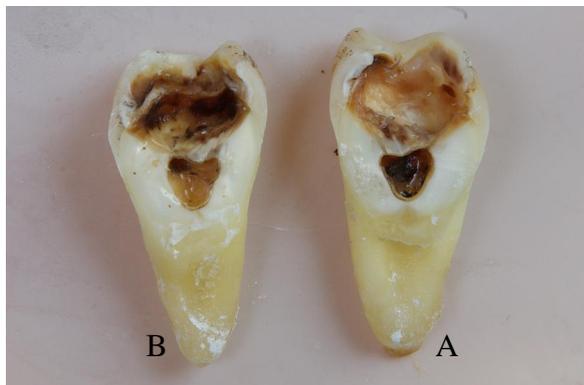


Figura 30 - Comparação dos lados (A e B).



Figura 31 – Aplicação do gel com 2 % de bromelina.

B

A

Figura 32 – Lado que recebeu o gel controle (B) e lado que recebeu o gel a 2% de bromelina (A).

3.13 Análise Histopatológica dos dentes

Os 15 (quinze) elementos dentários envolvidos no trabalho passaram pelo processo de descalcificação, por 30 dias em uma solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 30%, em suspensão em gaze, sendo trocados por uma nova solução idêntica a cada 24 horas (MORSE, 1945). Em seguida, os dentes foram lavados em água corrente por 24h, desidratados e diafinizados. Os elementos dentários foram emblocados em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo em sentido longitudinal com 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (apêndice B) . Foram obtidos cinco (5) cortes histológicos de cada lado do dente (A e B), totalizando vinte e cinco (25) cortes do lado A e vinte e cinco cortes do lado B, nos grupos (1, 2 e 3).

Foi realizada uma análise histopatológica qualitativa através da comparação dos lados A (gel com o extrato enzimático) e B (controle). Avaliou-se estatisticamente, o remanescente dentário pela presença de lesão (PL), onde não houve remoção da cárie, e ausência de lesão (AL), onde houve remoção de cárie.

Na **ausência de lesão (AL)** observou-se tecido dentinário hígido representado por prolongamentos odontoblásticos regulares e eosinófilos (figuras 33 e 34). Considerou-se também como ausência de lesão (AL) áreas com discretas linhas basófilas de permeio (Figuras 35 e 36).

Na **presença de lesão (PL)** observou-se infiltrado bacteriano basofílico, representado por áreas basofílicas de aspecto granuloso e prolongamentos odontoblásticos espessos (figuras 37 a 42).



Figura 33 – Histopatologia da dentina após remoção da cárie, apresentando ausência de lesão (AL), amostra 1, dente 16, G1.



Figura 34 – Ausência de Lesão (AL) caracterizada por prolongamentos odontoblásticos regulares e eosinófilos, amostra 1, dente 16, G1.

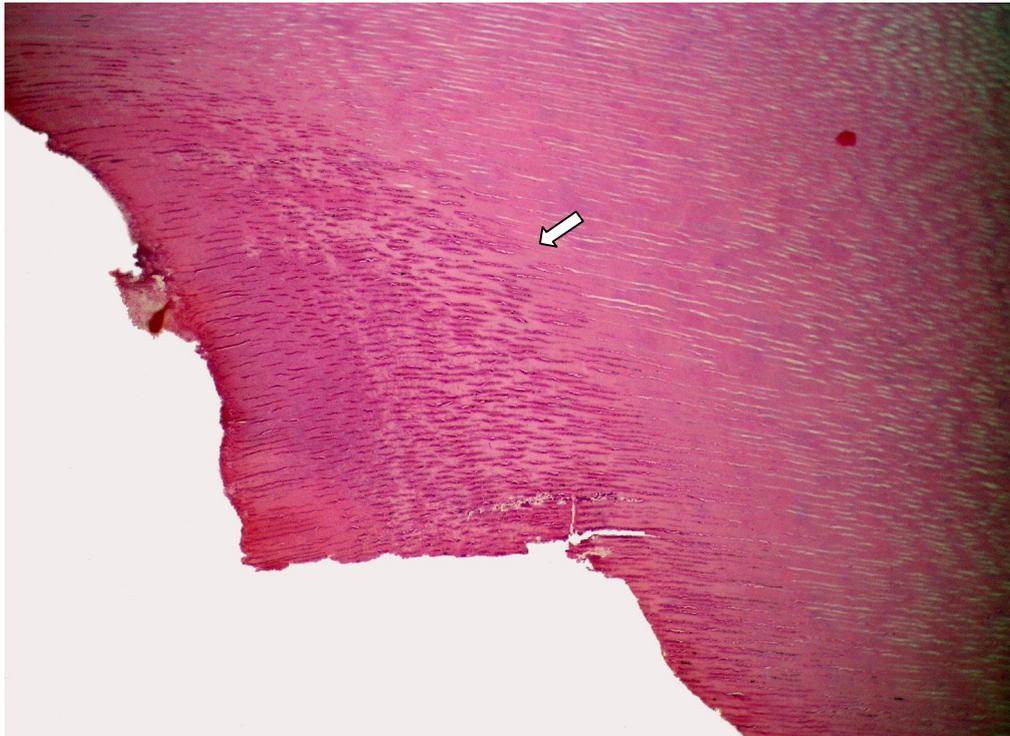
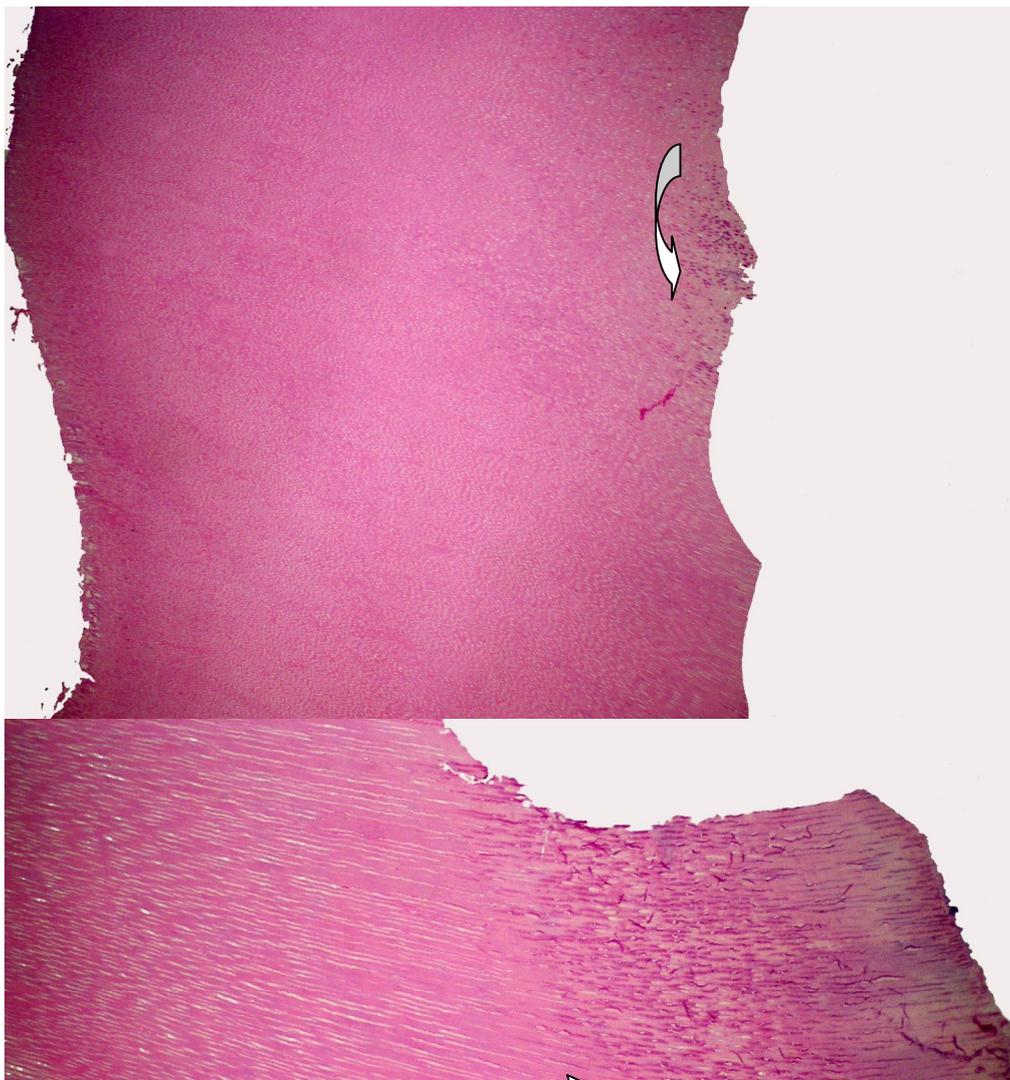
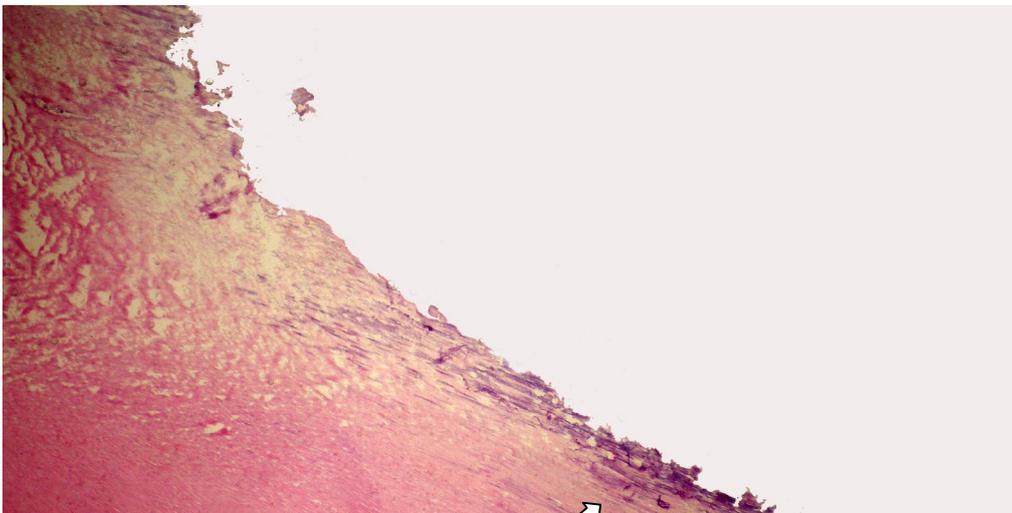


Figura 35 – Ausência de lesão (AL) com discretas linhas basofílicas de permeio e infiltrado bacteriano, amostra 4, dente 36, G1.







3.14 Análise Estatística

A amostra utilizada na análise foi composta por cinco repetições do experimento (cortes histológicos) em cinco dentes seccionados em duas partes. Indicando um total de 25 medidas do lado A e 25 medidas do lado B (controle), para cada grupo (1, 2 e 3) .

Os dados foram apresentados por meio de tabela de frequência, onde se calculou as frequências absolutas simples e relativas. Na comparação das proporções foram utilizados testes não paramétricos como o teste do *qui-quadrado* de *Pearson*, quando não satisfeitas as condições para aplicação do teste de *Pearson*, utilizou-se o teste Exato de Fisher (VIEIRA, 2004). Em caso de $p < 0,05$ rejeitou-se H_0 e quando $p > 0,05$ aceitou-se H_0 .

O software utilizado na análise foi o programa Epi-Info 3.3 for Windows (2008) desenvolvido e distribuído pelo CDC (www.cdc.org/epiinfo) e o nível de significância utilizado nos testes foi de 5%.

4.2 Determinação da Atividade Proteolítica

As soluções do extrato liofilizado de bromelina foram analisadas quantitativamente quanto a sua atividade proteolítica pelo método de Kunitz (1947), descrito no item 3.4, cujos dados estão demonstrados na tabela 4:

Soluções do extrato liofilizado de bromelina	Atividade enzimática (U/A)
Solução 1%	286
Solução 2%	387
Solução 3%	600

Tabela 4: Atividade proteolítica das soluções do extrato liofilizado de bromelina, expressa em unidade de atividade (UA).

Soluções do extrato liofilizado de bromelina	n1	n2	n3	Média	DP
Solução 1%	282	279	298	286	134
Solução 2%	392	386	383	387	46
Solução 3%	600	599	602	600	15

Tabela 5: Média e desvio padrão da atividade proteolítica dos extratos liofilizados de bromelina.

A atividade enzimática dos extratos liofilizados de bromelina variou de 288 a 600 UA (unidade de atividade), mostrando resultado superior ao do descrito por Freiman & Sabaa-Srur (1996) e Freiman & Sabaa-Srur (1999), onde a atividade enzimática da casca do abacaxi foi de 245 UA e do obtido por Lima & Romanelli (1977) que detectaram uma atividade proteolítica do caule de 132 UA. Os dados apresentados na tabela 5 indicam atividade enzimática satisfatória do extrato liofilizado de bromelina obtido nesse trabalho.

4.3 Determinação do teor de proteína.

As soluções do extrato liofilizado de bromelina foram analisadas quantitativamente quanto ao seu teor de proteína pelo método de Lowry et al. (1951) (Apêndice C), cujos resultados estão demonstrados na tabela 6 e 7:

Soluções do extrato liofilizado de bromelina	Teor de Proteínas (%)
Solução 1%	1,0%
Solução 2%	1,7%
Solução 3%	3,0%

Tabela 6: Teor de proteína das soluções do extrato liofilizado de bromelina.

O teor de proteína da solução 1% do extrato liofilizado de bromelina apresentou resultado semelhante ao da Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (2004), publicado pelo Nepa-Unicamp, cujo valor foi de 1g de proteína por 100g (1%) da parte comestível do abacaxi, mas em desacordo com o teor de 0,125 % de proteína da bromelina liofilizada do caule do abacaxi, descrito por Lima & Romanelli (1977).

Soluções do extrato liofilizado de bromelina	n1	n2	n3	Média	DP
Solução a 1%	1,1 %	1,0%	1,0%	1,0%	0.06
Solução a 2%	1,8%	1,7 %	1,8%	1,7%	0.06
Solução a 3%	3,0%	3,2%	3,0%	3,0%	0.12

Tabela 7: Média e desvio padrão da concentração de proteína do extrato liofilizado de bromelina.

4.4 Atividade específica

A atividade específica é um indicativo da pureza da enzima expressa em unidades de atividade pela concentração de proteína em grama. Os dados da atividade específica das soluções do extrato liofilizado de bromelina estão demonstrados na tabela 8 e 9:

Soluções do extrato liofilizado de bromelina	Atividade específica (UA/mg) de proteína
Solução a 1%	28,60
Solução a 2%	22,76
Solução a 3%	19,35

Tabela 8: Atividade específica das soluções do extrato liofilizado de bromelina.

Soluções do extrato liofilizado de bromelina	Atividade Colagenolítica	Unidade de atividade	Teor de Proteína (mg/proteína)	Atividade Específica (UA/mg/proteína)
Solução a 1%	Baixa (+)	286 UA	10 mg	28,60
Solução a 2%	Baixa (+)	387 UA	17 mg	22,76
Solução a 3%	Moderada (++)	600 UA	31 mg	19,35

Tabela 9: Atividade colagenolítica, atividade enzimática, teor de proteínas e atividade específica das soluções do extrato liofilizado de bromelina.

A atividade específica, dos extratos liofilizados de bromelina (tabela 8), apresentou resultados diferentes quando comparados aos das análises de Freiman & Sabaa-Srur (1996) (166 UA/mg de proteína); de Lima & Romanelli (1977) (105 UA/mg de proteína); de Rowan et al. (1990) (1,49 UA/mg de proteína). Porém, os valores da atividade específica do extratos liofilizados de bromelina de 1 a 3% desse estudo se aproximaram ao do extrato liofilizado de bromelina comercial (SIGMA, 2008), cujo valor varia de 5-15 UA/ mg de proteína, indicando que o extrato liofilizado de bromelina poderá ter uma possível uma aplicação industrial.

4.5 Análise Histopatológica

Para avaliação do remanescente dentinário optou-se por uma análise histopatológica, em microscopia óptica, cuja remoção de cárie foi classificada como ausência de lesão (AL) e a não remoção de cárie como presença de lesão (PL).

4.5.1 Grupo 1

Os resultados da análise histopatológica das amostras 1-5, tratadas com o extrato liofilizado de bromelina a 1% (lado A) e o grupo controle (lado B) do Grupo 1 (G1), descritos no item 3.13, estão apresentados nas tabelas 10 a 14 .

Amostra 1 - Comparando-se os lados A e B das lâminas notou-se presença de lesão (**PL**) somente no lado B. Em **a.5 (lado A-corte histológico 5)**, encontrou-se um aparente infiltrado bacteriano, com discretas linhas basofílicas de permeio (tabela 10).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
(1) 16 G1/a.1	AL	(1) 16 G1 /b.1	PL
(1) 16 G1/a.2	AL	(1) 16 G1 /b.2	PL
(1) 16 G1/a.3	AL	(1) 16 G1 /b.3	PL
(1) 16 G1/a.4	AL	(1) 16 G1 /b.4	PL
(1) 16 G1/a.5	AL	(1) 16 G1 /b.4	PL

Tabela 10: Resultados dos cortes histológicos da amostra nº.1, dente 16 (primeiro molar superior direito), lados A e B do grupo 1 (G1).

Amostra 2- Comparando-se os lados A e B das lâminas notou-se presença da lesão (PL) em maior parte dos cortes em ambos os lados, com exceção na lâmina a.5 onde houve ausência de lesão (AL). Neste caso, considerou-se (PL) nos lados A e B (tabela 11).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
(2) 47 G1/a.1	PL	(2) 47 G1/b.1	PL
(2) 47 G1/a.2	PL	(2) 47 G1/b.2	PL

(2) 47 G1/a.3	PL	(2) 47 G1/b.3	PL
(2) 47 G1/a.4	PL	(2) 47 G1/b.4	PL
(2) 47 G1/a.5	AL	(2) 47 G1/b.5	PL

Tabela 11: Resultados dos cortes histológicos da amostra n^o.2, dente 47 (segundo molar inferior direito), lados A e B do grupo 1 (G1).

Amostra 3 - Comparando-se os lados A e B das lâminas notou-se presença de lesão (PL) somente no lado B (tabela 12).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
(3) 46 G1/a.1	AL	(3) 46 G1/ b.1	PL
(3) 46 G1/a.2	AL	(3) 46 G1/b.2	PL
(3) 46 G1/a.3	AL	(3) 46 G1/b.3	PL
(3) 46 G1/a.4	AL	(3) 46 G1/b.4	PL
(3) 46 G1/a.5	AL	(3) 46 G1/b.5	PL

Tabela 12: Resultados dos cortes histológicos da amostra n^o.3, dente 46 (primeiro molar inferior direito), lados A e B do grupo 1 (G1).

Amostra 4 - Comparando-se os lados A e B das lâminas acima notou-se presença de lesão (PL) somente no lado B. Em todas as lâminas do lado A, encontrou-se um aparente infiltrado bacteriano, com discretas linhas basofílicas de permeio (tabela 13).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
(4) 36 G1/a.1	AL	(4) 36 G1/b.1	PL
(4) 36 G1/a.2	AL	(4) 36 G1/b.2	PL
(4) 36 G1/a.3	AL	(4) 36 G1/b.3	PL
(4) 36 G1/a.4	AL	(4) 36 G1/b.4	PL
(4) 36 G1/a.5	AL	(4) 36 G1/b.5	PL

Tabela 13: Resultados dos cortes histológicos da amostra n^o.4, dente 36 (primeiro molar inferior esquerdo), lados A e B do grupo 1 (G1).

Amostra 5 - Comparando-se os lados A e B das lâminas notou-se ausência de lesão (AL) em ambos os lados (tabela 14).

No. Do dente/lâmina		No. Do dente/lâmina	
(5) 37 G1/a.1	AL	(5) 37 G1/b.1	AL
(5) 37 G1/a.2	AL	(5) 37 G1/b.2	AL
(5) 37 G1/a.3	AL	(5) 37 G1/b.3	AL

(5) 37 G1/a.4	AL	(5) 37 G1/b.4	AL
(5) 37 G1/a.5	AL	(5) 37 G1/b.5	AL

Tabela 14: Resultados dos cortes histológicos da amostra n^o.5, dente 37 (segundo molar inferior esquerdo), lados A e B do grupo 1 (G1).

4.5.2 Grupo 2

Os resultados da análise histopatológica das amostras 6-10, tratadas com o extrato liofilizado de bromelina a 2% (lado A) e o grupo controle (lado B) do Grupo 2 (G2), descritos no item 3.13, estão apresentados nas tabelas 15 a19.

Amostra 6 - Comparando-se **a.1/b.1**, **a.2/b.2** e **a.3/b.3** observou-se presença de lesão (PL) somente no lado B. Em **a.4** e **b.4** observou-se as seguintes variações: lado A com presença de lesão (PL) e B com ausência de lesão (AL); em **a.5** e **b.5** observou-se ausência de lesão (AL). Neste caso, considerou-se presença de lesão (PL) nos lados A e B (tabela 15).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
(6) 16 G2/a.1	AL	(6) 16 G2/b.1	PL
(6) 16 G2/a.2	AL	(6) 16 G2/b.2	PL
(6) 16 G2/a.3	AL	(6) 16 G2/b.3	PL
(6) 16 G2/a.4	PL	(6) 16 G2/b.4	AL
(6) 16 G2/a.5	AL	(6) 16 G2/b.5	AL

Tabela 15: Resultados dos cortes histológicos da amostra n^o.6, dente 16 (primeiro molar superior direito), lados A e B do grupo 2 (G2).

Amostra 7- Comparando-se os lados A e B das lâminas notou-se presença de lesão (PL) somente no lado B. Encontrou-se um aparente infiltrado bacteriano, com discretas linhas basofílicas de permeio em **a.2**, **a.3** e **a.5** (tabela 16).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
----------------------------	--	----------------------------	--

(7) 17 G2/a.1	AL	(7) 17 G2/b.1	PL
(7) 17 G2/a.2	AL	(7) 17 G2/b.2	PL
(7) 17 G2/a.3	AL	(7) 17 G2/b.3	PL
(7) 17 G2/a.4	AL	(7) 17 G2/b.4	PL
(7) 17 G2/a.5	AL	(7) 17 G2/b.5	PL

Tabela 16: Resultados dos cortes histológicos da amostra n^o.7, dente 17 (segundo molar superior direito), lados A e B do grupo 2 (G2).

Amostra 8 - Comparando-se os lados A e B das lâminas notou-se ausência de lesão (AL) em ambos os lados (tabela 17).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
(8) 37 G2/a.1	AL	(8) 37 G2/b.1	AL
(8) 37 G2/a.2	AL	(8) 37 G2/b.2	AL
(8) 37 G2/a.3	AL	(8) 37 G2/b.3	AL
(8) 37 G2/a.4	AL	(8) 37 G2/b.4	AL
(8) 37 G2/a.5	AL	(8) 37 G2/b.5	AL

Tabela 17: Resultados dos cortes histológicos da amostra n^o.8, dente 37 (segundo molar inferior esquerdo), lados A e B do grupo 2 (G2).

Amostra 9 - Comparando-se os lados A e B das lâminas notou-se presença de lesão (PL) somente no lado B. Na lâmina **a.5**, encontrou-se um aparente infiltrado bacteriano com discretas linhas basofílicas de permeio (tabela 18).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
(9) 38 G2/a.1	AL	(9) 38 G2/b.1	PL
(9) 38 G2/a.2	AL	(9) 38 G2/b.2	PL
(9) 38 G2/a.3	AL	(9) 38 G2/b.3	PL
(9) 38 G2/a.4	AL	(9) 38 G2/b.4	PL
(9) 38 G2/a.5	AL	(9) 38 G2/b.5	PL

Tabela 18: Resultados dos cortes histológicos da amostra n^o.9, dente 38 (terceiro molar inferior esquerdo), lados A e B do grupo 2 (G2).

Amostra 10 - Comparando-se os lados A e B das laminas notou-se presença de lesão (PL) em ambos os lados (tabela 19).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
(10) 18 G2/a.1	PL	(10) 18 G2/b.1	PL
(10) 18 G2/a.2	PL	(10) 18 G2/b.2	PL
(10) 18 G2/a.3	PL	(10) 18 G2/b.3	PL
(10) 18 G2/a.4	PL	(10) 18 G2/b.4	PL
(10) 18 G2/a.5	PL	(10) 18 G2/b.5	PL

Tabela 19: Resultados dos cortes histológicos da amostra n^o.10, dente 18 (terceiro molar superior direito), lados A e B do grupo 2 (G2).

4.5.3 Grupo 3

Os resultados da análise histopatológica das amostras 11-15, tratadas com o extrato liofilizado de bromelina a 3% (lado A) e o grupo controle (lado B) do Grupo 3 (G3) descritos no item 3.13 estão apresentados nas tabelas 20 a 24 .

Amostra 11 - Comparando-se os lados A e B das lâminas notou-se presença da lesão (PL) em ambos os lados (tabela 20).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
(11) 38 G3/a.1	PL	(11) 38 G3/ b.1	PL
(11) 38 G3/a.2	PL	(11) 38 G3/ b.2	PL
(11) 38 G3/a.3	PL	(11) 38 G3/ b.3	PL
(11) 38 G3/a.4	PL	(11) 38 G3/ b.4	PL
(11) 38 G3/a.5	PL	(11) 38 G3/ b.5	PL

Tabela 20: Resultados dos cortes histológicos da amostra n^o.11, dente 38 (terceiro molar inferior esquerdo), lados A e B do grupo 3 (G3).

Amostra 12 - Comparando-se as lâminas **a.1/a.2** e **b.1/b.2** notou-se ausência de lesão (AL) nos lados A e presença de lesão (PL) nos lados B. Com o aprofundamento do corte a partir das lâminas **a.3/b.3** notou-se presença de cárie (PL) em ambos os lados (tabela 21).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
(12) 16 G3/a.1	AL	(12) 16 G3/b.1	PL
(12) 16 G3/a.2	AL	(12) 16 G3/b.2	PL
(12) 16 G3/a.3	PL	(12) 16 G3/b.3	PL
(12) 16 G3/a.4	PL	(12) 16 G3/b.4	PL
(12) 16 G3/a.5	PL	(12) 16 G3/b.5	PL

Tabela 21: Resultados dos cortes histológicos da amostra n^o.12, dente 16 (primeiro molar superior direito), lados A e B do grupo 3 (G3).

Amostra 13- Comparando-se os lados A e B das lâminas notou-se presença da lesão (PL) em ambos os lados (tabela 22).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
(13) 47 G3/a.1	PL	(13) 47 G3/b.1	PL
(13) 47 G3/a.2	PL	(13) 47 G3/b.2	PL
(13) 47 G3/a.3	PL	(13) 47 G3/b.3	PL
(13) 47 G3/a.4	PL	(13) 47 G3/b.4	PL
(13) 47 G3/a.5	PL	(13) 47 G3/b.5	PL

Tabela 22: Resultados dos cortes histológicos da amostra n^o.13, dente 47 (segundo molar inferior direito), lados A e B do grupo 3 (G3).

Amostra 14 - Comparando-se os lados A e B das lâminas notou-se presença da lesão (PL) em ambos os lados (tabela 23).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
(14) 26 G3/a.1	PL	(14) 26 G3/b.1	PL
(14) 26 G3/a.2	PL	(14) 26 G3/b.2	PL
(14) 26 G3/a.3	PL	(14) 26 G3/b.3	PL
(14) 26 G3/a.4	PL	(14) 26 G3/b.4	PL
(14) 26 G3/a.5	PL	(14) 26 G3/b.5	PL

Tabela 23: Resultados dos cortes histológicos da amostra no. 14, dente 26 (primeiro molar superior esquerdo), lados A e B do grupo 3 (G3).

Amostra 15 - Comparando-se os lados A e B das lâminas notou-se presença da lesão (PL) em ambos os lados (tabela 24).

Cortes Histológicos		Cortes Histológicos	
(15) 17 G3/a.1	PL	(15) 17 G3/b.1	PL
(15) 17 G3/a.2	PL	(15) 17 G3/b.2	PL
(15) 17 G3/a.3	PL	(15) 17 G3/b.3	PL
(15) 17 G3/a.4	PL	(15) 17 G3/b.4	PL
(15) 17 G3/a.5	PL	(15) 17 G3/b.5	PL

Tabela 24: Resultados dos cortes histológicos da amostra n°.15, dente 17 (segundo molar superior direito), lados A e B do grupo 3 (G3).

Grupos	Número da amostra	Número do dente	Lado A	Lado B	Porcentagem de AL por grupo no lado A (%)	Porcentagem de AL por grupo no lado B (%)
G1 (1%)	1	16	AL	PL	80% das amostras do grupo 1 apresentavam AL	20% das amostras do grupo 1 apresentavam AL
	2	47	PL	PL		
	3	46	AL	PL		
	4	36	AL	PL		
	5	37	AL	AL		
G2 (2%)	6	16	PL	PL	60% das amostras do grupo 2 apresentavam AL	20% das amostras do grupo 1 apresentavam AL
	7	17	AL	PL		
	8	37	AL	AL		
	9	38	AL	PL		
	10	48	PL	PL		
G3 (3%)	11	38	PL	PL	0% das amostras do	0% das amostras do
	12	16	PL	PL		

13	47	PL	PL	grupo 3	grupo 1
14	26	PL	PL	apresentavam	apresentavam
15	17	PL	PL	AL	AL

Tabela 25: Percentual de ausência de lesão (lado A) em relação ao controle (lado B) em amostras de dentes que receberam gel de extrato de bromelina a 1, 2 e 3%.

A metodologia utilizada, na maioria dos estudos, para avaliação histopatológica do remanescente dentinário após a remoção químico-mecânica do Carisolv[®] e o Papacárie[®] foi a microscopia eletrônica de varredura (BANERJEE et al., 2000a; TONAMI et al., 2003; PINHEIRO et al., 2004; CORRÊA, 2006), onde avaliou-se a ação dos produtos nas duas camadas da cárie, como também na dentina peritubular e intertubular. Nesse estudo, pela falta de viabilidade da microscopia eletrônica de varredura, optou-se pela microscopia óptica (ROTH et al., 1989; CEDERLUND et al., 1999; YIP et al., 1999).

O Carisolv[®] e o Papacárie[®] demonstraram serem eficazes na remoção químico-mecânica das lesões cariosas (SILVA et al., 2004; CÔRREA, 2006; BARATA, 2007). A cloramina, o principal componente responsável pela remoção químico-mecânica da cárie, encontra-se presente na composição de ambos (TONAMI et al., 2003; BUSSADORI et al., 2005).

O alto custo para os padrões nacionais inviabiliza a utilização do Carisolv[®] no setor público (CORRÊA, 2006). O Papacárie[®] apresenta um prazo de validade limitado em refrigeração, é comercializado por um laboratório em São Paulo e sua compra na região Norte é por via aérea, encarecendo o produto (GUIA ODONTO, 2005; FÓRMULA E AÇÃO, 2008). Sugere-se que a cloramina seja o principal princípio ativo responsável pela remoção da cárie.

A papaína, por ser uma enzima proteolítica, tende a sofrer auto-degradação perdendo a sua função proteolítica (CAPUCHO, 2008). Com isso, o gel do Papacárie[®] torna-se mais fluidificado,

ao longo do prazo de validade. O produto também não apresenta em seu rótulo, nenhuma indicação da atividade enzimática da papaína, protocolo exigido em todo o produto que contém enzimas em sua composição.

Considerando os aspectos citados, este estudo testou, *in vitro*, o extrato liofilizado de bromelina utilizando como veículo o carboximetilcelulose. O objetivo de testar um novo princípio ativo é devido a aspectos econômicos e de sustentabilidade, pela utilização de resíduos agroindustriais. A liofilização do extrato, também, proporciona um tempo maior de validade ao biomaterial, além de preservar suas propriedades físico-químicas.

O extrato liofilizado foi adicionado imediatamente ao gel, antes de ser aplicado nos dentes extraídos, objetivando avaliar histopatologicamente, a ação proteolítica imediata da bromelina.

A análise em microscopia óptica mostrou que cerca de 2/5 das amostras do grupo 1 (G1-lado A) e 3/5 das amostras do grupo 2 (G2-lado A) apresentaram, em áreas onde havia ausência de lesão (AL), infiltrado bacteriano com discretas áreas basofílicas de permeio. Dados semelhantes foram encontrados no trabalho de Cederlund et al. (1999) testando o Carisolv[®] em 10 (dez) molares permanentes. Os autores observaram discreto infiltrado bacteriano em 6 (seis) amostras nas áreas de remoção de cárie (6/10).

Comparando-se o percentual de ausência de lesão (AL) dos lados A e B dos três grupos, verificou-se que no G1 e G2 houve maior número de amostras com remoção de cárie no lado A do que no B. No G3 não houve remoção em ambos os lados. Comparando-se os grupos entre si, observou-se que o G1 apresentou maior número de amostras com remoção da cárie que no G2. No G3 não houve remoção (G1>G2>G3), conforme demonstra as tabelas 25 e 26.

4.6 Análise Estatística

Grupos	Lado A		Lado B		
	Fi	%	f _i	%	
Bromelina (1%)					P*
Ausência de Lesão	21/25	84,0	5/25	20,0	<0,001
Bromelina (2%)					
Ausência de Lesão	19/25	76,0	7/25	28,0	<0,001
Bromelina (3%)					
Ausência de Lesão	25/15	8,0	0/25	0,0	0,249**

Tabela 26: Comparação da ausência de cárie entre os lados A (gel com o extrato de bromelina) e B (controle- gel sem o extrato) das amostras.

A análise estatística aplicada aos dados histopatológicos em microscopia óptica mostrou que no grupo 1 e 2 houve diferença significativa (5%) entre os lados que receberam o gel de CMC com o extrato enzimático (1 e 2%) ao serem comparados com o grupo controle. O grupo 3 não apresentou resultado estatisticamente significativo entre os lados.

Esses resultados são devido à atividade específica do extrato liofilizado de bromelina a 1% ser superior. Também, o tempo de incorporação do extrato enzimático ao gel de CMC pode ter inativado parcialmente a bromelina no grupo 3, por ter sido mais longo em relação aos demais. O tempo de incorporação na concentração de 1% foi de 5 minutos de manipulação, na de 2%, 8 minutos e 3%, 12 minutos (Figuras 40 a 42).

Conforme demonstra a tabela 25, o lado A, do G1, apresentou 80% de remoção de cárie (AL) em relação ao lado B (controle), aproximando-se dos resultados de Yip et al. (1999), que constataram 84% de remoção de cárie nos dentes que receberam NMAB (N-monocloroglicina), e 90% de remoção de cárie nos dentes que receberam NMAB-urea (ácido-aminobutírico-3N-monocloro-DL-2 + urea).

Roth et al. (1989), em microscopia óptica, observaram que houve remoção da cárie em 10,8% das amostras (37 dentes) após aplicação do Caridex[®], diferindo dos resultados desse estudo onde o grupo 1 e 2 (lado A) apresentaram, respectivamente, 80% e 60% de remoção de cárie.

As amostras do grupo controle apresentaram 20% de AL nos G1 (5/25) e G2 (7/25), indicando que a remoção mecânica da cárie, mesmo com a utilização de cureta sem corte, pode ter efeito variando de acordo com o tipo de tecido cariado, porém com percentual inferior ao do método químico-mecânico (80 e 60%).

O extrato enzimático a 1 e 2% apresentou, nessas amostras, ação química sobre o tecido cariado. Sugere-se que o mecanismo de ação do extrato liofilizado de bromelina na cárie seja pela sua ação proteolítica, a capacidade da bromelina de clivar proteínas em oligopeptídeos e aminoácidos (VENTURA et al., 2006).

O presente trabalho mostrou o potencial do extrato liofilizado de bromelina, obtido por um método simples e econômico, ser utilizado no preparo de um fitofármaco para uso odontológico.

Os resultados foram estatisticamente significativos (G1 e G2) em relação ao controle, evidenciando um dado promissor que impulsiona a realização de estudos futuros utilizando o extrato liofilizado de bromelina na remoção das lesões cariosas. Porém, há necessidade de realizar pesquisas para testar outras propriedades do gel, no que se refere à atividade físico-química, mecanismo de ação, biocompatibilidade, toxicidade entre outras, antes da aplicação clínica.

A utilização do gel, em estudo, para a remoção químico-mecânica da cárie, devido ao seu baixo custo e sua durabilidade, enquadra-se perfeitamente na filosofia do TRA. O método otimiza a remoção mecânica da cárie, pois minimiza a tensão muscular e acelera o tempo de remoção da cárie. Tornando-se uma excelente opção em áreas de difícil acesso, em especial, nas comunidades ribeirinhas do estado do Amazonas.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

1. Resíduos agroindustriais de abacaxi podem ser fonte eficaz para obtenção de um biomaterial para uso odontológico.

2. De acordo com a análise histopatológica, os extratos liofilizados, nas concentrações a 1 e 2%, apresentaram remoção químico-mecânica da cárie, estatisticamente significativa, em relação ao grupo controle, rejeitando H0.

3. Nas amostras que receberam o gel a 3%, não houve remoção químico-mecânica da cárie, apresentando 0% de ausência de lesão (AL) nas amostras, aceitando H0.

REFERÊNCIAS

ACHSTETTER, V.A. Microtomy. In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1994. p.45-52, cap. 8.

AGUIAR, M.C.; ARANA-CHAVEZ, V.E. Ultrastructural and imunocytochemical analyses of osteopontin in reactionary and reparative dentine formed after extrusion of upper rat incisors. **J Anat**, v.210, p.418-27, 2007.

ALENCASTRE, J.B.; BENTLEY, M.V.L.B.; GARCIA, F.S. et al. Estudo das características e propriedades da permeação *in vitro* de micropartículas de CMC/quitosana como sistema de liberação cutânea para vitamina E. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.42, n.1, p.69-76, jan./mar. 2006.

AMERONGEN, W. Dental caries under glass ionomer restorations. **J Pub Health Dent**, v.56, n.3, p.150-154, 1996.

ASSUNÇÃO DA SILVA, A. Liofilização. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org>>. Acesso em: 15/10/2006.

BAÍA, K.; SALGUEIRO, M. Promoção de saúde bucal através de um programa educativo-preventivo e curativo utilizando a Técnica Restauradora Atraumática (TRA). **Rev ABO Nac**, v. 8, n.2, p.98-107, 2000.

BANERJEE, A.; KIDD, E.A.M.; WATSON, T.F. In vitro evaluation of five alternatives methods of carious dentine excavation. **Caries Res**, v.34, p.144-50, 2000a.

BANERJEE, A.; WATSON, T.F.; KIDD, A.M. Dentine caries excavation: a review of current clinical techniques. **British Dental Journal**, v.188, n.9, 2000b.

BARATA, Terezinha de Jesus Esteves. Avaliação clínica de dois métodos minimamente invasivos: químico-mecânico e mecânico (TRA). 2007. 173p. Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade de São Paulo, Bauru.

BARBOSA, A.R.S.; MEDEIROS, U.V. Correlação entre experiências de cárie e níveis salivares de estreptococos do grupo *mutans* em bebês de 06-36 meses de idade. **RBO**, v.57, n. 4, jul./ag. 2000.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M.C.; FREITAS NETO, A. G. de. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1976. 180p.

BERGMANN, J.; LEITÃO, J.; KULTJE, C.; BERGMAM, D.; CLODE, M.J. Removing dentine caries in deciduous teeth with Carisolv: a randomised controlled prospective study with six-month follow-up, comparing chemomechanical treatment with drilling. **Oral Health Prev Dent**, v.3, n.2, p.105-11, 2005.

BON, Elba P.S et al. Mercado e perspectivas de uso de enzimas industriais e especiais no Brasil. In: _____. **Enzimas e Biotecnologia**. Rio de Janeiro, 2008. p.462-79.

BONECKER, M.; ARDENGHI, T.M.; TRINDADE, C.P.; CURY, P. Transmissão vertical de *Streptococcus mutans* e suas implicações. **JBP- Rev Ibero-Am Odontopediatria Odontol Bebê**, v.7, n.37, p.297-303, 2004.

BORTOLETTO, C.C.; MOTISUKI, C.; FERRARI, J.C.L.; SANTOS PINTO, L. Atividade antimicrobiana do Papacárie[®]. **Braz Oral Res**, v.18, n.100, 2004.

BUSATO, A.L.S. Uma nova filosofia em dentística. In: _____. **Dentística, filosofia, conceitos e prática clínica**. São Paulo, 2005. p.1-34.

BUSSADORI, S.K.; GUEDES-PINTO, A.C.; SANTOS, E.M.; MURILLO, J.H., SILVA, L.R. Utilización del gel de la papaya para la remoción de la carie- reporte de um caso com seguimento clínico de um año. **Acta Odontol. Venezuelana**, Caracas, v.43, n.2, 2005.

CAMPOS, Edgar Silveira. Purificação e caracterização de bromelina a partir do extrato bruto de *Ananas cosmosus* por adsorção em leito expandido. 2007. 74p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - UNICAMP, Campinas.

CAPUCHO, Helaine Carneiro. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína para o tratamento de feridas. 2007. Dissertação. [Resumo]. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CEDERLUND, A.; LINDSKOG, S.; BLOMLOF, J. Efficacy of Carisolv[®] - assisted caries excavation. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v.19, n.5, p.464-9, 1999.

CEFALY, D.F.G.; BARATA, T.J.E.; TAPETY, C.M.C.; BRESCIANI, E.; NAVARRO, M.F.L. Avaliação clínica de restaurações compostas ou complexas com a técnica do ART. **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru, v.13, n.1, jan./mar. 2005.

CELESTE, R.K.; NADANOVSKY, P.; PONCE DE LEON, A. Associação entre procedimentos preventivos no serviço público de Odontologia e a prevalência de cárie dentária. **Rev Saúde Pública**, São Paulo, v.41, n.5, out. 2007.

CESAR, Ana Claudia Wabiszczewicz. Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi. 2005. 98p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - UNICAMP, Campinas.

CORRÊA, Fernanda Nahás Pires. Avaliação da dentina remanescente após remoção de cárie com instrumento cortante rotatório e métodos químico-mecânicos, utilizando análise de microdureza, fluorescência a laser e MEV. 2006. 105p. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo.

CURY, J.A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: BARATIERI, L.N. et al. **Odontologia Restauradora - Fundamentos e possibilidades**. São Paulo, 2001. p.31-68.

DENVERCOTIA. Carboximetilcelulose.

Disponível em: <<http://www.denvercotia.com.br/carboximetilcelulose/>>. Acesso em: 23 de Junho de 2005.

DEV, D.K.; INGLE, U.M. Utilization of pineapple by products and wastes: a review. **Indians Food Parker**, v.36, n.5, p.15-21, 1982.

ENNIS, L.M. Roentgenografic techniques. The bisecting technique vs paralleling. **D. Clin. N. Americ.**, p.779-8, nov., 1960.

EPI-INFO, Versão 3.3 for Windows, produzido e distribuído gratuitamente pelo Centro de Controle de Doenças - CDC, Califórnia, jan.,1997. Disponível em: <http://www.cdc.org/epiinfo>. Acesso em: 25 de Junho de 2008.

ERICSON, D.; ZIMMERMAN, M.; RAGER, H.; GÖTRICK, B.; BORNSTEIN, R. Clinical evaluation of efficacy and safety of a new method for chemo-mechanical removal of caries. **Carie Res**, v.33, p.171-7, 1998.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA. Banco de Dentes. Disponível em: <<http://www.foar.unesp.br/comite/dentes>> Acesso em: 05/05/2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª Edição, Parte I, São Paulo. 1988.

FERREIRA, Juliana Ferrari. Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato. 2007. 76p. Dissertação (Mestrado Engenharia Química) - UNICAMP, Campinas.

FÓRMULA E AÇÃO. Papacárie. Disponível em: <<http://formulaeacao.com.br/papacarie>>. Acesso em: 02/08/2008.

FRANCO, T.C.F.; AMOROSO, P.; MARIN, J.M.; ÁVILA, F.A. Detection of *streptococcus mutans* and *streptococcus sobrinus* in dental plaque samples from Brazilian preschool children by polymerase chain reaction. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v.18, n.4, 2007.

FREIMAN, L.O.; SABAA-SRUR, A.U.O. Aproveitamento dos resíduos da agroindústria do abacaxi (*Ananas comosus* (L) Merrill) para a produção de bromelinas. **Rev. Soc. Bras. Cienc e Technol. Alim.**, Campinas, v.16, n.3, p.246-49, out./dez.1996.

_____. Determinação de proteína total e padrão de aminoácidos de bromelinas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L) Merrill). **Rev. Soc. Bras. Cienc e Technol. Alim.**, Campinas, v.19, n.2, maio/ago.1999.

FREIMAN, L.O. Os avanços do uso da bromelina na área de alimentação e saúde. **Alim. Nutr.**, São Paulo, v.12, p.215-226, 2001.

FRENCKEN, J.; MAKONI, F.; SITHOLE, W. Atraumatic Restorative Treatment and Glass-Ionomer Sealants in a School Oral Health Programme in Zimbabwe: Evaluation after 1 year. **Caries Res.**, v.30, p.428-435, 1996.

FRENCKEN, J.; PHANTUMVANIT, P.; PILOT, T.; SONGPAISAN, Y.; AMERONGEN, E. **Manual for the Atraumatic Restorative Treatment Approach to Control Dental Caries**. 3^a. ed. Groningen: WHO Collaborating Centre for Oral Health Services Research, 1997. 120p.

FURE, S.; LINGSTROM, P.; BIRKHED, D. Evaluation of Carisolv[®] for the chemo-mechanical removal of primary root caries *in vivo*. **Caries Res.**, v.34, p.275-280, 2000.

FURE, S.; LINGSTROM, P. Evaluation of the chemomechanical removal of dentine caries *in vivo* with a new modified Carisolv[®] gel. **Clin. Oral Invest.**, v.8, n.3, p.139-44, 2004.

FUSAYAMA, T.; OHGUSHI, K. Eletron microscopic structure of the two layers of carious dentin. **J. Dent. Res.**, v.54, n.5, p.1019-26, 1975.

FUSAYAMA, T. The process and results of revolution in dental caries treatment. **Int Dent J**, v.47, p.157-166, 1997.

GABRIEL, V. Observações clínicas de uma enzima vegetal, a bromelina, em cirurgia odontológica. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas**, São Paulo, v.22, p. 56-60, mar.1968.

GARCIA, E.O.; CASAGRANDE, M.V.; RAGO, A.M.; MASSOLA JUNIOR, N.S. Preservação de urediniosporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana-de-açúcar. **Summa phytopathol.**, Botucatu, v.33, n.2, abril/Junho 2007.

GOLDBERG, M.; KEIL, B. Action of a bacterial *Achromobacter collagenase* on the soft carious dentine: an *in vitro* study with the scanning electron microscope. **J. Biol. Buccale**, v. 17, p.269-274, 1989.

GOLDMAN, M.; KRONMAN, J.; WOLSKI, K. et al. Caries removal to improve the bonding surface of dentin: an SEM study. **NY State Dent. J.**, v.53, p.20-21, 1987.

GREENBERG, D.M.; WINNICK, T. Plant proteases-activation-inhibition reactions. **J. Biol. Chem.**, v.135, p.761-75, 1940.

GROISMAN, S.; AMORIM, K.M.; CANCIO, V.A. Relação entre níveis salivares de estreptococos do grupo *mutans* nos pares de mães e seus filhos. **Revista PerioNews**, v.1, n. 7, p.377-80, 2007.

GUERRA, N.B.; DAVID, P.R.B.S.; MELO, D.D.; VASCONCELOS, A.B.B.; GUERRA, M.R.M. Modificações do método gravimétrico não enzimático para determinar fibra alimentar solúvel e insolúvel em frutos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.17, n.1, jan./mar. 2004.

GUIA ODONTO. Papacárie®. Disponível em:
<http://www.guiaodonto.com.br/ver_artigo.asp?codigo=239>
Acesso em: 29/09/2005.

HABIB, C. M.; KRONMAN, J.; GOLDMAN, M. A chemical evaluation of collagen and hidroxyproline after treatment with GK 101® (N-chloroglycine). **Pharmacol. Ther. Dent.**, v.2, p.209-215, 1975.

HALE, L.P.; GREER, P.K.; CHAU T.; JAMES, L.C.; JAMES, L.T. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. **Int. Imunopharmacol.**, v.5, n.4, p.783-95, 2005.

HALL, J. Embedding. In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1994. p.39-43, cap. 7.

IMPARATO, J.C.P. Organização e funcionalidade do banco de dentes humanos (ênfase para dentes decíduos) da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. 1999. 97p. Tese (Doutorado em Odontopediatria). Faculdade de Odontologia - USP, São Paulo.

IDAM - INSTITUO DE DESENVOLVIMENTO AGROPECUÁRIO DO ESTADO DO MAZONAS. Relatório de acompanhamento trimestral. Cultura: Abacaxi. Jan./Junho.2006.

KELLY, G. S. Bromelain: a literature review and discussion of its therapeutic applications. **Alt. Med. Rev.**, v.1, n.1, p.243-257, 1996.

KIDD, E.A.M. How “clean” must a cavity be before restoration? **Caries Res.**, v.38, p.305-313, 2004.

KLEIN, M.I.; FLÓRIO, F.M.; PEREIRA, A.C.; HOFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. **J. Clin. Microbiol.**, v.42. p. 4620-26, 2004.

KRONMAN, J.; GOLDMAN, M.; HABIB, C.M.; MENGEL, L. Eletron microscopic evaluations of altered collagen structured induced by N-monochloroglycine (GK-101®). **J. Dent. Res.**, p.1539-45, 1977.

KUBOKI, Y. et al. Collagen biochemistry of the two layer of carious dentin. **J. Dent. Res.**, v. 56, n.10, out. 1977.

KUNITZ, M. Crystalline soyben trypsin II general properties. **Journal of General Physiology**, v.30, p.291-310, 1947.

KUROSAKI, N.; SATO, Y.; IWAKU, M. Effect of a carious dentin softner on the dentin and pulp. **J. Prosthet. Dent.**, v.38, p.169-175, 1977.

LIMA, J.E.O. Cárie Dentária: um novo conceito. **Rev. Dent. Press. Ortodont. Ortop. Facial**, Maringá, v.12, n.6, nov./dez. 2007.

LIMA, D.C.; ROMANELLI, P. F. Extração e estudo de algumas propriedades bioquímicas da enzima proteolítica do caule do abacaxi branco, variedade Pérola. **Col. Int. Tecnol. Alim.**, v.8, n.2, p-377-89, 1977.

LOESCHE, W. J. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. **J. Dent. Res.**, v.58, n.12, p.2404-12, dez. 1979.

_____. Role of *streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, v. 50, p.353-380, 1986.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.T.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-75, 1951.

MACEDO, G.A. et al. Bioquímica Experimental de Alimentos. In:_____. Bioquímica Experimental de Alimentos. São Paulo, 2005. p. 31-32.

MAGALHÃES, C.S.; MOREIRA, A.N.; COSTA CAMPOS, W.R.; ROSSI, F.M.; CASTILHO, G.A.C.; FERREIRA, R.C. Effectiveness and efficiency of chemomechanical carious dentin removal. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v.17, n.1, 2006.

MALTZ, M. Cárie dental: fatores relacionados. In: PINTO, V.G. Saúde bucal coletiva. São Paulo, 2000. p.319-39.

MANDARI, G.; FRENCKEN, J.; VAN'T HOF, M. Six years success rates of occlusal amalgam and glassionomer cements restorations placed using three minimal intervention approaches. **Caries Res.**, v.37, p.246-55, 2003.

MARAGAKIS, G.M.; HAHN P.; HELLWIG, E. Chemomechanical caries removal: a comprehensive review of the literature. **Int. Dent. J.**, v.51, n.4, p.291-9, 2001.

MARINHO, V.C.C.; HIGGINS, J.P.T.; SHEIHAM, A.; LOGAN, S. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v.1, 2004.

MAURER, H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Celular and Molecular Life Sciences**, v.8, p.9, 2001.

MEDI-TEAM. Carisolv: Clinical Manual. Disponível em: <<http://www.mediteam.carisolv.htm>>
Acesso em: 27/07/2005.

MILLS, B. Specimen Orientation. In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1994. p. 33-7, cap. 6.

MIYAGI, S.P.H.; BUSSADORI, S.K.; MARQUES, M.M. Resposta de fibroblastos pulpares humanos ao gel Papacárie®. **RPG**, v.11, n.33, p.287, 2004.

MJÖR, I.A.; FERRARI, M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry-part 6: reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces and adhesive techniques. **Quintessence Int.**, v.33, n.1, p.283-91, 2002.

MONDELLI, J. O Complexo Dentinopulpar. In: _____. Proteção do Complexo Dentinopulpar. São Paulo, 1998. p.7-23.

MORSE, A. A formic acid-sodium citrate descalcification and buty 1 alcohol dehydration of teeth and bone for sectioning in paraffin. **J. Dent. Res.**, n.24, p.143-53, 1945.

MOTTA, L.J.; PINTO, M.M.; SANTOS, E.M. A aplicabilidade do gel de papaína em benefício das comunidades ribeirinhas da Bacia Amazônica. **Braz. Oral Res.**, v.18, n.33, 2004.

NEVES, Kilma da Silva . Avaliação da produção de enzima proteolítica de levedura e sua aplicação no amaciamento de carne bovina. 2004. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

OMAR, S.; IDRUS, A.Z.; RAZAK, O. A. Extraction and activity of bromelain from pineapple. **Madr. Res. Bull.**, v.6, p.172-9, fevereiro 1978.

PAES, Ellen Regina da Costa. Formulação de um gel de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. e sua ação em feridas provocadas na pele de ratos Wistar. 2004. 82p. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

PARK, Y. K. Produção de enzimas industriais de origem vegetal. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial-processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo, 2001. p.367-76.

PÉCORA, J.D. Dentina. Disponível em: <http://www.forp.usp.br/Atlas/Res.dentina_e_polpa/>. Acesso em: 07/02/2008.

PEREIRA, J.C. et al. Proteção do complexo dentinopulpar. In: BUSATO, A.L.S. **Dentística, filosofia, conceitos e prática clínica**. São Paulo, 2005. p.148-49.

PHANTUMVANIT, P.; SONGPAISAN, Y.; PILOT, T.; FRENCKEN, J. Atraumatic Restorative Treatment (ART): a three-year community field trial in Thailand – survival of one-surface restorations in the permanent dentition. **J Pub Health Dent.**, v.56, n.3, p.141-145, 1996.

PINHEIRO, S.L.; AOKI, C.M.B.; MENDES, F.M.; BENGSTON, N.G.; BENGSTON, A.L. Avaliação morfológica de dentina após diferentes métodos de remoção do tecido cariado. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v.58, n.5, p.363-8, 2004.

PIZA, I.M.T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O. G. Atividade da enzima bromelina em plantações de abacaxi (*Ananas cosmosus* (L) Merrill), sob condições de salinidade *in vitro*. **Rev. Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.5, n.1, p.68-74, 2002.

PORDEUS, I.A.; PAIVA, S.M.; JANSEN, W.C.; VALE, M.P.P.V.; FERREIRA, F.M. Desempenho de cimentos de ionômero de vidro nacionais e importados utilizados no Tratamento Restaurador Atraumático (ART) frente à microinfiltração em molares decíduos **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru, v.14, n.5, set./out. 2006.

PORTO, C.L.A.; BANDEIRA, M.F.C.L.; POZZOBON, R.T. Carisolv[®]: Nova Alternativa de Tratamento da Dentina Cariada- Relato de Caso Clínico. **Jornal Brasileiro de Clínica & Estética em Odontologia**, v.5, n.25, p.60-73, jan./fev. 2001.

PROPHET, E.B. Fixation. In: In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1994a, p.25-28, cap. 4.

_____. Tissue Processing: Dehydration, Clearing, and Infiltration. In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1994b, p.29-31, cap. 5.

RAMOS, M.; SANTOS, M.; CARVALHO, F. TRA - Uma história de sucesso. **RBO**, v.58, n. 1, p.13-15, set./out. 2001.

ROJAHN, C.A.; GIRAL, F. Preparation of chemistries products. Philipp. **J. Plant. Ind.**, v. 2, p.906, 1942.

ROTH, K.K.; DOMNICK, E.; AHRENS, G. Studies into the effectivity of Caridex[®] in caries removal. **Dtsch. Zahnärztl. Z.**, v.44, n.6, p.463-5, 1989.

ROWAN, D.A.; BUTTLE, J.D.; BARRETT, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. **Biochem. J.**, v.266, p.869-75, 1990.

SAKAMOTO, C.; MOIMAZ, S. Tratamento Restaurador Atraumático. **Rev. Paul. Odontol.**, v.5. p.42-5, set./out. 2001.

SCHUTZBANK, S. G.; GALAINI, J.; KRONMAN, J. H. A comparison in vitro study of GK-101[®] and GK-101E[®]: in caries removal. **J. Dent. Res.**, v. 57, p. 861-864, 1978.

SIGMA. Bromelina. Disponível em: <[http://: www .sigmadrech.com/catalog/search](http://www.sigmadrech.com/catalog/search)>. Acesso em: 08/09/2008.

SILVA, L.R.; BUSSADORI, S.K.; GUEDES, C.C. et al. Papacárie[®] - um novo sistema para a remoção química e mecânica do tecido cariado - relato de caso clínico. **Rev. Paulista de Odontologia**, n.6, p.4-8, nov./dez. 2004.

SILVA, L.R.; TONOLLI, G.; SANTOS, E.M.; BUSSADORI, S. K. Avaliação da biocompatibilidade *in vitro* de um novo biomaterial para a remoção química e mecânica da cárie. In: 20^a. Reunião Anual SBPqO, 2003, Águas de Lindóia. Anais. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, p.95, 2005.

SMITH, A.J. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. **J. Dent. Educ.**, v.67, p.678-89, 2003.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DOS ALIMENTOS. Núcleo de Estudos e Pesquisa (NEPA). UNICAMP. 2004. 113p.

TEIXEIRA, M.F.S. et al.. Determinação qualitativa de proteases: método de cup-plate. **Revista UFAM - Seção Ciências da Saúde**, v, 4/5, p.39-45, 1996.

TENUTA, L.M.A.; LIMA, J.E.O.; CARDOSO, C.L.; TABCHOURY, C.P.M.; CURY, J.A. Effect of period of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition *in situ*. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.17, n.4, p.326-31, 2003.

THYLSTRUP, O.; FEJERSKOV, A. Patologia da Cárie. In: _____. **Tratado de Cariologia**. Rio de Janeiro, 1988. p.194-215.

TONAMI, K.; ARAKI, K.; MATAKI, S.; KUROSAKI, N. Effects of chloramine and sodium hypochlorite on carious dentine. **J. Med. Dent. Sci.**, v.50, p.139-46, 2003.

TORNECK, C. Complexo Dentina-Polpa. In: TEN CATE, R.. **Histologia Bucal-Desenvolvimento, Estrutura e Função**. Rio de Janeiro, 2001. p.143-59.

VENTURA, A.P.M.; SILVA NOVAES, J.A.; CAMPELO DOS SANTOS, R.; ALMEIDA, A.K.D. Ação proteolítica da bromelina na liquefação de secreção brônquica (1^a parte). **Hebron Atualidades**, p.30-31, maio/jun. 2006.

VIEIRA, S. **Bioestatística, Tópicos Avançados**. 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 87p.

VONO, H.Z.; CEFALY, D.F.G.; TAPETY, C.M.C.; NAVARRO M.F.L. Resistência à tração diametral de três cimentos de ionômero de vidro indicados no TRA. **Pesq. Odontol. Bras.**, v.17, n.2, p.186, 2003.

WIKIPEDIA. Abacaxi. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ananás/>>. Acesso em: 04/09/2008.

WEYNE, S.C.; HARARI, S.G. Cariologia – implicações e aplicações clínicas em Odontologia Restauradora: fundamentos e possibilidades. 1.ed. São Paulo: Quintessence. 2002. 187p.

YIP, H.K.; STEVENSON, A.G. BEELEY, J.A Chemomechanical removal of dental caries in deciduous teeth: further studies *in vitro*. **Br. Dent. J.**, v.27, n.186, p.179-82, fevereiro. 1999.

ZANIN, L. et al. Métodos de utilização do flúor tópico. In: PEREIRA, A.C. et al. Odontologia em saúde coletiva. Porto Alegre, 2003. p.275-86.

OBRAS CONSULTADAS

BARBALHO, C.R.S.; MORAES, S.O. **Guia para normalizações de teses e dissertações**. Manaus: UFAM, 2005. 64 p.

FURASTÉ, P. A. **Normas técnicas para o trabalho científico**, 14^a ed. Porto Alegre: Dáctilus-plus. 2006. 206p.

VILELA, G.G; BACILA, M. TASTALDI, H. **Técnicas e Experimentos de Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1977. 504p.

APÊNDICE B

1 PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS

Os procedimentos constaram de fixação em formalina a 10% (para preservar os tecidos de autólise, permitindo que as características dos mesmos permanecessem sem variações no tratamento subsequente, processamento tecidual constituído por desidratação, clareamento e infiltração (que através de etapas seqüenciadas removeu-se a água livre dos tecidos, substituindo-a por material que solidificasse permitindo a realização da microtomia), emblocamento em parafina

(que circundou o tecido com uma substância firme para facilitar o corte de delgadas fatias) e realização de colorações histológicas (para a análise geral das características microscópicas dos dentes avaliados).

Essas fases, indispensáveis ao processamento histológico de qualquer fragmento tecidual, estão descritas de acordo de Prophet (1994a), Prophet (1994b), Mills (1994), Hall (1994), Achstetter (1994), conforme detalhado a seguir.

1.1 Fixação em formalina

Os quinze molares permanentes (peças) foram imersos em solução fixadora padrão, constituída por formalina a 10% tamponada, por 24 horas (PROPHET, 1994a). Concluída a fixação as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas.

1.2. Descalcificação

Os dentes permaneceram, aproximadamente, 30 dias submersos em solução de Morse, (MORSE, 1945) suspensos em gaze, para descalcificação. As soluções foram trocadas diariamente. Concluída a descalcificação as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas.

1.3 Processamento Tecidual

De acordo com Prophet (1994b), o processamento tecidual abrangeu a realização de três etapas: desidratação em soluções alcoólicas com aumento progressivo na concentração das mesmas, clareamento com xilol, e infiltração de parafina. Esse processamento pode ser manual ou automatizado, geralmente, com duração de 12 a 16 horas.

Consistiram de:

- a) para desidratação, as partes seccionadas dos dentes, foram colocadas em uma solução de etanol a 80%, por 1 hora, seguido por três submersões em etanol absoluto, com duração de 1 a 2 horas cada;
- b) para o clareamento, as partes seccionadas dos dentes, foram submersas em parafina líquida (sob aquecimento controlado em torno de 56°C, por três vezes, com duração de 2 horas cada, estando prontos para o emblocamento.

1.4 Emblocamento em parafina

De acordo com Hall (1994) & Mills (1994), as partes seccionadas dos dentes, foram colocadas individualmente, em espaços de aproximadamente 1cm x 1cm, delimitadas os moldes de metálicos ou plásticos, posicionado-os no fundo e com a face medial voltada para baixo.

Verteu-se parafina aquecida (geralmente, com ponto de fusão em torno de 56°C), até que os fragmentos (dentes) estivessem submersos. Transferiu-se o molde para uma placa resfriada, na qual permaneceu até que a parafina solidificasse (aproximadamente 30 minutos). O bloco foi retirado do molde, estando apto para a etapa de microtomia.

1.5 Microtomia

De acordo com Achstetter (1994), os blocos foram ajustados ao micrótomo, aparelho utilizado para realizar delgados cortes para microscopia óptica. Para os cortes de rotina, a seleção da espessura foi de 5 µm. Cada corte foi colocado em banho-maria a 58° C, onde flutuaram sobre a água, a partir da qual foram colocados sobre lâmina de vidro para microscopia “pescaria”. Em cada lâmina foram colocados quatro ou mais cortes, lado a lado, e sem sobreposição. Após essa etapa, a lâmina foi posicionada verticalmente para retirada do excesso de água, seguida por pernoite à temperatura de 37 a 40°C, para desparafinização e posterior coloração.

1.6 Colorações Histológicas

A coloração padrão utilizada para a análise dos aspectos morfológicos gerais foi a Hematoxilina-Eosina de Carazzi (BEHMER et al., 1976) descrita a seguir:

a) hematoxilina (Carazzi)

Hematoxilina	<i>0,5g</i>
Glicerina	<i>100mL</i>
Sulfato de alumínio e potássio	<i>25g</i>
Água destilada	<i>400mL</i>
<i>Iodato de potássio</i>	<i>0,1g</i>

Dissolveu-se o alúmen de potássio em 350 mL de água destilada em aquecimento. Após a dissolução total e com a solução ainda quente, adicionou-se a hematoxilina e deixou-se resfriar a temperatura ambiente. Em outro frasco, dissolveu-se o iodato de potássio em 50 mL de água destilada. Com a solução contendo hematoxilina já resfriada, adicionou-se a solução do iodato de potássio e a glicerina. Homogeneizou-se e filtrou-se. Aguardou-se um período mínimo de 10 minutos antes que viesse a ser utilizada;

b) eosina:

Eosina	<i>2g</i>
Dicromato de Potássio	<i>1g</i>
Solução Aquosa saturada de Ácido Pírico	<i>20 mL</i>
Álcool Absoluto	<i>20 mL</i>
<i>Água destilada</i>	<i>160 mL</i>

Dissolveu-se a eosina no álcool e o dicromato de potássio em água destilada. Misturaram-se as duas soluções e acrescentou-se a solução de ácido pícrico, homogeneizando-as.

Para a coloração dos cortes histológicos, inicialmente foi realizada a desparafinização dos mesmos. Em seguida, as lâminas com os cortes foram posicionadas em um suporte metálico e submetida a imersões rápidas em concentrações decrescentes de álcool (absoluto, 80% e 70%), até a água destilada. Após esta hidratação, os cortes foram cobertos pela solução de hematoxilina de Carazzi por 10 minutos, com realização de nova lavagem em água corrente. Os cortes foram, então, submetidos à desidratação em quatro soluções com concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 100% e 100%), seguida de clareamento em xilol e montagem em lâmina-lamínula em Entellan[®].

Demais reagentes e modo de preparo das soluções, segundo Behmer et al. (1976).

Ácido Fórmico (Formalina)

Ácido Fórmico	<i>5- 10 mL</i>
Aldeído fórmico (37-40%)	<i>5 mL</i>
<i>Água destilada</i>	<i>100 mL</i>

Solução de Morse (Morse, 1945)

<i>Citrato de Sódio a 20%</i>
<i>Ácido Fórmico a 30%</i>

APÊNDICE C

ÁGAR-COLÁGENO-LEITE

Ágar -----9,0g
Colágeno-----5,0g
Leite desnatado-----5,0g
Tampão citrato-fosfato 0,1M pH5,0----- 400ml

Adicionou-se o ágar em 400 mL de tampão e homogeneizou-se. Diluiu-se o colágeno em 50 mL de tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0, em seguida, foi homogeneizado e aquecido em banho-maria para sua dissolução completa. Ambos foram esterilizados a 120°C por 15 minutos. Dissolveu-se a solução de leite desnatado em 50 mL de água esterilizada e esterilizou-se a 120°C por 10 minutos. Misturou-se as soluções de ágar, colágeno e leite, com cuidados assépticos (NEVES, 2004).

ANEXOS

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS MESTRADO MULTIDISCIPLINAR EM PATOLOGIA TROPICAL

Ilma. Sra.

SUELY BEZERRA DE SOUZA

DD. Gerente de Odontologia do SESI (Serviço Social da Indústria)

REF.: Solicitação de coleta de dentes extraídos para projeto de pesquisa

Prezada Senhora Gerente

Enquanto mestranda do Curso Multidisciplinar em Patologia Tropical (UFAM), estou realizando o projeto de pesquisa, ***GEL DE BROMELINA: UMA NOVA OPÇÃO PARA A REMOÇÃO QUÍMICO-MECÂNICA DE TECIDO CARIADO DE DENTES***, e para sua efetivação necessitarei que seja autorizada a coleta de dentes molares permanentes extraídos, considerados material de descarte, não tendo utilização posterior, tanto para o paciente quanto para a instituição.

Na oportunidade, renovo protestos de estima e consideração.

Manaus, 26 de setembro de 2006.

Giselle Desideri Tino B. Ferreira
CRO-1317(Am)
Pesquisadora responsável pela execução e elaboração do projeto.

Autorizo e dou pleno consentimento:

Suely Bezerra de Souza
Gerente de Odontologia – SESI

ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM

PARECER CONSUBSTANCIADO

Protocolo CEP-UFAM nº 018/2007

A. IDENTIFICAÇÃO

Título do Projeto: Avaliação do gel de bromelina na remoção químico-mecânica da cárie.
Pesquisadora Responsável: Giselle Desidéri Tino Barbosa Ferreira
Local de Origem (instituição): Universidade Federal do Amazonas
Data de apresentação ao CEP-UFAM: 07/02/2007
Data do parecer: 01/03/2007
Grupo/Área Temática: III – Projeto fora das áreas temáticas especiais.
Área do Conhecimento: Ciências da Saúde (Odontologia) (Código 4.02 – Nível T)

B. OBJETIVOS DO PROJETO

Objetivo geral

- Formular um gel à base de bromelina capaz de atuar na remoção química da cárie.

Objetivos específicos

- Proceder a extração e obtenção da bromelina a partir da casca do abacaxi (*Ananas cosmosus* (L) Merrill);
- Realizar testes de atividade proteolítica (análise quantitativa) da bromelina liofilizada;
- Realizar teste de degradação do colágeno (análise qualitativa) da bromelina liofilizada e do grupo controle (Papacárie[®]);



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM

D. ANÁLISE DOS ELEMENTOS METODOLÓGICOS E ÉTICOS
(Resolução CNS nº 196/96 e complementares)

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Mestrado em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas como Dissertação de Mestrado de Giselle Desidéri Tino Barbosa Ferreira, sob orientação da Profa.Dra. Rosa Maria Lozano Borrás e co-orientação da Profa.Dra. Ângela Delfino Bittencourt Garrido.

O presente projeto apresenta consistência metodológica, importância científica e relevância social, estando adequado às normas éticas e metodológicas para as pesquisas que envolvem seres humanos (carta de encaminhamento, folha de rosto, objetivos, metodologia, referências bibliográficas, cronograma, orçamento, currículos dos pesquisadores, termo de concordância da instituição colaboradora e solicitação de dispensa do TCLE).

DIANTE DO EXPOSTO, considerando que o presente protocolo de pesquisa apresenta-se SEM RESTRIÇÕES ÉTICAS OU METODOLÓGICAS, salvo melhor juízo, recomendo que o mesmo seja APROVADO.

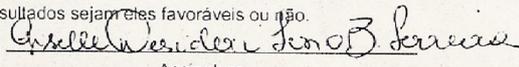
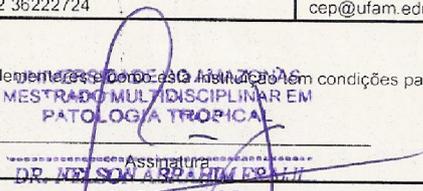
Manaus, 01 de março de 2007.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized letters, is written above a horizontal line.

RELATOR



MINISTÉRIO DA SAÚDE
 Conselho Nacional de Saúde
 Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS				FR - 122590	
Projeto de Pesquisa Avaliação do Gel de Bromelina na remoção químico-mecânica da cárie.					
Área de Conhecimento			Grupo Grupo III	Nível	
Área(s) Temática(s) Especial(s)				Fase Não se Aplica	
Unitermos cárie, remoção químico-mecânica, enzimas, bromelina.					
Sujeitos na Pesquisa					
Nº de Sujeitos no Centro 20	Total Brasil 20	Nº de Sujeitos Total 20	Grupos Especiais		
Placebo NAO	Medicamentos HIV / AIDS NAO	Wash-out NAO	Sem Tratamento Especifico NAO	Banco de Materiais Biológicos NAO	
Pesquisador Responsável					
Pesquisador Responsável Giselle Desideri Tino Barbosa Ferreira		CPF 344.055.502-04		Identidade 832.469-7	
Área de Especialização ODONTOLOGIA - PERIODONTIA		Maior Titulação ESPECIALISTA		Nacionalidade BRASILEIRA	
Endereço R. Rio Mar, 1141 apto 701 - Vialves		Bairro N. Sra. Graças		Cidade MANAUS - AM	
Código Postal 69037-581	Telefone / (92) 3234-1629	Fax (92) 3232-9504		Email gdesideri@uol.com.br	
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não.					
Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.			 Assinatura		
Data: <u>07 / 02 / 2007</u>					
Instituição Onde Será Realizado					
Nome Universidade Federal do Amazonas - UFAM		CNPJ 04.378.626/0001-97		Nacional/Internacional Nacional	
Unidade/Órgão Faculde de Ciências da Saúde		Participação Estrangeira NAO		Projeto Multicêntrico NAO	
Endereço Rua Teresina, 495		Bairro Adrinopolis		Cidade Manaus - AM	
Código Postal 69057-070	Telefone 92 36222724 R32	Fax 92 36222724		Email cep@ufam.edu.br	
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.					
Nome: _____			 Assinatura DR. ARILSON A. B. DE MELLO COORDENADOR		
Data: <u>07 / 02 / 2007</u>					

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 07/02/2007. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.

◁ Voltar

IMPRIMIR

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)