

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

LARISSA FARIA ANDRADE E SILVA

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA
DO AÇAÍ-BERRY SOBRE A ATIVIDADE
DAS MMP-2 E MMP-9**

BAURU
2016

LARISSA FARIA ANDRADE E SILVA

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA
DO AÇAÍ-BERRY SOBRE A ATIVIDADE
DAS MMP-2 E MMP-9**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em
Odontologia, sob orientação da Profa. Dra.
Melissa Thiemi Kato.

BAURU
2016

S5861d Silva, Larissa Faria Andrade e

Determinação da concentração inibitória do açaí-berry sobre a atividade das MMP-2 e MMP-9 / Larissa Faria Andrade e Silva. -- 2016.
24f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Melissa Thiemi Kato.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Açaí-berry. 2. Dentina. 3. Erosão dentária. 4. Metaloproteinase da matriz I. Kato, Melissa Thiemi. II. Título.

LARISSA FARIA ANDRADE E SILVA

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA
DO AÇAÍ-BERRY SOBRE A ATIVIDADE
DAS MMP-2 E MMP-9**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em
Odontologia, sob orientação da Profa.
Dra. Melissa Thiemi Kato.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Melissa Thiemi Kato
Universidade do Sagrado Coração

Dra. Polliana Mendes Candia Scaffa
Faculdade de Odontologia de Bauru FOB/USP

Ms. Bruno Lara Zarella
Faculdade de Odontologia de Bauru FOB/USP

Bauru, 28 de Outubro de 2016.



ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em odontologia de Larissa Faria Andrade e Silva.

Ao dia vinte e oito de outubro de dois mil e dezesseis, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Larissa Faria Andrade e Silva intitulado: "**Determinação da concentração inibitória do açaí-berry sobre a atividade das MMP-2 e MMP-9.**". Compuseram a banca examinadora os professores Dra. Melissa Thiemi Kato, Dra. Polliana Mendes Candia Scaffa e Me. Bruno Lara Zarella. Após a exposição oral, a candidata foi arguida pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, APROVA-LA, com a nota 10 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segue assinada pelo Orientador e pelos demais membros da banca.

Dra. Melissa Thiemi Kato (Orientadora)

Dra. Polliana Mendes Candia Scaffa (Avaliador 1)

Me. Bruno Lara Zarella (Avaliador 2)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus por permitir o meu crescimento e amadurecimento durante os quatro anos de faculdade, por me abençoar com saúde e força de vontade para lutar por meus objetivos a cada dia.

Agradeço à Melissa Thiemi Kato pela dedicação e amor pelo seu trabalho, por me instruir e auxiliar tão bem, tanto no desenvolvimento quanto na escrita deste trabalho. Foram dois anos de muito empenho para conseguir que o trabalho fosse realizado, neste período inúmeras coisas aconteceram entre elas coisas boas e ruins, porém nada a impediu de desempenhar sua função de orientadora com excelência. Sempre disponível para responder minhas dúvidas, acalmar minha ansiedade, e me dar forças para continuar lutando. Sofremos com as dificuldades encontradas, e nos alegamos com os bons resultados da pesquisa até agora. Agradeço imensamente por tudo que fez por mim durante a graduação, sem seu auxílio nada disso seria possível.

Agradeço à Polliana Mendes Candia Scaffa por todo o tempo dedicado a mim e a minha pesquisa. Por me ajudar a realizar a parte laboratorial do trabalho, onde fizemos inúmeras zimografias. Agradeço também toda a paciência que teve durante estes meses em que me ajudou.

Agradeço muito ao Bruno Lara Zarella por ter me ensinado toda a parte laboratorial do meu trabalho, juntamente com a Melissa Thiemi Kato. Agradeço também pelo tempo dedicado a minha pesquisa, por todos os conselhos e apoio na vida acadêmica.

Agradeço aos meus pais pelo apoio durante minha pesquisa, por todo incentivo para que eu fosse cada dia mais longe, e por estarem sempre presentes aplaudindo de pé minhas vitórias e fracassos.

Agradeço aos meus amigos e namorado, por estarem sempre presentes em minhas apresentações, me proporcionando todo o apoio que eu precisava.

Agradeço a FAPESP pela confiança depositada, dando-me o privilégio de receber bolsa para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade do Sagrado Coração USC, representada pela digníssima reitora Profa. Irmã Susana de Jesus Fadel.

À Pró-Reitoria de Pesquisa, representada pela digníssima Pró-Reitora Sandra de Oliveira Saes.

À profa. Marília Buzalaf por ceder o laboratório de bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB-USP como sede para o desenvolvimento da pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); pelo apoio financeiro concedido em forma de bolsa (processo número 2014/14491-9) fundamental para a realização da minha iniciação científica.

RESUMO

O Açaí-berry (*Euterpe oleracea* Mart.), é um extrato natural rico em polifenóis. A presença de catequinas e epicatequinas exerce efeito antioxidante e anti-inflamatório, bem como, a possibilidade inibitória sobre as metaloproteinases da matriz (MMPs). As MMPs são enzimas responsáveis pela degradação dos substratos ricos em colágeno. Elas tem demonstrado aumentar a taxa de progressão da erosão em dentina devido à degradação da camada de colágeno da dentina. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito do açaí-berry na inibição da atividade das MMP-2 e MMP-9. MMP-2 e -9 purificadas de origem humana foram diluídas em tampão de amostra não redutor e imediatamente submetidas à zimografia. Cada gel foi incubado separadamente a 37°C por 24h em tampão contendo (ou não – controle) extrato de açaí-berry em diferentes concentrações (0,5% a 10%). A porcentagem de inibição da atividade enzimática foi representada graficamente contra a concentração do extrato. O açaí-berry diminuiu as atividades das formas pró- e ativas das MMP-2 e -9 purificadas humanas de maneira dose-dependente. As formas purificadas de ambas MMP-2 e -9 foram completamente inibidas por 5% e 10% de açaí-berry, respectivamente. Pode-se concluir que o extrato de açaí-berry inibe MMPs e é um novo potencial agente contra erosão de dentina.

Palavras-chave: Açaí-berry. Dentina. Erosão dentária. Metaloproteinase da Matriz.

ABSTRACT

Euterpe oleracea Mart. (acai-berry extract) is a natural extract rich in polyphenols. The presence of catechins and epicatechins confer antioxidant and anti-inflammatory effects as well as the possibility to inhibit matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs are enzymes responsible for the degradation of collagen-rich components. They have been shown to increase the rate of dentin erosion progression due to the degradation of the dentin collagen layer. The aim of this study was to analyze the effect of acai berry on the activities of MMP-2 and MMP-9. Purified human MMP-2 and -9 were diluted in non-reducing sample buffer and immediately subjected to zymography. The gels were cut into 2-cm strips, each containing both the MMPs and molecular weight marker. Each strip was incubated separately at 37°C for 24h in buffer containing (or not - control) acai-berry extract in different concentrations (0.5% to 10%). Percent inhibition of enzyme activity was plotted against extract concentration. Acai-berry decreased the activities of pro- and active forms of purified human MMP-2 and -9 in a dose-response manner. Purified forms of both MMP-2 and -9 were completely inhibited by 5% and 10% acai-berry, respectively. We can conclude that acai-berry extract inhibits MMPs and is a potential new therapeutic agent against dentin erosion.

Keywords: Acai-berry. Dental erosion. Dentin. Matrix metalloproteinase.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	12
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
2.1 ZIMOGRÁFIA	14
2.1.1 Preparo do Gel de Separação e do Gel de Larga 14	14
2.1.2 Corrida e incubação do gel	16
2.1.3 Coloração e Descoloração do gel	17
3 RESULTADOS	19
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Diferentemente do esmalte, a dentina contém cerca de 18-20% de colágeno, o qual pode exercer papel importante na difusão de ácidos. (GANSS et al., 2004). A desmineralização erosiva na dentina resulta na exposição de uma camada externa de matriz orgânica totalmente desmineralizada, seguida de uma zona parcialmente desmineralizada, até ser atingida a dentina mais interna. (KINNEY et al., 1995). A taxa de desmineralização da dentina diminui quando a quantidade de colágeno degradável aumenta. Por este motivo, acredita-se que a matriz desmineralizada dificulte a difusão iônica para dentro e para fora da zona de desmineralização. (KLETER et al., 1994; KLONT; CATE, 1991). A matriz orgânica da dentina pode ser degradada por ação de colagenases e gelatinases. A matriz dentinária contém principalmente colágeno tipo I, e as colagenases podem degradar essa matriz após a desmineralização. (TJÄDERHANE et al., 1998). A dentina humana intacta também contém colagenase de mamífero latente (DAYAN et al., 1983), além das gelatinases MMP-2 e -9 (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; MAZZONI et al., 2007; SANTOS et al., 2009) que podem degradar essa matriz dentinária. Van Strijp et al. (2003) investigaram a presença e atividade da MMP-1, -2 e -9 na saliva e em espécimes de dentina completamente desmineralizada e encontraram uma correlação entre essas enzimas e os níveis de degradação do colágeno. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa verificou que inibidores de colagenases, como a clorexidina, são capazes de reduzir o desgaste de dentina após desafios erosivos. (KATO et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2009).

Seguindo este raciocínio, pensou-se na possibilidade de se testar o açaí (*Euterpe oleracea*), uma nativa palmeira do Brasil, a qual é chamada de açaí-berry. Nos últimos anos tem recebido especial atenção, devido ao seu potencial antioxidativo e propriedades anti-inflamatórias. (HAVSTEEN, 2002; MOURA et al., 2012). Existem muitos estudos mostrando os benefícios dos fitoquímicos (metabólitos secundários da planta) e seu potencial para prevenir doenças humanas associadas com stress oxidativo, assim como, o câncer e doenças cardiovasculares. (MANACH et al., 2004). Os polifenóis são fitoquímicos efetivos, os quais possuem potentes ação antioxidante de acordo com o aumento da biodisponibilidade do óxido

nítrico, promovendo propriedades anti-hipertensivas. (MANACH et al., 2005; WILLIAMSON; MANACH, 2005).

Os mesmos polifenóis que são encontrados em várias frutas e vegetais são também encontrados no açaí-berry. (DEL POZO-INSFRAN et al., 2004; STOCLET et al., 2004). Entre os muitos polifenóis extraídos do açaí-berry, estão as antocianinas, catequinas e epicatequinas (BU et al., 2008), estes dois últimos também encontrados no chá verde. Neste sentido, foi verificado pelo nosso grupo de pesquisa, que o chá verde foi efetivo na redução do desgaste de dentina submetida à erosão associada ou não à abrasão. (KATO et al., 2009). Além disso, em outro trabalho, adicionando-se o princípio ativo do chá verde, o polifenol epigallocatechin-gallate (EGCg) a um gel de aplicação tópica, mostrou-se efetivo na prevenção do desgaste da erosão dentária. (KATO et al., 2010a; KATO et al., 2012). A hipótese de que o princípio ativo do chá verde diminuiria efetivamente o desgaste dentinário, baseiou-se no fato de que o EGCg é um polifenol, inibidor natural de metaloproteinases da matriz (MMPs). (DEMEULE et al., 2000; GARBISA et al., 2001).

Em relação à erosão dentária, as propriedades benéficas do açaí poderiam hipoteticamente estar relacionada a mesma ação do EGCg, presente no chá verde, bem como, da ação desconhecida dos outros agentes.

Portanto, pode-se esperar um bom potencial protetor deste polifenol contra desafios erosivos, pela preservação da camada de colágeno. No caso de pacientes de risco à erosão dentária, pode-se afirmar que a inibição das MMPs pelo açaí-berry, reduziria a velocidade de remoção da superfície desmineralizada da dentina, rica em colágeno e teria um efeito benéfico na prevenção da erosão dentinária. Esta formulação poderia ser usada como novo material odontológico em protocolo de ações preventivas e na prática clínica.

Em virtude do exposto, o objetivo do presente trabalho foi analisar o efeito do açaí-berry na inibição da atividade das MMP-2 e MMP-9.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para análise da degradação da gelatina e da inibição da atividade da MMP-2 e MMP-9, foi utilizada metodologia baseada em trabalhos anteriores. (KATO et al., 2014; KATO et al., 2010b). Para cada concentração inibitória testada foram confeccionados 5 géis de zimografia e detalhada a seguir (Figura 1):

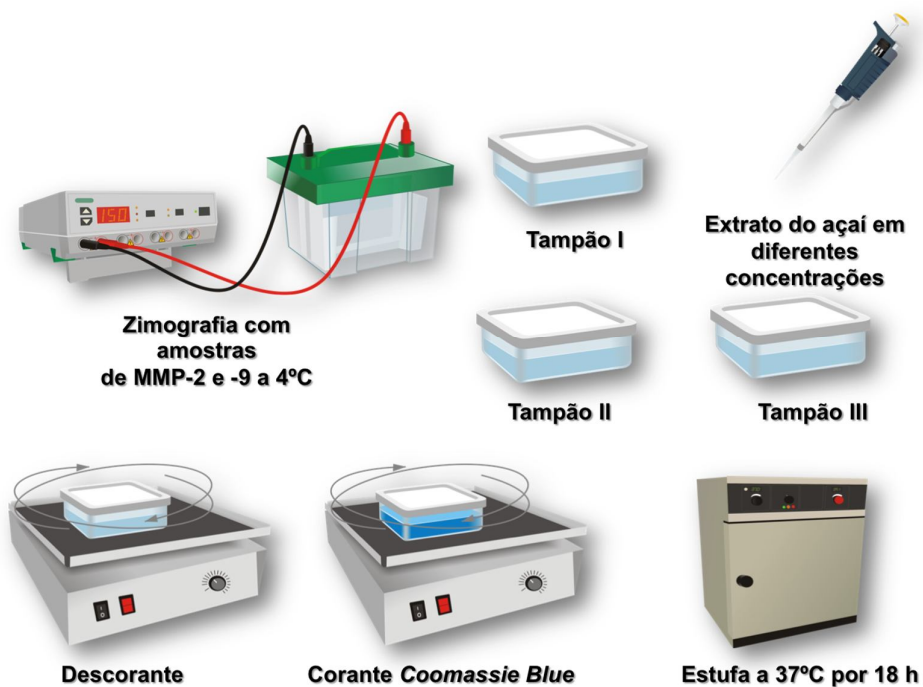


Figura 1 – Esquema ilustrativo da metodologia.

Fonte: adaptado de Kato, Melissa Thiemi (Tese de Doutorado, 2011)

2.1 ZIMOGRAFIA

2.1.1 Preparo do Gel de Separação e do Gel de Largada

Primeiramente, o gel de separação (Quadro 1) foi colocado entre as placas de vidro com o auxílio de uma pipeta e aguardado o período de 30 min para sua

polimerização, em temperatura ambiente. O gel de poliacrilamida contém gelatina (Quadro 1) como substrato.

Em seguida, o gel de largada (Quadro 1) foi colocado sobre o gel de separação e polimerizado, juntamente com o pente, para a delimitação dos poços de inserção das amostras. O gel foi protegido com gaze embebida em água, para impedir a inibição de sua polimerização pelo oxigênio

Gel de Corrida								
10%	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
H ₂ O	2.0	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.8	20
30% Acrylamide mix	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10.0	13.3	16.6
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	
Gel de Largada								
	1ml	2 ml	3ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% Acrylamide mix	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
0.5 M Tris (pH 6.8)	0.25	0.50	0.75	1.0	1.25	1.50	2.0	
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% APS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Quadro 1 – Descrição dos constituintes do gel de poliacrilamida

O padrão de peso molecular (*Pre stained SDS-PAGE Standards – Low Range*, Cat n^o 161-0305, Control 300002319. BIO-RAD Laboratories Inc, CA) foi inserido no primeiro poço, calibrado com os pesos moleculares descritos na Figura 2 que se segue.

Protein	Calibrated MW (daltons)
Phosphorylase B	106,904
Bovine serum albumin	93,636
Ovalbumin	52,264
Carbonic anhydrase	37,226
Soybean trypsin inhibitor	28,244
Lysozyme	18,833

CL1610305 REV A
Bio-Rad Laboratories • 2000 Alfred Nobel Drive • Hercules, CA 94547

Figura 2– Descrição do marcador de peso molecular.

Os controles positivos foram utilizados para confirmar as bandas correspondentes à MMP-2 e MMP-9 purificadas. Foram inseridos em poços separados 4 μ L da enzima MMP-2 e 2 μ L da enzima MMP-9 recombinantes.

2.1.2 Corrida e incubação do gel

O tampão de corrida foi colocado nas partes superior e inferior do tanque, a câmara de vidro foi colocada dentro da cuba e coberta com tampão. O eletrodo positivo (vermelho) foi ligado à parte inferior da cuba, enquanto o eletrodo negativo (preto) foi acoplado à sua porção superior. As amostras foram submetidas à eletroforese em condições não redutoras. (LAEMMLI et al., 1970). A corrida foi realizada a 4^o C em um sistema de separação proteica por eletroforese (Mini-PROTEAN 3 System, Bio-Rad Laboratories, Inc, CA). A voltagem foi fixada em 110volts e então iniciada a corrida, que demora aproximadamente 1 hora e 45 minutos.

- Após a eletroforese, o gel foi recortado em tiras de ~2 cm e colocadas em recipientes plásticos contendo 100 ml de tampão de lavagem (Tris HCl a 50mM, 2,5% de Tween 80, 0,02%(peso/volume) de NaN₃, pH 7,5 a temperatura ambiente), e incubado, sob suave agitação por 30 min, a 22°C.

- Em seguida, a solução foi substituída pelo tampão de lavagem II (Tris HCl a 50mM, 2,5% de Tween 80, 0,02%(peso/volume) de NaN_3 , ZnCl_2 a $1\mu\text{M}$, CaCl_2 a 5 mM) e novamente agitada por mais 30 min.

Por último, as tiras do gel foram incubadas separadamente *overnight* (24 horas) no tampão de incubação (Tris HCl a 50mM, CaCl_2 a 5 mM, ZnCl_2 a $1\mu\text{M}$, 0,02%(peso/volume) de NaN_3), pH 7,5 a 37°C , contendo ou não (controle) o extrato de açaí em diferentes concentrações para se determinar a atividade das MMPs. (KATO et al., 2014; KATO et al., 2010b). O extrato de açaí-berry foi adquirido da Embrafarma (Ceará, Brasil). Tratando-se de extrato seco de açaí berry, com 99,8% de pureza.

Com o objetivo de verificar o efeito do extrato do açaí sobre a atividade das MMP-2 e -9, os géis contendo amostras puras de MMP-2 e MMP-9, foram incubados a 37°C (Orion®; estufa de cultura 502; Fanem; Brasil) por exatamente 24 h em tampão III (Tris HCl a 50 mmol/L, NaN_3 a 0,2% (p/v), ZnCl_2 a 10 $\mu\text{mol/L}$ e CaCl_2 a 100 mmol/L), contendo diferentes concentrações do extrato do açaí. O estudo piloto foi então realizado para obtenção de concentrações do extrato de açaí-berry para inibição mínima e máxima da atividade das MMP-2 e MMP-9 (Figura 3). Sendo assim, pode-se determinar que as concentrações a serem testadas foram de 0,5%, 1%, 2,5%, 5% e 10%.

2.1.3 Coloração e Descoloração do gel

- Após o período de incubação, o tampão foi substituído por 100 ml de solução corante contendo 0,5% de *Coomassie Blue*, 30% de metanol, 10% de ácido acético por um período de 1 h.

- O corante foi substituído por 100 ml de solução descorante (composta de: 10% de metanol, 5% de ácido acético) e o gel foi, em seguida, armazenado em água deionizada.

- Após a incubação no descorante, as proteínas com atividade gelatinolítica foram visualizadas como bandas negativas.

A porcentagem de inibição da atividade enzimática será representada graficamente contra a concentração do extrato. A porcentagem final de inibição da atividade da enzima será calculada posteriormente quando o experimento for realizado em quintuplicata e de acordo com a concentração do extrato do açaí. O efeito inibitório será determinado da concentração que inibir 50% e 100% da atividade enzimática (IC_{50} e IC_{100} , respectivamente). A porcentagem de inibição do extrato do açaí será determinado comparando com a atividade das MMPs do controle positivo.

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos com o estudo piloto (Figura 3), demonstraram que houve inibição tanto da MMP-2, quanto da MMP-9, sugerindo uma dose-resposta do açaí-berry, ou seja, quanto maior a concentração do extrato de açaí-berry, maior a inibição da atividade.

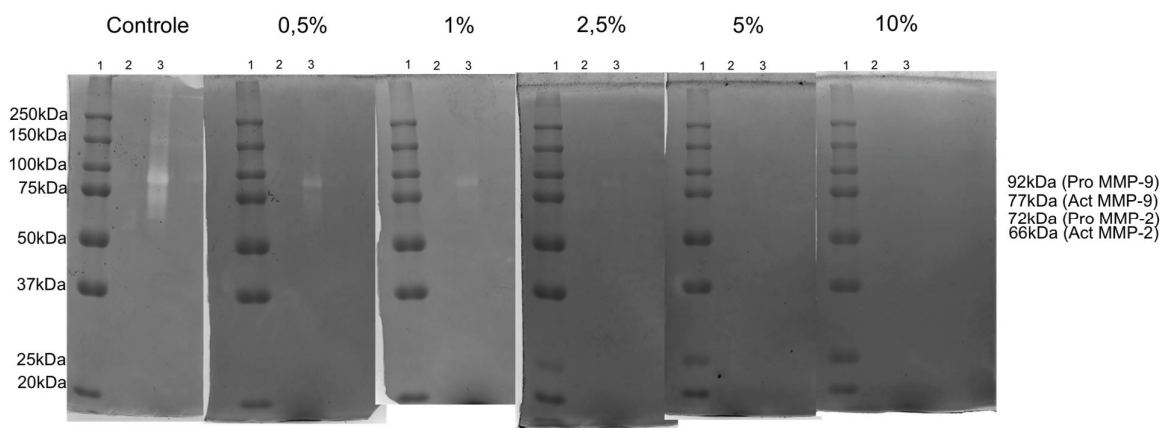


Figura 3 – Estudo piloto para determinação da concentração do extrato do açaí-berry sobre a atividade gelatinolítica das metaloproteinases da matriz (MMP-2 e MMP-9). Colunas 1: Padrão de peso molecular (kDa). Colunas 2 e 3: MMP-2 e MMP-9 humana purificada, respectivamente. Depois da incubação com o extrato do açaí-berry, a atividade de degradação da gelatina das formas pro e ativa (Pro e Act MMP-2 e MMP-9), diminuiu significativamente de maneira dose-dependente.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo a demonstrar o efeito do extrato do açaí-berry sobre a atividade das gelatinases. Embora ainda não finalizado, o estudo piloto testando-se diferentes concentrações do extrato de açaí-berry, mostrou efeito inibitório evidente a partir de 1%. O mecanismo de inativação das gelatinases ainda não é conhecido. No entanto, sabe-se que o extrato de açaí-berry possui polifenóis, como as antocianinas, catequinas e epicatequinas. (BU et al., 2008). Estes dois últimos também encontrados no chá verde. Estudo prévios, demonstraram que esses polifenóis reduziram o desgaste de dentina submetida à erosão associada ou não à abrasão. (KATO et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009). O mecanismo de ação envolvido, poderia ser explicado devido à ação inibitória sobre as MMPs e a subsequente preservação da matriz orgânica desmineralizada.

As MMPs presentes tanto na saliva ou dentina hidrolisam os componentes da matriz extracelular, como os componentes orgânicos presentes na matriz dentinária (Figura 4). Sendo assim pode-se sugerir que uma dieta rica em açaí poderia apresentar um potencial efeito terapêutico em lesões dentárias.

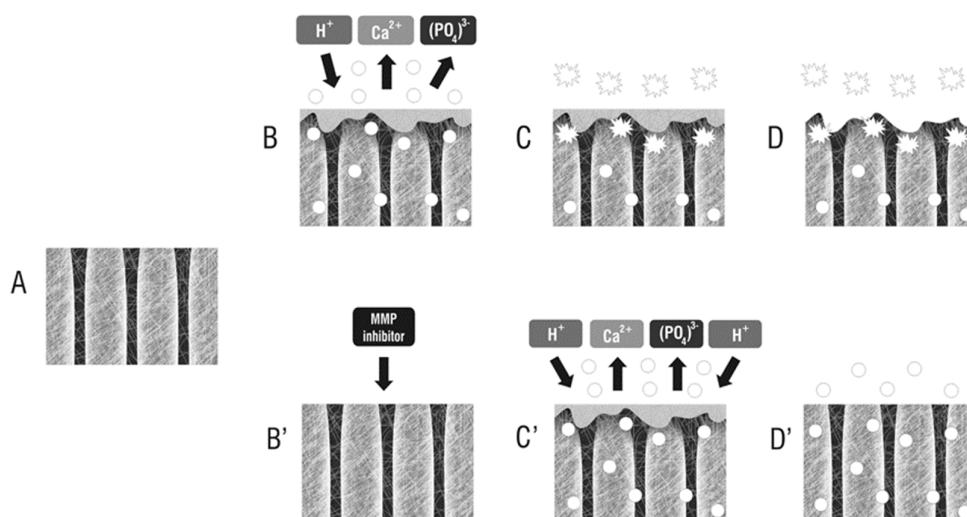


Figura 4 – Mecanismo de ação das MMPs sobre a erosão dentinária. Esferas: MMPs inativas. Asterisco: MMPs ativas. (A) Dentina hígida. Após desafio erosivo, a superfície da dentina está desmineralizada (B), causando a exposição de fibrilas de colágeno (C). Quando desprotegida pelos inibidores de MMP, as fibrilas de colágeno ficam expostas pela ação do ácido e são hidrolisadas pelas (C, D). A inibição das MMPs da dentina e/ou da saliva (B') preserva a degradação da camada orgânica durante desafios erosivos subsequentes (C'), resultando em uma significativa redução do desgaste erosivo (D'). Ilustração modificada de KATO et al. (2010). Fonte: BUZALAF et al. (2012).

As MMPs são secretadas na forma precursoras inativas (pró-formas), requerendo ativação pelo baixo pH para degradar os componentes da matriz extracelular. No entanto, o efeito da ativação sobre as MMPs intrínsecas da saliva não foi objeto de estudo no presente trabalho.

Medidas preventivas para reduzir a erosão dentária, como aplicações tópicas de flúor tem sido investigadas. A maioria desses tratamentos são baseadas sobre a ação do flúor, a qual pode ser explicada pela formação de uma barreira mecânica por meio da deposição de fluoreto de cálcio na superfície dentária. (BUZALAF, 2013). No entanto, o flúor na prevenção da erosão ainda é controversa (WIEGANG, 2003), embora KATO et al. (2014), também propuseram que o flúor poderia exercer efeito inibitório sobre as MMPs. Avaliar outros inibidores de MMPs torna-se interessante, pois poderiam ser associados à ação já conhecida e remineralizante do

flúor. Partindo-se dos conhecimentos do possível mecanismo de ação, o uso de inibidores de MMPs passou a ser considerado eficaz no tratamento dos problemas que ocorrem na cavidade oral.

Sabe-se que as propriedades dos polifenóis podem variar de acordo com o cultivo ou época de colheita dos frutos, uma vez que a concentração dos princípios ativos podem variar dependendo das circunstâncias. Neste caso, trata-se de extrato bruto de açaí-berry, e as concentrações das antocianinas e catequinas podem variar de acordo com a procedência do produto e da região cultivada. O extrato testado não possui definida as concentrações dos princípios ativos separadamente. A origem do produto é do Ceará-Brasil, tendo apenas a referência de sua pureza. Caso os princípios ativos fossem testados separadamente, resultados diferentes seriam obtidos.

A porcentagem de inibição do extrato do açaí foi determinado comparando com a atividade das MMPs do controle (sem a adição do extrato de açaí-berry). As concentrações de 5% e 10% do extrato de açaí-berry foram capazes de inibir totalmente a atividade das MMP-2 e -9, respectivamente. Pode-se concluir que o extrato do açaí-berry exerce efeito inibitório sobre as MMPs testadas.

REFERÊNCIAS

- Bu SY, Lerner M, Stoecker BJ, Boldrin E, Brackett DJ, Lucas EA, Smith BJ: Dried plum polyphenols inhibit osteoclastogenesis by downregulating nfatc1 and inflammatory mediators. *Calcif Tissue Int* 2008;82:475-488.
- Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR: The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res* 2012;24:72-76.
- Dayan D, Binderman I, Mechanic GL: A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. *Arch Oral Biol* 1983;28:185-187.
- Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST: Phytochemical composition and pigment stability of acai (euterpe oleracea mart.). *J Agric Food Chem* 2004;52:1539-1545.
- Demeule M, Brossard M, Page M, Gingras D, Beliveau R: Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta* 2000;1478:51-60.
- Ganss C, Klimek J, Starck C: Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Arch Oral Biol* 2004;49:931-935.
- Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, Albini A: Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer* 2001;91:822-832.
- Havsteen BH: The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002;96:67-202.
- Kato MT. Inibição das metaloproteinases da matriz como nova estratégia para prevenção da erosão dentinária. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo. 2011. 207p.
- Kato MT, Bolanho A, Zarella BL, Salo T, Tjäderhane L, Buzalaf MA: Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res* 2014;93:74-77.
- Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA: Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res* 2010a;89:468-472.
- Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calábria MP, Magalhães AC, Pereira JC, Buzalaf MA: Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J Dent Res* 2012;91:1119-1123.
- Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Oliveira RC, Pereira JC, Tjäderhane L, Buzalaf MA: Effect of iron on matrix metalloproteinase inhibition and on the prevention of dentine erosion. *Caries Res* 2010b;44:309-316.
- Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Attin T, Buzalaf MA: The protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion: An in situ study. *J Appl Oral Sci* 2009.
- Kinney JH, Balooch M, Haupt DL, Jr., Marshall SJ, Marshall GW, Jr.: Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res* 1995;74:1179-1184.

- Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Niehof J, Ten Cate JM: The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *J Dent Res* 1994;73:1523-1529.
- Klont B, ten Cate JM: Remineralization of bovine incisor root lesions in vitro: The role of the collagenous matrix. *Caries Res* 1991;25:39-45.
- Laemmli UK et al.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 1970;227:680-685.
- Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA: Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent* 2009;37:994-998.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L: Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-747.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:230S-242S.
- Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM: The matrix metalloproteinase gelatinase a in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000;45:757-765.
- Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, Di Lenarda R, Pashley DH, Breschi L: Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res* 2007;86:436-440.
- Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KM, Nesi RT, Resende AC, Souza PJ, Silva AJ, Borges RM, Porto LC, Valenca SS: Effects of *Euterpe oleracea Mart.* (acai) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine* 2012;19:262-269.
- Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, Pashley D, Tay F, Ferraz C, Tjäderhane L: Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *J Endod* 2009;35:686-689.
- Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB: Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 2004;500:299-313.
- Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto V-J, Larmas M, Salo T: The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998;77:1622-1629.
- van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V: Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res* 2003;37:58-65.
- Wiegand A, Attin T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions--a review. *Oral Health Prev Dent.* 2003;1(4):245-53.
- Williamson G, Manach C: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:243S-255S.