

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação de Mestrado

**Atividade Colagenolítica, Propriedades Físico-mecânicas e Resistência de
União de Adesivo Dentinário com Nanocápsulas Contendo Clorexidina e
Copaíba**

Melissa Ballier Correia dos Santos

Brasília, outubro de 2024

Melissa Ballier Correia dos Santos

**Atividade Colagenolítica, Propriedades Físico-Mecânicas e Resistência de
União de Adesivo Dentinário com Nanocápsulas Contendo Clorexidina e
Copaíba**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília,
como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador(a): Prof. Dra. Bruna Genari Degrazia

Brasília, 2024

Melissa Ballier Correia dos Santos

**Atividade Colagenolítica, Propriedades Físico-Mecânicas e Resistência de
União de Adesivo Dentinário com Nanocápsulas Contendo Clorexidina e
Copaíba**

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 15 de outubro de 2024

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Bruna Genari Degrazia (Orientadora)

Prof. Dra. Thais Yumi Umeda Suzuki (Membro titular)

Prof. Dra. Rayssa Ferreira Zanatta (Membro titular)

Prof. Fernanda Cristina Pimentel Garcia (Suplente)

Dedico este trabalho ao Deus da minha vida, dono da minha existência e razão de tudo o que sou. Aos meus pais: Sérgio, Célia e minha irmã, Nicole, por estarem sempre ao meu lado e me incentivarem todos os dias. Aos meus amigos que seguraram a minha mão e não me deixaram desistir (vocês sabem quem são) e à minha querida orientadora, Prof. Bruna Genari, por toda parceria, aprendizado e confiança durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Falar sobre a Universidade de Brasília é falar sobre um sonho antigo que eu possuo desde o ensino médio. O sonho precisou ser adiado na graduação, porém continuou latente em meu coração. Por ter a certeza de que tenho um Deus que realiza os desejos mais íntimos do meu coração, cheguei até a conclusão deste sonhado mestrado, nesta desejada universidade. Por isso, é a Ele meu primeiro e mais importante agradecimento, louvor e honra “Porque dele, e por meio dele, e para ele são todas as coisas. A ele, pois, a glória eternamente. Amém!” (Romanos 11:33-36)

Falando em sonhos, tenho convicção de que estes não são realizados de maneira solitária. Por isso, agradeço com todo o meu coração aos meus pais, Sérgio e Célia à minha irmã, Nicole, por serem o fundamento e ao mesmo tempo a força motora que me fizeram chegar até aqui. Sem vocês, eu não teria sido nem feito metade do que fiz e serei eternamente grata e devedora de tanto amor.

A caminhada para a finalização deste título contou com muitos desafios e momentos de tempestades e nessa jornada fui impulsionada e motivada por amigas mais chegadas que irmãs: Carol, Tati, Stefanie, Diovanna e Ana Bia. Vocês enxugaram minhas lágrimas e sei que agora podem sorrir e celebrar comigo, essa é a beleza da verdadeira amizade.

Na UnB encontrei companheiros de lida diária que se tornaram grandes amigos. Por isso, não posso deixar de agradecer à minha querida Amanda, pela companhia e parceria e por tornar os experimentos e as dificuldades mais leves naquele laboratório. À querida Marcelene, que chegou em meio ao turbilhão dos meus experimentos, mas comprou a minha causa, e, com toda a sua presteza e simpatia transformou o laboratório em um ambiente mais agradável e produtivo. Ao José Alejandro, por também ter sido parceiro nas atividades e testes do laboratório e por sua disposição de sempre em ajudar.

À professora Rayssa Zanatta, por me acolher tão bem e tanto me ensinar com seu exemplo de dedicação ao que faz. Ao professor Leandro Hilgert, pelos ensinamentos e instruções laboratoriais que foram essenciais para a realização deste trabalho. À professora Nailê Dame, por sua parceria em fornecer seu laboratório, materiais e, sobretudo, sua expertise na realização dos testes.

Também não posso deixar de agradecer às professoras Karina Paese, Luiza Frank, Priscilla Souza e toda a equipe do Núcleo de Terapias Nanotecnológicas da UFRGS, por fornecerem seus conhecimentos na realização das nanocápsulas e, por me receberem com tanto carinho em Porto Alegre.

À Pro-Reitoria de Pesquisa da UFMG, por abrirem as portas para o desenvolvimento deste projeto em seus laboratórios e dependências.

Por último, mas um dos mais importantes, à minha orientadora, Professora Bruna Genari, por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditei, por me impulsionar e ser mais que uma orientadora, mas um exemplo de mulher e profissional e junto dela ao seu marido,

Professor Felipe Degrazia, agradeço por me receberem em Belo Horizonte com tanto amor e por tanto me ensinarem. Meus sinceros agradecimentos a todos que de algum modo contribuíram com este sonho.

RESUMO

A integridade e estabilidade das fibrilas de colágeno, envoltas pelo material resinoso, são a base estrutural da odontologia adesiva em dentina. Nesse sentido, o maior desafio se deve ao processo de degradação polimérica e ação enzimática de metaloproteínas endógenas às fibras colágenas expostas, podendo comprometer a estabilidade da câmara híbrida. No entanto, as atividades collagenolítica e gelatinolítica podem ser controladas por inibidores de protease. Dentre os inibidores já estudados estão o óleo de copaíba (OC) e a clorexidina (CHX). Desse modo, aliar estes inibidores a um sistema polimérico de liberação controlada pode ser capaz de preservar as propriedades adesivas e melhorar seu desempenho a longo prazo. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver um adesivo contendo nanocápsulas com clorexidina em núcleo oleoso de copaíba (NC-CHXCOP) e avaliar as suas propriedades físico-químicas bem como sua atividade collagenolítica. A formulação das NC-CHXCOP foi realizada com o método de deposição interfacial de polímero pré-formado, utilizando policaprolactona (0,5 g), acetato de clorexidina (25 mg), óleo de copaíba (1100 µl), Span™ 60 (0,19 g), polissorbat 80 (0,38 g), etanol (45 mL), acetona (90 mL) e água (265 mL). A suspensão foi processada por um *spray dryer* em ciclo aberto, utilizando sílica coloidal (1,5g) como adjuvante de secagem. As partículas foram mensuradas por difração a laser e a análise morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O adesivo foi formulado com 66/33% em massa de dimetacrilato glicerolato de bisfenol A (BisGMA)/2-hidroxietil metacrilato (HEMA), canforoquinona (CQ) e etil 4-dimetilaminobenzoato (EDAB) a 1 mol%. As NC-CHXCOP foram adicionadas ao adesivo nas concentrações de 5% e 10% em massa e um grupo foi mantido sem partículas, como controle. O adesivo foi avaliado quanto à atividade collagenolítica avaliada usando EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay Kit (n=3), degradação em solvente através da mensuração de microdureza Knoop antes e após imersão em etanol:água (1:1) por duas horas (n=3), grau de conversão por FTIR (n=3) e resistência de união à microtração após 24 h (µTBS, n=10). Os testes ANOVA, Tukey, Fisher e Teste t pareado foram utilizados para análise dos dados. O diâmetro médio (d_{4,3}) das partículas foi de 860 nm. Não houve diferença na dureza inicial entre os grupos (p=0,15). Os grupos de 5% e 10% demonstraram inibir atividade collagenolítica. A degradação em solvente foi significativamente maior para o grupo de 10% NC-CHXCOP, enquanto na concentração de 5% não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. O grau de conversão variou de 55,23 ± 4,85% a 67,91 ± 8,21%, sem diferença estatisticamente

significante entre os grupos ($p=0,13$). As NC-CHXCOP não tiveram influência no μ TBS imediato. As fraturas adesivas predominaram em todos os grupos. Conclui-se nanocápsulas contendo clorexidina em núcleo oleoso de copaíba foram produzidas e incorporadas a um adesivo odontológico com inibição da atividade colagenolítica e sem interferir nas suas características físico-químicas.

Palavras-Chave: Metaloproteases, Adesivos Dentinários, Nanocápsulas, Clorexidina, Óleo De Copaíba

ABSTRACT

The integrity and stability of collagen fibrils, surrounded by resinous material, serve as the structural basis of adhesive dentistry in dentin. In this context, the primary challenge arises from the polymeric degradation process and the enzymatic action of endogenous metalloproteinases on exposed collagen fibers, which may compromise the stability of the hybrid layer. Collagenolytic and gelatinolytic activities can be controlled by protease inhibitors. Among the inhibitors that have been studied are copaiba oil (OC) and chlorhexidine (CHX). Therefore, combining these inhibitors with a controlled-release polymeric system may be able to preserve adhesive properties and improve the stability of the hybrid layer. The objective of this study was to develop an adhesive containing nanocapsules with chlorhexidine in a copaiba oil core (NC-CHXCOP) and to evaluate its collagenolytic activity and physicochemical properties. The formulation of NC-CHXCOP was conducted using the preformed polymer interfacial deposition method, using polycaprolactone (0.5 g), chlorhexidine acetate (25 mg), copaiba oil (1100 μ L), Span™ 60 (0.19 g), polysorbate 80 (0.38 g), ethanol (45 mL), acetone (90 mL) and water (265 mL). The suspension was processed using an open cycle spray dryer, with colloidal silica (1.5 g) as a drying adjuvant. Particle size was measured by laser diffraction, and morphological analysis was performed using scanning electron microscopy (SEM). The adhesive was formulated with a weight ratio of 66/33% of bisphenol A glycerolate dimethacrylate (BisGMA) to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), along with camphorquinone (CQ) and ethyl 4-dimethylaminobenzoate (EDAB) at a concentration of 1 mol%. NC-CHXCOP were incorporated into the adhesive at concentrations of 5% and 10% by weight, while a control group was maintained without particles. Collagenolytic activity was assessed using EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay Kit (n=3). Degradation in solvent was evaluated by measuring Knoop microhardness before and after immersion in ethanol:water (1:1) for two hours (n=3), the degree of conversion was determined by FTIR (n=3), and microtensile bond strength (μ TBS) was measured after 24 h (n=10). Data analysis was performed using ANOVA and Tukey post-hoc test, Fisher and paired t-tests at a significant level of 0.05. The average diameter (d4.3) of the particles was 860 nm. The 5% and 10% groups exhibited inhibition of collagenolytic activity. No significant difference in initial hardness was observed between groups (p=0.15). Degradation in solvent was significantly greater in the 10% NC-CHXCOP group, while at the 5% concentration no statistically significant difference was found compared to the control

group. The degree of conversion ranged from $55.23 \pm 4.85\%$ to $67.91 \pm 8.21\%$, with no statistically significant difference between the groups ($p=0.13$). NC-CHXCOP did not affect immediate μ TBS. Adhesive fractures were predominant in all groups. In conclusion, nanocapsules containing chlorhexidine in a copaiba oil core were successfully produced and incorporated into a dental adhesive, demonstrating inhibition of collagenolytic activity without adversely affecting its physicochemical properties.

Keywords: Metalloproteases, Dentin Adhesives, Nanocapsules, Chlorhexidine, Copaiba Oleoserin

LISTA ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mecanismos de clivagem de metaloproteinases de matriz (MMPs) e catepsinas.....	20
Figura 2. Estrutura molecular da clorexidina (C ₂₂ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀)	22
Figura 3. Modelos de mecanismo de encapsulamento de fármacos.....	24
Figura 4. Esquema representativo da formulação das NCs através do método de deposição interfacial de polímero pré-formado.....	25
Figure 5. Size distribution of suspended particles, measured using the Mastersizer 2000 equipment.....	34
Figure 6. Images obtained through scanning electron microscopy (SEM) of the NCs, showing the agglomerated appearance of the particles on the drying adjuvant.....	34
Figure 7. Spectrophotometric assay for collagenase data analysis.....	35
Figure 8. Microtensile Bond Strength (μTBS)	36
Figure 9. Percentage (%) of fracture modes of statistically analyzed specimens.....	37

LISTA DE TABELAS

Table 1. Mean and standard deviation of initial (KHN1) and final hardness (KHN2) and its percentage of variation (Δ %) and Degree of Conversion (DC).....	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MMPs- Metaloproteinases de Matriz

CHX- Clorexidina

OC- Óleo de copaíba

TIMPs- Inibidores teciduais de MMPs

PCL- Poli(ϵ -caprolactona)

PLA - Poli(lactídeo)

PLGA- Poli (lactídeo-co-glicólido)

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

FTIR- Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

NCs- Nanocápsulas

NC-CHXCOP- Nanocápsulas de clorexidina em núcleo oleoso de copaíba

BisGMA- Dimetacrilato de bisfenol A glicol

HEMA- Etacrilato de 2-hidroxietyl

CQ- Canforoquinona

EDAB- 4-dimetilaminobenzoato de etila

GC- Grau de Conversão

FPT- Falha pré-teste

N- Newton

Mpa- Megapascal

KHN1- Dureza Knoop inicial

KHN2- Dureza Knoop Final

μ TBS- Resistência de união à microtração

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Dentina.....	18
2.2 Colágeno.....	18
2.3 Metaloproteinases (MMPs).....	19
2.4 Adesão Dentinária.....	20
2.5 Clorexidina (CHX).....	21
2.6 Copaíba.....	22
2.7 Encapsulação em Nanocápsulas Poliméricas	23
3 JUSTIFICATIVA.....	26
4 OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo geral	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
5 ARTICLE – COLLAGENOLYTIC ACTIVITY, PHYSICOMECHANICAL PROPERTIES AND BOND STRENGTH OF A DENTIN ADHESIVE CONTAINING CHLORHEXIDINE AND COPAIBA NANOCAPSULES	28
5.1 ABSTRACT	28
5.2 INTRODUCTION	28
5.3 MATERIALS AND METHODS	28
5.3.1 Preparation of NCs	28
5.3.2 Characterization of NCs.....	28
5.3.3 Formulation of the adhesive	28
5.3.4 Spectrophotometric assay for collagenase	28
5.3.5 Softening in ethanol.....	28
5.3.6 Degree of conversion	28
5.3.7 Microtensile bond strength (μ TBS)	28
5.4 RESULTS	28
5.5 DISCUSSION.....	28
REFERENCES.....	28
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
6.1 PRESS RELEASE	29
REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

A odontologia restauradora com resina composta é possível dados os conceitos de adesão, pelo imbricamento dos monômeros ao substrato dentário, túbulos dentinários e fibras colágenas, formando o que se conhece como camada híbrida (1,2). O desempenho desse imbricamento micromecânico depende tanto dos agentes do sistema adesivo quanto das características teciduais, em especial da malha colágena (2,3). A integridade e estabilidade das fibrilas de colágeno, envoltas pelo material resinoso, são a base estrutural para durabilidade adesiva (4).

Nesse sentido, o maior desafio se deve ao processo de degradação polimérica e ação enzimática às fibras colágenas expostas, podendo comprometer a estabilidade da camada híbrida (5,6). Essa ação enzimática às fibras colágenas ocorre em especial devido às metaloproteinases de matriz (MMPs) potencialmente ativadas pelo processo carioso e ação de condicionadores ou monômeros ácidos (7,8,9). A dentina contém diferentes MMPs, como collagenase MMP-8, gelatinases MMP-2 e - 9, estromelisina MMP-3 e enamelisina MMP-20 (6,9).

No entanto, as atividades collagenolítica e gelatinolítica podem ser controladas por inibidores de protease (10). Alguns inibidores de MMPs têm sido investigados na odontologia adesiva, como a clorexidina (CHX) (2,11,12) e, mais recentemente, o óleo de copaíba (13,14). O uso de CHX como inibidor não específico de MMPs têm apresentado resultados promissores na inibição de pelo menos três tipos de MMPs: MMP-2, MMP-8 e MMP-9 (2,12). Sua capacidade é atribuída à ação quelante e de eliminação dos íons cálcio e zinco, essenciais para o funcionamento enzimático (3). Contudo, há controvérsias quanto ao benefício a longo prazo da aplicação de clorexidina diretamente à dentina (11). Ademais, o uso da solução de CHX sobre a dentina condicionada é mais uma etapa do procedimento adesivo, (15) seguida pela lavagem do substrato dentinário, que pode afetar negativamente sua concentração efetiva e tornar o substrato indesejavelmente mais úmido (2). Já a copaíba, cujo óleo tem sido objeto de pesquisas, apresenta resultados significativos, com potencial bactericida e bacteriostático (14), bem como para inativação de MMPs 2 e 9 (13). Portanto, a incorporação destes agentes inibidores de MMP ao sistema adesivo pode ser uma alternativa para otimizar seu uso, com a eliminação de uma etapa adicional e controle de seus efeitos indesejados (16).

Para a incorporação aos sistemas adesivos, aliar esses agentes a um sistema polimérico de liberação controlada pode ser capaz de preservar as propriedades adesivas, viabilidade celular, adicionando efeito terapêutico (2,17,18). Agentes ativos têm sido incorporados em sistemas poliméricos para uso em dentina (2,17,18). Partículas com diferentes características físico-químicas de dimensões micro ou nanométricas são obtidas de acordo com seu processo de obtenção e com as características do agente ativo utilizado (19). Até o presente momento, não há estudos que apresentem sistemas adesivos com a incorporação de partículas poliméricas contendo CHX ou óleo de copaíba em sua composição.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dentina

A dentina é um tecido mineralizado que corresponde à maior porção do elemento dentário, sendo constituída por componente orgânico (colágeno) e inorgânico (cristais de apatita inorgânica) (20). Dependendo de características específicas do dente, como a idade do paciente ou a profundidade do preparo, a superfície do substrato dentinário pode apresentar proporções variadas de dentina intertubular, dentina peritubular e dentina esclerótica (1). Esses túbulos, quando sadios, possuem aproximadamente 1,3 μm e, se desmineralizados ou cariados podem variar entre 2,2 a 1,7 μm (21). Estes se comunicam com uma polpa vulnerável que reage a injúrias mecânicas, biológicas ou químicas (22).

Embora o conteúdo de água varie conforme o tipo e profundidade da dentina, ele corresponde a aproximadamente 12% do volume total, enquanto o conteúdo mineral, a 70% e material orgânico, a cerca de 18% (1,22). Da matriz orgânica da dentina, o colágeno apresenta-se como o principal componente, correspondendo a cerca de 90% (23,24). Em sua composição remanescente, são elencadas proteínas não colágenas, como os proteoglicanos, e lipídeos (23,24).

2.2 Colágeno

O colágeno, em seus variados tipos, é considerado um grupo de proteínas com uma estrutura molecular fibrilar, o que contribui para o suporte extracelular (25). Nessa perspectiva, as fibras colágenas são os principais componentes dos tecidos conjuntivos e são encontrados também no tecido intersticial dos parênquimas (24,25). No tecido dentinário, a principal proteína é o colágeno (24). A maior parte deste colágeno é do tipo I, embora pequenas quantidades do tipo III e V já foram encontradas (24,25).

O colágeno do tipo I, principal componente da matriz extracelular, apresenta uma estrutura fibrilar e uma tripla hélice com conformação *coiled coil*, na qual duas cadeias $\alpha 1$ idênticas e uma cadeia $\alpha 2$ se enrolam como os fios de uma corda (20). Essas cadeias são sintetizadas em meio intracelular para formar um precursor, o pró-colágeno, que contém aminoácidos como a glicina e a prolina (23). Na dentina, os odontoblastos são os responsáveis pela síntese desta proteína (20,22). Após passar por modificações pós-translacionais, como processos de hidroxilação, este precursor é excretado para o meio extracelular, clivado e associado em fibrilas (25,26). Durante o processamento e modificações extracelulares, as fibrilas são adicionalmente estabilizadas por ligações

covalentes, que contribuem para a sua resiliência mecânica (25,26).

2.3 Metaloproteinases (MMPs)

As fibrilas de colágeno da dentina contêm pró-formas inativas de enzimas proteolíticas chamadas metaloproteinases de matriz (MMPs). Essas enzimas, identificadas em odontoblastos e na dentina mineralizada ou desmineralizada, são capazes de degradar componentes da matriz extracelular e, portanto, desempenham um papel nas ligações resina-dentina (27). Nos humanos, são relatados 23 tipos de MMPs, classificadas em 6 grupos com base na especificidade do substrato e homologia (28,29,30). Vários MMPs foram identificados em dentina humana mineralizada em estado inativo, como a collagenase MMP-8, as gelatinases MMP-2 e MMP-9, e a esmaltenisina MMP-20 (31). Entretanto, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 foram descritas com atividade associada. (28,31)

As MMPs são enzimas endógenas que dependem de Zn^{2+} e Ca^{2+} para sua atividade catalítica. Todas as MMPs contêm Zn^{2+} no sítio catalítico e requerem Ca^{2+} para estabilidade e atividade (27,20). Elas geralmente são expressas como zimogênios inativos, e a pró-proteína deve ser dissociada da porção catalítica para sua ativação (20). Nas MMPs não ativadas, a cisteína desemparelhada na pró-proteína forma uma ponte com o zinco catalítico (chamado mecanismo de “troca de cisteína”), prevenindo a atividade enzimática e atuando como um ligante no sítio ativo do átomo de zinco, tornando a enzima inativa (29). A regulação da atividade das MMPs ocorre pela clivagem do pró-peptídeo e pode ocorrer em múltiplos níveis, incluindo autólise, serino-proteases, ou outras MMPs. (Figura 1). Além disso, os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) são glicoproteínas envolvidas no controle local da atividade da MMPs nos tecidos, representando os principais inibidores destas enzimas (30,31).

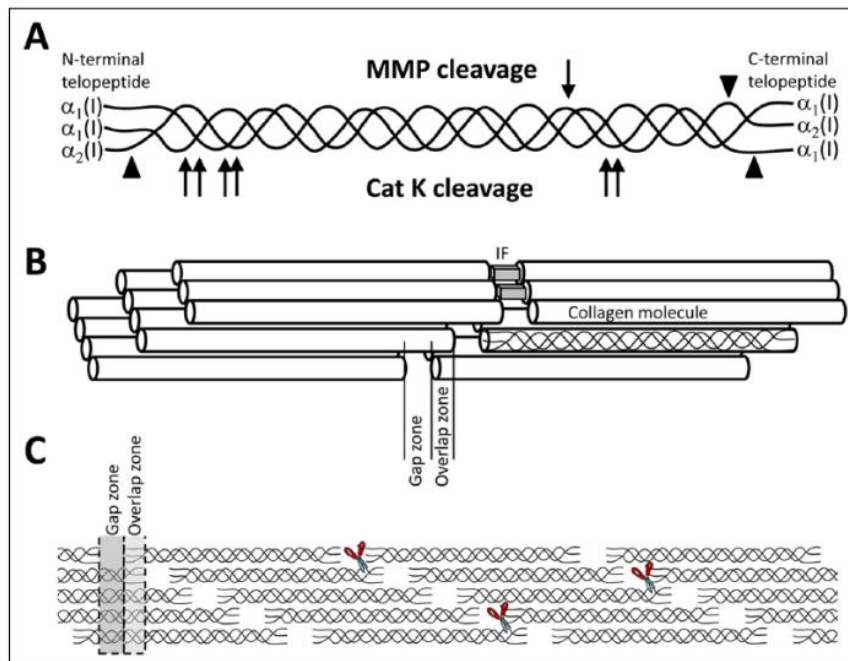


Figura 1. Mecanismos de clivagem de metaloproteínas de matriz (MMPs) e catepsinas. A) A molécula de colágeno tipo I com localizações aproximadas dos locais de clivagem da MMP (setas acima) e locais de clivagem de cisteína catepsina K (setas abaixo). As setas indicam atividades de clivagem da telopeptidase. As MMPs sempre clivam a parte da tripla hélice da molécula em $\frac{3}{4}$ do terminal N e $\frac{1}{4}$ dos terminais C. A cisteína catepsina K possui múltiplos locais de clivagem na tripla hélice. (B) Orientação das moléculas de colágeno do tipo I em tecidos duros. As extremidades dos terminais N e C de moléculas sucessivas são separados pela zona gap, que é o local dos minerais intrafibrilares (IF). (C) A periodicidade característica do colágeno é causada pela sobreposição de 4 (gap zone) ou 5 (overlap zone) moléculas individuais. Portanto, sua clivagem por enzimas com atividade telopeptidase resulta em perda gradual da periodicidade do colágeno. Fonte: Mazzoni et al., 2014 (20)

2.4 Adesão Dentinária

O objetivo de uma restauração adesiva é alcançar uma adaptação selada entre o material restaurador e o substrato dentário. Esta fixação íntima é possível no esmalte quando condicionado com ácido fosfórico, mas se torna desafiadora na dentina devido à quantidade significativa de água e matéria orgânica. Assim, foram desenvolvidos sistemas adesivos dentinários compatíveis com ambientes úmidos (21,31). Após a polimerização dos monômeros no adesivo, a mistura de colágeno, resina, água residual e cristais de hidroxiapatita forma uma camada híbrida que adere a restauração de resina ao substrato

dentinário (32).

As fibrilas de colágeno desmineralizadas são suscetíveis à degradação hidrolítica ou enzimática ao longo do tempo, resultando em vazios ou nanocanais desmineralizados dentro da camada híbrida (32,34). Com o passar do tempo, o grau de degradação aumenta e é principalmente concentrado na parte inferior da camada híbrida, onde o colágeno parece ser menos penetrado pelos monômeros (34) e apresenta elevada atividade enzimática. A eluição de resina por polímeros hidroliticamente instáveis na camada híbrida também pode levar à exposição das fibras de colágeno (32,34). Estas fibrilas recém-expostas, juntamente com as fibrilas de colágeno que não foram completamente envolvidas pelos monômeros durante o protocolo adesivo, são vulneráveis à fadiga mecânica e hidrolítica, além da degradação por enzimas colagenolíticas, como às MMPs, o que pode comprometer a integridade das ligações dentina-resina (32).

2.5 Clorexidina (CHX)

A clorexidina (CHX) é um composto bisbiguanida e membro dos monoclorobenzenos com uma estrutura é composta por duas unidades de (p-clorofenil)guanida ligadas por uma ponte hexametileno (Figura 2) (34,35,36,37).

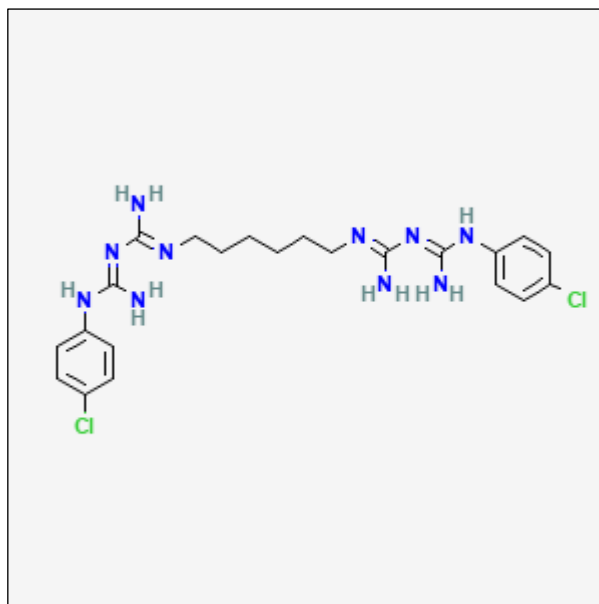


Figura 2. Estrutura molecular da clorexidina (C₂₂H₃₀Cl₂N₁₀). Fonte: National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 9552079, Chlorhexidine.

A CHX atua como agente antimicrobiano e tem sido estudada como um inibidor de proteases para preservar a camada híbrida, inibindo MMPs e catepsinas de cisteína (30,37). A inibição das proteases pela CHX está relacionada à sua propriedade quelante de cátions (20), uma vez que a CHX é capaz de remover os íons de zinco e cálcio, que são essenciais para a atividade das MMPs, além de poder reagir com os sítios catalíticos dessas enzimas (38). Sabe-se que a CHX possui alta substantividade para a dentina, tanto mineralizada quanto desmineralizada, e acredita-se que a inibição das MMPs ocorra de maneira puramente eletrostática e, portanto, reversível (39).

No entanto, antes de ser testada como potencial inibidor de MMP, a CHX foi utilizada pela primeira vez na adesão dentária como desinfetante antes da aplicação de adesivos dentinários (35). A aplicação de CHX durante o procedimento adesivo demonstrou aumentar a longevidade da camada híbrida em estudos *in vitro* (11,38). Com o objetivo de inibir a atividade enzimática endógena da dentina e, assim, melhorar a durabilidade da adesão, a CHX já foi testada de diferentes maneiras em ambientes clínicos: como um *primer* aquoso separado (37), misturada no *primer* de sistemas adesivos autocondicionantes de duas etapas (37), ou incorporada a adesivos (1). Já se sabe que a CHX exerce um efeito inibitório direto contra MMPs 2, 8 e 9 (40). Entretanto, uma revisão de literatura recente (38) concluiu que, apesar dos muitos achados *in vitro*, ainda não há evidências clínicas suficientes que apoiem o uso de CHX para melhorar o prognóstico de restaurações em resina composta.

2.6 Copaíba

As árvores de copaíba pertencem ao gênero *Copaifera*, família *Fabaceae* e subfamília *Caesalpinioideae*. São árvores comuns na América Latina e na África Ocidental, sendo encontradas, no Brasil, nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Amazônica (42). O óleo extraído da árvore, chamado como óleo de copaíba, tem sido utilizado há mais de 500 anos na medicina popular e apresenta diversas propriedades potenciais, como ação anti-inflamatória, antimicrobiana e antisséptica (43).

O óleo de copaíba é uma mistura de terpenos de variados pesos moleculares (44). Quimicamente, os terpenos são definidos como “alcenos naturais” e apresentam uma dupla ligação de carbono, sendo caracterizado como hidrocarbonetos insaturados (45). De acordo com alguns autores, foram descritos como provenientes do óleo de copaíba 72 sesquiterpenos (óleo essencial) e 27 ou 28 diterpenos (resina), dependendo da fonte (44,46). Os principais sesquiterpenos encontrados no óleo-resina da copaíba incluem o β -

cariophileno, que possui comprovada ação antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiedêmica (48), e o β -*bisaboleno*, cujas propriedades são descritas como anti-inflamatórias e analgésicas (44). Além desses, destacam-se também o α -*humuleno*, β -*selineno*, α -*bisabolol*, β -*elemeno*, γ -*cadineno*, α -*cadinol* (47), entre outros.

O óleo de copaíba tem sido objeto de pesquisas na Odontologia, mostrando-se como solução promissora, com resultados significativos em seu potencial bactericida e bacteriostático (13). No que diz respeito ao seu uso em tecido dentinário, estudos demonstraram sua eficácia na manutenção da resistência adesiva (46), evidenciando a formação de uma camada híbrida homogênea, regular e contínua, além da presença de *tags* independentes no substrato dentinário (47,50). Um estudo recente (13) destacou que uma emulsão contendo copaíba reduziu a atividade antiproteolítica das MMPs em dentes humanos. Embora os mecanismos ainda não sejam completamente elucidativos, a literatura sugere que essa ação na dentina pode ser atribuída aos hidrocarbonetos sesquiterpenos presentes nos óleos de copaíba (50). No entanto, ainda não foi possível alcançar um consenso sobre quais espécies de *Copaifera*s são mais compatíveis com os tecidos e a microbiota oral. (44)

2.7 Encapsulação em Nanocápsulas Poliméricas

Nos últimos 30 anos, diferentes sistemas carreadores têm sido extensivamente estudados com o objetivo de controlar a liberação do fármaco e melhorar a eficácia e seletividade das formulações (51). Os sistemas de liberação controlada de medicamentos são projetados para fornecer uma resposta apropriada no local de ação desejado por períodos prolongados, aprimorando o tratamento e diminuindo efeitos adversos (52).

Em geral, as nanocápsulas poliméricas são compostas por agente ativo/fármaco disperso em núcleo oleoso, envoltos com um polímero, além de surfactantes e solventes que participam da formulação (Figura 3). Elas são produzidas por diferentes métodos, apresentando distribuições estreitas de tamanho e diâmetros de aproximadamente 1 μ m (19). Uma técnica de obtenção das nanocápsulas é através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado, como pode ser observado na Figura 4. Os primeiros estudos sobre nanocápsulas poliméricas como transportadores de fármacos foram publicados na década de 70 por P. Speiser, J. Kreuter e P. Couvreur, que utilizaram, em geral, poli(acrilamida) e poli(alquilcianoacrilato) como polímeros (19). Atualmente, entre os polímeros mais utilizados na produção de nanocápsulas, estão a poli(ϵ -caprolactona) (PCL), o poli(lactídeo) (PLA), e o poli(lactídeo-co-glicólido) (PLGA) (19,52).

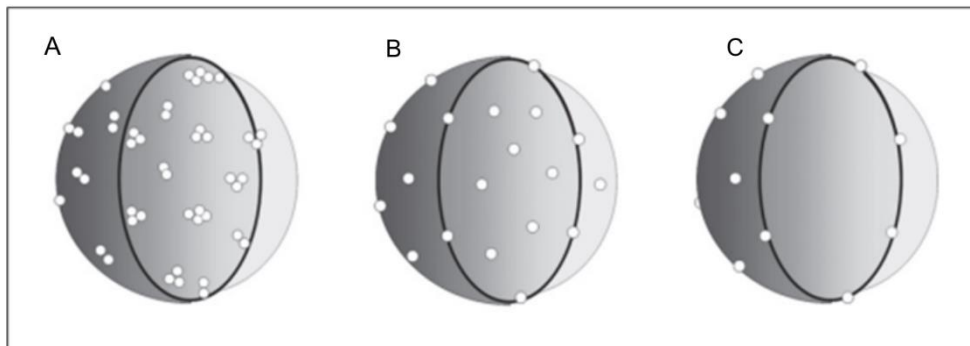


Figura 3. Modelos de mecanismo de encapsulamento de fármacos: A. Fármaco aprisionado. B. Fármaco dissolvido disperso C. Fármaco dentro da nanocápsulas.

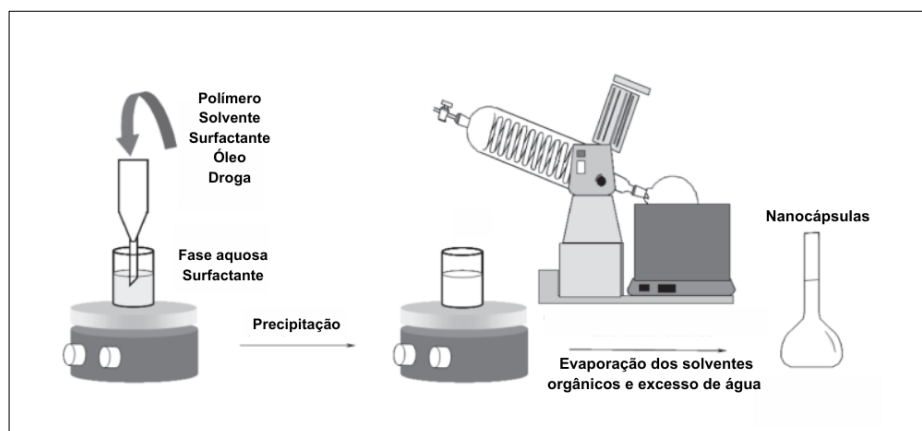


Figura 4. Esquema representativo da formulação das NCs através do método de deposição interfacial de polímero pré-formado. Fonte: Adaptado de Guterres et al. (50).

As nanocápsulas são geralmente produzidas em meio aquoso, resultando em uma solução coloidal turva (19,53,54,55). Essa solução pode ser usada como produto final ou incorporada em géis (54,55) ou ainda convertida em pós (52), com o objetivo de facilitar suas aplicações e aumentar a estabilidade física do produto (19). No caso da conversão em pós, um adjuvante de secagem é necessário para possibilitar o processo, evitando que as partículas venham a aderir ao equipamento (56,18).

Além da redução de potenciais efeitos adversos por meio do controle na entrega e na dosagem do fármaco, os sistemas de liberação controlada melhoram a estabilidade, biocompatibilidade e biodisponibilidade do princípio ativo (17,19). A literatura prévia (57) demonstra a liberação controlada de fármacos em sistemas adesivos, resultando em um efeito desejado prolongado, enquanto mantém satisfatoriamente suas propriedades físico-químicas e resistência de união. Além disso, estudos anteriores mostraram que

nanocápsulas em adesivos podem difundir-se nos túbulos dentinários, dentro dos ramos interconectados e nos espaços interfibrilares de colágeno da dentina (58,2). Apesar dessas vantagens, o uso de sistemas carreadores de agentes ativos na Odontologia adesiva ainda é pouco explorado (17).

3 JUSTIFICATIVA

Ainda existe uma série de limitações associadas à manutenção da estabilidade da camada híbrida. Portanto, são necessários mais estudos focados em agentes estabilizadores da matriz colágena dentinária, bem como na avaliação do efeito desses agentes sobre os aspectos físicos e químicos que envolvem a adesão. Além disso, nos últimos anos, vem crescendo a busca por materiais dentários e compósitos que, além de cumprir a função restauradora, possuam propriedades ativas benéficas ao tecido dentário.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi sintetizar, caracterizar e incorporar nanocápsulas contendo clorexidina em núcleo oleoso de copaíba a um adesivo e avaliar suas propriedades físico-químicas e atividade colagenolítica.

4.2 Objetivos específicos

- Formular e caracterizar nanocápsulas contendo clorexidina em núcleo oleoso de copaíba;
- Incorporar as nanocápsulas a um adesivo odontológico;
- Avaliar as propriedades físico-químicas do adesivo odontológico, através dos testes de grau de conversão, microdureza e degradação em solvente;
- Avaliar a resistência de união à microtração;
- Avaliar o efeito de desativação das metaloproteinases, através da avaliação da atividade colagenolítica.

5 ARTICLE – COLLAGENOLYTIC ACTIVITY, PHYSICOMECHANICAL PROPERTIES AND BOND STRENGTH OF A DENTIN ADHESIVE CONTAINING CHLORHEXIDINE AND COPAIBA NANOCAPSULES

5.3 MATERIALS AND METHODS

5.3.1 Preparation of NCs

5.3.2 Characterization of NCs

5.3.3 Formulation of the adhesive

5.3.4 Spectrophotometric assay for collagenase

5.3.5 Softening in ethanol

5.3.6 Degree of conversion

5.3.7 Microtensile bond strength (μ TBS)

5.4 RESULTS

5.5 DISCUSSION

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos avanços nos estudos em relação à adesão dentinária, a degradação enzimática que afeta a estabilidade da malha colágena na camada híbrida ainda é um desafio. Nesse contexto, surge a possibilidade de explorar agentes ativos já conhecidos e de fácil obtenção, tais como o óleo de copaíba e a clorexidina, que apresentam o potencial de inibir a ação enzimática. Além disso, o uso de sistemas carreadores de fármacos continua pouco explorado na Odontologia atual, o que torna o adesivo experimental contendo NC-CHXCOP uma proposta inovadora. O adesivo contendo NC-CHXCOP foi formulado, gerando resultados de inibição de

atividade enzimática com propriedades físico-químicas satisfatórias.

Estudos futuros ainda são necessários para avaliação longitudinal da resistência de união à microtração. O efeito inibidor da atividade colagenolítica foi demonstrado, mas o efeito específico em relação às metaloproteinases 2 e 9, que são as predominantemente encontradas em tecido dentinário, ainda deve ser explorado. Faz-se necessário também avaliar a ação isolada de nanocápsulas contendo apenas o óleo de copaíba, em face de efeito sinérgico à clorexidina no presente estudo. Além dessa ação, o potencial antimicrobiano e anti-inflamatório do óleo de copaíba podem ser objetos de estudos futuros.

6.1 PRESS RELEASE

Apesar do avanço na odontologia no que tange à adesão, muito ainda se discute sobre a durabilidade de restaurações em resina composta. Um dos motivos pelos quais isso se dá está na base estrutural adesiva que é a integridade e estabilidade das fibrilas de colágeno presentes na dentina, que são envoltas pelo material resinoso. Nesse sentido, o maior desafio se deve ao processo de ação enzimática de metaloproteinases endógenas, ativadas após o condicionamento ácido da dentina, às fibras colágenas expostas, podendo comprometer a estabilidade da câmara híbrida. No entanto, as atividades colagenolítica e gelatinolítica podem ser controladas por inibidores destas enzimas. Dentre os inibidores já estudados estão o óleo de copaíba e a clorexidina.

Assim, aliar estes inibidores a um sistema polimérico de liberação controlada de fármacos, ou seja, nanopartículas poliméricas, pode ser capaz de preservar as propriedades adesivas e melhorar seu desempenho a longo prazo. Assim, o objetivo deste estudo avaliou um adesivo contendo nanocápsulas com clorexidina em núcleo oleoso de copaíba bem como as suas propriedades físico-químicas e sua atividade colagenolítica.

REFERÊNCIAS

1. Nakabayashi N, Nakamura M, Yasuda N. Hybrid Layer as a Dentin-Bonding Mechanism. *J Esthet Restor Dent*. 1991 Jul;3(4):133–8.
2. Priyadarshini BM, Selvan ST, Lu TB, Xie H, Neo J, Fawzy AS. Chlorhexidine Nanocapsule Drug Delivery Approach to the Resin-Dentin Interface. *J Dent Res*. 2016 Jul 20;95(9):1065–72.
3. Fonseca BM da, Pleffken PR, Balducci I, Tay F, Pucci CR, Araujo MAM. New Trends in Dentin Bonding: Treatment with chlorhexidine, hyaluronic acid, vitamin C and green tea. *Braz Dent Sci*. 2013 Aug 6;16(3):56–62.
4. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer—A review. *Dental Materials*. 2013 Oct;29(10):999–1011.
5. Göstemeyer G, Schwendicke F. Inhibition of hybrid layer degradation by cavity pretreatment: Meta- and trial sequential analysis. *J Dent*. 2016 Jun; 49:14–21.
6. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A Critical Review of the Durability of Adhesion to Tooth Tissue: Methods and Results. *Journal of Dental Research*. 2005 Feb;84(2):118–32.
7. Demarco FF, Collares K, Correa MB, Cenci MS, Moraes RR de, Opdam NJ. Should my composite restorations last forever? Why are they failing? *Braz oral res*. 2017 Aug 28;31(suppl 1):e56.
8. Mazzoni A, Pashley D, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*. 2006 Sep;27(25):4470–6.
9. Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, et al. Effects of Etch-and-Rinse and Self-etch Adhesives on Dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res*. 2012 Nov 5;92(1):82–6.
10. Carrilho MRO, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine Preserves Dentin Bond in vitro. *J Dent Res*. 2007 Jan;86(1):90–4.
11. Breschi L, Maravic T, Comba A, Cunha SR, Loguercio AD, Reis A, et al. Chlorhexidine preserves the hybrid layer in vitro after 10-years aging. *Dent Mater*. 2020 May 1;36(5):672–80.
12. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year in vitro study. *Dent Mater*. 2010 Apr;26(4):320–5.

- 13.Araújo EAM, Lima GR, Aleixo L, de B, Carvalho M, Chacon N, et al. Effect of a Copaiba Oil-Based Dental Biomodifier on the Inhibition of Metalloproteinase in Adhesive Restoration. *Advances in pharmacological and pharmaceutical sciences*. 2021 Feb 17;2021:1–10.
- 14.Fulgência M, Lima, Lopes PP, Toda C, Venâncio GN, Lima GA, et al. Dentin Cleaning Ability of an Amazon Bioactive: Evaluation by Scanning Electron Microscopy. *The Open Dentistry Journal*. 2016 May 11;10(Suppl-1, M5):182–7.
- 15.Moon PC, Weaver J, Brooks CN. Review of Matrix Metalloproteinases' Effect on the Hybrid Dentin Bond Layer Stability and Chlorhexidine Clinical Use to Prevent Bond Failure. *Open Dent J*. 2010 Jul 20;4:147–52.
- 16.Kalagi S, Feitosa S, Münchow EA, Martins VM, Karczewski A, Cook NB, et al. Chlorhexidine-modified nanotubes and their effects on the polymerization and bonding performance of a dental adhesive. *Dent Mater*. 2020 May 1;36(5):687–97.
- 17.Dornelles NB, Collares FM, Genari B, de Souza Balbinot G, Maria S, Rodrigo Alex Arthur, et al. Influence of the addition of microsphere load amoxicillin in the physical, chemical and biological properties of an experimental endodontic sealer. *J Dent*. 2018 Jan 1;68:28–33.
- 18.Genari B, Leitune VCB, Jornada DS, Camassola M, Arthur RA, Pohlmann AR, et al. Antimicrobial effect and physicochemical properties of an adhesive system containing nanocapsules. *Dent Mater*. 2017 Jun 1;33(6):735–42.
- 19.Frank LA, Contri RV, Beck RCR, Pohlmann AR, Guterres SS. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2015 Jan 30;7(5):623–39.
- 20.Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of Dentin MMPs in Caries Progression and Bond Stability. *Journal of Dental Research*. 2014 Dec 22;94(2):241–51.
- 21.Arends J, Stokroos I, Jongebloed WG, Ruben J. The Diameter of Dentinal Tubules in Human Coronal Dentine after Demineralization and Air Drying. *Caries Research*. 1995;29(2):118–21.
- 22.Arana V, Katchburian E. *Histologia e Embriologia Oral*. Guanabara Koogan; 2023.
- 23.Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1993 Oct;4(5):679–728.
- 24.Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2011;3:711–35.
- 25.Gelse K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003 Nov 28;55(12):1531–46.
- 26.Hulmes DJS. *Collagen Diversity, Synthesis and Assembly*. Springer eBooks. 2008 May 9;15–47.

27. Mazzoni A, Mannello F, Tay F, Tonti G, Papa S, Mazzotti G, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. 2007;86(5).
28. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circulation Research*. 2003 May 2;92(8):827–39.
29. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldini S, et al. Optimizing dentin bond durability: Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dental Materials*. 2013 Jan;29(1):116–35.
30. Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjaderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *European Journal of Oral Sciences*. 2003 Apr;111(2):117–27.
31. Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin Adhesion and MMPs: A Comprehensive Review. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*. 2013 Feb 19;25(4):219–41.
32. Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological Aspects of the Resin-Dentin Interdiffusion Zone with Different Dentin Adhesive Systems. *Journal of Dental Research*. 1992 Aug;71(8):1530–40.
33. Garcia IM, Castelo V, Camassola M, Takimi AS, Maria S, Collares FM. Quantum Dots as Nonagglomerated Nanofillers for Adhesive Resins. *Journal of Dental Research*. 2016 Jun 28;95(12):1401–7.
34. Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjäderhane L, et al. MMP Activity in the Hybrid Layer Detected with *in situ* Zymography. *Journal of Dental Research*. 2012 Feb 21;91(5):467–72.
35. Pashley DH, Carvalho RM, Tay FR, Agee KA, Lee KW. Solvation of dried dentin matrix by water and other polar solvents. *American journal of dentistry*. 2024;15(2).
36. Perdigão J, Denehy G, Swift Jr E. Effects of chlorhexidine on dentin surfaces and shear bond strengths. *American journal of dentistry*. 2024;7(2).
37. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1999 May 1;6(3):437–9.
38. Josic U, Maravic T, Mazzitelli C, Del Bianco F, Mazzoni A, Breschi L. The effect of chlorhexidine primer application on the clinical performance of composite restorations: a literature review. *J Esthet Restor Dent* . 2020 Dec 27;33(1):69–77.
39. Uitto VJ, Turto H, Huttunen A, Lindy S, Uitto J. Activation of human leukocyte collagenase by compounds reacting with sulfhydryl groups. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 1980 May 1;613(1):168–77.
40. Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dental Materials*. 2010 Aug;26(8):779–85.

41. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1999 May 1;6(3):437–9.
42. Dwyer JD. The Central American, West Indian, and South American Species of *Copaifera* (Caesalpiniaceae). *Brittonia*. 1951 Jan 31;7(3):143.
43. Bayoumi RE, Ibrahim S. Assessment of Antibacterial Properties and Compressive Strength of Copaiba Oil –modified Glass Ionomer Cement versus Nanosilver or Nanogold-modified Glass Ionomer Cements: An In-Vitro Study. *Arab Journals Platform*. 2019;
44. Lima M, Cavalcante S, Wiedemann L, Veiga Junior V. Caracterização E Controle De Qualidade De Óleos De Copaíba (*Copaifera* Sp.) Utilizando Detecção De Marcadores Por Fator De Retenção Relativa Em Hptlc. *Química Nova*. 2020;
45. Galúcio C de S, Benites CI, Rodrigues RAF, Maciel MRW. SESQUITERPENES RECOVERY OF COPAIBA OIL-RESIN FROM MOLECULAR DISTILLATION. *Química Nova*. 2016;
46. Fulgência M, Freitas AL, Menezes M de SC, Silva S, Dias A, Araújo EAM, et al. Adhesive resistance of a copaiba oil-based dentin biomodifier. *Brazilian Oral Research*. 2020 Jan 1;34.
47. Veiga Junior VF, Pinto AC. O gênero *copaifera* L. *Química Nova*. 2002 May;25(2):273–86.
48. Oliveira E, Lameira O, Zoghbi M. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. *Rev Bras Pl Med*. 2006;(3):14–23.
49. Bandeira MF, Conde N, Toda C, Casaroto AR, Lima G, Vasconcellos M, et al. Biopharmaceutical Products and Biomaterials of the Amazon Region Used in Dentistry. Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration. 2019 May 22;
50. Bandeira MF, Conde N, Toda C, Casaroto AR, Lima G, Vasconcellos M, et al. Biopharmaceutical Products and Biomaterials of the Amazon Region Used in Dentistry. Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration. 2019 May 22;
51. Barratt GM. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 2000 May;3(5):163–71.
52. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*. 2007 Jul 11;2:147–57.
53. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JPh, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989 Oct;55(1):R1–4.

- 54.Guterres SR, Contri RV, Frank LA, Kaiser M, Pohlmann AR. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. *International Journal of Nanomedicine*. 2014 Feb;951.
- 55.Guterres S, Frank LA, Sandri G, D'Autilia F, Contri RV, Bonferoni MC, et al. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 2014 Jun;3151.
- 56.Marchiori MCL, Ourique AF, Silva C de B da, Raffin RP, Pohlmann AR, Guterres SS, et al. Spray-Dried Powders Containing Tretinoin-Loaded Engineered Lipid-Core Nanocapsules: Development and Photostability Study. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2012 Mar 1;12(3):2059–67.
- 57.Genari B, Leitune VCB, Jornada DS, Camassola M, Pohlmann AR, Guterres SS, et al. Effect of indomethacin-loaded nanocapsules incorporation in a dentin adhesive resin. *Clinical Oral Investigations*. 2016 Apr 12;21(1):437–46.
- 58.Ouyang X, Huang X, Pan Q, Zuo C, Huang C, Yang X, et al. Synthesis and characterization of triethylene glycol dimethacrylate nanocapsules used in a self-healing bonding resin. *Journal of Dentistry*. 2011 Dec 1;39(12):825–33.