



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102015015484-4

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 302013005551-5

(22) Data do Depósito: 31/10/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 31/05/2016

(51) Classificação Internacional: A61K 6/00; A61Q 11/00.

(52) Classificação CPC: A61K 6/00; A61Q 11/00.

(54) Título: BIOMATERIAIS DE REPARAÇÃO TECIDUAL E USOS DOS BIOMATERIAIS DE REPARAÇÃO TECIDUAL

(73) Titular: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP, -. CGC/CPF: 63025530000104. Endereço: Av. Brasil, Nº 1971 Jardim Paulista, São Paulo, São Paulo, SP, BRASIL(BR), 01431001; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA, -. CGC/CPF: 34621748000123. Endereço: Rua Augusto Corrêa,1, Guamá, Belém, PA, BRASIL(BR), 66075900

(72) Inventor: MÁRCIA MARTINS MARQUES; ROBERTA SOUZA D'ALMEIDA COUTO.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 31/10/2013, observadas as condições legais

Expedida em: 08/09/2020

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

**BIOMATERIAIS DE REPARAÇÃO TECIDUAL E USOS DOS
BIOMATERIAIS DE REPARAÇÃO TECIDUAL**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo de aplicação da Odontologia, uma vez que se refere a dois biomateriais de reparação tecidual contendo extrato natural de copaíba (COP) (na forma de óleo-resina, resina ou óleo).

DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA

[002] A odontologia por muito tempo preocupou-se em buscar materiais para restaurar a estrutura anatômica do dente perdida e proteger contra forças mastigatórias. De fato, ao longo dos anos tem-se melhorado continuamente as propriedades físicas e adesivas dos materiais restauradores. No entanto, um dos grandes desafios da Odontologia Contemporânea é como restaurar o tecido dental doente e salvar a vitalidade do dente, ou seja, desenvolver um material que facilite e até mesmo promova formação de tecido dental natural por meio de processos regenerativos, pois a grande limitação dos novos materiais são os defeitos gerados na interface dente-material, o que levam à infiltração e novas infecções e consequentemente perda da vitalidade dental.

[003] O conhecimento integral das propriedades, estruturas e função do complexo dentina-polpa é necessário para a compreensão biológica e relevante para a tomada de decisões clínicas, garantindo a longevidade da restauração. O complexo dentina-polpa é uma unidade biológica constituída de tecido dentinário e tecido pulpar, que mantém íntima relação estrutural, embriológica e funcional. Este fato faz com que a dentina e a polpa não sejam consideradas como estruturas isoladas. Pelo contrário, as repercussões e mecanismos de resposta tecidual integradas fazem com que estes

tecidos mantenham íntima relação ao longo de toda vida do órgão dental.

[004] A polpa dentária tem como função essencial formar dentina continuamente, enquanto a polpa é biologicamente ativa. A dentina protege a polpa das agressões do meio externo ao revesti-la com tecido duro, mineralizado. Quando essa dentina é agredida física, química e/ou biologicamente, por procedimento operatório de preparo da cavidade dental e/ou processo de cárie, por exemplo, a polpa responde a diferentes estímulos formando dentina reparadora desde que o estímulo não exceda a capacidade da polpa de reparação.

[005] A proteção do complexo dentina-polpa é constituída pela aplicação de uma ou mais camadas de material específico entre o material restaurador e o tecido dentário para evitar desafio adicional para o tecido da polpa causada pelo procedimento operatório, a toxicidade dos materiais restauradores e a penetração de bactérias, devido à infiltração.

[006] Rotineiramente os cirurgiões-dentistas utilizam de diversos materiais com o objetivo de proteger a polpa, quer para o capeamento direto ou para o indireto. No entanto, os materiais que existem hoje no mercado não apresentam todas as características ideais de um material capeador que são: compatibilidade biológica, bioestimulação, insolubilidade; capacidade isolante térmica e elétrica; bactericida e bacteriostático; adesividade; resistência mecânica e vedamento. Assim sendo, ainda há que se encontrar novos materiais para este fim.

[007] O Hidróxido de cálcio $(Ca(OH)_2$, é uma base forte com um pH de aproximadamente 12,5 a 12,8; cuja ação principal é a dissociação iônica dos íons cálcio (Ca^{2+}) e

hidroxila (OH⁻), o que garante a propriedade de alcalinidade e o pH elevado confere propriedade antibacteriana. Estudos recentes apontam atividade dentinogênica do Ca(OH)₂, ou seja, capacidade de formar tecido dentinário. Porém, o Ca(OH)₂ leva à formação de áreas de necrose e considerável inflamação, o que provavelmente acarreta na formação de tecido de pouca qualidade, com descontinuidade e longo tempo de formação tecidual, propiciando invasão bacteriana e complicações na reparação tecidual. Além disso, o Ca(OH)₂ apresenta desvantagem biomecânica, baixa resistência, alta solubilidade em água; o que leva à degradação de sua interface no decorrer de alguns anos após sua aplicação.

[008] O agregado de trióxido mineral (do inglês *mineral trioxide aggregate*- MTA) é formado por diversos componentes, principalmente pela sílica e cálcio, cujo mecanismo de ação é semelhante ao do Ca(OH)₂, tem boa capacidade seladora o que dificulta a infiltração marginal, baixa solubilidade e radiopacidade satisfatória. Estudos recentes apontam atividade dentinogênica e ao comparar com o Ca(OH)₂ formam menos áreas de necrose, pouca inflamação, o que provavelmente acarreta na formação de tecido de melhor qualidade e menor tempo de formação. Porém, o MTA é um material de grande dificuldade de manipulação. O material MTAFillapex®, da Angelus, é o MTA com a inclusão de resina para facilitar a manipulação, porém não preserva as excelentes características biológicas do MTA, sendo um material citotóxico provavelmente em razão da presença da resina, conforme pode ser visto na figura 1.

[009] A figura 1 é a representação das curvas de crescimento celular dos grupos experimentais, onde: CG: grupo controle; MTA: MTA branco, MTA-F: MTA Fillapex; e onde * significa que não houve crescimento celular.

[0010] O óleo-resina de copaíba (COP) é um exsudato originário da desintoxicação do organismo vegetal e funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias. É uma substância natural obtida da perfuração no tronco da árvore do gênero *Copaifera* e pertencente à família Leguminosae-Caesalpinziaceas. Popularmente é conhecida como copaibeira ou pau d'óleo e apresenta uma variedade de espécies. Na região Amazônica, principalmente nos estados brasileiros Pará e Amazonas, a copaíba é uma planta medicinal de vasto uso popular. A origem do nome copaíba parece vir do tupi "cupa-yba", a árvore de depósito, ou que tem jazida, em alusão ao óleo que guarda em seu interior.

[0011] A designação correta para o óleo de copaíba é a de óleo-resina, por ser um exsudato composto de uma parte sólida, resinosa não volátil, formada por ácidos diterpênicos (46,9%) e a outra parte formada por óleo essencial composto de hidrocarbonetos e álcoois sesquiterpênicos (53%). Esses compostos são potencialmente importantes como fonte de princípios ativos em farmacologia, tendo como principal atividade efeitos antiinflamatórios e cicatrizantes, além de potencial antisséptico e analgésico.

[0012] A composição encontrada/determinada para o COP por Guimarães-Santos et al., 2012, em estudo de cromatografia em fase gasosa, se encontra na Tabela 1.

Tabela 1: Composição do COP utilizado no estudo revelado por cromatografia em fase gasosa.

Composição	Percentual (%)
δ -elemeno	0,2
Cyclosativene	0,9
α -copaeno	0,5
δ -elemeno	0,2

Cyclosativene	0,9
α -copaeno	0,5
β -elemeno	3,2
α -gurjunene	0,7
β -cariofileno	37,3
trans- α -bergamoteno	9,0
Aromadendreno	0,9
epi- β -santaleno	0,1
α -humuleno + (E)- β -farneseno	5,4
β -chamigrene	1,0
γ -gurjunene	0,6
γ -curcumeno	0,6
β -selineno	4,8
α -selineno	3,0
(Z)- α -bisaboleno	1,8
α -bulnesene	2,2
β -bisaboleno	14,5
β -curcumeno	0,4
β -sesquiphelandrene	1,2
(E)- γ -bisaboleno	1,4
óxido de cariofileno	0,1
epi- β -bisabolol	0,1
β -bisabolol	0,2

[0013] A presente invenção é um material dentário restaurador composto de minerais associados ao COP que visa restaurar a integridade funcional do dente e promover rápida

formação de tecido dentinário perdido e com mínima resposta inflamatória, necessária para induzir o processo regenerativo. Partindo das características ideais de reparação/regeneração tecidual dos compostos isolados Ca(OH)_2 , MTA e COP, a invenção propõe associá-los a fim de obter materiais mais bioativos.

Documentos do Estado da Técnica

[0014] Uma das áreas que tem pesquisado a utilização do COP é a odontologia. Estudos têm apontado grande potencial como agente antimicrobiano e anti-inflamatório.

[0015] Bandeira et al., 1999 avaliaram a atividade bacteriana para *Streptococcus mutans*, bactéria cariogênica, para pastas à base de Ca(OH)_2 e óleo essencial de copaíba, Ca(OH)_2 e resina de copaíba, óxido de zinco e óleo essencial de copaíba, óxido de zinco e resina de copaíba. Os resultados apontaram atividade antibacteriana para todas as pastas experimentais. O óleo essencial de copaíba isolado mostrou melhor atividade bacteriana que a resina de copaíba isolada.

[0016] Vasconcelos et al., 2008 utilizaram o COP em substituição ao eugenol formulado com óxido de zinco e Ca(OH)_2 , cimento com indicação para tratamento restaurador atraumático, e mostraram efeito antimicrobiano do cimento frente aos microorganismos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*. Dados também confirmados por Pieri et al 2010 e 2012, que avaliaram a aderência de bactérias formadoras de placa dental para os microorganismos *Streptococcus mutans* em testes in vitro e in vivo e mostraram superioridade do COP comparado com a clorexidina.

[0017] Nos estudos de Souza et al, 2010a mostraram que o composto diperteno, especificamente o ácido copálico, presente na composição do COP apresentou efeito bacteriostático para bactérias cariogênicas nas primeiras 12

horas e efeito bactericida entre 12 e 24 horas. Souza et al, 2010b apresentaram esse mesmo efeito para bactérias anaeróbicas da doença periodontal.

[0018] Rosa et al., 2010 avaliaram as alterações dimensionais e a solubidade de um novo cimento endodôntico, Biosealer, à base de óxido de zinco, Ca(OH)_2 , bismuto, subcarbonato de resina natural, bórax e COP e não atenderam as especificações da ADA (American Dental Association). No entanto, nos estudos de Garrido et al, 2010 o mesmo cimento apontou resultados satisfatórios dos testes físico-químicos requeridos pela ADA. Dados indicam resultados controversos quanto às propriedades físico-químicas.

[0019] Costa et al., 1996 avaliaram a biocompatibilidade dos cimentos óxido de zinco e COP; e óxido de zinco e eugenol em subcutâneo de camundongo. Ambos os cimentos apresentaram presença de células inflamatórias, necrose e degradação de fibras colágenas, porém, o cimento com o COP foi menos irritante.

[0020] Garcia et al., 2011 em teste *in vivo* no tecido subcutâneo de camundongo avaliaram a biocompatibilidade de dois novos cimentos endodônticos, ambos à base de Ca(OH)_2 e própolis, porém um com COP e o outro apenas com a porção líquida do COP, óleo essencial, foram testados. Os resultados foram satisfatórios quanto à reação do tecido para ambos os cimentos, porém, o cimento que melhor modulou a resposta inflamatória em 7 e 21 dias foi à base de COP. Em 42 dias as respostas foram similares para os dois cimentos.

[0021] Lima et al., 2011 avaliaram *in vivo* a reparação pulpar utilizando o COP em 24 horas, 15 e 30 dias após pulpotomia em molares de camundongo Wistar. O COP foi capaz de modular o processo inflamatório e, em 15 dias observaram presença de depósito de tecido mineralizado subjacente ao

material protetor.

[0022] A literatura aponta as vantagens do COP na Odontologia como atividade antimicrobiana para doença cárie e doença periodontal, biocompatibilidade do COP utilizado isoladamente e na forma de cimentos propostos com óxido de zinco e com o hidróxido de cálcio.

Problemas do Estado da Técnica e Soluções alcançadas pela presente invenção

[0023] Os biomateriais, Ca(OH)_2 e MTA, apresentam excelentes características em termos biológicos para induzir a reparação tecidual, em especial da polpa dentária. No entanto, cada um deles apresenta desvantagens, como por exemplo, o alto pH com conseqüente dano inicial do Ca(OH)_2 ao tecido exposto, ou a dificuldade de manipulação do MTA, em especial quando a indicação for para tratamento de exposições pulpares. Desta forma, a indústria ainda busca fórmulas alternativas de uso destes biomateriais para fins de reparação pulpar.

[0024] Na presente invenção, os biomateriais de reparação tecidual contendo extrato natural COP, aqui arbitrariamente denominados de BIOCOP one e BIOCOP tri mostraram em testes *in vitro* serem capazes de melhorar algumas destas características indesejáveis do Ca(OH)_2 e do MTA, como por exemplo, reverter a citotoxicidade do Ca(OH)_2 e melhorar as características de manipulação do MTA. Mais ainda, os materiais da presente invenção mostraram ser mais bioativos porque reúnem as vantagens dos materiais comercializados Ca(OH)_2 e MTA, bem como do COP.

[0025] A biocompatibilidade, a regulação da infecção e da inflamação são propriedades cruciais para materiais dentais quando se trata de promover e facilitar a reparação e regeneração tecidual, sendo esta a proposta do novo

material. Ou seja, os novos materiais destacam-se por proliferar, diferenciar, mineralizar e recrutar células-tronco de polpa dentária humana e conseqüentemente estimular reparação ou regeneração tecidual, quando necessário e de forma mais rápida e organizada.

[0026] Assim, os novos materiais propostos por apresentarem melhores características biológicas e de manipulação do material poderão ser utilizados como um material restaurador, que facilita, e até mesmo promove a formação de tecido dental natural por meio de processos reparativos/regenerativos e restaura a estrutura física do dente perdida, protegendo contra forças mastigatórias.

Vantagens da Invenção

[0027] Os biomateriais de reparação tecidual contendo extrato natural COP possuem uma série de vantagens em relação ao que já é conhecido no estado da arte, entre essas vantagens, podemos ressaltar as seguintes:

- Permitem excelente capacidade proliferativa da célula (não são irritantes às células e possuem excelente biocompatibilidade).
- São capazes de reverter completamente o efeito inibitório (irritante) do material comercializado Hidróxido de Cálcio PA na proliferação celular.
- Aumentam a deposição de nódulos mineralizados comparado ao material comercializado Hidróxido de Cálcio PA.
- Induzem superexpressão dos genes relacionados à formação dentinária comparados aos materiais comercializados Hidróxido de Cálcio PA e MTA branco, ou seja, maior ativação de células responsáveis em formar tecido dentinário.
- Melhor capacidade migratória das células, comparados aos materiais comercializados Hidróxido de Cálcio

PA e MTA branco, ou seja, capacidade de reparação mais rápida.

- O BIOCOP one, à base de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e COP, reverte por completo a inibição de migração celular causada pelo material comercializado Hidróxido de Cálcio PA.

- O BIOCOP tri, à base de MTA e COP, aumenta a velocidade de migração das células em relação ao material comercializado MTA branco.

- Melhor manipulação do material sem perda das características biológicas como: material não irritante, biocompatível, potencial de formação de tecido dentinário, ação anti-inflamatória, antimicrobiana.

- Material com capacidade de formar tecido natural do dente de melhor qualidade e em menor tempo, além de devolver a funcionalidade na cavidade oral. Os materiais $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e MTA são materiais reparadores de tecido, mas com qualidade inferior do tecido formado, maior tempo de formação tecidual e dificuldade de manipulação do material, além de não devolverem a funcionalidade na cavidade oral, não são materiais restauradores.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

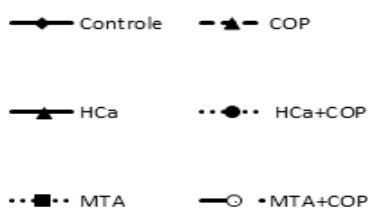
[0028] A invenção se refere a dois cimentos (materiais para proteção pulpar) para reparação tecidual na área de odontologia, sendo que estes cimentos contêm minerais definidos na forma de pó, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou tipo Portland sem gesso MTA, associados ao COP.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0029] A figura 1 é a representação das curvas de crescimento celular dos grupos experimentais, onde: CG: grupo controle; MTA: MTA branco, MTA-F: MTA Fillapex; e onde * significa que não houve crescimento celular; e onde:

— CG
 - - - MTA
 - - - - MTA-F

[0030] A figura 2 é uma representação gráfica das curvas de crescimento celular dos grupos experimentais; sendo que houve crescimento significativo em todos os grupos experimentais, exceto no grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$. No gráfico, a letra "a" significa número de células viáveis significativamente maior em 72 horas que todos os demais grupos experimentais; A letra "b" indica o número de células viáveis significativamente menor em 72 horas na comparação com todos os demais grupos experimentais ($p < 0,01$); sendo que, na figura:



[0031] A figura 3 é uma representação gráfica da média das absorvâncias dos grupos experimentais em 21 dias. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas. Barra significa desvio padrão da média.

[0032] A figura 4 é uma representação gráfica dos valores da média de expressão gênica normalizada do BGLAP (osteocalcina) pelo GAPDH (gene constitutivo) em todos os grupos experimentais. Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com a análise de variância ($p < 0,05$). A barra significa desvio padrão da média.

[0033] A figura 5 é uma representação gráfica dos valores da média de expressão gênica normalizada do DSPP (sialofosfoproteína dentinária) pelo GAPDH (gene constitutivo) em todos os grupos experimentais; onde * significa que não houve expressão gênica. Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com a análise de variância ($p < 0,05$). A barra significa desvio padrão da média.

[0034] A figura 6 é uma representação gráfica dos valores da média de expressão gênica normalizada do HSP-27 (*heat shock protein 27*) pelo GAPDH (gene constitutivo) em todos os grupos experimentais. Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com a análise de variância ($p < 0,05$). A barra significa desvio padrão da média.

[0035] A figura 7A é uma representação gráfica dos índices de migração (número de células /área da ferida) em 12h de todos os grupos experimentais; onde * significa que não houve migração; e onde ** significa: "significativamente menor que os demais grupos onde houve migração ($p < 0,01$)". A migração celular foi analisada após contato dos meios condicionados. A barra significa desvio padrão da média.

[0036] A figura 7B é uma representação gráfica dos índices de migração (número de células /área da ferida) em 24h de todos os grupos experimentais; onde * significa que não houve migração; e onde ** significa: "significativamente menor que os demais grupos onde houve migração ($p < 0,01$)". A migração celular foi analisada após contato dos meios condicionados. A barra significa desvio padrão da média.

[0037] A figura 7C é uma representação gráfica dos índices de migração (número de células /área da ferida) em 48h de todos os grupos experimentais; onde * significa que não houve migração; e onde ** significa: "significativamente menor que os demais grupos onde houve migração ($p < 0,01$)". A migração celular foi analisada após contato dos meios condicionados. A barra significa desvio padrão da média.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0038] A invenção proposta combina os minerais definidos na forma de pó, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou MTA, com o COP formando um cimento.

[0039] O diferencial deste cimento são os minerais utilizados em associação com extrato de COP retirado diretamente do caule da copaibeira. O proposto é que se utilize o COP na sua forma bruta, no entanto, há como se separar este óleo-resina em duas outras formas, a saber: só óleo e só resina.

[0040] A invenção contempla os minerais Ca(OH)_2 e MTA, sendo o Ca(OH)_2 com o COP ($\text{Ca(OH)}_2 + \text{COP}$) e o MTA com o COP ($\text{MTA} + \text{COP}$), aqui denominados BIOCOP one e BIOCOP tri, respectivamente com o COP na forma de extrato.

BIOCOP one

[0041] O BIOCOP one é composto por hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) na forma de pó e adicionalmente, o líquido é composto de COP. A proporção do cimento BIOCOP one varia de 0,5g a 1,5g de pó (HCa) e 20 a 100 μl do líquido (COP), sendo preferencialmente utilizada a proporção de 1 g de pó (Ca(OH)_2) para 70 μl do líquido (COP).

[0042] O COP é o extrato de copaíba que pode ser o extrato de óleo-resina de copaíba, o óleo de copaíba ou a resina de copaíba, sendo preferencialmente o extrato de óleo-resina de copaíba.

BIOCOP tri

[0043] O BIOCOP tri é composto por MTA (sólido em pó) e COP (líquido). O MTA é um cimento do tipo Portland em pó sem adição de gesso. O MTA é composto por óxidos minerais: SiO_2 , K_2O , Al_2O_3 , Na_2O , Fe_2O_3 , SO_3 , CaO , Bi_2O_3 , MgO e resíduos insolúveis de sílica cristalina, óxido de cálcio e sulfatos de potássio e sódio. Adicionalmente, a porção líquida que compõe o cimento BIOCOP tri é composto de COP que apresenta a composição conforme a Tabela 1. A proporção do cimento BIOCOP tri varia de 0,5g a 1,5g de pó (MTA) e 5 a 50 μl de

líquido (COP), sendo preferencialmente utilizada a proporção de 1 g de pó (MTA) para 20µl do líquido (COP).

[0044] O COP é o extrato copaíba que pode ser o extrato de óleo-resina de copaíba, o óleo de copaíba ou a resina de copaíba, sendo preferencialmente o extrato de óleo-resina de copaíba.

Usos dos Biomateriais de Reparação Tecidual contendo Extrato Natural de COP

[0045] O biomaterial de reparação tecidual contendo extrato natural de COP pode ser utilizado em: proteção pulpar direta; proteção pulpar indireta; material restaurador; adesivo dentinário; pulpotomia (remoção da porção coronária afetada da polpa para preservar a vitalidade e a função da polpa radicular remanescente); medicação intracanal; obturação do canal radicular; apicigênese (indução do término da formação radicular em dentes permanentes vitais com polpa coronária inflamada); apicificação (indução da formação de barreira apical de tecido duro em dentes permanentes jovens, com raízes incompletamente formadas e polpa necrótica); tratamento de perfuração radicular (canal e furca) iatrogênica ou por lesão de cárie; tratamento via canal de perfuração radicular por reabsorção interna; tratamento cirúrgico de perfuração radicular por reabsorção interna; cirurgia parendodôntica com retrobturação; enxerto ósseo-preenchimento de defeitos ósseos; entre outros.

Exemplo de Concretização da Invenção

[0046] A invenção já foi inicialmente testada in vitro para o estudo da resposta de células-tronco da polpa dentária de humanos e os resultados mostraram evidentes vantagens da invenção na reparação/regeneração tecidual com a proliferação, diferenciação e migração de células-tronco da polpa dental humana. Na proliferação celular observa-se

crescimento celular significativo em todos os materiais testados, exceto o material Ca(OH)_2 . Quando o Ca(OH)_2 é associado ao COP ($\text{Ca(OH)}_2+\text{COP}$), a capacidade proliferativa das células aumenta significativamente em todos os tempos experimentais, conforme pode ser visto na figura 2. Ou seja, os materiais propostos $\text{Ca(OH)}_2+\text{COP}$ e $\text{MTA}+\text{COP}$ não são irritantes as células permitindo a proliferação celular e, ao associar o COP ao Ca(OH)_2 , é revertido o efeito irritante do Ca(OH)_2 isolado.

[0047] A figura 2 é uma representação gráfica das curvas de crescimento celular dos grupos experimentais mostrando que houve crescimento significativo em todos os grupos experimentais, exceto no grupo HCa. No gráfico, observe que onde a letra "a" significa número de células viáveis significativamente maior em 72 horas que em todos os demais grupos experimentais, e a letra "b" significa número de células viáveis significativamente menor em 72 horas que em todos os demais grupos. Este experimento mostrou que a associação de COP com Ca(OH)_2 anulou o efeito citotóxico do Ca(OH)_2 quando aplicado isoladamente.

[0048] Na diferenciação celular observa-se a capacidade dos materiais propostos $\text{Ca(OH)}_2+\text{COP}$ (BIOCOP one) e $\text{MTA}+\text{COP}$ (BIOCOP tri) em formar nódulos de tecido mineralizado. Para o material $\text{Ca(OH)}_2+\text{COP}$ houve formação de nódulos mineralizados significativamente maior que o material Ca(OH)_2 , conforme pode ser visto na figura 3.

[0049] A figura 3 é uma representação gráfica da média das absorbâncias dos grupos experimentais em 21 dias. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas. Barra significa desvio padrão da média.

[0050] Na expressão de genes responsáveis pela formação de tecido dentinário (BGLAP, DSPP e HSP-27) nota-se

maiores expressões para os materiais $\text{Ca}(\text{OH})_2+\text{COP}$ e $\text{MTA}+\text{COP}$ para o gene *BGLAP*, conforme pode ser visto na figura 4. A superexpressão para o gene *DSPP* pode ser vista na figura 5 e a superexpressão para o gene *HSP-27* pode ser vista na figura 6. Assim, os materiais propostos apresentam grande potencial dentinogênico e conseqüentemente o tecido formado é potencialmente de melhor qualidade comparado com os materiais comercializados $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e *MTA*.

[0051] A figura 4 é uma representação gráfica dos valores da média de expressão gênica normalizada do *BGLAP* (osteocalcina) pelo *GAPDH* (gene constitutivo) em todos os grupos experimentais. Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com a análise de variância ($p < 0,05$). A barra significa desvio padrão da média.

[0052] A figura 5 é uma representação gráfica dos valores da média de expressão gênica normalizada do *DSPP* (sialofosfoproteína dentinária) pelo *GAPDH* (gene constitutivo) em todos os grupos experimentais; onde * significa que não houve expressão gênica. Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com a análise de variância ($p < 0,05$). A barra significa desvio padrão da média.

[0053] A figura 6 se refere à representação dos valores da média de expressão gênica normalizada do *HSP-27* (*heat shock protein 27*) pelo *GAPDH* (gene constitutivo) em todos os grupos experimentais. Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com a análise de variância ($p < 0,05$). A barra significa desvio padrão da média.

[0054] Na migração celular, os materiais propostos $\text{Ca}(\text{OH})_2+\text{COP}$ e $\text{MTA}+\text{COP}$ apresentam índices de migração

significativamente maiores que os materiais Ca(OH)_2 , com o qual não houve migração celular e o MTA, que normalizou o índice de migração celular apenas em 48 horas, conforme pode ser visto nas figuras 7A, 7B, 7C.

[0055] A figura 7A é uma representação gráfica dos índices de migração (número de células /área da ferida) em 12h de todos os grupos experimentais; onde * significa que não houve migração; e onde ** significa: "significativamente menor que os demais grupos onde houve migração ($p < 0,01$)". A migração celular foi analisada após contato dos meios condicionados. A barra significa desvio padrão da média.

[0056] A figura 7B é uma representação gráfica dos índices de migração (número de células /área da ferida) em 24h de todos os grupos experimentais; onde * significa que não houve migração; e onde ** significa: "significativamente menor que os demais grupos onde houve migração ($p < 0,01$)". A migração celular foi analisada após contato dos meios condicionados. A barra significa desvio padrão da média.

[0057] A figura 7C é uma representação gráfica dos índices de migração (número de células /área da ferida) em 48h de todos os grupos experimentais; onde * significa que não houve migração; e onde ** significa: "significativamente menor que os demais grupos onde houve migração ($p < 0,01$)". A migração celular foi analisada após contato dos meios condicionados. A barra significa desvio padrão da média.

[0058] Diante dos resultados acima mencionados, questões importantes são consideradas. Os materiais Ca(OH)_2 e MTA apresentam o mesmo mecanismo de ação, ou seja, dissociam-se em íons cálcio e hidroxila. Os íons cálcio reagem com o CO_2 dos tecidos e formam granulações de calcita que em grande quantidade podem ser irritantes aos tecidos. Pela característica do Ca(OH)_2 de ser altamente solúvel em água,

formam grande quantidade de granulações de calcita, o que confere ao material a natureza irritante, enquanto que o MTA por não ser altamente insolúvel em água forma menor quantidade de granulações de calcita, o que não lhe confere natureza irritante, porém atrasa o processo de reparação tecidual. Além disso, ambos os materiais, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e MTA, têm dificuldade de manipulação, principalmente o MTA.

[0059] A presente invenção não deixa formar granulações de calcita, provavelmente pela mudança da dissociação por meio viscoso, o óleo de copaíba, o que garante biocompatibilidade do material e formação mais rápida de tecido. A melhor manipulação do material, provavelmente seja em razão da presença da resina que melhora o escoamento do material e por ser uma resina natural não foi irritante às células e ainda assim, potencializou os efeitos biológicos de todos os materiais presentes na composição da invenção. A qualidade do tecido formado, também é superior comparado aos materiais $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e MTA com a superexpressão de genes formadores de tecido dentinário para os novos materiais BIOCOP one e BIOCOP tri, fato provavelmente relacionado ao sinergismo alcançado pela associação dos minerais e COP, obtendo-se materiais mais bioativos.

[0060] Assim, os novos materiais descritos na presente invenção mostram-se promissores com a grande capacidade de induzir proliferação, diferenciação e migração de células-tronco de polpa dentária humana. O diferencial da invenção está em serem materiais mais bioativos com melhor qualidade e menor tempo de reparação/regeneração tecidual. Adicionalmente, a presença do COP na composição destes novos materiais permite melhor manipulação do material e potencializa as propriedades biológicas dos materiais comercializados $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e MTA. Dessa forma, a proposta dos

novos materiais é utilizá-los não apenas como protetores do complexo dentina-polpa, mas sim, como materiais restauradores com propriedades de estimular formação de tecido natural do dente e devolver a funcionalidade à cavidade bucal, atuando como um material restaurador de reparação tecidual de ação anti-inflamatória e antimicrobiana.

[0061] Embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas visando aprimoramento do projeto sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1- Biomaterial de reparação tecidual **caracterizado** pelo fato de compreender: 0,5 g a 1,5 g de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) e de 20 a 100 μl de extrato de copaíba (COP).

2- Biomaterial, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de compreender: 1g de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) e 70 μl de extrato de copaíba (COP).

3- Biomaterial, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato do extrato de copaíba (COP) ser o extrato de óleo-resina de copaíba, o óleo de copaíba ou a resina de copaíba.

4- Biomaterial, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato do extrato de copaíba (COP) ser extrato de óleo-resina de copaíba.

5- Biomaterial de reparação tecidual de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** pelo fato de compreender: 0,5g a 1,5g de agregado de trióxido mineral (MTA) e 5 a 50 μl de extrato de copaíba (COP).

6- Biomaterial, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de compreender: 1g de agregado de trióxido mineral (MTA) e 20 μl de COP.

7- Biomaterial, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, **caracterizado** pelo fato do extrato de copaíba (COP) ser o extrato de óleo-resina de copaíba, o óleo de copaíba ou a resina de copaíba.

8- Biomaterial, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato do extrato de copaíba (COP) ser o extrato de óleo-resina de copaíba.

9- Usos dos biomateriais de reparação tecidual,

definidos nas reivindicações 1 e 5, **caracterizado** pelo fato de ser em: proteção pulpar direta; proteção pulpar indireta; material restaurador; adesivo dentinário; pulpotomia (remoção da porção coronária afetada da polpa para preservar a vitalidade e a função da polpa radicular remanescente); medicação intracanal; obturação do canal radicular; apicigênese (indução do término da formação radicular em dentes permanentes vitais com polpa coronária inflamada); apicificação (indução da formação de barreira apical de tecido duro em dentes permanentes jovens, com raízes incompletamente formadas e polpa necrótica); tratamento de perfuração radicular (canal e furca) iatrogênica ou por lesão de cárie; tratamento via canal de perfuração radicular por reabsorção interna; tratamento cirúrgico de perfuração radicular por reabsorção interna; cirurgia parendodôntica com retrobturação; e enxerto ósseo- preenchimento de defeitos ósseos.

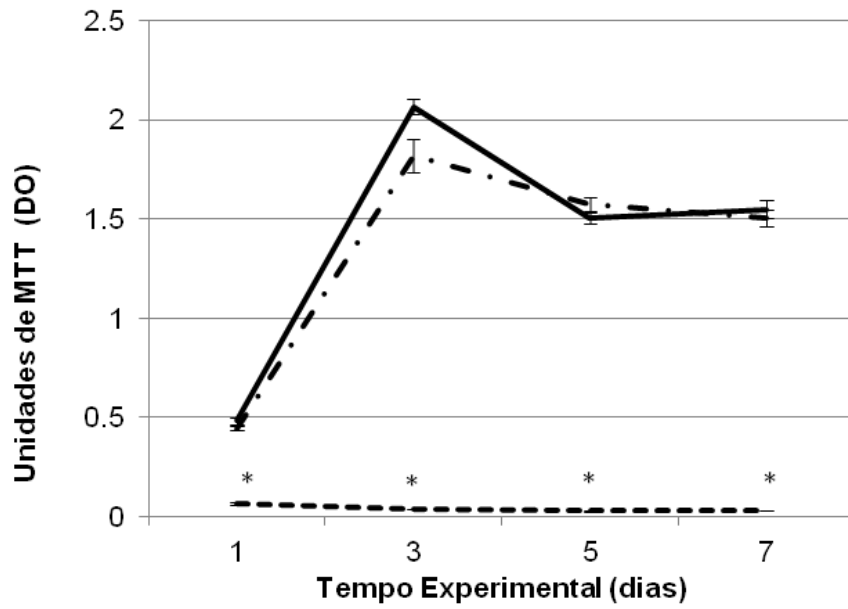


Figura 1

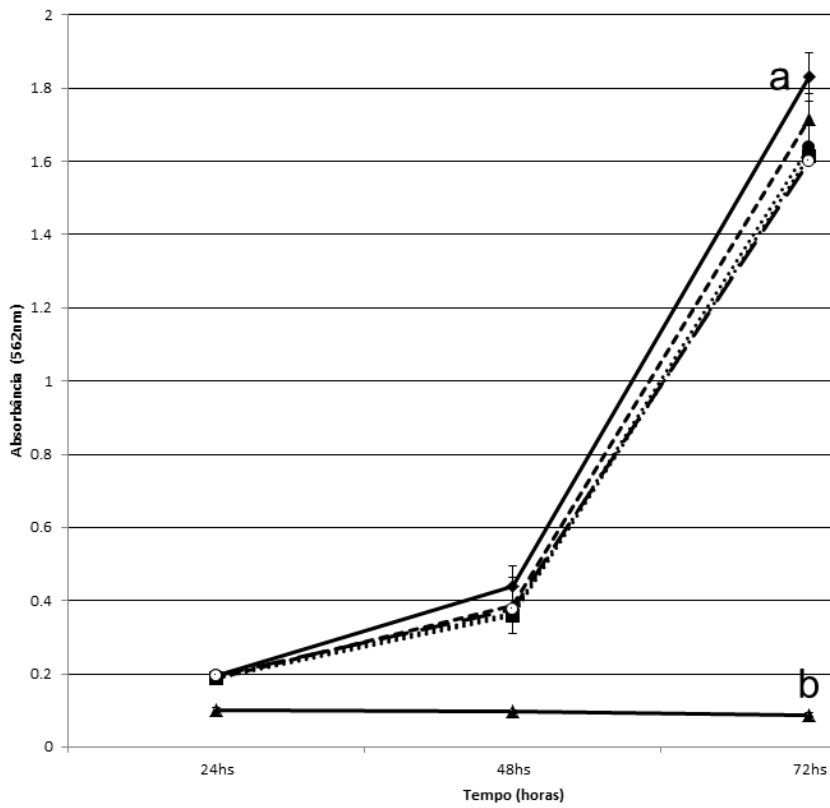


Figura 2

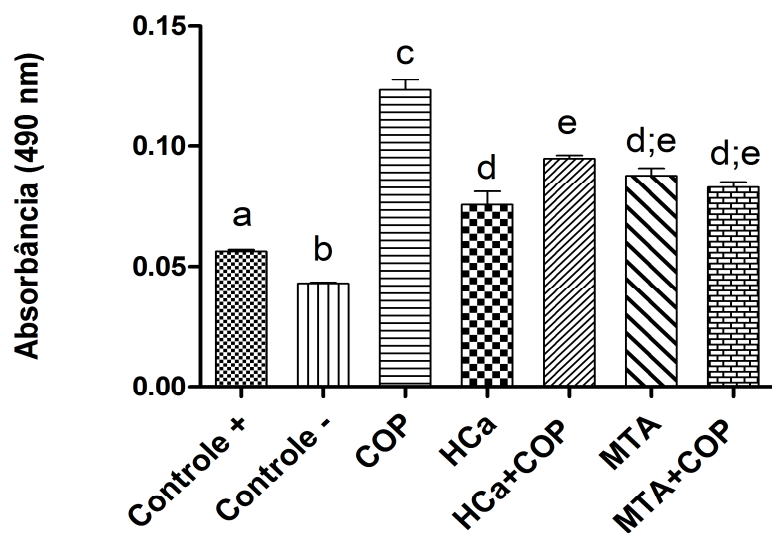


Figura 3

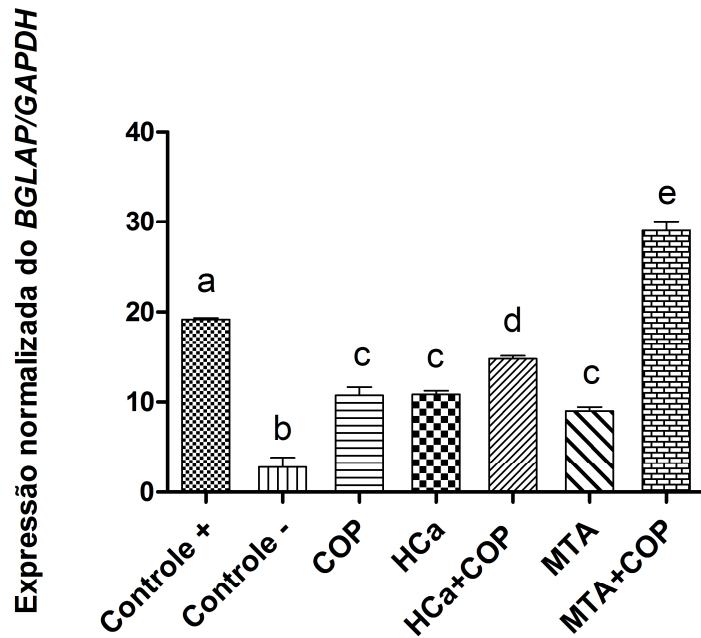


Figura 4

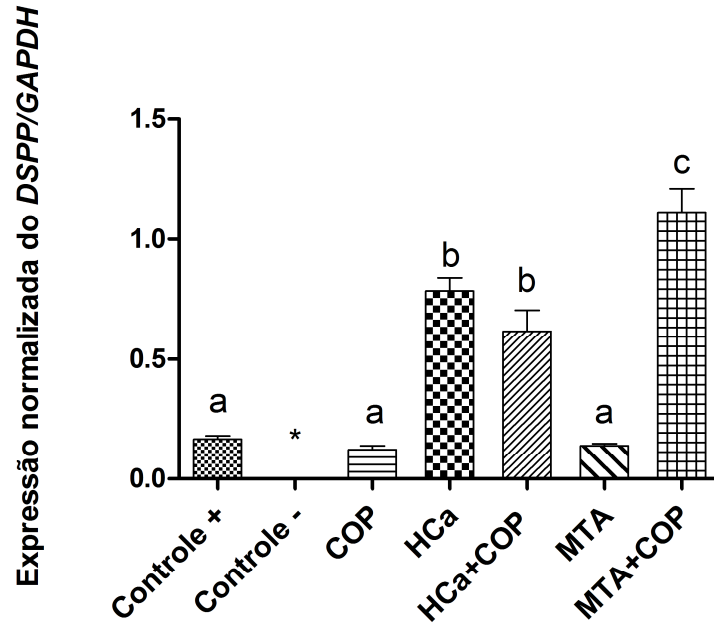


Figura 5

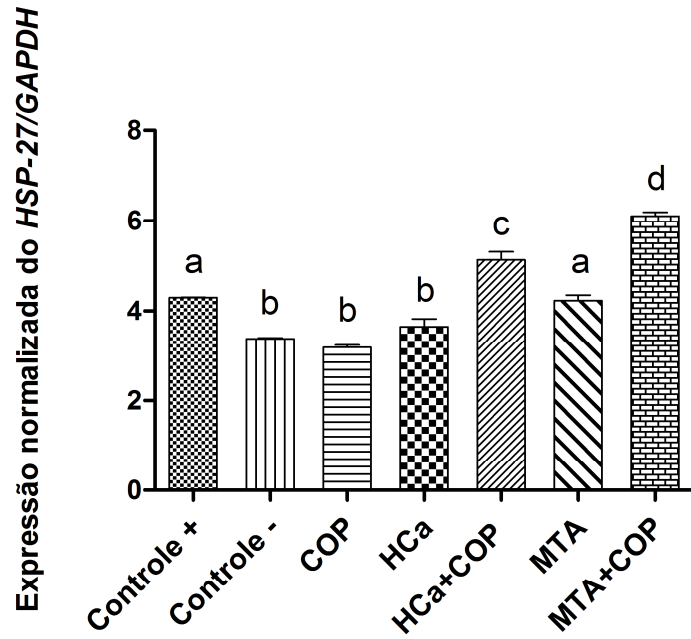


Figura 6

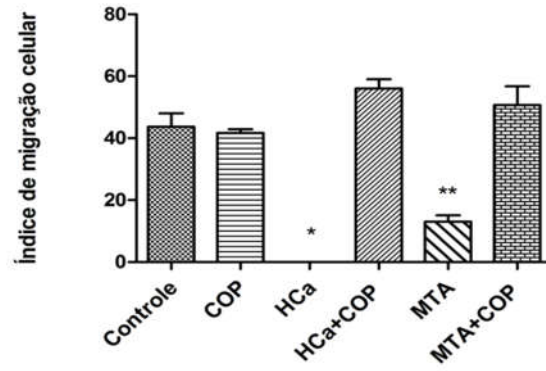


Figura 7A

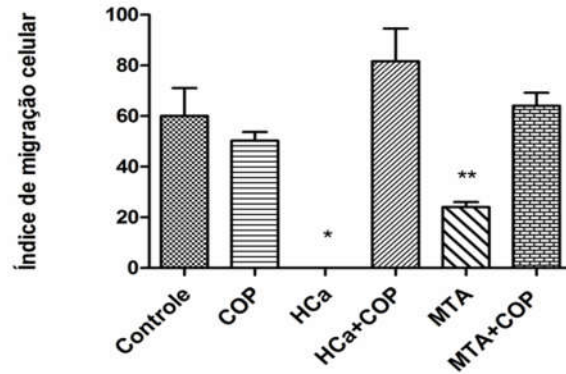


Figura 7B

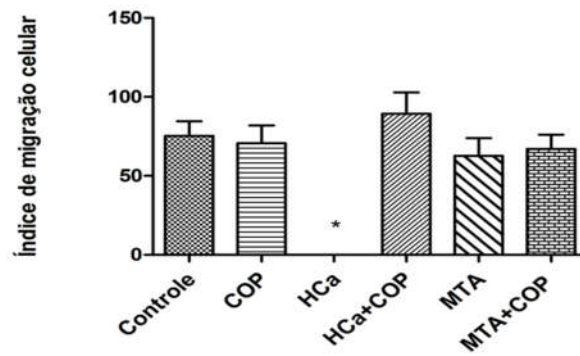


Figura 7C