

4.02.09- Odontologia / Materiais Odontológicos.

## **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ADESIVO DENTINÁRIO COM QUERCETINA E PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS**

Arthur B. B. Rocha<sup>1</sup>, Bruna M. Barros<sup>1</sup>, Iverson I. S. Ferreira<sup>1</sup>, José M. S. Oliveira<sup>2</sup>, Ticiano G. Nascimento<sup>3</sup>  
Isabel C. C. M. Porto<sup>4</sup>,

1. Cirurgião dentista formado pela Faculdade de Odontologia da UFAL
2. Doutorando IQB – UFAL
3. Pesquisador ESENFAR – UFAL
4. Pesquisadora da Faculdade de Odontologia da UFAL, Orientadora.

### **Resumo:**

**Introdução:** Em menos de 10 anos quase metade das restaurações resinosas falham devido à degradação hidrolítica do material e à ação das MMPs que degradam o colágeno da dentina.

**Objetivos:** Avaliar a atividade antioxidante da quercetina e própolis vermelha de Alagoas (PVA) e seus efeitos sobre o grau de conversão de um adesivo comercial.

**Metodologia:** O adesivo Single Bond 2 foi modificado pela adição de quercetina ou PVA nas concentrações 20µg/ml, 250µg/ml e 500µg/ml. Foram avaliados o grau de conversão (GC) em FTIR e a atividade antioxidante-AA pelo método DPPH.

**Resultado:** A adição de quercetina 500µg/mL aumentou significativamente o GC do adesivo testado. Nas outras concentrações testadas quercetina e PVA não houve diferença significativa no GC comparada ao controle. A AA da quercetina, do EEP e sua fração hexânica foi comprovada.

**Conclusão:** Quercetina ou PVA nas concentrações utilizadas mostrou alta AA e não afetou negativamente o GC do sistema adesivo testado.

**Autorização legal:** Não se aplica

**Palavras-chave:** Adesivo Dentinário; Flavonóides; Metaloproteínases;

**Apoio financeiro:** CNPq

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UFAL

### **Introdução:**

Na odontologia restauradora a adesão entre materiais resinosos e o substrato dentinário forma uma interface de união chamada de camada híbrida. A composição da dentina pode ser descrita em três partes: minerais ricos em carbonato, uma matriz orgânica formada por fibrilas de colágeno tipo I e a parte líquida na forma de plasma<sup>1</sup>. Na matriz orgânica estão as enzimas metaloproteínases da matriz (MMPs), envolvidas na degradação da camada híbrida da dentina, e que são sensíveis à substâncias antioxidantes, íons metálicos e quelantes dos íons Zn<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup>.<sup>2</sup> Assim, as pesquisas utilizando agentes de reticulação de colágeno e inibidores de MMPs no tratamento da interface de dentina desmineralizada ou inibidores incorporados ao agente de união para evitar a ativação dessas enzimas têm se destacado. A quercetina é um flavonol e pertence a uma classe de metabólitos secundários de plantas conhecidos como flavonóides. É conhecida por seu alto potencial antioxidante e suas atividades biológicas: antiviral, anticancerígena, antimicrobiana, antiinflamatória, dentre outras.<sup>3</sup> A própolis vermelha de Alagoas (PVA) é rica em flavonoides, isoflavonoides, taninos, xantonas e gutiferonas que também são antioxidantes. Considerando-se os efeitos biológicos das duas substâncias e sua alta atividade antioxidante, presume-se que elas possam ser usadas como potenciais inibidores das MMPs.<sup>4</sup> Portanto, justifica-se o uso da quercetina e PVA para controle da atividade colagenolítica na dentina após a confecção de restaurações adesivas. Esse estudo avaliou a atividade antioxidante da quercetina e PVA e seus efeitos sobre o grau de conversão de um adesivo comercial.

### **Metologia:**

Preparou-se uma solução mãe de cada substância, adicionando-se 48mg de quercetina ou 50mg da fração hexânica do extrato etanólico de PVA a 1mL de etanol (Solução mãe), que foram solubilizadas em ultrassom durante 1 minuto. Para formulação do adesivo contendo 500µg/ml de quercetina ou PVA, uma alíquota de 25µL da solução mãe foi acrescentada a 240mg de adesivo. Para fazer o adesivo contendo 250µg/ml de quercetina ou PVA, 500µL da solução mãe foi adicionada a 500µL de etanol, obtendo-se a concentração 24mg/mL (Solução 2). Logo após, uma alíquota de 25µL dessa nova solução foi adicionada a 240mg de adesivo. Na obtenção do adesivo com 20µg/ml de quercetina ou PVA, tomou-se 80µL da solução 2 e adicionou-se 920µL de etanol, obtendo-se uma solução na concentração de 1,92mg/mL. Da última solução foram retirados 25µL e acrescentou-se a 240 mg de adesivo. Uma alíquota de 25µL de etanol foi acrescentado a 240mg de adesivo para se observar o efeito do diluente(branco). O adesivo puro serviu como controle.

As amostras foram mantidas em tubos protegidos de luz, em local refrigerado, até a análise em FTIR. Amostras polimerizadas foram preparadas depositando-se 25µL de cada adesivo modificado, branco e controle, sobre uma película de poliéster e depois de 30 segundos o adesivo foi polimerizado por 20 segundos com uma fonte LED (1500mW/cm<sup>2</sup>).

Foram obtidos espectros FTIR das amostras polimerizadas e não polimerizadas (n=5) do adesivo modificado com quercetina ou PVA nas concentrações 500, 250 e 20µg/mL, adesivo puro e o branco, totalizando 80 espectros. O valor do grau de conversão (GC) foi obtido aplicando-se equação:

*Grau de conversão (%) = 100[1-R(polimerizada)/R(não polimerizada)].*

Na análise dos dados do grau de conversão foram obtidas as medidas estatísticas: média, desvio padrão, coeficiente de variação e mediana e foi utilizado o teste estatístico F (ANOVA) com um fator seguido do teste de Tukey. Os testes foram realizados com auxílio do software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 21. A margem de erro utilizada nas decisões dos testes estatísticos foi de 5%.

Realizou-se a caracterização das soluções de quercetina como no esquema a seguir:

### Atividade Antioxidante



Figura 1- caracterização solução DPPH e Solução mãe 1 quercetina

### Atividade Antioxidante

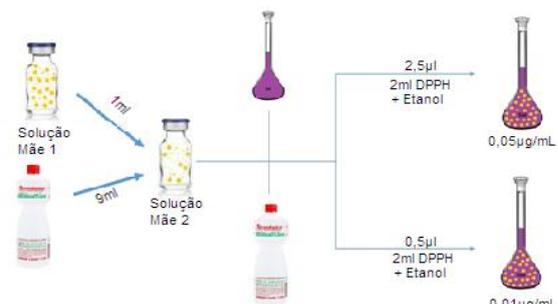


Figura 3- caracterização soluções de quercetina 0,05µg/mL e 0,01µg/mL

### Atividade Antioxidante

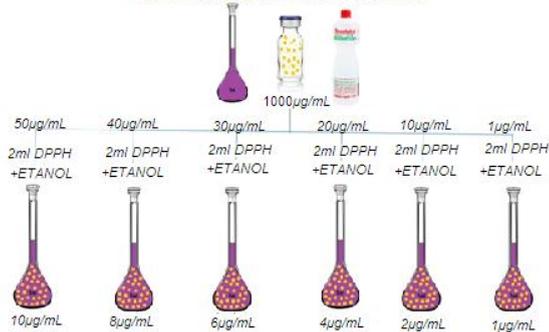


Figura 2- Caracterização soluções 10, 8, 6, 4, 2, 1µg/mL

### Atividade Antioxidante

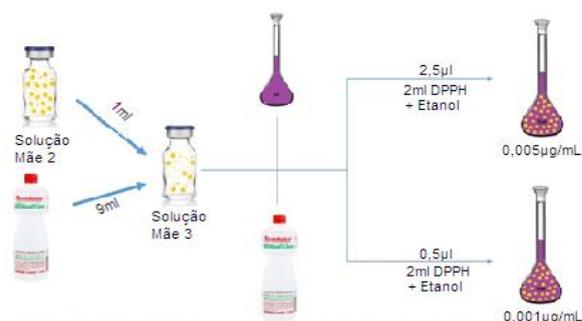


Figura 4 - Caracterização soluções de quercetina 0,005µg/ml e 0,001µg/ml

Todo o esquema acima foi repetido para as soluções contendo PVA, diferindo apenas nas diluições, que foram até 1µg/mL. Após a preparação, as diluições foram acondicionadas em frascos de vidro, cobertas com papel laminado e guardadas em ambiente protegido de luz, durante 30 minutos. Todas as diluições foram preparadas em triplicata. Então as soluções foram depositadas, uma por vez, em uma cubeta de cristal de quartzo e inseridas no espectrofotômetro UV-Vis, calibrado com etanol, em um comprimento de onda de 518nm. A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}} \times 100$ .

### Resultados e Discussão:

O grau de conversão de todos os adesivos modificados e controle são apresentados na Tabela 1. Apenas Q3 mostrou aumento significativo no grau de conversão comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre Q1 e Q3 ( $p = 0,955$ ). O grau de conversão de P1, P2, P3, Q1 e Q2 não foi estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle ( $p > 0,05$ ) e, portanto, a hipótese do estudo foi parcialmente confirmada. O maior valor de GC foi registrado no grupo Q3 (91,14%) e o valor mais baixo no grupo Q2 (79,29). O que está de acordo com o estudo de Yang et al<sup>1</sup>, que mostrou, que a incorporação de quercetina em baixas concentrações não reduziu significativamente o grau de conversão do adesivo modificado em comparação ao grupo controle (sem adição do flavonoide).

Espectros FTIR de amostras polimerizadas e não polimerizadas de cada adesivo testado são apresentadas nas Figuras 5-A a 5-D e mostram as alterações nas duplas ligações (C=C) no adesivo polimerizado, cujo pico característico está em 1640 cm<sup>-1</sup> e apresenta intensidade reduzida após a polimerização.

Tabela 1 – Valores médios do grau de conversão (+ desvio padrão) dos adesivos testados.

Adesivo (codificação)	Grau de conversão (%)
Adesivo Single Bond2 puro, grupo controle (C)	83,13 + 4,64 AB
Branco (Adesivo Single Bond2 + 25µl de etanol (B)	84,00 + 8,60 AB
Adesivo Single Bond2 + quercetina 20µg/mL (Q 1)	88,50 + 2,55 BC
Adesivo Single Bond2 + quercetina 250µg/mL (Q 2)	79,29 + 8,31 A
Adesivo Single Bond2 + quercetina 500µg/mL (Q 3)	91,14 + 3,00 C
Adesivo Single Bond2 + PVA 20µg/mL (P 1)	81,77 + 4,67 AB
Adesivo Single Bond2 + PVA 250µg/mL (P 2)	81,74 + 6,07 AB
Adesivo Single Bond2 + PVA 500µg/mL (P 3)	82,89 + 15,91 AB

ANOVA seguido de Tukey Teste para comparações múltiplas ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante

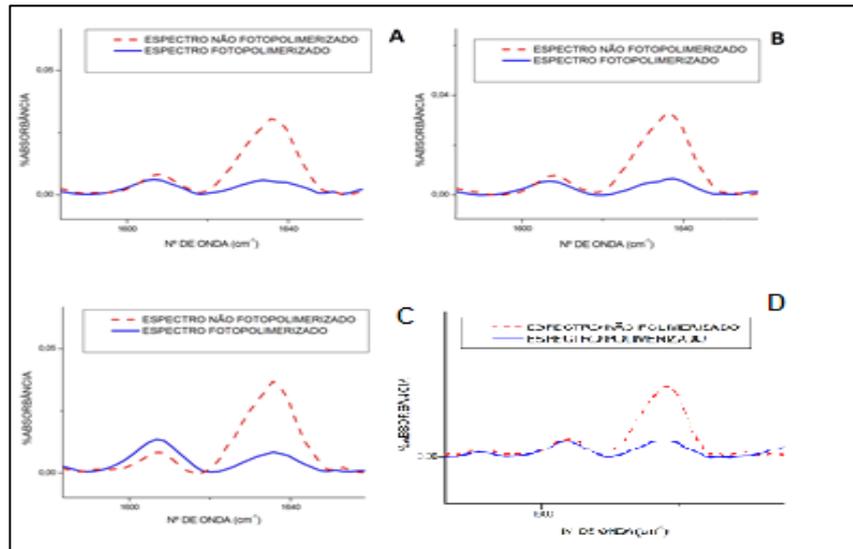


Figura 5- Espectros FTIR sobrepostos de amostras polymerizadas e não polymerizadas de Quercetina e PVA, representativos de todos os grupos. 5-A: Adesivo Puro, 5-B: Branco (adesivo + etanol), 5-C: Adesivo + Quercetina 500µg/mL 5-D: Adesivo + PVA 500µg/mL.

Yang et al, 2017<sup>5</sup> mostrou que a atividade metabólica de *S. mutans* diminuiu quando foi acrescentado quercetina ao adesivo, especialmente o Q500. Mostrou também que assim como nosso estudo não houve diferença do grau de conversão, divergindo apenas na concentração de 500µg/mL, que nesta pesquisa provocou aumento significativo no grau de conversão.

Os polifenóis e em particular os flavonóides possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais livres, sua atividade antioxidante depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanol formado; reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas<sup>6</sup>. Isso sugere que a própolis vermelha tem potencial para neutralizar o efeito das metaloproteínas, por conter um grande teor de polifenóis<sup>4</sup>

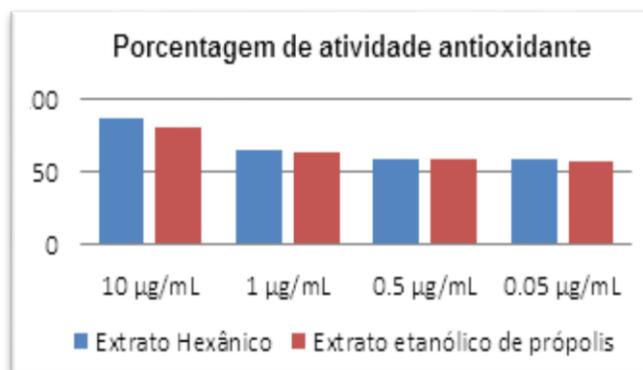
Nesse estudo avaliou-se a atividade antioxidante (AA) da quercetina e PVA através do método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•). O resultado da AA das diferentes concentrações de quercetina testadas estão apresentadas na Tabela 2, e PVA gráfico 2. A amostra de quercetina 10µg/mL apresentou o maior percentual de AA (96,68%). Foi observado que até a concentração de 0,001µg/mL (em todos os casos, exceto 0,005µg/mL) o consumo de DPPH foi diretamente proporcional à concentração da amostra. Todas as amostras apresentaram capacidade de consumo de DPPH, demonstrando a atividade antioxidante das amostras com quercetina

Conforme mostrado no Gráfico 2, o extrato hexânico apresentou atividade de sequestro do radical livre DPPH discretamente mais alta em todas as concentrações, quando comparado ao extrato etanólico de própolis. Foi possível observar também, que as absorbâncias das soluções (10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,05 µg/mL) encontram-se dentro do padrão esperado, em proporcionalidade com as concentrações. O extrato hexânico obteve um perfil da atividade antioxidante maior que o extrato etanólico de própolis (EEP), variando de 87 % até 58%, enquanto o EPP de 81% a 57%. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição de oxidação, ou seja, a porcentagem de AA é correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante.

Tabela 2 –Atividade antioxidante (AA%) das soluções etanólicas de quercetina de acordo com a concentração

Concentração	AA%
10	98,88%
5	93,27%
4	89,25%
2	76,68%
1	73,22%
0,05	64,78%
0,01	63,04%
0,005	69,58%
0,001	63,38%

Gráfico 2. Porcentagem de atividade antioxidante do extrato etanólico de própolis e do extrato hexânico.



Quercetina como um importante antioxidante, inibe a formação de oxigênios reativos, mediadores do stress oxidativo, que atuam como ativadores das MMPs.<sup>7,8</sup> Além disso suprime a expressão das proteínas da matriz extracelular MMP-9 e MMP-2, inibindo a expressão proteica da matriz extracelular, através da via quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK e AKT)<sup>9</sup>. Como antioxidante, tem potencial para promover a reticulação do colágeno da dentina aumentando a força de união imediata à dentina e estabilizando a interface adesiva<sup>10,11</sup>. Desse modo, um adesivo dentinário dopado com quercetina pode ser um potencial material dentário funcional capaz de prolongar a meia vida das restaurações adesivas.

No estudo de Mendonça et al 2015<sup>4</sup>, a análise quantitativa in vitro revelou que a atividade antioxidante (AA) do EEP e suas frações (hexânica, clorofórmio e acetato de etila) foram satisfatórias, sendo em ordem decrescente, fração de clorofórmio > fração hexânica > EEP  $\cong$  fração de acetato de etila, no entanto, Cabral et al 2009<sup>12</sup>, demonstraram que a fração hexânica foi a que apresentou maior atividade de sequestro do radical livre DPPH (74,4%), seguida pelo EEP (50,5%) e fração clorofórmio (49,8%), o que está de acordo com nossos resultados. Nessa pesquisa demonstrou-se que a fração hexânica comparada com o EEP, nas concentrações analisadas mostrou valores superiores de captura de radicais. O interesse no estudo dos compostos fenólicos é devido principalmente à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres<sup>13</sup>. Desse modo, acredita-se que o efeito antioxidante da PVA e da quercetina pode atuar na preservação do colágeno da dentina.

### Conclusões:

Dentro das limitações desse estudo concluímos que a adição de quercetina ou PVA nas concentrações 20µg/mL e 250µg/mL não afetou negativamente o grau de conversão do sistema adesivo testado. A adição de quercetina 500µg/mL aumentou o percentual de conversão dos monômeros do adesivo testado.

A atividade antioxidante da quercetina, do EEP e sua fração hexânica foi comprovada, o que indica uma possibilidade de formulação de adesivos dentinários contendo essas substâncias para redução de radicais livres na dentina.

### Referências bibliográficas

- Tjäderhane L, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH. Dentin basic structure and composition—an overview. *Endod Top*. 2009;20(1):3-29. doi:10.1111/j.1601-1546.2012.00269.x
- Zheng P, Chen H. Evaluate the effect of different mmps inhibitors on adhesive physical properties of dental adhesives, bond strength and mmp substarte activity. *Sci Rep*. 2017;(February):1-11. doi:10.1038/s41598-017-04340-1
- Bhattaram V, Graefe U, Kohlert C, Veit M, Derendorf H. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. *Phytomedicine*. 2002;9(SUPPL. 3):1-33. doi:10.1078/0944-7113-00108
- de Mendonça ICG, Porto ICC de M, do Nascimento TG, et al. Brazilian red propolis: Phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15(1). doi:10.1186/s12906-015-0888-9
- Yang H, Li K, Yan H, Liu S, Wang Y, Huang C. High-performance therapeutic quercetin-doped adhesive for adhesive–dentin interfaces. *Sci Reports*. 2017. doi:10.1038/s41598-017-08633-3
- Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova*. 2006;29(1):113-123. doi:10.1590/S0100-40422006000100021
- Lee DE, Chung MY, Lim TG, Huh WB, Lee HJ, Lee KW. Quercetin suppresses intracellular ros formation, MMP activation, and cell motility in human fibrosarcoma cells. *J Food Sci*. 2013;78(9). doi:10.1111/1750-3841.12223
- Essick EE, Ouchi N, Wilson RM, et al. Adiponectin mediates cardioprotection in oxidative stress-induced cardiac myocyte remodeling. *AJP Hear Circ Physiol*. 2011;301(3):H984-H993. doi:10.1152/ajpheart.00428.2011
- Pan H-C, Jiang Q, Yu Y, Mei J-P, Cui Y-K, Zhao W-J. Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells. *Neurochem Int*. 2015;80:60-71. doi:10.1016/j.neuint.2014.12.001
- Chiang YS, Chen YL, Chuang SF, et al. Riboflavin-ultraviolet-A-induced collagen cross-linking treatments in improving dentin bonding. *Dent Mater*. 2013;29(6):682-692. doi:10.1016/j.dental.2013.03.015
- Fawzy AS, Nitisusanta LI, Iqbal K, Daood U, Neo J. Riboflavin as a dentin crosslinking agent: Ultraviolet A versus blue light. *Dent Mater*. 2012;28(12):1284-1291. doi:10.1016/j.dental.2012.09.009
- Quintans JSS, Costa E V., Tavares JF, et al. Phytochemical study and antinociceptive effect of the hexanic extract of leaves from *Combretum duarteanum* and *friedelin*, a triterpene isolated from the hexanic extract, in orofacial nociceptive protocols. *Brazilian J Pharmacogn*. 2014;24(1):60-66. doi:10.1590/0102-695X20142413347
- Carpes ST, De Alencar SM, Cabral ISR, et al. Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. *CYTA - J Food*. 2013;11(2):150-161. doi:10.1080/19476337.2012.711776