



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



INGRID DE OLIVEIRA CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DO
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADO À ALOE VERA EM
SUBCUTÂNEO DE *RATTUS NORVEGICUS***

Teresina

2016

INGRID DE OLIVEIRA CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DO
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADO À ALOE VERA EM
SUBCUTÂNEO DE *RATTUS NORVEGICUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Linha de Pesquisa: Análise de Situação de Saúde em Odontologia

Orientadora: Prof^a Dr^a. Carmen Milena Rodrigues Siqueira Carvalho

Teresina

2016

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DO
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADO À ALOE VERA EM
SUBCUTÂNEO DE *RATTUS NORVEGICUS***

COMISSÃO EXAMINADORA

1) Profa. Dra. Carmen Milena Rodrigues Siqueira Carvalho

Titulação: Doutora em Odontologia (Dentística e Endodontia)

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Profa. Dra. Lucielma Salmito Soares Pinto

Titulação: Doutora em Estomatopatologia

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Profa. Dra. Simone Souza Lobão Veras Barros

Titulação: Doutora em Patologia Bucal

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Suplente:

1) Profa. Dra. Carmen Dolores Vilarinho Soares de Moura

Titulação: Doutora em Ciências Odontológicas – Prótese Dentária

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Teresina

2016

DEDICATÓRIA

- À Ledinha, minha rainha, que guiou todos os meus passos até essa conquista

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meus passos em toda minha vida, por me erguer após cada queda e por me manter firme na minha fé e nos meus objetivos.

Ao meu herói, meu pai, Michel, que abriu mão de tantas coisas em nome da minha educação, do meu bem-estar e da minha felicidade. Espero que essa vitória o faça orgulhoso. Agradeço pelo seu apoio incondicional e amor absoluto.

À minha vó Lêda, que foi minha inspiração para seguir em frente.

À Professora, orientadora e amiga Carmen Milena Rogrigues Siqueira Carvalho, por ter me dado a chance de tentar mostrar que sou digna de sua orientação, de sua confiança e de sua amizade. Nunca poderei agradecer o suficiente por tudo que você me ensinou ao longo desses anos. Que Deus abençoe você e sua família.

A todo nosso grupo de pesquisa, em especial à Isadora Melo, que me ensinou tudo que precisei saber nesses dois anos de curso, e por sempre estar disposta a me ajudar, mesmo de longe. Desejo muito sucesso em sua carreira. E à Ingrid Lopes, que foi crucial para conquistarmos o prêmio no SBPqO. Admiro muito sua coragem e seu talento. Agradeço também às minhas orientadas, Carol, Ana Victória e Leilanne, por me dar a oportunidade de aprender junto com vocês.

Às queridas mestras Ana Cristina Fialho, Elonice Melo, Vera Prado, Josilda Floriano e Carmem Dolores pela torcida diária, ensinamentos, exemplos, “cafés com bolo” e “bate papos” nas clínicas. Levo todas no coração com grande carinho.

Às funcionárias Aninha, Adriana, Odete, Marlúcia e Domingas, por sempre cuidarem bem de mim.

À Universidade Federal do Piauí– UFPI, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof.

Dr. José Arimatéia Dantas Lopes e Vice-Reitora Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PRPPG) na pessoa de Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha;

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia coordenado pelo Prof^o. Dr. Glauber Campos Vale;

A todo corpo docente do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPI, pelos conhecimentos transmitidos;

Ao funcionário da Secretaria de Pós-graduação Plínio José da Paz e Silva pelo seu trabalho impecável e por todo suporte que nos deu ao longo do curso

Aos Professores, Dra. Lucielma Salmito Soares Pinto, Dra. Simone Souza Lobão Veras Barros, Dra. Carmem Dolores Vilarinho Soares de Moura membros da Banca Examinadora, por terem atendido prontamente ao convite, dispondo de seu tempo e conhecimento para correção desta dissertação;

À toda 4^a turma PPGO-UFPI, pelo companheirismo, apoio, dicas, risadas, lágrimas, “selfies” e piadas internas. Esse curso se tornou mais leve com a presença de vocês. Agradeço por ter conhecido novas pessoas maravilhosas e iluminadas: Fabiana Rolim, Ricardo Costa e Kassio Macedo. Agradeço por conhecer melhor colegas antigos: Hellen Samia, Alessandra Pontes, Thais Torres, Romário Reis, Natália Andrade e, principalmente, minha duplinha de todos os trabalhos, Urias Vasconcelos. Obrigada por sempre me ajudar, por estar ao meu lado e por ser essa pessoa brilhante que você é.

Ao Biotério e aos Laboratórios de Histologia da UFPI pela prontidão em me disponibilizar tudo que precisei. Ao professor Airton Mendes Conde Júnior por

me ensinar tudo que sei sobre processamento. Ao técnico Paulinho por cuidar dos meus “bebês”, à Mestranda Andrezza Braga pela ajuda nas lâminas e à Doutoranda Dayane Miranda, pela leitura e mensuração morfométricas das mesmas.

Aos meus amigos da graduação, que estiveram comigo durante a jornada, torcendo por mim: Isaac Luís, Gybson Frota, Anita Jaciara. Ao Lucas Nannini, pelo seu carinho e por ser um porto seguro nos momentos difíceis.

À minha família, principalmente meus avós, padrinhos e minha prima Amanda por acompanharem de perto essa jornada e sempre me dizer que “vai dar certo”.

Aos amigos Fernando Muratori, Gerlane Costa e suas famílias por seus conhecimentos de causa e por sempre me estimular a crescer mais e mais.

Aos irmãos Antônio Junior, João Vitor e Mônica Damasceno, por serem meus melhores amigos por tantos anos.

Ao estatístico Israel Oliveira que realizou as análises deste trabalho.

Aos meus empregadores por sempre permitir que eu me ausentasse para cumprimento das obrigações com o programa.

Aos meus alunos do estágio de docência. Aprendi muito com vocês e espero ter conseguido transmitir meus conhecimentos e meu amor pela odontologia para vocês. Obrigada por terem paciência comigo. Um abraço especial para Renara Cerqueira, minha monitora do coração.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

Muito obrigada!

LISTADE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aloe – *Aloe vera*

bFGF– Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico

Ca(OH)₂ – Hidróxido de Cálcio

CEEA– Comitê de Ética em Animais

HE – Hematoxilina e Eosina

MTA – Mineral Trióxido Agregado

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

TGF-β-1– Fator Transformador de Crescimento β-1

LISTADE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre as substâncias no período experimental de 7 dias.

Tabela 2 – Comparação entre as substâncias no período experimental de 15 dias.

Tabela 3 – Comparação entre as substâncias no período experimental de 30 dias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – A: Grupo controle 7 dias após o procedimento cirúrgico. B: Grupo controle 15 dias após o procedimento cirúrgico. C: Grupo controle 30 dias após o procedimento cirúrgico.

Figura 2 – A: Grupo clorexidina após 7 dias do procedimento cirúrgico. B: Grupo clorexidina após 15 dias do procedimento cirúrgico. C: Grupo clorexidina após 30 dias do procedimento cirúrgico.

Figura 3 – A: Grupo Aloe vera após 7 dias do procedimento cirúrgico. B: Grupo Aloe vera após 15 dias do procedimento cirúrgico. C: Grupo Aloe vera após 30 dias do procedimento cirúrgico.

Figura 4 – Lâminas mostrando a imunorreatividade tecidual da proteína Ki-67 em amostras de Aloe vera, Clorexidina e Controle, nessa ordem, após 7 dias.

Figura 5 – Lâminas mostrando a imunorreatividade tecidual da proteína Ki-67 em amostras de Aloe vera, Clorexidina e Controle, nessa ordem, após 15 dias.

Figura 6 – Lâminas mostrando a imunorreatividade tecidual da proteína Ki-67 em amostras de Aloe vera, Clorexidina e Controle, nessa ordem, após 30 dias.

Sumário

1. RESUMO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Hidróxido de Cálcio.....	13
2.2. Clorexidina.....	16
2.3. Aloe vera.....	18
2.4. Referências.....	22
3. ARTIGO.....	28
3.1. RESUMO.....	29
3.2. INTRODUÇÃO.....	31
3.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.3.1. Desenho do Estudo e Caracterização.....	35
3.3.2. Manipulação dos materiais.....	35
3.3.4. Animais utilizados e alocação dos grupos.....	36
3.3.5. Procedimentos cirúrgicos e eutanásia.....	36
3.3.6. Análise histológica.....	37
3.3.7. Análise estatística.....	38
3.4. Resultados.....	39
3.4.1 Achados Histológicos.....	39
3.4.2. Achados Imunohistoquímicos.....	43
3.5. Discussão.....	46
3.6. Conclusões.....	52
3.7. Agradecimentos.....	52
3.8. Conflito de Interesse.....	52
3.9. Importância para Endodontia.....	52
3.10. Referências.....	53
ANEXOS.....	57
ANEXO 1.....	58
ANEXO 2.....	60

1. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar histológica e imunohistoquimicamente a biocompatibilidade de uma pasta experimental composta por hidróxido de cálcio associado à *Aloe vera* em tecido subcutâneo de ratos. 45 animais foram divididos em três grupos, de acordo com os materiais testados (hidróxido de cálcio P.A. com *Aloevera*, água destilada ou clorexidina 2%) e diferentes tempos experimentais (07, 15 e 30 dias). Tubos de polietileno com as pastas foram implantados no dorso dos animais. Nos tempos experimentais determinados as peças implantadas foram removidas e cortes foram realizados para a análise histológica e imunohistoquímica. Grupo 7 dias: O subgrupo controle apresentou exsudato rico em fibrina, com leve presença de células inflamatórias. O subgrupo da clorexidina apresentou leve infiltrado inflamatório com neoformação vascular e fibroblastos. O subgrupo *Aloe vera*, apresentou grande quantidade de fibras colágenase acentuada migração de células polimorfonucleares para as proximidades dos vasos sanguíneos. Grupo 15 dias: o subgrupo controle apresentou leve formação de tecido de granulação e o subgrupo *Aloe vera* apresentou tecido conjuntivo com poucas células inflamatórias e fibras colágenas desorganizadas. O subgrupoclorexidina apresentou moderado infiltrado inflamatório. Em 30 dias todos os subgrupos apresentaram resultados semelhantes, tendo os subgrupos *Aloe vera* e clorexidina mostrado rara presença de núcleos corados com anticorpo contra ki-67. Conclui-se que o *Aloe vera* apresentou propriedades anti-inflamatórias e reparadoras que nos faz acreditar que o mesmo possa ser indicado.

A revisão de literatura foi realizada utilizando-seo portal de periódicos da Capes. Os seguintes descritores foram pesquisados: *CalciumHydroxide*, *Aloe*, *BiocompatibleMaterials*, *DentistryeEndodontics*.

1.1. Hidróxido de Cálcio

O hidróxido de cálcio é atualmente utilizado em diversas formas, por meio de diferentes aplicações e em várias modalidades de tratamentos endodônticos. Formulações à base de Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)_2) são utilizadas para tratamento de perfurações , fraturas e reabsorções radiculares e tem um papel significativo na traumatologia dentária, por exemplo, após avulsão dentária e luxação.

O Ca(OH)_2 é uma substância de grande alcalinidade, com pH 12,5 que é um meio desfavorável para a maioria dos patógenos endodonticamente relevantes, e sua capacidade de ceder íons Ca^{++} aos tecidos confere uma ação antimicrobiana e indutora de mineralização a este material².

Os veículos inertes comumente utilizados em associação ao Ca(OH)_2 são biocompatíveis, porém não influenciam na capacidade antimicrobiana deste; os mais comumente usados são a água destilada, o soro fisiológico, anestésicos, glicerina, óleo de oliva e propilenoglicol. Diferentemente dos veículos inertes, os veículos ativos contribuem com efeitos adicionais. O paramonoclorofenol, a clorexidina, a cresatina e o tricresol formalina constituem alguns desses veículos. Assim, a escolha do veículo dependerá do tipo de tratamento e da velocidade de dissociação iônica preconizada^{3, 4}.

Devido às suas propriedades antibacteriana, indutora de mineralização, biocompatível e antiinflamatória, o hidróxido de cálcio exerce atualmente um

papel de extrema importância nos tratamentos endodônticos⁵ por apresentar características como: a) controle microbiano, b) dissolução de restos orgânicos, c) poder antiinflamatório, d) inibição de reabsorções inflamatórias⁶.

Para comprovar tais propriedades, diversos estudos foram realizados. Em dentes permanentes com ápice aberto, há o estudo de Soares et al.⁷, no qual relataram um caso clínico sobre a apicificação induzida pelo hidróxido de cálcio. O paciente em questão possuía 10 anos de idade, tinha queixas de dor intensa e edema na região da face, compatível com um abscesso dento alveolar agudo. O dente 11 exibiu, radiograficamente, formação radicular incompleta, mostrada por uma radiolucência apical. Primeiramente o abscesso foi drenado e sanado. O tratamento de apicificação teve início na segunda sessão após 7 dias, utilizando-se preparo químico-mecânico, com limas K-File e irrigação com solução de hipoclorito de sódio 2,5%. Uma pasta à base de hidróxido de cálcio foi inserida no canal radicular e renovada diversas vezes em mais de 8 meses, até que o exame radiográfico revelou a total formação radicular. O canal radicular foi obturado pela compactação termomecânica da guta-percha e cimento. Após 3 da finalização do tratamento, constatou-se a normalidade dos tecidos e ausência de sintomatologia.

Ainda com relação à dentes permanentes imaturos, foi feito um estudo que comparou os resultados clínicos do tratamento de apicigênese em 40 incisivos com apicificação incompleta utilizando-se hidróxido de cálcio ou agregado trióxido mineral (MTA) e concluiu-se que apesar de os incisivos com ápices abertos tratados com MTA formarem a barreira apical de tecido duro mais rapidamente, o alongamento e crescimento da raiz mostrou-se mais satisfatório nos dentes tratados com Ca(OH)_2 ⁸.

Com relação à capacidade antimicrobiana, Mohammadi⁹ em 2012 elaborou uma revisão sobre o assunto, e dentre suas conclusões afirmou que o hidróxido de cálcio exerce efeitos antibacterianos no sistema de canais radiculares, enquanto um pH elevado é mantido; observou que canais radiculares tratados com Ca(OH)_2 possuíam menos bactérias do que aqueles tratados com paramonoclorofenol canforado ou monoclórofenol canforado e comentou que para o hidróxido de cálcio ser eficaz na prevenção do crescimento de microorganismos, há a necessidade do contato direto para atingir o efeito antibacteriano ideal⁹.

Pattama et al.¹⁰ estudaram a eficácia do Ca(OH)_2 no tratamento de revascularização. O objetivo do estudo foi investigar a capacidade de fixação das células papilares apicais (APCs) humanas viáveis, utilizando-se para a análise a técnica de imunofluorescência, o ensaio de Alamar Azul, e a digitalização por microscopia eletrônica. APCs foram cultivadas em superfícies de dentina radicular tratadas com a pasta 3Mix-MP ou com Ca(OH)_2 em diferentes concentrações. Após as análises os autores concluíram que um maior número de células ligadas foi observado nos grupos cuja superfície foi tratada com Ca(OH)_2 .

A eficácia do Ca(OH)_2 quando utilizado sozinho, porém, vem sendo questionada. Kim & Kim¹¹ fizeram uma revisão de literatura sobre o efeito antimicrobiano de tal substância como medicação intracanal por meio de estudos *in vitro* e concluíram que as pesquisas mostraram resultados variados e conflitantes. Embora alguns tenham confirmado o efeito antimicrobiano do Ca(OH)_2 , outros questionaram sua eficácia. A primeira parte da revisão relaciona o efeito antimicrobiano do Ca(OH)_2 como íons hidroxila liberados em

meio aquoso, o que afeta membranas citoplasmáticas, proteínas e o DNA de microrganismos, porém ele é menos eficaz contra espécies específicas, tais como *E. faecalis* ou *C. albicans*. A adição de veículos ou outros agentes podem contribuir para o efeito antimicrobiano do Ca(OH)_2 .

Isso posto, diversos trabalhos foram feitos adicionando substâncias ao Ca(OH)_2 , um deles¹² utilizou a clorexidina como princípio ativo junto ao Ca(OH)_2 como pasta para tratamento de necrose pulpar em dentes decíduos. Amostras microbiológicas foram coletadas antes e depois do tratamento endodôntico e em seguida analisadas. Concluiu-se que o Ca(OH)_2 associado à Clorexidina tem maior eficácia do que o Ca(OH)_2 com um veículo inerte, agindo tanto na diminuição da carga bacteriana total, como também contra microrganismos gram positivos e gram negativos.

1.2. Clorexidina

A clorexidina é definida como um detergente catiônico, da classe das bisbiguanidas, disponível nas formas de acetato, hidrocloreto e digluconato, que é a forma de apresentação do produto mais utilizada na odontologia. Ela foi sintetizada por volta dos anos 40 e introduzida no mercado em 1954 como um antisséptico para ferimentos na pele¹³.

Diversas utilidades para a clorexidina foram sugeridas ao longo dos anos, por exemplo, uso em espermicidas para impedir a transmissão do vírus HIV¹⁴, uso para a preparação de pacientes em procedimentos¹⁵, para anti-sepsia da pele das mãos e em tratamentos de feridas e queimaduras^{16,17}. Além disso, a OMS recomenda clorexidina para a limpeza de cordões umbilicais, pois esta pode reduzir significativamente o risco de onfalite¹⁸. Stevens e colaboradores¹⁹,

HaY Cheung e Abad-Villar e colaboradores²⁰descreveram a utilização de clorexidinaem soluções para desinfetar lentes de contato, devido à sua baixa toxicidade.

Na odontologia, é utilizada como um antisséptico bucal paraprevenção da formação de placa dentária e gengivite e para eliminar patógenos orais^{21,22}.Apresenta efeito sobre bactérias gram positivas, gramnegativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos, é considerada um antimicrobiano de amplo espectro de ação²³. Løe e Rindom Schiott²⁴foram dos primeiros pesquisadores que demonstraram que colutórios de uma solução de gluconato de clorexidinaa 0,2% mostraram eficácia na diminuição do crescimento do biofilme bacteriano e, conseqüentemente,melhoras dos quadros de gengivite clinicamente detectáveis.

Além de seu uso na periodontia, a clorexidina é uma substância amplamente utilizada nos tratamentos endodônticos. Por exemplo, na forma degluconato de clorexidina, ela pode ser utilizadacomo um irrigante ou medicação intracanal,devido à sua biocompatibilidade, substantividadee ampla atividade antimicrobiana^{25,26}

Sua propriedade antimicrobiana é atribuída à presença de uma molécula catiônica em sua estrutura, que é adsorvida pelas células da membrana interna dos microorganismos, devido à presença de carga negativa nas mesmas. A consequência desse fenômeno é a fuga decomponetes intracelulares.Portanto, é um agente eficaz contra bactérias gram positivas e gramnegativas²⁷.

A associação da clorexidina com outras substâncias também já foi estudada, dentre elas, o Ca(OH)_2 . Saatchi e colaboradores²⁸ em 2014 realizaram uma revisão sistemática e metanálise sobre o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio associado à clorexidina contra o *Enterococcus faecalis* e concluíram que a pasta não foi mais efetiva do que o Ca(OH)_2 puro em amostras *ex vivo*.

1.3. Aloe vera

Atualmente, o estudo da fitoterapia em programas preventivos e curativos tem estimulado a avaliação da atividade de diferentes extratos de plantas. O hábito de empregar o uso de plantas no restabelecimento da saúde pelos próprios membros da comunidade, comum a todos os povos e quase esquecido por décadas, vem, nos últimos anos, se tornando importante. No entanto, o emprego correto de plantas para fins terapêuticos requer o uso de plantas selecionadas para sua eficácia e segurança, cientificamente validadas como medicinais²⁹.

Capazes de proporcionar importantes propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas, hipoglicêmicas e antidiabéticas, imunomoduladoras, cicatrizantes e regenerativas³⁰, as espécies de plantas do gênero Aloe (Liliaceae) têm sido estudadas, devido às suas propriedades medicinais, incluindo a Aloe vera, uma espécie que contém substâncias biologicamente ativas³¹.

Sobre sua capacidade redutora da inflamação, sabe-se que o produto inibe a via cicloxigenase e reduz a prostaglandina E2, além de possuir em sua composição o composto anti-inflamatório conhecido por cromona C –

glicosilo³². Além disso, as enzimas bradiquinase e peptidase foram isoladas a partir do extrato Aloe, substâncias responsáveis pela quebra da bradicinina, uma substância inflamatória que induz a dor³³. Gupta & Malhotra em 2012 elaboraram um estudo sobre os atributos farmacológicos da *Aloe vera*. Com base no material estudado, conclui-se que a *Aloe* possui diferentes mecanismos que proporcionam efeitos terapêuticos em feridas que incluem manter a ferida úmida, aumentar a migração celular epitelial, promover uma rápida maturação de colagénio e promover a redução da inflamação³⁴.

A capacidade antifúngica da Aloe foi estudada por meio da extração de nanopartículas de prata de folhas de *Aloe vera* e utilização destas contra dois patógenos: *Rhizopus* sp. e *Aspergillus* sp. As nanopartículas preparadas foram caracterizadas por SEM, FT-IR e por espectroscopia de UV-Vis. A partir da microscopia de varredura foi possível evidenciar que as partículas são heterogêneas em forma, tais como retangular, triangulares e esféricas com uma distribuição uniforme. O estudo de FT-IR revelou picos de absorção em 1,631 e 3,433 cm^{-1} para os grupos amida e hidroxilas, respectivamente. Dessa forma, os autores concluíram que nanopartículas de prata originadas da folha de Aloe vera possuem grande potencial antifúngico³⁵.

Suas propriedades antivirais auxiliam no tratamento de herpes simples e infecções de herpes zoster. Áreas de ferida da mucosa oral que são cobertas por próteses podem ser tratadas com géis à base de aloe, já que, como dito acima, é um ótimo agente antifúngico. Além disso, reduzem a dor associada a úlceras nas comissuras bucais³⁶.

Além de antifúngica, a Aloe atua sobre a síntese de fibras colágenas, conseqüentemente, no reparo tecidual, como foi comprovado por Aroe

colaboradores, em 2012. Para chegar a tal conclusão, os pesquisadores seccionaram parcialmente o tendão calcâneo de ratos, aplicando em seguida uma pomada de ação tópica à base de *Aloe*. Os animais foram, então, separados em dois grupos: o primeiro com tendões tratados com o extrato de *Aloe* e o segundo, controle, tratado com pomada sem extrato. As análises dos resultados indicaram um efeito benéfico da *aloe* na reorganização do tecido na região seccionada do tendão, 21 dias após a lesão, suportado por um aumento de metaloproteinase do tipo 2³⁷. A cicatrização de lesões tardias causadas por radiação aguda também se mostrou acelerada após o uso da *Aloe*, ação comprovada devido ao aumento da produção de fator transformador de crescimento β -1 (TGF- β -1) e da produção de fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF)³⁸.

Na odontologia, as pesquisas com *Aloe vera* também mostraram resultados promissores, por exemplo, propriedades antissépticas e anti-inflamatórias, úteis no tratamento da gengivite. Estudos clínicos comprovam que bochechos e dentifrícios contendo *aloe vera* têm mostrado uma redução notável na gengivite e acúmulo de placa após a sua utilização^{39,40}. Estudos realizados por Gita Bhatt et al. revelaram que o uso de gel de *aloe vera* administrado subgengivalmente apresentou resultados promissores no tratamento de bolsas periodontais⁴¹.

Kriplanie colaboradores⁴², em 2013, realizaram um estudo comparando a ação antimicrobiana de diversos materiais endodônticos. *Aloe vera* com água destilada, óxido de zinco e eugenol associado e não associado ao *Aloe vera* hidróxido de cálcio com água destilada e *Aloe vera*, Hidróxido de cálcio com água destilada e Hidróxido de cálcio com iodofórmio e vaselina foram os

materiais analisados. O trabalho concluiu que todos os materiais, exceto a vaselina, mostraram alguma eficácia contra as bactérias, porém o grupo com a atividade antimicrobiana superior foi o que utilizou *Aloe vera* com água destilada, seguido dos grupos óxido de zinco e eugenol + *Aloe vera*, óxido de zinco e eugenol e hidróxido de cálcio com água destilada. O grupo com hidróxido de cálcio, iodofórmio e vaselina não mostrou resultados significantes⁴².

A aloe também foi testada em dentes decíduos. Khairwa e colaboradores⁴³ avaliaram clínica e radiograficamente uma pasta à base de óxido de zinco e eugenol e aloe vera como um material de obturação de dentes decíduos. Para isso foram selecionadas 50 crianças com idades entre 4 e 9 anos apresentando molares decíduos comprometidos. Destas, 15 crianças foram selecionadas aleatoriamente para o tratamento endodôntico. A obturação foi feita com uma mistura de pó de óxido de zinco e o gel de aloe vera. A avaliação clínica e radiográfica foi realizada após 7 dias, 1 mês, 3 meses, 6 meses e 9 meses e concluiu-se que o tratamento endodôntico utilizando uma mistura a pasta mostrou sucesso clínico e radiográfico.

1.4. Referências

1. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal*, 44, 697–730, 2011.
2. Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Odontologia: Endodontia/ Trauma. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2002.
3. Giro EMA.;lost HI, Lia RCC. Análise histopatológica comparativa em polpa de dentes de cães após pulpotomia e utilização de pastas a base de Hidróxido de cálcio em diferentes veículos. *Rev. Odontol. UNESP*. 1994, v.23, n.2, p.191-201.
4. Braga V, Otani AY, Moura AAM. Hidróxido de cálcio como medicação intracanal: associações e técnicas de inserção. *Rev. Inst. Ciênc. Saúde*, Jul./Dez.1997. v.15, n.2, p.101-107.
5. Silva-Herzog DF, Velásquez LMA, Rímola JL. Comparación del hidróxido de calcio como medicamento intraconducto, utilizando vehículos viscosos y acuosos: Estudio in vitro. *Revista ADM*, v.60, n.1, p. 14-18, enero/ febrero.2003.
6. Lopes HP, Siqueira Jr. JF. Medicação Intracanal. In: Lopes HP, Siqueira Jr. JF, Endodontia Biología e Técnica. Rio de Janeiro: *Medsí*(2004), 581-618.
7. Soares J, Santos S, César C, Silva P, Sá M, Silveira F, Nunes E. Calcium hydroxide induced apexification with apical root development: a clinical case report. *Int Endod J*. 2008 Aug;41(8):710-9. Epub 2008 Jun 28.
8. Li-Wan L., Sung-Chih H., Yun-Ho L., Chiung-Fang H., Sheng-Huang H., Wei-Chiang H. Comparison of clinical outcomes for 40 necrotic immature permanent incisors treated with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate

apexification/apexogenesis, Journal of the Formosan Medical Association, Volume 114, Issue 2, February 2015, Pages 139-146.

9. Mohammadi Z, Shalavi S, Yazdizadeh M. Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide in Endodontics: A Review. ChonnamMed J. 2012 Dec;48(3):133-140.

10. Pattama K., Tanida S. Attachment Ability of Human Apical Papilla Cells to Root Dentin Surfaces Treated with Either 3Mix or Calcium Hydroxide, Journal of Endodontics, Volume 42, Issue 1, January 2016, Pages 89-94

11. Krishna K, Kidiyoor K, Rao R. Histological evaluation of calcium hydroxide and dentin bonding agent in direct pulp capping: - an in vivo study. *Journal of Conservative Dentistry. HighBeam Research.* 2 Feb. 2016

12. Nadia S. Ferreira, Frederico C. Martinho, Flavia G.R. Cardoso, Gustavo G. Nascimento, Cláudio A.T. Carvalho, Marcia C. Valera, Microbiological Profile Resistant to Different Intracanal Medications in Primary Endodontic Infections, *Journal of Endodontics*, Volume 41, Issue 6, June 2015, Pages 824-830.

13. Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol Chemother.* 1954;9(2):192-6

14. Martindale: The complete drug reference. Pharmaceutical Press, London, 35th ed. 2007.

15. Trabulsi LR and Alterthum F. *Microbiologia*, Sao Paulo, Atheneu, 4th ed. 2005.

16. Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER, Conway BR and Lambert PA. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination

with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62 2008:1031–1036.

17. Gajadhar T, Lara A, Sealy P and Adesiyun AA. Microbial contamination of disinfectants and antiseptics in four major hospitals in Trinidad. *Revista Panamericana de Salud Publica* 14(3) 2003:193–200.

18. Mullany CL, Darmstadt GL, Khatri SK, Katz J, Leclercq SC, Shrestha S, Adhikari R and Tielsch JM. Topical applications of chlorhexidine to the umbilical cord for prevention of omphalitis and neonatal mortality in southern Nepal: A community-based, cluster-randomised trial. *Lancet* 367 2006:910–918.

19. Stevens LE, Durrwachter JR and Helton DO. Analysis of chlorhexidine sorption in soft contact lenses by catalytic oxidation of (¹⁴C) chlorhexidine and by liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Science* 75 1986:83–86.

20. Ha Y and Cheung AP. New stability-indicating high performance liquid chromatography assay and proposed hydrolytic pathways of chlorhexidine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 14 1996:1327–1334

21. Abad-Villar EM, Etter SF, Thiel MA and Hauser PC. Determination of chlorhexidine digluconate and polyhexamethylenebiguanide in eye drops by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Analytica Chimica Acta* 561 2006:133–137.

22. Havlíková L, Matysová L, Nováková L, Hájková R and Solich, P. HPLC determination of chlorhexidine gluconate and pchloroaniline in topical ointment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 2007:1169–1173.

23. Amorin CVG, Aun CE, and Mayer MP. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Brazilian Oral Research* 18(3) 2004:242–246.
24. Van der Weijden GA, Timmerman MF, Novotny AG, Rosema NA, Verkerk AA. Three different rinsing times and inhibition of plaque accumulation with chlorhexidine. *J Clin Periodontol.* 2005;32(1):89-92.
25. Loe H, Schiott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res.* 1970;5(2):79-83.
26. Estrela CR, Estrela C, Reis C, Bammann LL, Pécora JD. Control of microorganisms in vitro by endodontic irrigants. *Braz Dent J.* 2003;14:187-92.
27. Evanov C, Buxton TB, Joyce Ap. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide and chlorhexidine gluconate irrigants at 37 degrees C and 46 degrees C. *J Endod.* 2004;30:653-7
28. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994;20:276-8
29. Saatchi M, Shokrane AH, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Applied Oral Science.* 2014;22(5):356-365. doi:10.1590/1678-775720140032.

30. Lorenzi H. Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas. Nova Odessa: Ed. *Instituto Plantarum de Estudo da Flora ITDA*; 2000. p.35-58
31. Mendes, M.A; Nunes, L.S.S; Fachin, E.V.F. Alternativas de Medicação Intracanal em Casos de Necrose Pulpar com Lesão Periapical. *Revista Odonto Ciência*. Vol. 21. No. 54. 2006
32. Bernardes I, Rodrigues MPF, Bacelli GK, Munin E, Alves LP, Costa MS. Aloe vera extract reduces both growth and germ tube formation by *Candida albicans*. *Mycoses*. 2012;55(3):257-61
33. Hutter JA, Salmon M, Stavinoha WB, Satsangi N, Williams RF, Streeper RT, et al. Anti-inflammatory C-glycosylchromone from aloe barbadensis. *J Nat Prod*. 1996; 59:541-543.
34. Ito S, Teradaira R, Beppu H, Obata M, Nagatsu T, Fujita K. Properties and pharmacological activity of carboxypeptidase in *Aloe arborescens* Mill var. *natalensis* Berger. *Phytother Res*. 1993;7: S26–9.
35. Gupta, Vinay K., and Seema Malhotra. Pharmacological Attribute of *Aloe Vera*: Revalidation through Experimental and Clinical Studies. *Ayu* 33.2 (2012): 193–196.
36. Medda S, Hajra A, Dey U, Bose P, Mondal NK. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Aloevera* leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus* sp. and *Aspergillus* sp. *Applied Nanoscience*. October 2015, Volume 5, Issue 7, pp 875-880.
37. Sujatha G, Muruganandan G, SenthilKumar J, SrinivasaPrasad T. Aloe vera in dentistry. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, October, 2014, Vol.8 (10), pp.ZI01-ZI02.

38. Aro AA, Nishan U, Perez MO, Rodrigues RA, Foglio MA, Carvalho JE, Gomes L, Vidal BC, Pimentel ER. Structural and biochemical alterations during the healing process of tendons treated with Aloe vera. *Life Sciences*, Volume 91, Issues 17–18, 29 October 2012, Pages 885-893.
39. Atiba A, Nishimura M, Kakinuma S, Hiraoka T, Goryo M, Shimada Y, Ueno H, Uzuka Y, Aloe vera oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor- β and fibroblast growth factor production. *The American Journal of Surgery*. Volume 201, Issue 6, June 2011, Pages 809-818.
40. Villalobos OJ, Salazar CR, Sánchez GR. Efecto de un enjuague bucal compuesto de aloe vera en la placa bacteriana e inflamación gingival. *Acta Odontol Venez*. 2001;39(2):16-24.
41. Oliveira SMA, Torres TC, Pereira SLS, Mota OML, Ximenes M. Effect of a dentifrice containing aloe vera on plaque and gingivitis control. A double-blind clinical study in humans. *J Appl Oral Sci*. 2008;16(4):293-99.
42. Geetha B, Praveen K, Vidya D. Aloe vera: Nature's soothing healer to periodontal disease. *J of Indian Soc Periodontology*. 2011; 15(3):205 –09.
43. Kriplani R, Thosar N, Baliga M S, Kulkarni P, Shah N, Yeluri R. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Various Root Canal Filling Materials Along with Aloe vera Used in Primary Teeth: A Microbiological Study. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2013. Vol. 37, No. 3. p. 257-262.
- Khairwa A, Bhat M, Sharma R, Satish V, Maganur P, Goyal A. Clinical and radiographic evaluation of zinc oxide with aloe vera as an obturating material in pulpectomy: An in vivo study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*. 32.1 (January-March 2014): p33.

2. ARTIGO

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico “*Dental Materials*”

PÁGINA DE TÍTULO

Área da pesquisa: Endodontia

Título: Avaliação Histológica e Imunohistoquímica do Hidróxido de Cálcio

Associado à *Aloe vera* em Subcutâneo de *rattus norvegicus*.

Autores:

1- Ingrid de Oliveira Cavalcante - Estudante do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí – Teresina (PI) – ingrid.ocavalcante@gmail.com

2- Carmen Milena Rodrigues Siqueira Carvalho – Professora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí – Teresina(PI) – carmenmilena@ufpi.edu.br

Endereço para correspondência:

Profa. Dra. Carmen Milena Rodrigues Siqueira Carvalho

Campus Universitário Ministro Petrônio Portella – Bloco 5 – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Bairro Ininga / CEP: 64049-550 Teresina - Piauí – Brasil

Fone: (86) 3237-1517/ 9445-2180 / e-mail: carmenmilena@ufpi.edu.br

Palavras chave:aloe; materiais biocompatíveis; endodontia; inflamação.

3.1. RESUMO

Objetivos:Avaliar a biocompatibilidade do extrato de Aloe vera como princípio ativo para atuar em conjunto com o hidróxido de cálcio nas medicações intracanalais.**Métodos:** Foram utilizados 45 animais da espécie *Rattus norvegicus*, divididos em três grupos, de acordo com os materiais testados (hidróxido de cálcio P.A. com *Aloe vera*, ou água destilada ou clorexidina 2%) e com os diferentes tempos experimentais (07, 15 e 30 dias). Tubos de polietileno preenchidos com as pastas foram implantados na região dorsal dos animais. Nos tempos experimentais determinados as peças implantadas foram removidas e cortes foram realizados para a análise histológica da reação tecidual local e imunohistoquímica para ki67.

Resultados:Grupo 7 dias:O subgrupo controle apresentou exsudato rico em fibrina, com leve presença de células inflamatórias. O subgrupo da clorexidina apresentou leve infiltrado inflamatório com neoformação vascular e fibroblastos. O subgrupo *Aloe vera*, apresentou grande quantidade de fibras colágenas e acentuada migração de células polimorfonucleares para as proximidades dos vasos sanguíneos. Grupo 15 dias: o subgrupo controle apresentou leve formação de tecido de granulação e o subgrupo *Aloe vera* apresentou tecido conjuntivo com poucas células inflamatórias e fibras colágenas desorganizadas. O subgrupo clorexidina apresentou moderado infiltrado inflamatório. Em 30 dias todos os subgrupos apresentaram resultados semelhantes, tendo os subgrupos *Aloe vera* e clorexidina mostrado rara presença de núcleos corados com anticorpo contra ki-67.

Significância: Conclui-se que o *Aloe vera* apresentou propriedades anti-inflamatórias e reparadoras que nos faz acreditar que o mesmo possa ser indicado.

3.2. INTRODUÇÃO

O tecido pulpar é a parte vital de um dente e está protegido das substâncias exógenas da cavidade bucal pelos outros tecidos dentários: o esmalte ou o cemento, juntamente com a dentina. Quando essa proteção é violada, por cárie dentária, traumas ou procedimentos restauradores invasivos, o complexo dentino-pulpar se torna vulnerável ao microbioma bucal, o que pode levar a uma doença pulpar ou periapical [1,2].

Para evitar que essas patologias atinjam os tecidos periodontais, realiza-se a terapia endodôntica que elimina a maior parte das bactérias e produtos bacterianos do sistema de canais radiculares pelo preparo químico-mecânico. Tais tratamentos têm se tornado cada vez mais eficazes devido às novas técnicas e substâncias utilizadas, porém, os índices de sucessos obtidos não são suficientes para dispensar o controle clínico e radiográfico de um tratamento endodôntico após sua finalização[3-6].

Além disso, as variações presentes na anatomia interna do sistema de canais radiculares podem interferir no sucesso da limpeza e desinfecção dos mesmos. Assim, em condições clínicas, o preparo biomecânico não elimina por completo os microorganismos presentes, havendo necessidade da ação de uma medicação intracanal com efetiva atividade antimicrobiana. Um dos materiais que tem sido amplamente utilizado para esse fim é o hidróxido de cálcio, devido às suas atividades: antimicrobiana, solvente de matéria orgânica, indutora de tecido mineralizado e apoiadora à reparação tecidual [7,8].

Portanto, em dentes com lesão periapical faz-se necessário o uso de medicação intracanal entre sessões. O hidróxido de cálcio é uma substância de grande alcalinidade, com pH 12,5, que é um meio desfavorável para a maioria dos patógenos endodonticamente relevantes, e sua capacidade de ceder íons Ca aos tecidos, lhe confere ação antimicrobiana e indutora de mineralização. Devido às suas propriedades antibacteriana, indutora de mineralização, biocompatível e antiinflamatória, o hidróxido de cálcio exerce atualmente um papel de extrema importância[9], como coadjuvante ao preparo químico cirúrgico do sistema de canais radiculares infectados.

Recentemente, a capacidade do hidróxido de cálcio na erradicação completa das espécies bacterianas do interior do sistema de canais radiculares tem sido questionada. Estudos *ex vivo* mostraram que a dentina pode inativar a atividade antibacteriana do hidróxido de cálcio[10] e um estudo[11] mostrou que a presença de bactérias nos canais aumentou após a medicação de hidróxido de cálcio. Outros estudos indicaram que o hidróxido de cálcio não eliminava as bactérias de forma ideal, e que as culturas passaram de negativo para positivo após o uso da medicação a base de hidróxido de cálcio[12,13].

Objetivando ativação e melhoramento das propriedades do hidróxido de cálcio, há uma diversidade de veículos empregados como medicação intracanal, demonstrando a ausência de consenso entre a substância que deve ser eleita para associar ao hidróxido de cálcio *pró-análise*[14,15].

Dentre as vantagens que esses veículos podem conferir ao hidróxido de cálcio estão: o bom escoamento, radiopacidade satisfatória e manutenção do pH, contudo esses materiais não podem afetar as propriedades biológicas, nem interferir na dissociação iônica deste produto[16,17].

A Clorexidina é um dos materiais mais utilizados em conjunto com o $\text{Ca}(\text{OH}_2)$ nos tratamentos endodônticos, podendo ser utilizada como um irrigante ou medicação intracanal, devido à sua biocompatibilidade, substantividade e ampla atividade antimicrobiana [16,17]. Porém, pesquisas mostram que ela não é tão eficaz associada ao $\text{Ca}(\text{OH}_2)$ quanto o este usado de forma pura[18], o que abre espaço para a pesquisa de novas substâncias

Buscando-se um veículo que melhorasse as características do hidróxido de cálcio e observando um crescimento mundial da fitoterapia, baseada no uso de diferentes extratos de plantas, em programas de prevenção e curativos, surgem as espécies de plantas do gênero *Aloe* (Liliaceae). Tal gênero tem sido extensivamente estudado, devido às suas propriedades medicinais, sendo a *Aloe vera* uma das principais espécies. Esta planta contém substâncias biologicamente ativas[21], capazes de proporcionar propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas, hipoglicêmicas e antidiabéticas, imunomoduladoras, cicatrizantes e regenerativas[22,23,24]. Com isso, sua associação ao hidróxido de cálcio enriqueceria as propriedades desse biomaterial.

Essas propriedades biológicas dos produtos naturais já têm sido testadas em diversos tecidos, com o intuito de se buscar auxílio no processo de reparação tecidual[25]. Isso posto, o objetivo deste trabalho foi avaliar histológica e imuno-histoquimicamente a biocompatibilidade de uma pasta experimental composta de hidróxido de cálcio associado à *Aloe vera* em tecido subcutâneo de ratos, nos dando a possibilidade de identificar um novo veículo para o hidróxido de cálcio nas medicações intracanaís, utilizando-se um fitoterápico.

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1. Desenho do Estudo e Caracterização

O estudo caracterizou-se como sendo experimental, controlado, randomizado e com leitura cega. Foi previamente aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da UFPI (034/13). Neste trabalho avaliou-se a resposta inflamatória do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Os resultados foram obtidos a partir da análise qualitativa (morfológica, imuno-histoquímica) e quantitativa (estatística) dos tecidos, levando-se em consideração os seguintes eventos histopatológicos: infiltrado inflamatório, celularidade, vascularização e atividade macrofágica na cápsula reacional. Os valores determinados para os eventos histopatológicos são as médias encontradas nas áreas pré-determinadas para a aferição dos mesmos.

3.3.2. Manipulação dos materiais

Tubos de polietileno foram obtidos conforme a metodologia estabelecida por Sousa Costa[26], na qual se utiliza um tubo de polietileno com 0,8mm de diâmetro interno seccionado seqüencialmente em intervalos de 10mm. Uma das extremidades do tubo foi vedada com éster de Cianoacrilato gel (SuperBonder®, Aachen, Alemanha) para que o material a ser utilizado não fosse extravazado. Em seguida os tubos foram autoclavados a uma temperatura de 120°C durante 20 minutos. As pastas medicamentosas foram obtidas de acordo com as seguintes proporções 3,0 g de hidróxido de cálcio para 1,75 ml de *Aloe Vera*, 1,75 de água destilada ou 1,75 de clorexidina 2%. Após a manipulação das pastas, os tubos foram preenchidos com auxílio de um lântulo estéril compatível com o diâmetro interno do tubo de polietileno.

3.3.4. Animais utilizados e alocação dos grupos

Para a realização dos testes de biocompatibilidade, foram selecionados quarenta e cinco animais (*Rattus norvegicus*, *Albinus*, *holtzman*) fêmeas, adultas, com peso corporal variando entre 200 e 250g. Os animais usados na pesquisa foram divididos em três grupos maiores, com 15 componentes cada, por tempo de ação das substâncias. No primeiro grupo, todos os animais ficaram com os tubos por 30 dias, no segundo 15 dias, e no terceiro 7 dias. Cada grupo, por sua vez, foi subdividido levando-se em consideração o tipo de substância utilizada, sendo 5 componentes para o subgrupo com *Aloe Vera*, Clorexidina e Controle, respectivamente.

3.3.5. Procedimentos cirúrgicos e eutanásia

Os animais foram anestesiados com Xilazina 5mg/Kg+50mg/Kg de Quetamina misturados na mesma seringa, administrados intramuscularmente no músculo quadríceps da coxa esquerda, com agulha de dimensão 25x5mm. Realizou-se a tricotomia da região dorsal e posteriormente antissepsia com Iodopovidona. Foi feita uma incisão transversal na região dorsal de cada animal, com aproximadamente 30 mm de extensão utilizando-se uma lâmina de bisturi número 15. Uma tesoura de ponta romba foi utilizada para a divulsão do tecido, criando desta forma uma loja cirúrgica estratégica para implante do tubo de 20mm aproximadamente. Implantou-se no tecido conjuntivo subcutâneo do rato o tubo de polietileno preenchido com as pastas experimentais e controle com o auxílio de uma pinça porta agulha e uma pinça de Adson. Após o implante, foi realizada a sutura adequada com fio de nylon

4.0 (Procare®). Após o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em gaiolas unitárias, em boas condições de higiene e alimentação com dieta padrão do biotério, ração (Labina® – Purina) e água ad libidum. A analgesia foi feita utilizando Ácido Acetilsalicílico 100mg/Kg PO, a cada 4 horas. Em todos os animais foi administrada uma dose profilática de Pencivet®, antibiótico e antiinflamatório de uso veterinário para prevenir qualquer infecção nos tecidos.

Nos dias 7,15 e 30 dias pós-cirúrgicos, respectivamente, os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal do anestésico Tiopental Sódico na base de 100mg/Kg, em superdosagem.

3.3.6. Análise histológica

As peças implantadas foram extraídas, com o cuidado de remover uma margem de segurança suficiente de aproximadamente 20mm entorno do tubo. As peças foram colocadas em recipiente contendo solução de formol tamponado à 10% e após fixação, as peças foram incluídas em parafina. Os cortes microscópicos foram feitos no tecido processado com 5µm de espessura e corados pelo método de Hematoxilina/Eosina. As reações imunohistoquímicas foram realizadas com o KI-67 (proteína MKI67) para avaliação da proliferação celular. Foi empregado o método da estreptavidina-biotina para as reações imunohistoquímicas, conforme os passos descritos por Soares et al, 2009[27]. A análise das lâminas foi realizada por um único patologista, com cegamento, por microscópico ótico.

3.3.7. Análise estatística

Para a quantificação dos resultados histológicos, escores foram atribuídos às características morfológicas encontradas, sendo estes classificados em: 1) Intensidade do Infiltrado Inflamatório Mononuclear; 2) Intensidade do Infiltrado Inflamatório Polimorfonuclear e 3) Neoformação do conjuntivo vascular. Os valores atribuídos foram: Ausente: 0, Leve: 1, Moderado: 2 e Severo: 3.

A análise estatística foi efetuada no software IBM SPSS Statistics 20. Os testes não paramétricos utilizados na análise foram o teste de Wicoxon-Mann-Whitney ou simplesmente teste de Mann-Whitney, pois este é o teste não paramétrico adequado para comparar as funções de distribuição de uma variável medida em duas amostras independentes, e o teste de Kruskal-Wallis, utilizado para testar se duas ou mais amostras provém de uma mesma população ou se de populações diferentes ou se, de igual modo, as amostras provêm de populações com a mesma distribuição.

3.4. Resultados

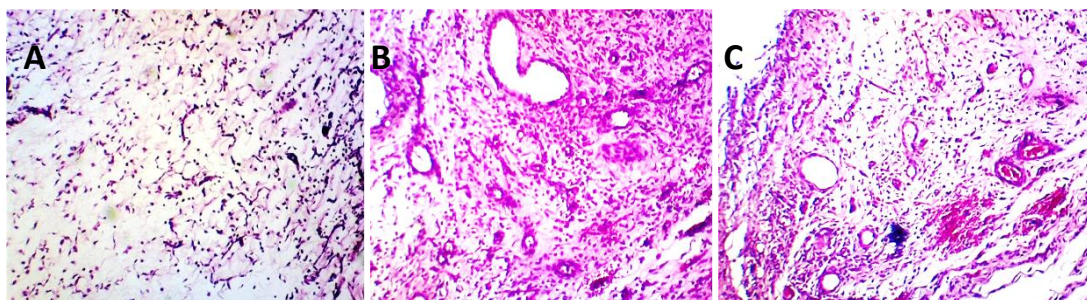
3.4.1 Achados Histológicos

A avaliação dos eventos histológicos foi realizada por um único observador, através da microscopia óptica, com aumentos de 100 e 200 vezes.

Os resultados obtidos da análise das lâminas foram agrupados em três tabelas, segundo os seguintes eventos histopatológicos: intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear, intensidade do infiltrado inflamatóriopolimorfonuclear e neoformação conjuntivo-vascular.

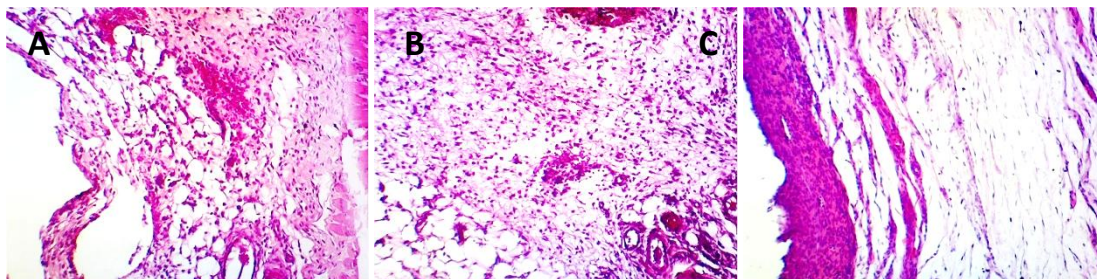
Na análise morfológica, o subgrupo Controle de 7 dias apresentou exsudato rico em rede de fibrina e com leve presença de algumas células inflamatórias (Figura 1A). Já no subgrupo de 7 dias cuja substância observada foi a Clorexidina, observou-se leve infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares com áreas de neoformação vascular e fibroblastos jovens (Figura 2A). O subgrupo em que foi utilizada *Aloe vera*, no período pós-cirúrgico de 7 dias teve acentuada migração de células polimorfonucleares próximo aos vasos sanguíneos (Figura 3A).

Figura1: Cortes histológicos dos subgrupos controle segundo os tempos estudados: A: 7 dias. B: 15 dias. C: 30 dias. Aumento 40x.



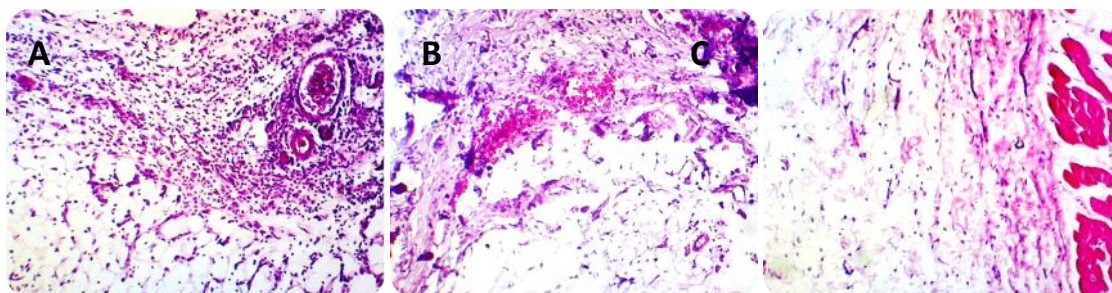
Por sua vez, o subgrupo Controle 15 dias apresentou nível mediano de formação de tecido de granulação com presença de células fibroblásticas jovens e neoformação vascular (Figura 1B), enquanto que o subgrupo de Clorexidina 15 dias apresentou moderado infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares com poucas áreas de tecido de granulação (Figura 2B). Por fim, no subgrupo *Aloe vera* 15 dias obteve-se leve formação de tecido de granulação com poucas células fibroblásticas(Figura 3B).

Figura 2: Cortes histológicos do subgrupo clorexidinasegundo os tempos estudados: A: 7 dias. B: 15 dias. C: 30 dias. Aumento 40x.



Por fim, pela análise morfológica, o subgrupo de Controle 30 dias apresentou em todas as amostras tecido conjuntivo com moderada presença de infiltrado inflamatório, pouco tecido de granulação e fibroblastos difusos, enquanto que o subgrupo Clorexidina 30 dias teve leve presença de células inflamatórias próximas à capsula fibrosa densa com tecido conjuntivo escasso de fibras colágenas e o *Aloe vera* 30 dias apresentou tecido conjuntivo com poucas de células inflamatórias e presença de fibras colágenas desorganizadas.

Figura 3: Cortes histológicos do subgrupo *Aloe vera* segundo os tempos estudados: A: 7 dias. B: 15 dias. C: 30 dias. Aumento 40x.



3.4.2. Análise Descritiva

De acordo com a análise estatística dos dados obtidos não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de 7 dias com relação à intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear e à intensidade do infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Com relação à neoformação conjuntivo-vascular houve diferença significativa entre os grupos estudados, sendo a Clorexidina o subgrupo com melhor resultado neste quesito, considerando $p < 0,05$, como pode ser observado na Tabela 1

Tabela 1: Comparação entre as substâncias no período experimental de 7 dias.

Grupo	Escore Médio	Desvio-Padrão	Teste de Kruskal-Wallis	P-valor
Intensidade do Infiltrado Inflamatório Mononuclear				
Controle	1,20	0,477	2,8	0,247
Clorexidina	1,80	0,477		
Aloe Vera	1,60	0,894		
Intensidade do Infiltrado Inflamatório Polimorfonuclear				
Controle	1,00	0,000	0	1
Clorexidina	1,00	0,000		
Aloe Vera	1,00	0,000		
Neoformação Conjuntivo-Vascular				
Controle	1,00	0,000	10,182	0,006*
Clorexidina	1,80	0,477		
Aloe Vera	1,00	0,000		

*Estatisticamente significativa

No período experimental de 15 dias não houve diferença significativa entre os subgrupos nos quesitos intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear e neoformação conjuntivo-vascular. Entretanto, no subgrupo clorexidina os valores foram maiores que nos outros subgrupos em relação à intensidade do infiltrado inflamatório polimorfonuclear, sendo este resultado estatisticamente válido, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2: Comparação entre as substâncias no período experimental de 15 dias.

Grupo	Escore Médio	Desvio-Padrão	Teste de Kruskal-Wallis	P-valor
Intensidade do Infiltrado Inflamatório Mononuclear				
Controle	2,00	0,000	2,8	0,247
Clorexidina	2,40	0,894		
Aloe Vera	1,60	0,894		
Intensidade do Infiltrado Inflamatório Polimorfonuclear				
Controle	1,00	0,000	7	0,03*
Clorexidina	1,60	0,548		
Aloe Vera	1,00	0,000		
Neoformação Conjuntivo-Vascular				
Controle	2,00	0,000	4,445	0,108
Clorexidina	1,80	0,447		
Aloe Vera	1,40	0,548		

*Estatisticamente significante

Após 30 dias, as diferenças histológicas encontradas não se mostraram estatisticamente relevantes, fato comprovado pelos dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Comparação entre as substâncias no período experimental de 30 dias.

Grupo	Escore Médio	Desvio-Padrão	Teste de Kruskall-Wallis	P-valor
Intensidade do Infiltrado Inflamatório Mononuclear				
Controle	1,00	0,000	2	0,157
Clorexidina	1,20	0,447		
Aloe Vera	1,00	0,000		
Intensidade do Infiltrado Inflamatório Polimorfonuclear				
Controle	1,40	0,548	2	0,157
Clorexidina	1,20	0,447		
Aloe Vera	1,80	0,447		
Neoformação Conjuntivo-Vascular				
Controle	1,00	0,000	2	0,157
Clorexidina	1,20	0,477		
Aloe Vera	1,00	0,000		

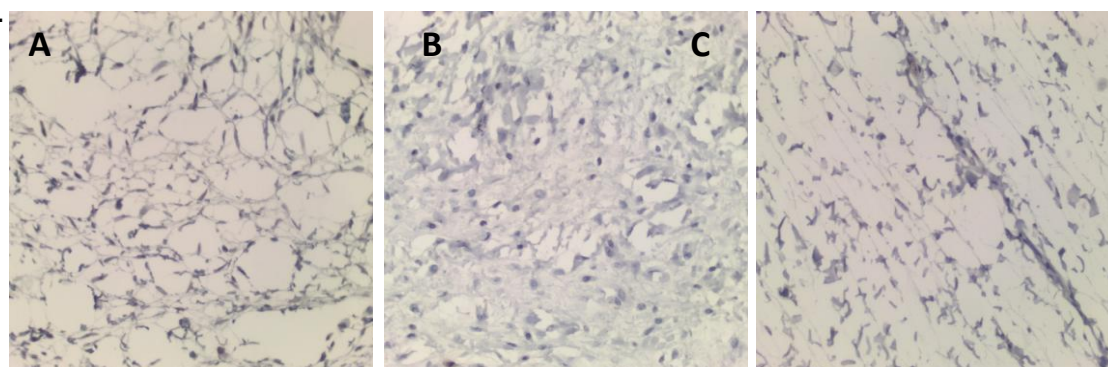
3.4.2. Achados Imunohistoquímicos

Após o teste de biocompatibilidade, foi realizada a análise imunohistoquímica, através de reações com o anticorpo contra Ki-67i (proteína relacionada a proliferação celular). A avaliação da expressão do anticorpo Anti ki67 foi determinada pela forte coloração acastanhada dos núcleos em proliferação celular com uma maior reatividade de padrão nuclear principalmente nos tecidos inflamados. As marcações imunohistoquímicas foram classificadas como ausente ou presente, e de acordo com o grau de intensidade da imunoexpressão: rara, leve, moderada e acentuada.

A análise de imagem da imunorreatividade tecidual da proteína Ki-67 demonstrou que o subgrupo controle após 7 dias do procedimento cirúrgico mostrou a presença rara de núcleos em atividade proliferativa indicando reduzida proliferação celular (Figura 4C).

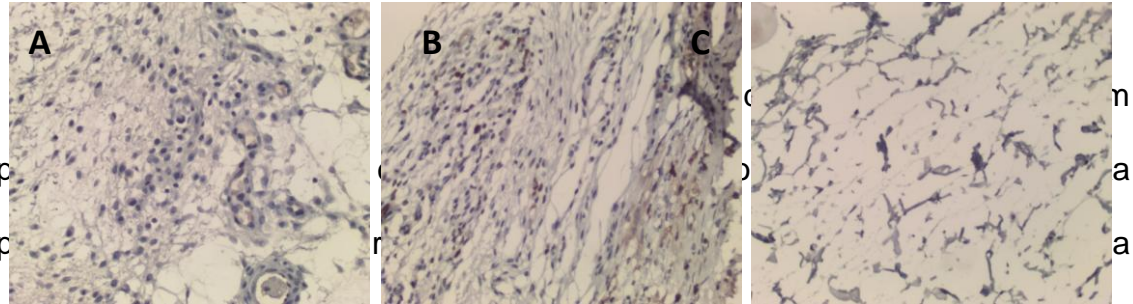
O subgrupo clorexidina de 7 (Figura 4B) dias apresentou presença acentuada de núcleos em atividade proliferativa e fibras colágenas. O último subgrupo de 7 dias, no qual foi utilizado o *Aloe vera*, apresentou grande quantidade de fibras, provavelmente fibras colágenas, e a presença moderada de núcleos mitóticos (Figura 4A).

Figura 4: Lâminas mostrando a imunorreatividade tecidual da proteína Ki-67 em amostras de *Aloe vera*, Clorexidina e Controle, nessa ordem, após 7 dias. Aumento 40x.



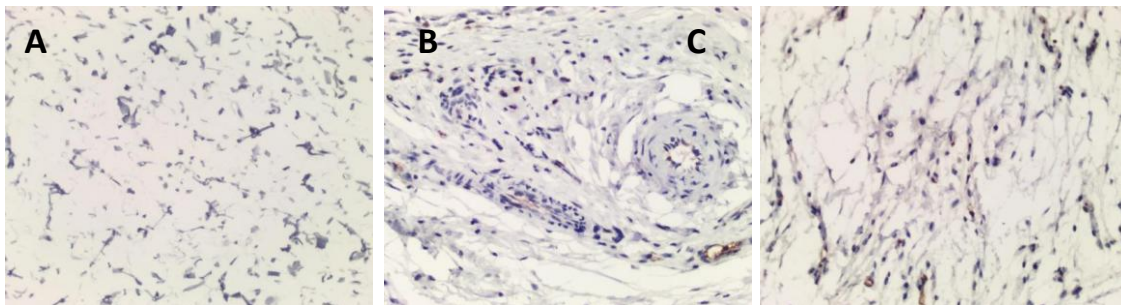
Dentro do grupo de 15 dias, no subgrupo Controle observou-se a presença moderada de núcleos mitóticos indicando moderada proliferação celular, próximo a áreas de neoformação vascular (Figura 5C). O subgrupo da Clorexidina mostrou presença acentuada de núcleos em atividade mitótica indicando intensa proliferação celular e remodelação inicial constatada pela presença de muitas fibras colágenas (Figura 5B). O do *Aloe vera* apresentou leve presença de núcleos proliferativos, além de numerosas fibras colágenas (Figura 5A).

Figura 5: Lâminas mostrando a imunorreatividade tecidual da proteína Ki-67 em amostras de *Aloe vera*, Clorexidina e Controle, nessa ordem, após 15 dias. Aumento 40x.



apresentou moderada presença de núcleos corados com anticorpo indicando moderada proliferação celular(Figura 6C).

Figura 6: Lâminas mostrando a imunorreatividade tecidual da proteína Ki-67 em amostras de *Aloe vera*, Clorexidina e Controle, nessa ordem, após 30 dias. Aumento 40x.



3.5. Discussão

A biocompatibilidade de um material endodôntico pode ser determinada por meio de três métodos: 1) avaliação do material testes de citotoxicidade, estudo *in vitro*; 2) implantação subcutânea ou intra-óssea do material, para observar a reação tecidual local, e 3) avaliação de qualquer reação ao material *in vivo*, através de ensaios pré-clínicos e clínicos. Enfatiza-se que a escolha de um material endodôntico deve ser fundamentada por suas propriedades biológicas[6].

O recurso escolhido para este trabalho foi o da implantação subcutânea dos materiais estudados, seguida de posterior análise tecidual e avaliação qualitativa e quantitativa dos resultados. As análises basearam-se em características teciduais de inflamação, visto que o reparo normal de feridas ocorre em três estágios: inflamação, proliferação e remodelação. O reparo depende, ainda, da provisão local de circulação, bem como da deposição de colágeno[9]. Tais análises foram do tipo histológica e imunohistoquímica com o uso da imunorreação do Ki-67.

Comparando-se as amostras dos subgrupos em 7 dias, infere-se que o *Aloe vera* e o Controle mostraram-se semelhantes, ambos em processo de reparo, comprovado pela presença da rede de fibrina no grupo controle e pela migração de células para áreas com vasos sanguíneos no grupo do *Aloe vera*, capacidade também observada por Bruno et al[6]. O subgrupo da clorexidina do mesmo período experimental, porém, já mostrou traços de neoformação vascular, o que o coloca em um nível de reparo mais avançado que os outros dois subgrupos. Estatisticamente, essa superioridade da clorexidina foi

comprovada, sendo o único subgrupo com resultados significantes na variável neoformação conjuntivo-vascular (Tabela 1). Tal fato está em concordância com os achados Tanomaru Filho e colaboradores em 2002, que após inoculação de solução de clorexidina a 2,0% em cavidade peritoneal de camundongos constataram que esta teve características biocompatíveis quando comparada com solução de hipoclorito de sódio a 0,5%[28].

A análise de imagem da imunorreatividade tecidual da proteína Ki-67 demonstrou que, o subgrupo controle após 7 dias do procedimento cirúrgico mostrou a presença rara de núcleos em atividade proliferativa indicando reduzida proliferação celular. As mudanças, porém, já sugeriram no subgrupo clorexidina de 7 dias a qual notou-se a presença acentuada de núcleos em atividade proliferativa e fibras colágenas, que esta associada à fibroplastia e neoformação vascular, características da fase reparadora do processo inflamatório.

O último subgrupo de 7 dias, no qual foi utilizado o *Aloe vera*, apresentou grande quantidade de fibras, possivelmente fibras colágenas, e a presença moderada de núcleos mitóticos, indicando moderada proliferação celular, que pode ser definida como o aumento do número de células, resultantes da finalização do ciclo celular. A proliferação celular é controlada pela diferenciação celular que constitui um processo biológico complexo e vital [29,30]. Numerosos processos fisiológicos e patológicos, incluindo crescimento, cicatrização, reparo, hipertrofia, hiperplasia e desenvolvimento de tumores, estão relacionados com a proliferação celular. Sendo, os estudos nesta área extremamente relevantes [31].

Os achados supracitados sugerem um processo de reparação tecidual após o processo inicial de inflamação nos subgrupos da clorexidina e no controle. O reparo encontra-se reduzido no subgrupo da *Aloe vera*, podendo indicar finalização de cicatrização e, nesse caso, demonstra o potencial anti-inflamatório e cicatrizante do *Aloe vera*.

Dentro do grupo de 15 dias, a análise histológica do subgrupo Controle apresentou um leve infiltrado neutrofílico, indicando uma ligeira inflamação tardia, que não foi considerada relevante para o resultado final, uma vez que foi associada à presença do tubo de polietileno no dorso do animal causando a irritação do tecido. Tal grupo também mostrou sinais avançados de reparo, devido à presença de células fibroblásticas jovens e neoformação vascular.

O subgrupo *Aloe vera* 15 dias, por sua vez, mostrou evolução quando comparado ao subgrupo de 7 dias, apresentando agora tecido de granulação e células fibroblásticas, corroborando com Mandelbaum e colaboradores, visto que eles afirmaram que a formação do tecido de granulação faz parte da fase proliferativa da cicatrização, esta dividida em três subfases: 1) reepitelização: que ocorre pela migração de queratinócitos das bordas e anexos remanescentes; 2) fibroplasia: na qual ocorre proliferação de fibroblastos e produção de colágeno, elastina e outras proteínas e 3) angiogênese que ocorre paralelamente à fibroplasia, onde os novos vasos darão suporte à formação da nova matriz[32].

Na análise do subgrupo Clorexidina, no pós-cirúrgico de 15 dias, encontrou-se moderado infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares com poucas áreas de tecido de granulação. Na análise estatística, a intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear, característico de inflamação

crônica, do subgrupo clorexidina mostrou-se relevante com relação aos outros subgrupos, tal fato pode ser atribuído ao fato de a clorexidina apresentar alta substantividade, segundo Quintas [33], portanto, impregnando-se nos tecidos e causando um processo inflamatório tardio. Esse achado mostra que a clorexidina com o passar do tempo pode tornar-se agressiva aos tecidos, provavelmente por ser uma substância com alta substantividade[34], advinda de sua natureza dicatiônica, segundo Zanatta[34].

Pela análise imunohistoquímica, dentro do grupo de 15 dias, no subgrupo Controle observou-se a presença moderada de núcleos mitóticos indicando moderada proliferação celular, próximo a áreas de neoformação sugerindo fibroplastia e neoformação vascular. O subgrupo da Clorexidina mostrou presença acentuada de núcleos em atividade mitótica indicando intensa proliferação celular e remodelação inicial constatada pela presença de muitas fibras colágenas. Isto indicou que o tecido ainda estava passando pelo processo de inflamação, porém no final deste, já podemos encontrar características da fase final de reparação.

O do *Aloe vera*, mais uma vez, apresentou leve presença de núcleos proliferativos, além de muitas fibras colágenas indicando baixa proliferação celular e remodelação. Novamente, isto indica a capacidade anti-inflamatória do *Aloe vera*, já que o grupo controle, antes em inflamação inicial, evoluiu para um quadro de inflamação tardia, apesar de leve, enquanto que o tecido no qual foi utilizado o *Aloe* mostra um quadro de tecido em reparação e evolução do inflamatório, bem como indícios de remodelação.

No grupo de 30 dias, foi visto no subgrupo controle e no subgrupo *Aloe vera*, tecido conjuntivo com moderada presença de infiltrado inflamatório, pouco tecido de granulação e fibroblastos difusos. No subgrupo clorexidina, leve presença de células inflamatórias próximas à capsula fibrosa densa com tecido conjuntivo escasso de fibras colágenas. Ou seja, após 30 dias os resultados são todos similares, com predominância de aspectos de regeneração e/ou pouca inflamação. Diferença estatisticamente relevante também não foi encontrada. O longo tempo de espera, independentemente da amostra, foi suficiente para reparar as irritações que possam haver existido naquele local.

Imuno-histoquimicamente, os subgrupos de 30 dias *Aloe vera* e Clorexidina, mostraram presença leve de núcleos corados com anticorpo contra ki-67i indicando baixa proliferação celular, demonstrando a finalização da reparação tecidual.

O subgrupo controle ainda apresentou moderada presença de núcleos corados com anticorpo indicando moderada proliferação celular, demonstrando menor velocidade de reparação se comparado aos outros subgrupos. Os resultados do grupo de 30 dias mostraram escores maiores no subgrupo *Aloe vera*, que pode estar relacionada a uma inflamação tardia, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Os outros subgrupos demonstraram o reparo tecidual das áreas de interesse.

Quanto ao uso do *Aloe vera* nos tratamentos endodônticos, deve-se ter em mente que o processo patogênico das doenças intrarradiculares envolve muitos eventos infecto-inflamatórios capazes de estimular a geração de

moléculas, tais como interleucinas, prostaglandinas, metaloproteinases, conduzindo à ativação da resposta inata e específica, determinante de maior ou menor progressão da doença nos tecidos periapicais[35,36].

Para o tratamento ser considerado ideal, busca-se uma substância química capaz de ter boa tolerância tecidual, auxiliar no processo de reparo, dissolver debris no interior do sistema de canais e produzir efeito antimicrobiano[16,34]. O *Aloe vera* dispõe de algumas propriedades compatíveis com os requisitos descritos; assim, além de ter ação antimicrobiana, pode auxiliar no processo de cicatrização do periápice, de forma semelhante ao que ocorre em outros tecidos, como os tecidos epitelial e conjuntivo [24,36,38].

A biocompatibilidade do *Aloe* é outro fator que contribui para a substância apresentar resultados satisfatórios. São vários os trabalhos como o de Maenthaisong[39], sobre cicatrização de queimaduras usando *aloe vera*, e estes ratificam essa propriedade.

Portanto, neste trabalho também foi testada a biocompatibilidade do *Aloe vera*, por método histo-morfológico e imuno-histoquímico, e os resultados sugerem que tal substância apresente tal característica, já estudada anteriormente por Bruno[6]. Tais resultados encontrados deverão servir de base para que outros experimentos sejam realizados e o *Aloe vera* possa ser utilizado como veículo para o hidróxido de cálcio nas medicações intracanaís.

3.6. Conclusões

Nesse estudo o fitoterápico *Aloe vera* apresentou propriedades anti-inflamatórias e reparadoras que nos faz acreditar que o mesmo possa ser indicado, corroborado por outros estudos futuros como um importante material a ser utilizado nas terapias endodônticas.

3.7. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Biotério da UFPI, pelo fornecimento dos animais e aos técnicos responsáveis pelo cuidado dos mesmos, ao Laboratório de Histologia da UFPI e ao Laboratório de Morfometria do CCA – UFPI, bem como todos os alunos de graduação, mestrado e doutorado envolvidos na pesquisa, em especial à Dayane Miranda e Andrezza Braga. Os autores também agradecem aos alunos Lucas Nannini e Gybson Frota, que participaram dos experimentos e da elaboração deste trabalho.

3.8. Conflito de Interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

3.9. Importância para Endodontia:

Fitoterápicos como o *Aloe vera* podem vir a ser importantes coadjuvantes nos tratamentos endodônticos por serem materiais abundantes na flora brasileira, pelo fato de serem biocompatíveis e apresentam baixo custo, podendo, inclusive, ser utilizados no serviço de saúde pública do país.

3.10. Referências

- [1]. Bauer AW, Kirby WMM, Sherrus JC, and Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American J. Clin. Path. v. 45, p493-496, 1966.
- [2]. Beer R, Baumann MA, Kielbassa AM. Endodontia texto e atlas. Porto Alegre, Arte Médicas, 2006.
- [3]. Bernardes I, Rodrigues MPF, Bacelli GK, Munin E, Alves LP, Costa MS. Aloe vera extract reduces both growth and germ tube formation by *Candida albicans*. Mycoses. 2012. 55:257-261.
- [4]. Bhat G, Kudva P, Dodwad V. Aloe vera: nature's soothing healer to periodontal disease. J Indian Soc Periodontol 2011. Vol.15:205-209.
- [5]. Braga V, Otani AY, Moura AAM. Hidróxido de cálcio como medicação intracanal: associações e técnicas de inserção. Rev. Inst. Ciênc. Saúde, v.15, n.2, p.101-107, Jul./Dez.1997.
- [6]. Bruno GB, Alves A PN, Menezes VA, Maia MCG, Bruno JA, Viana GSB. Biocompatibility evaluation of an antibiotic paste after pulpotomy in dogs. Braz J Oral Sci 2007;6(22):1397-1401.
- [7]. Holland R. Soares IJ, Soares IM. Influence of irrigation and intracanal dressing on the healing process of dog's teeth with apical periodontitis. endod dent traumatol. 1992;8(6):223-9.
- [8]. Leonardo MR. Endodontia: Tratamento de canais radiculares: Princípios técnicos e biológicos-Volume 2. São Paulo: Artes Médicas, 2005.
- [9]. Davis RH, Leitner MG, Russo JM and Byrne MEBS. Wound Healing, Oral And Topical Activity Of Aloe Vera. Journal of The American Podiatric Medical Assoc. Vol 79, Number 11, Nov 1989, P559-62.
- [10]. Silva-Herzog DF; Velásquez LMA.; Rímola JL. Comparación Del hidróxido de calcio como medicamento intraconducto, utilizando vehículos viscosos y acuosos. Estudio in vitro. Revista ADM, v.60, n.1, p. 14-18, Enero/febrero.2003.

- [11]. Haapasalo, H. K., Sirén, E. K., Waltimo, T. M. T., Ørstavik, D. and Haapasalo, M. P. P. (2000), Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *International Endodontic Journal*, 33: 126–131.
- [12]. Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *International Endodontic Journal*. 2002. 35,13–21.
- [13]. Reit C, Molander A, Dahlen G. The diagnostic accuracy of microbiologic root canal sampling and the influence of antimicrobial dressings. *Endodontics and Dental Traumatology*. 1999 15, 278–83.
- [14]. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann II. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *J Endod* 1999;25(6):416-8.
- [15]. Estrela C, Pécora JD, De Silva RS. Phanalyse of vehicles and calcium hydroxide pastes. *J Brasileiro de Endododontia*, v.3, n.2, p.41-47, 1998.
- [16]. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mecanismo de ação do hipoclorito de sódio. *Braz Dent J* 2002;13:113-7.
- [17]. Farber PA, Seltzer S. *Endodontics microbiology. I. Etiology*. *J Endod* 1988;14:363-71.
- [18]. Løe H, Schiott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res*. 1970;5(2):79-83
- [19]. Estrela CR, Estrela C, Reis C, Bammann LL, Pécora JD. Control of microorganisms in vitro by endodontic irrigants. *Braz Dent J*. 2003;14:187-92.
- [20]. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod*. 1994;20:276-8.
- [21]. Giro EMA, Iost HI, Lia RCC. Análise histopatológica comparativa em polpa de dentes de cães, após pulpotomia e utilização de pastas a base de Hidróxido

de cálcio em diferentes veículos. Rev. Odontol.UNESP., v.23, n.2, p.191-201, 1994.

[22]. Holland R, Soares IJ, Soares IM. Influence of irrigation and intracanal dressing on the healing process of dog's teeth with apical periodontitis. *endodont traumatol.* 1992;8(6):223-9.

[23]. Javidi M, Zarei M, Afkhami F. Antibacterial effect of calcium hydroxide on intraluminal and intratubular enterococcus faecalis. *Iran Endod J.* 2011 Summer;6(3):103-6. Epub 2011 Aug 15.

[24]. Kiliç N. The effect of Aloe vera gel on experimentally induced peritoneal adhesions in rats. *The Revue de MedVet* 2005; 156:409-13.

[25]. Leonardo MR, Almeida WA, Ito IY, Silva IAB. Radiography and microbiologic evaluation of post treatment apical and periapical repair of root canals of dog's teeth with experimentally induced chronic lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78(2):232-8.

[26]. Souza Costa CA, Oliveira MF, Giro EMA, Hebling J. Biocompatibility resin-based materials used as pulp-capping agents. *IntEndod J.* 2003;36:831-9.

[27]. Soares FP, Hayashi F, Yorioka CW, Sousa SC, Pustiglioni FE. Immunohistochemical evaluation of extracellular matrix proteins in the repair of acute class II furcation defects in dogs. *R. Periodontia.* Set 2009; v 19 – 03

[28]. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Aníbal FF. and Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *International Endodontic Journal.* 2002; 35: 735–739

[29]. Scoot, RE. Differentiation, differentiation/gene therapy and cancer. *Pharmacol. Therap.* 1997. v.73, n.1, p.51-65.

[30]. Levine AJ, Perry, ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D. The 1993 walterhubert lecture: the role of p53 tumor-suppressor gene in tumorigenesis. *Br. J. Cancer.* Mar. 1994. v. 69, n.3, p. 409-416.

[31]. Kumar V, Fausto N, Abbas AK. Robbins e Cotran: patologia – bases

patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005

[32]. Mandelbaum SH, Disantis EP, Mandelbaum MHS. Cica/trização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I. *An Bras Dermatol.* 2003;78(4):393-410

[33]. Quintas V., Prada-López I., Prados-Frutos J. C., Tomás I. (2015). *In situ* antimicrobial activity on oral biofilm: essential oils vs. 0.2 % chlorhexidine. *Clin. Oral Investig.* 19, 97–107

[34]. Zanatta FB, Rosing CK. Chlorhexidine: action's mechanisms and recent evidences of its efficacy over supragingival biofilm context. *Scientific-A* 2007;1(2):35-43

[35]. Farber PA, Seltzer S. Endodontics microbiology. I. Etiology. *J Endod* 1988;14:363-71.

[36]. Takashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J* 1998;31:311-25

[37]. Reynolds T, Dweck AC. Aloe vera leaf gel: a review update. *J Ethnopharmacol* 1999;68:3-37

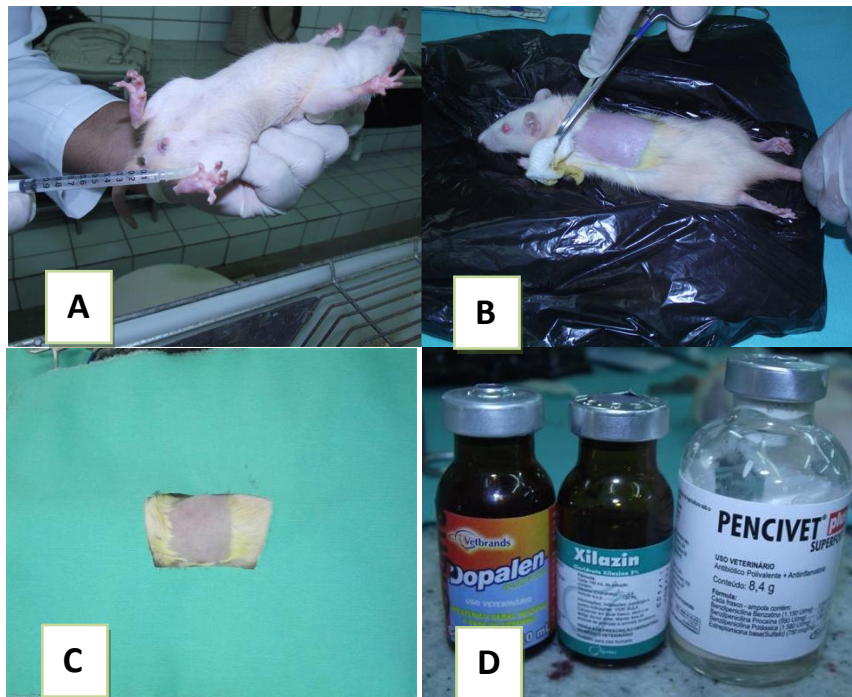
[38]. Semenoff TA, Semenoff-Segundo A, Figueiredo JA. Biocompatibility of different intracanal medications in rat buccal submucosa tissue. *J Appl Oral Sci* 2008;16:12-7.

[39]. Maenthaisong R, Chaiyakunapruk N, Niruntraporn S, Kongkaew C. The efficacy of aloe vera used for burn wound healing: a systematic review. *Burns.* 2007 Sep;33(6):713-8.

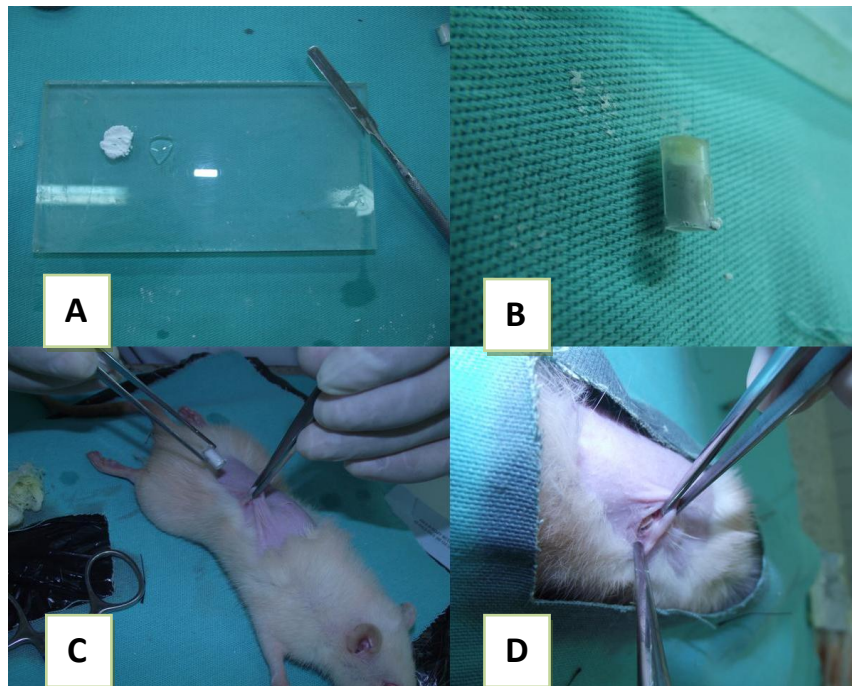
ANEXOS

ANEXO 1

PRANCHA I: PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS



A: Fotografia mostrando o momento da anestesia intramuscular. **B:** Fotografia mostrando o dorso do animal após a tricotomia e no momento da anti-sepsia com Álcool Iodado. **C:** Local da cirurgia devidamente limpo e isolado. **D:** Medicamentos utilizados durante os procedimentos cirúrgicos.



02: **A:** Fotografia mostrando o incremento de Hidróxido de Cálcio e a porção de Aloe Vera, devidamente medidas para a posterior manipulação. **B:** Tudo de polietileno já preenchido com a pasta. **C:** Momento da inserção do tubo na loja subcutânea criada no animal. **D:** Fotografia mostrando o tubo alojado subcutaneamente, momentos antes da sutura.

ANEXO 2

GUIDELINE PARA AUTORES DO PERÍÓDICO DENTAL MATERIALS



DENTAL MATERIALS

Official Publication of the [Academy of Dental Materials](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0109-5641

DESCRIPTION

Online submission and editorial system now available at <http://ees.elsevier.com/dema>

Dental Materials publishes original research, review articles, and short communications.

Academy of Dental Materials members click [here](#) to register for free access to Dental Materials online.

The principal aim of *Dental Materials* is to promote rapid communication of scientific information between academia, industry, and the dental practitioner. Original Manuscripts on clinical and laboratory research of basic and applied character which focus on the **properties** or **performance** of **dental materials** or the **reaction** of host tissues to materials are given priority publication. Other acceptable topics include application technology in **clinical dentistry** and dental laboratory technology.

Comprehensive reviews and editorial commentaries on pertinent subjects will be considered.

AUDIENCE

Dental research scientists, materials scientists, clinicians, students of dentistry, dental materials and equipment manufacturers.

IMPACT FACTOR

2014: 3.769 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

Aluminium Industry Abstracts
Ceramic Abstracts
Computer and Information Systems Abstract
Corrosion Abstracts
Current Contents
Current Contents Search
MEDLINE®
International Aerospace Abstracts
METADEX
Materials Science Citation Index
Dental Abstracts
Earthquake Engineering Abstracts
EI Compendex Plus
Electronics and Communications Abstracts
Engineering Materials Abstracts
Science Citation Index
Scisearch
Solid State Abstracts
UnCover
TOXFILE
CSA Civil Engineering Abstracts
CSA Mechanical & Transportation Engineering Abstracts
BIOSIS Previews
SIIC Data Bases
Inside Conferences
Scopus
CSA Technology Research Database
CSA Advanced Polymers Abstracts
CSA Engineered Materials Abstracts
Materials Business File
ISI
Mechanical and Transport Engineer Abstract

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

David C. Watts PhD FADM, University of Manchester School of Dentistry, Manchester, UK

Editorial Advisor

Nick Silikas PhD FADM, University of Manchester School of Dentistry, Manchester, UK

Editorial Assistant

Diana Knight, University of Manchester School of Dentistry, Manchester, UK

Editorial Board:

Joseph Antonucci, NIST Dental & Medical Materials,

Kenneth Anusavice, University of Florida, USA

Stephen Bayne, The University of Michigan, USA

Roberto R Braga, University of São Paulo, BRAZIL

Lorenzo Breschi, University of Bologna, Italy

Paulo Francisco Cesar, Depto. de Materiais Dentários, Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo, Brazil

Pierre Colon, Université Denis Diderot, FRANCE

Brian Darvell, University of Kuwait, KUWAIT

Alvaro Della Bona, University of Passo Fundo, BRAZIL

George Eliades, University of Athens, Athens,

Jack Ferracane, Oregon Health Sciences University, USA

Marco Ferrari, University of Siena, ITALY

Garry J.P. Fleming, Trinity College Dublin, IRELAND

Alex S.L. Fok, The University of Minnesota, USA

Jason A. Griggs, The University of Mississippi, USA

Reinhard Hickel, Ludwig-Maximilians University, GERMANY
Nicoleta Ilie, Ludwig-Maximilians University of Munich, GERMANY
Satoshi Imazato, Osaka University, JAPAN
Klaus Jandt, Friedrich-Schiller Universität Jena, GERMANY
J. Robert Kelly, University of Connecticut, USA
Matthias Kern, University of Keil, GERMANY
Karl-Heinz Kunzelmann, Ludwig-Maximilians University of Munich, GERMANY
Paul Lambrechts, Katholieke Universiteit, Leuven, BELGIUM
Ulrich Lohbauer, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, GERMANY
Grayson W. Marshall, University of California, San Francisco, USA
Mutlu Özcan, University of Zurich
Sally Marshall, University of California, San Francisco, USA
Jukka P. Matinlinna, University of Hong Kong, CHINA
Bart van Meerbeek, Katholieke Universiteit, Leuven, BELGIUM
Yasuko Momoi, Tsurumi University, Yokohama, JAPAN
Will Oalin, University of Birmingham, UK
David Pashley, Georgia Regents University
Patricia N.R. Pereira, University of Brasilia, BRAZIL
John Powers, University of Texas at Houston, USA
N. Dorin Ruse, University of British Columbia, Vancouver, CANADA
Paulette Spencer, University of Kansas, USA
Jeffrey W. Stansbury, University of Colorado, USA
Michael Swain, University of Sydney, AUSTRALIA
Arzu Tezvergil-Mutluay, University of Turku, FINLAND
John E. Tibballs, Nordic Institute of Dental Materials, NORWAY
Pekka K. Vallittu, University of Turku, FINLAND
John Wataha, The University of Washington, USA
Nairn H F Wilson, GKT Dental Institute, London, UK
Huakun (Hockin) Xu, The University of Maryland Dental School, MD, USA
Spiros Zinelis, University of Athens, GREECE
Reinhard Hickel, Ludwig-Maximilians University, GERMANY

GUIDE FOR AUTHORS

Authors are requested to submit their original manuscript and figures via the online submission and editorial system for Dental Materials. Using this online system, authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process. Please register at: <http://ees.elsevier.com/dema>.

Dental Materials now only accepts online submissions.

The Artwork Quality Control Tool is now available to users of the online submission system. To help authors submit high-quality artwork early in the process, this tool checks the submitted artwork and other file types against the artwork requirements outlined in the Artwork Instructions to Authors on <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. The Artwork Quality Control Tool automatically checks all artwork files when they are first uploaded. Each figure/file is checked only once, so further along in the process only new uploaded files will be checked.

Manuscripts

The journal is principally for publication of **Original Research Reports**, which should preferably investigate a defined hypothesis. Maximum length 6 journal pages (approximately 20 double-spaced typescript pages) including illustrations and tables.

Systematic Reviews will however be considered. Intending authors should communicate with the Editor beforehand, by email, outlining the proposed scope of the review. Maximum length 10 journal pages (approximately 33 double-spaced typescript pages) including figures and tables.

Three copies of the manuscript should be submitted: each accompanied by a set of illustrations. The requirements for submission are in accordance with the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", *Annals of Internal Medicine*, 1997,126, 36-47. All manuscripts must be written in American English. Authors are urged to write as concisely as possible.

The Editor and Publisher reserve the right to make minimal literary corrections for the sake of clarity. Authors for whom English is not the first language should have their manuscripts read by colleagues fluent in English. If extensive English corrections are needed, authors may be charged for the cost of editing. For additional reference, consult issues of *Dental Materials* published after January 1999 or the Council of Biology Editors Style Manual (1995 ed.).

All manuscripts should be accompanied by a **letter of transmittal**, signed by each author, and stating that the manuscript is not concurrently under consideration for publication in another journal, that all of the named authors were involved in the work leading to the publication of the paper, and that all the named authors have read the paper before it is submitted for publication.

Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety.

Manuscripts not conforming to the journal style will be returned. In addition, manuscripts which are not written in fluent English will be rejected automatically without refereeing.

For further guidance on electronic submission, please contact Author Services, Log-In Department, Elsevier Ltd, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK. E-mail: authors@elsevier.co.uk, fax: +44 (0)1865 843905, tel: +44 (0)1865 843900.

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving

humans, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals, <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines.** More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the *Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals*, <https://www.elsevier.com/patient-consent-policy>. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/dema/>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Embedded math equations

If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this related support information (http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/302/c/10528/supporthub/publishing).

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

This must be presented in a structured format, covering the following subjects, although actual subheadings should not be included:

- succinct statements of the issue in question;
- the essence of existing knowledge and understanding pertinent to the issue (reference);
- the aims and objectives of the research being reported relating the research to dentistry, where not obvious.

Materials and methods

- describe the procedures and analytical techniques.
- only cite references to published methods.
- include at least general composition details and batch numbers for all materials.
- identify names and sources of all commercial products e.g.

"The composite (Silar, 3M Co., St. Paul, MN, USA)..."

"... an Au-Pd alloy (Estheticor Opal, Cendres et Metaux, Switzerland)."

- specify statistical significance test methods.

Results

- refer to appropriate tables and figures.
- refrain from subjective comments.
- make no reference to previous literature.

- report statistical findings.

Discussion

- explain and interpret data.
- state implications of the results, relate to composition.
- indicate limitations of findings.
- relate to other relevant research.

Conclusion (if included)

- must NOT repeat Results or Discussion
- must concisely state inference, significance, or consequences

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract (structured format)

- 250 words or less.
- subheadings should appear in the text of the abstract as follows: Objectives, Methods, Results, Significance. (For Systematic Reviews: Objectives, Data, Sources, Study selection, Conclusions). The Results section may incorporate small tabulations of data, normally 3 rows maximum.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Up to 10 keywords should be supplied e.g. dental material, composite resin, adhesion.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Embedded math equations

If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this related support information (http://support.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/302/).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Captions to tables and figures

- list together on a separate page.
- should be complete and understandable apart from the text.
- include key for symbols or abbreviations used in Figures.
- individual teeth should be identified using the FDI two-digit system.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

References

Must now be given **according to the following numeric system**:

Cite references in text in numerical order. Use square brackets: in-line, not superscript e.g. [23]. All references must be listed at the end of the paper, double-spaced, without indents. For example: 1. Moulin P, Picard B and Degrange M. Water resistance of resin-bonded joints with time related to alloy surface treatments. *J Dent*, 1999; 27:79-87. 2. Taylor DF, Bayne SC, Sturdevant JR and Wilder AD. Comparison of direct and indirect methods for analyzing wear of posterior composite restorations. *Dent Mater*, 1989; 5:157-160. Avoid referencing abstracts if possible. If unavoidable, reference as follows: 3. Demarest VA and Greener EH. Storage moduli and interaction parameters of experimental dental composites. *J Dent Res*, 1996; 67:221, Abstr. No. 868.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/dental-materials>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '.... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with 25 free paper offprints, or, alternatively, a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, more paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>