



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

MARCELO VICTOR SIDOU LEMOS

**EFEITO DE DIFERENTES AGENTES NATURAIS BIOMODIFICADORES NA
ADESÃO À DENTINA HÍGIDA E AFETADA POR CÁRIE**

FORTALEZA
2016

MARCELO VICTOR SIDOU LEMOS

**EFEITO DE DIFERENTES AGENTES NATURAIS BIOMODIFICADORES NA
ADESÃO À DENTINA HÍGIDA E AFETADA POR CÁRIE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago

Coorientador: Prof. Dr. Victor Pinheiro Feitosa

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

L578e

Lemos, Marcelo Victor Sidou.

Efeito de diferentes agentes naturais biomodificadores na adesão à dentina hígida e afetada por cárie/ Marcelo Victor Sidou Lemos. – Fortaleza, 2016.
49 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2016.
Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientação: Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago.

Coorientação: Prof. Dr. Victor Pinheiro Feitosa.

1. Dentina. 2. Colágeno. 3. Cárie Dentária. 4. Proantocianidinas. I. Título.

CDD 617.67

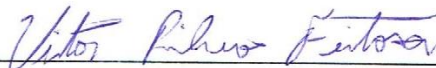
MARCELO VICTOR SIDOU LEMOS

EFEITO DE DIFERENTES AGENTES NATURAIS BIOMODIFICADORES NA
ADESÃO À DENTINA HÍGIDA E AFETADA POR CÁRIE

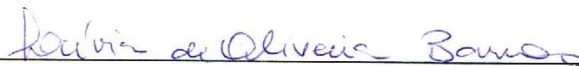
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Aprovada em 19/02/16

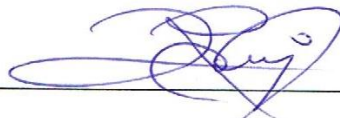
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Victor Pinheiro Feitosa - Coorientador
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof^a. Dr^a. Livia de Oliveira Barros
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Jovanne Rabelo Neri
Universidade de Fortaleza (Unifor)

Aos meus pais, Marcelo e Cláudia, pelo incentivo, constante apoio, aprendizado de vida e esforço realizado para a minha educação. Exemplos de garra, humildade e perseverança, ensinando-me a lutar pelos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, a quem confio e nunca me decepcionou, sempre me proporcionando momentos de felicidades e conquistas.

Aos meus avós maternos, **Sidou** e **Juraci**, por toda a confiança depositada e apoio dado nos momentos mais difíceis. Sem vocês esse momento jamais seria possível.

Aos meus avós paternos, **Airton** (*in memoriam*) e **Rita** (*in memoriam*), que tenho certeza estão torcendo por mim de um lugar bem mais especial e que sempre confiaram no meu potencial, sempre afirmando que seria um CAMPEÃO, mesmo nos momentos mais árduos.

A minha família, em especial ao meu irmão, **Vinícius**, e meus tios, **Cléber**, **Carlos** e **Clayton**, que sempre me desejaram o melhor estão pessoas em quem posso confiar para compartilha minhas angustias e que sempre procuram me mostrar os melhores caminhos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago**, uma pessoa que admiro imensamente, tanto pela inteligência inigualável, como pela capacidade de buscar sempre extrair todo o potencial das pessoas que com ele trabalham.

Ao meu Coorientador, **Prof. Dr. Victor Pinheiro Feitosa**, que além de brilhante e dedicado pesquisador se mostrou como um amigo de imenso valor. Um exemplo de dedicação e competência. Agradeço pelo acolhimento, pela amizade e por todos os ensinamentos me permitiram crescer imensamente. Sem seus conselhos e orientação esse momento não seria possível. MUITÍSSIMO OBRIGADO!

À banca, **Profa Dra Livia Barros** e **Prof Dr Jiovanne Neri**, pelas contribuições que certamente contribuirão para o engrandecimento do trabalho realizado.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia** da Universidade Federal do Ceará, em especial aos funcionários e docentes.

Ao Team Feitosa, que trabalhou arduamente em conjunto para que tudo corresse da melhor forma possível durante esse ano. Obrigado aos meus amigos **Diego Martins**, **Maria Elisa**, **Nara Sena**, **Vitaliano Neto** e **Caio Nobre**.

A todos os pós-graduandos do laboratório de pesquisa do PPGO que tive a oportunidade de trabalhar desde os anos de Iniciação Científica, em especial, aos meus grandes amigos **Jorgiana de Assis**, **Denise Moraes**, **Nadine Guimarães**,

Vanara Passos, Jacqueline Santiago, Camila Ferraz, Cecília Atem, Mário Áureo e tantos outros que contribuíram para que esse e tantos outros projetos se tornassem possíveis. Além, é claro, do meu grande amigo **David Queiroz**, que esteve sempre disposto á contribuir com seus conhecimentos e conselhos quando precisei.

Aos meus grandes amigos de Mestrado, **Felipe Ramirez, Flávia Jucá, Samara Marinho, Joel Barreto** e **Felipe Marçal** agradeço pelo companheirismo e pelos momentos de descontração que marcaram esse ano de Mestrado.

RESUMO

A Odontologia restauradora minimamente invasiva tem priorizado cavidades mais conservadoras. Por isso o uso de estratégias como a biomodificação da dentina com o intuito de melhorar as propriedades mecânicas da camada híbrida e de proteger as fibras colágenas da degradação, tem ganhado cada vez mais destaque. O presente estudo tem o objetivo de avaliar a influência de diferentes agentes naturais de biomodificação sobre a resistência de união (RU) resina-dentina, nanoinfiltração e microporabilidade em dentina hígida e afetada por cárie. Os fatores sob investigação são (1) pré-tratamento dentinário: álcool absoluto (controle negativo), proantocianidinas a 2%; cardanol-metacrilato a 2%, cardol a 2%, cardol-metacrilato a 2% e epigallocatequina-3-galato (EGCG) a 0,1%; (2) tipo de substrato dentinário: dentina hígida e dentina afetada por cárie artificialmente. Microtração (n=6), microporabilidade dentinária (n=3) e nanoinfiltração interfacial (n=6), foram avaliados em uma máquina de ensaios universais, microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. Os valores de RU em dentina hígida foram superiores nos grupos tratados com cardol-metacrilato e EGCG. Já em dentina afetada por cárie, o grupo pré-tratado com cardol-metacrilato apresentou resultados superiores aos demais grupos. Todos os grupos de dentina hígida apresentaram redução de nanoinfiltração em relação ao controle, exceto o grupo pré-tratado com cardanol-metacrilato. Para selamento, em dentina hígida, os grupos cardol-metacrilato e cardanol-metacrilato apresentaram os melhores resultados. O cardol-metacrilato mostrou-se como um agente promissor para biomodificação dentinária tanto em dentina hígida como em dentina afetada por cárie.

Palavras-chave: dentina; colágeno; cárie dentária; proantocianidinas.

ABSTRACT

Minimally invasive dentistry has been prioritizing more conservative cavity preparations. For this reason, the employment of strategies as dentin biomodification, to ameliorate the mechanical properties of resin-dentin interface and to protect collagen fibrils from biodegradation, is highlighted as a promising technique. The present study aimed to evaluate the influence of different natural biomodification agents on resin-dentin bond strength, nanoleakage and micropermeability at sound and caries-affected dentin. The variable investigated were (1) dentin pre-treatment: absolute ethanol (control), proanthocyanidins (PACs) 2%, cardol (from cashew nut shell liquid) 2%, cardol-methacrylate 2%, cardanol-methacrylate 2% and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 0.1%; and (2) dentin substrate: sound dentin and artificial caries-affected dentin. Microtensile bond strength (n=6), dentin micropermeability (n=3) and interfacial nanoleakage (n=6) were assessed on a universal testing machine, confocal-laser scanning microscope and scanning electron microscope respectively. The bond strength on sound dentin was higher by using cardol-methacrylate and EGCG. On caries-affected dentin, pre-treatment using cardol-methacrylate achieved the highest bond strength. All biomodification agents reduced the nanoleakage in comparison with control, except cardanol-methacrylate. On sound dentin, the micropermeability was decreased when using cardanol- and cardol-methacrylate. Cardol-methacrylate has shown to be a promising biomodification agent thereby improving dentin bonding at both sound and caries-affected dentin.

Keywords: dentin; collagen; dental caries; proanthocyanidins.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	PROPOSIÇÃO	14
2.1	<i>Objetivo Geral</i>	14
2.2	<i>Objetivos Específicos</i>	14
3	CAPÍTULO	16
4	CONCLUSÃO	39
5	REFERÊNCIAS	41
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ...	48

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

A adesão entre materiais restauradores estéticos e o dente ocorre predominantemente através de sistemas adesivos, que atuam em dentina por meio de retenção micromecânica, ao promover a penetração de monômeros no emaranhado de fibrilas colágenas expostas na dentina parcialmente ou completamente desmineralizada (NIU et al., 2014). Essa interação entre adesivo e substrato dentinário faz surgir na interface adesiva uma região com características mistas chamada de zona de interdifusão (VAN MEERBEEK et al., 1993) ou camada híbrida (NAKABAYASHI et al., 1991).

Porém essa camada híbrida formada após condicionamento ácido, no caso de adesivos convencionais, parece ser o elo fraco da adesão em dentina. Sendo esta susceptível a degradação através de diversas formas, dentre elas a hidrólise dos monômeros ocasionada pelo excesso de água na interface adesiva e a ação de enzimas colagenolíticas, como metaloproteinases da matriz (MMPs) e cisteíno catepsinas (CTPs) (BRESCHI et al., 2008; PASHLEY et al., 2004; HEBLING et al., 2005; TOLEDANO et al., 2013; MAZZONI et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2011; TJÄDERHANE et al., 2013; BEDRAN-RUSSO et al., 2014; VIDAL et al., 2014).

A adesão à dentina é mais crítica em regiões afetadas por cárie. Estudos morfológicos preconizam que uma camada híbrida perfeita raramente é formada em dentina afetada por cárie (HAJ-ALI et al, 2006). Devido à hipomineralização, esse substrato torna-se muito poroso, permitindo uma desmineralização mais profunda após o condicionamento ácido. Conseqüentemente uma zona mais profunda de colágeno parcialmente exposto, torna-se mais difícil para os monômeros resinosos infiltrarem completamente na trama de colágeno. Dessa forma, ocorre a presença de maior número de fibrilas de colágeno desprotegidas e expostas à degradação (NAKAJIMA et al, 2000; HAJ-ALI et al, 2006; WANG et al, 2007; LENZI et al, 2014).

A Odontologia restauradora minimamente invasiva tem alterado o conceito de remoção do tecido cariado, sendo priorizadas cavidades mais conservadoras, nas quais durante a intervenção clínica, a zonas de dentina afetada por cárie pode ser preservada por serem passíveis de remineralização e apresentarem colágeno ainda organizado (MOUNT; NGO, 2000; ÇEHRELI et al, 2003; NAIK et al, 2014). Por isso o uso de estratégias como a biomodificação da dentina e aplicação de inibidores de

MMPs e CTPs, com o intuito de melhorar as propriedades mecânicas da camada híbrida e de proteger as fibrilas colágenas da degradação, tem ganhado cada vez mais destaque e são recursos importantes na tentativa de estender a longevidade da adesão entre dentina e resina (TAY; PASHLEY, 2009; TJÄDERHANE et al., 2013; BEDRAN-RUSSO et al., 2014).

Dentre os agentes sintéticos podemos destacar o glutaraldeído e a carbodiimida, as quais são substâncias químicas que aumentam as propriedades mecânicas da matriz colágena da dentina e com capacidade de redução da degradação devido à formação de ligações covalentes e ligações cruzadas (cross-link) entre fibrilas de colágeno. Entretanto, a citotoxicidade do primeiro e a limitada ação *cross-link* da segunda apresentam-se como fatores limitantes a suas aplicações clínicas (BEDRAN-RUSSO et al., 2010).

Dentro desse contexto, existe uma busca crescente por agentes naturais de ligação cruzada (biomoficiadores) de colágeno, sendo as proantocianidinas (extraída da semente de uva) destacadas por apresentarem influência positiva sobre dentina em diversas características como resistência à tração (BEDRAN-RUSSO et al., 2011), dureza (DOS SANTOS et al., 2011), módulo de elasticidade (CASTELLAN et al., 2010; AGUIAR et al., 2014), resistência adesiva (MACEDO et al., 2009; AL-AMMAR et al., 2009; BROYLES et al., 2013), resistência à biodegradação (LIU, et al., 2013) e redução da desmineralização (PAVAN et al., 2011). Entretanto, há ainda poucos estudos que revelem bons resultados utilizando-se períodos curtos e clinicamente viáveis de aplicação de soluções contendo essas substâncias (LIU, et al., 2013).

As catequinas compõem outro grupo de substâncias presentes em extratos vegetais ricos em polifenóis com comprovado efeito biomodificador positivo sobre a dentina (VIDAL et al., 2014). Nesse sentido, a Epigallocatequina-3-galato (EGCG), principal polifenol do chá verde (*Camelia sinensis*), tem sido estudado devido ao seu potencial inibidor de MMP-2, -9 e CTPs (GARBISA et al, 2001;DELL´AICA et al, 2000). Além de induzir ligações cruzadas de colágeno e impedir o livre acesso das collagenases às cadeias dos sítios ativos do colágeno (JACKSON et al, 2010). Mostrando-se efetivo em preservar a resistência de união dentina-resina por até 6 meses (SANTIAGO et al, 2013).

Na busca por novos agentes biomodificadores naturais tem sido propostas diferentes moléculas extraídas de vários componentes naturais, dentre os quais estão os componentes do líquido da casca da castanha do caju (LCC) que podem apresentar efeitos benéficos sobre a dentina desmineralizada. Dentre essas moléculas podemos destacar o cardol e o cardanol, potenciais agentes para esse tipo de união química com o colágeno dentinário por suas longas cadeias carbônicas (15 carbonos) e terminação em polifenol, similar ao EGCG e às proantocianidinas. Baseado na forte interação e formação de ligações cruzadas entre o cardol/cardanol e as fibrilas de colágeno da dentina recentemente descoberta em estudos pilotos do nosso grupo, sintetizamos duas novas moléculas funcionais a partir do cardol e do cardanol com funcionalização dos mesmos com um radical metacrilato (OGLIARI et al., 2008), criando assim o cardol-metacrilato e o cardanol-metacrilato. Tais moléculas funcionais podem ser capazes de promover *cross-link* de fibrilas de colágeno dentinário, aumentando a resistência à biodegradação e melhorando a adesão à dentina afetada por cárie.

Entretanto, não há estudos disponíveis que analisem o efeito do uso do cardol, cardol-metacrilato e cardanol-metacrilato sobre propriedades mecânicas da dentina e integridade da interface adesiva.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos:

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de diferentes agentes naturais de biomodificação do colágeno na resistência de união, selamento dentinário e integridade da interface adesiva com dentina hígida e afetada por cárie.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a influência de pré-tratamento com diferentes substâncias naturais com potencial *cross-link* de colágeno sobre a resistência de união em dentina hígida e em dentina afetada por cárie artificialmente.

- Avaliar o selamento dentinário promovido pelo sistema adesivo testado após aplicação do pré-tratamento utilizando diferentes substâncias com potencial biomodificador de colágeno por meio de microscopia confocal a laser.

- Avaliar a influência dos diferentes pré-tratamentos sobre nanoinfiltração com nitrato de prata amoniacal na interface de união formada pelo adesivo resinoso e a dentina hígida e afetada por cárie em microscopia eletrônica de varredura.

Capítulo

3 CAPÍTULO

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado, e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato. Por se tratar de estudos envolvendo seres humanos, ou parte deles, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado. Assim sendo, esta dissertação é composta de um artigo científico que será submetido ao periódico *The Journal of Adhesive Dentistry*, conforme descrito abaixo:

INFLUENCE OF PLANT-DERIVED BIOMODIFICATION AGENTS ON BONDING TO SOUND AND CARIES-AFFECTED DENTIN

LEMOS MVS, DE-PAULA DM, MOURA MEM, LOMONACO D, MAZZETTO SE,
FEITOSA VP, SANTIAGO SL

INFLUENCE OF PLANT-DERIVED BIOMODIFICATION AGENTS ON BONDING TO SOUND AND CARIES-AFFECTED DENTIN

ABSTRACT

Purpose: The present study aimed to evaluate the influence of different natural biomodification agents on resin-dentin bond strength, nanoleakage and micropermeability at sound and caries-affected dentin. The variables investigated were (1) dentin pre-treatment: absolute ethanol (control), proanthocyanidins (PACs) 2%, cardol (from cashew nut shell liquid) 2%, cardol-methacrylate 2%, cardanol-methacrylate 2% and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 0.1%; and (2) dentin substrate: sound dentin and artificial caries-affected dentin. **Materials and Methods:** Microtensile bond strength (n=6), dentin micropermeability (n=3) and interfacial nanoleakage (n=6) were assessed on a universal testing machine, confocal-laser scanning microscope and scanning electron microscope respectively. **Results:** The bond strength on sound dentin was higher by using cardol-methacrylate and EGCG. On caries-affected dentin, pre-treatment using cardol-methacrylate achieved the highest bond strength. All biomodification agents reduced the nanoleakage in comparison with control, except cardanol-methacrylate. On sound dentin, the micropermeability was decreased when using cardanol- and cardol-methacrylate. **Conclusion:** Cardol-methacrylate has shown to be a promising biomodification agent thereby improving dentin bonding at both sound and caries-affected dentin.

KEYWORDS: dentin; collagen; dental caries; proanthocyanidins.

1. INTRODUCTION

The resin-dentin interface, in particular the hybrid layer formed after phosphoric acid etching and use of etch-and-rinse adhesives, seems to be the vulnerable zone of resin composite restoratives²¹. Dentin bonds are prone to degradation principally by polymer hydrolysis and collagen breakdown accelerated by enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs) and cysteine cathepsins (CTPs)^{5,14,18,24}.

Particularly, the adhesion to caries-affected dentin is more critical, once it is more challenging to create a uniform and homogeneous hybrid layer in this substrate¹⁰. With the spread of minimally invasive dentistry, direct restorations are often bonded on caries-affected dentin which is preserved due to its likelihood to remineralization^{7,15,16}. Nevertheless, caries-affected dentin is porous with areas of partially demineralized collagen that allows deeper demineralization of the phosphoric acid etching. Indeed, with a thicker layer of etched dentin, the infiltration of monomers is compromised and more resin-sparse collagen fibers are exposed to degradation^{10,11,17,26}.

Recent strategies to improve dentin bonding and its durability are the use of MMPs and CTPs inhibitors²⁴, and dentin biomodification by using collagen cross-linkers³ aiming to increase the mechanical properties of hybrid layer and unprotected collagen fibrils, thereby preventing interface degradation and providing long-lasting dentin bonds^{4,22,24}. Furthermore, an increasing search for natural collagen cross-linkers (biomodification agents) has occurred in the last years, with proanthocyanidins (PACs, from grape seed extract *Vitis vinifera*) highlighted for

several improvements on dentin ultimate tensile strength³, hardness⁸, elastic modulus⁶ and resistance against biodegradation¹². Catechins from green tea (*Camelia sinensis*) are other compounds rich in polyphenols able to induce remarkable biomodification of dentin collagen²⁵.

Major substances from cashew nut shell liquid (CNSL) are also potential dentin biomodification agents extracted from plants (*Anacardium Occidentale* L.) due to the long carbon chain (15 carbons) and the terminal polyphenols, similar to PACs. However, there are no reports in the literature regarding the effects of CNSL compounds on dentin bonding.

Therefore, the aim of this investigation was to evaluate the influence of pre-treatment using proanthocyanidins, epigallocatechin-3-gallate (major catechin in green tea), cardol (from CNSL), cardol-methacrylate monomer and cardanol-methacrylate (monomer created from the major phenol in CNSL) on dentin bonding, dentin micropermeability and resin-dentin interface nanoleakage. The two study hypotheses were that (1) there are no differences among natural biomodification agents tested in terms of bonding effectiveness (bond strength and nanoleakage) to sound and caries affected dentin, and (2) the sealing ability promoted by the adjunctive use of different biomodification agents is similar and better than the control application of only adhesive.

2. Materials and methods

2.1. - Experimental Design

The factors investigated were (1) dentin pre-treatment (six levels): absolute ethanol (negative control), 2wt% proanthocyanidins (PACs) from grape seed extract (95% PACs, *Vitis vinifera*, Mega-Natural Gold, Polyphenolics, Madera, USA), 2wt% cardol (separated and purified from CNSL), 2wt% cardol-methacrylate (synthesized from cardol), 2wt% cardanol-methacrylate (synthesized from purified cardanol), 0.1wt% epigallocatechin-3-gallate (EGCG, Sigma Aldrich, St. Louis, USA), and (2) type of dentin (two levels): sound dentin and artificially created caries-affected dentin. All reagents were diluted in absolute ethanol (Sigma Aldrich). The experiments undertaken were microtensile bond strength (μ TBS) test, dentin micropermeability and interfacial nanoleakage, the latter two qualitatively evaluated by confocal-laser microscopy and scanning electron microscopy respectively. Six bonded teeth were used in each group ($n = 6$) for μ TBS and nanoleakage assessment whereas further three teeth per group ($n=3$) were prepared for micropermeability evaluation.

2.2. Synthesis and purification of new monomers

Cardol and cardanol were obtained from industrial CNSL supplied by Amendoas do Brasil LTDA (Fortaleza, Brazil) separated by column chromatography (silica gel 60) and characterized by gas chromatography/mass spectroscopy¹³. The synthesis and purification of cardol-methacrylate and cardanol-methacrylate was undertaken according to the protocol of Ogliari et al. 2008 by means of esterification of the phenolic compounds with methacrylic acid in order to attach the polymerizable methacrylate functionality.

2.2. Preparation of artificial caries-affected dentin

Seventy two dentin specimens (n = 6) were prepared from extracted human third molars obtained under approval of institutional Ethics Committee and stored in 0.1% timol solution at 4 °C.

Each tooth was sectioned to expose a flat middle dentine surface using a slow-speed water-cooled diamond saw (Isomet 4000; Buehler, Lake Bluff, USA), thereby removing occlusal enamel crown and the roots. Exposed dentin surfaces were grounded using SiC 320-grit abrasive papers under constant water irrigation during 30s to create a standardized smear-layer.

Half of the specimens were subjected to pH cycling in order to create artificial caries-affected dentin. The occlusal dentin surface was polished with 1200-grit silicon carbide papers to create a smooth surface. All further surfaces were protected with acid-resistance nail varnish. A layer of partially demineralized dentin with approximately 200µm thickness was created on the uncoated surface by pH cycling using the demineralizing solution with 1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM KH₂PO₄, 50 mM acetic acid and 5 mM NaN₃ adjusted to pH 4.8. The remineralizing solution was consisted of 1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM NaH₂PO₄, 0.13 M KCl and 5 mM NaN₃ buffered to pH 7.0 with HEPES buffer. Each specimen was immersed in 10 ml demineralizing solution for 8 h followed by immersion in 10 ml of remineralizing solution for 16 h, with fresh solutions used for each cycle. This procedure was performed during 14 days at ambient temperature²⁰.

2.3. Microtensile bond strength testing

All specimens (with sound dentin and caries-affected dentin) were etched using a 37% phosphoric acid gel (Condac 37%, FGM, Joinville, Brazil) for 15 s

followed by copious water rinse for 30s. The etched-dentin surfaces were gently air-dried for 2s to remove the excess of water. Each pretreatment (negative control, PACs, EGCG, cardol, cardol-methacrylate or cardanol-methacrylate) was actively applied for 60s and following washed for 30s with distilled water. Treated dentin was again gently air-dried for 2s to remove the excess of water leaving a moist reflective surface. All specimens were bonded using the two-step etch-and-rinse adhesive Optibond Solo Plus (Kerr, Orange, USA). The bonding agent was actively applied for 30 s, gently air-dried and light-cured for 20s using the LED light-curing unit DB-685 (1100 mW/cm²; Dabi Atlante, Ribeirao Preto, Brazil). The composite TPH Spectrum (Dentsply Caulk, Milford, USA) was used for build-ups.

All bonded teeth ($n = 6$) were immersed in distilled water for 24h at 37 °C and subsequently sectioned into $0.80 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ sticks using the Isomet saw. The sticks were fixed to jigs using cyanoacrylate glue and tested to failure under tension in a universal testing machine (EMIC DL 2000, Sao Jose dos Pinhais, Brazil) with a crosshead speed of 0.5 mm/min. Bond strengths of sticks from the same tooth were averaged and the mean was used as statistical unit. Sticks that failed prematurely were included as 0 MPa. The data were statistically analyzed using two-way ANOVA (pre-treatment and type of dentin) and Tukey's test ($p < 0.05$). The fractured sticks were imaged to determine the failure mode by stereomicroscopy at 60× magnification. The fractures were classified as 'adhesive', 'cohesive' or 'mixed'.

2.4. Nanoleakage evaluation

Six resin-dentin bonded sticks from each group were analyzed for nanoleakage, as previously described by Tay et al. 2002, using 50 wt% ammoniacal silver nitrate solution [$\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{NO}_3$]. Specimens were immersed in the tracer solution

for 24h and then immersed in photo-developing solution for 8h under fluorescent light to reduce silver ions into metallic silver grains. Afterwards, the specimens were rinsed with distilled water, embedded in epoxy resin stubs and polished using successive 600-, 1200- and 2000-grit wet SiC papers, and 1 μm diamond paste (Buehler); they were cleaned for 5 min by means of ultrasonic bath after each abrasive/polishing step. The specimens were dehydrated in silica gel for 24h, coated with carbon and examined using field-emission SEM (Quanta FEG 450, FEI, Amsterdam, Netherlands) in backscattered electron mode with 1000X and 2000X standardized magnifications.

2.5. Micropermeability evaluation

Three teeth per group ($n = 3$) were bonded as previously described with the adhesive doped with 0.1wt% rhodamine-B (Sigma Aldrich) and assessed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) according to a published protocol⁹. In brief, the micropermeability of resin–dentin interfaces was evaluated using a 0.3 wt% aqueous fluorescein (Sigma Aldrich) solution. This dye was perfused for 3h under 15 cm H₂O simulated pulpal pressure⁹ to test the sealing ability of the adhesive after different pre-treatments. The specimens were subsequently cut into 1-mm thick slabs, slightly polished with 2000-grit polishing paper and sonicated for 2 min.

The specimens evaluated using CLSM (LSM 710, Carl Zeiss, Munchen, Germany) equipped with a 63x/1.4 NA oil immersion lens using 488-nm and 568-nm laser illumination. CLSM fluorescence images were obtained with a 1 μm z-step to section optically the specimens up to 20 μm below the surface. The z-stack scans were compiled into single projections. Each resin–dentin interface was entirely

characterized and images were randomly captured along bonded interfaces representing the micropermeability characteristic from each group.

3. RESULTS

The overall microtensile bond strength observed in sound dentin was superior to that in caries-affected dentin ($p < 0.001$). Concerning sound dentin specifically, the pre-treatments using cardol-methacrylate and EGCG achieved higher bond strength than PACs and the control group ($p < 0.05$), whilst pre-treatments with cardol and cardanol-methacrylate obtained intermediary bond strength without significant differences among further groups (Fig. 2). In the case of caries-affected dentin, the pre-treatment using cardol-methacrylate promoted statistically higher bond strength than all other groups ($p < 0.05$), followed by PACs and cardol which also induced higher bond strengths than the control ($p = 0.008$ and $p = 0.016$ respectively). The failure pattern analysis showed predominantly adhesive fractures for all groups, except with pre-treatments using cardol-methacrylate and cardanol-methacrylate which achieved more mixed cohesive fractures in composite (Fig. 3).

Regarding the nanoleakage assessment, intense silver accumulation below the hybrid layer was observed in caries-affected dentin specimens. This zone was found approximately $15\mu\text{m}$ distant from the hybrid layer in the control group (Fig. 4-A2) whereas for EGCG and PACs the distance was increased to $50\mu\text{m}$ (Fig. 4-F2) and $80\mu\text{m}$ (Fig. 4-E2) respectively. All biomodification pre-treatments on sound dentin presented reduction of silver impregnation in comparison with control group (Fig. 4-A1), except cardanol-methacrylate application (Fig. 4-B1) which depicted more nanoleakage, even reaching the adhesive layer (Fig. 4-B3). For caries-affected

dentin, the presence of cracks (Fig. 4-A3 and 4-F3) and gaps (Fig. 4-B2 and 4-E3) was often noted in control, cardanol-methacrylate, PACs and EGCG treatments. Cardol-methacrylate treatment achieved less nanoleakage and better interface integrity than further groups in caries-affected dentin.

On the micropermeability analysis, all treatments showed deficient sealing ability when applied on caries-affected dentin, with presence of gaps at the interface of control group (Fig. 5-A2). More fluorescein uptake was observed in the hybrid layers created using EGCG (yellow pigmentation in Fig. 5-F2), cardanol-methacrylate (Fig. 5-B2) and PACs (Fig. 5-E2). In sound dentin, the control group depicted intense fluorescein uptake in the hybrid layer thereby indicating high micropermeability, whilst the pre-treatments using EGCG (Fig. 5-F1) and cardol-methacrylate (Fig. 5-D1) attained the improved dentin sealing ability.

4. DISCUSSION

Dentin pre-treatment using cardol-methacrylate has demonstrated the best overall outcomes of microtensile bond strength and silver nanoleakage in both substrates evaluated, thus, the first hypotheses needs to be rejected. Lower uptake of fluorescein near the hybrid layer was observed by using cardanol-methacrylate and cardol-methacrylate pre-treatments, thereby indicating improved sealing ability. The second hypotheses should, then, be rejected.

The molecule epigallocatechin-3-gallate (EGCG) has presented high collagen cross-linking ability due to the presence of galloyl moieties²⁵. In fact, the high bond strength of the two-step etch-and-rinse adhesive Optibond Solo Plus after pre-treatment using EGCG might be explained by the optimal and rapid cross-linking of

collagen relying on the galloyl radicals. These polyphenolic functionalities are often present in the proanthocyanidins whereas a similar structure is found in the molecule of cardol. Indeed, one may ascertain the high presence of polyphenols in EGCG (Fig. 1) might represent improved collagen cross-linking capabilities due to the formation of hydrogen bonds, which would be faster with EGCG than with more hydrophobic proanthocyanidins and cardol. Contrariwise, cardol has a long 15-carbon chain connected to the aromatic ring (Fig. 1) which may promote the formation of hydrophobic interactions⁴ thereby improving the cross-linking of collagen fibrils attained only via hydrogen bonds.

The aim at synthesizing a dental resin monomer from cardol molecule was to produce a collagen binding monomer with cross-linking potential, observations previously found in pilot studies. Cardol-methacrylate was created from cardol encountered in the cashew nut shell liquid (CNSL), a natural (renewable) source supplied by the cashew nut industry. Furthermore, CNSL has been widely investigated in Chemistry Institutes to create several industrial products¹³. Cardol-methacrylate may chemically bond the demineralized dentin collagen with the adhesive resin by the collagen cross-linking reactions (hydrogen bond and hydrophobic interactions) prior to the co-polymerization of methacrylate functionality with further methacrylate monomers from the bonding agent. Indeed, such reaction may increase the dentin bond strength as observed in the present outcomes (Fig. 2), especially on caries-affected dentin.

Cardanol-methacrylate monomer embraces a chemical structure very similar to that of cardol-methacrylate, but without the presence a free hydroxyl pending from the aromatic ring (Fig. 1). Such hydroxyl functionality would allow the formation of hydrogen bond during collagen cross-linking. Therefore, the lack of this hydroxyl

affords solely hydrophobic interactions between cardanol-methacrylate and collagen fibrils. The inclusion of cardanol-methacrylate in the present study aimed to investigate the role of the pending hydroxyl radical in cardol-methacrylate and the consequent formation of hydrogen bonds. The absence of hydrophilic moieties in cardanol-methacrylate seems to compromise the penetration of such monomer in the water-rich demineralized collagen mesh and likely the binding to collagen fibrils. This is a suitable explanation for the lower bond strength to caries-affected dentin in comparison with cardol-methacrylate. Moreover, a noteworthy difference was observed in the nanoleakage (Fig. 4) of cardol-methacrylate which provided lower silver impregnation than cardanol-methacrylate within resin-dentin interface.

In caries-affected dentin, big silver deposits were found some micrometers beneath the hybrid layers. This occurs due to the fact that caries-affected dentin presents zones of organized but partially demineralized collagen²⁶. This finding was remarkable in the micrographs of control, PACs and EGCG (Figs. 4A2, 4E2 and 4F2 respectively). However, in the control specimens the distance between hybrid layer and the silver deposits of caries-affected dentin was approximately 15µm, and farther using EGCG and PACs (50µm and 80µm respectively). This layer between hybrid layer and porous caries-affected dentin was not observed in the interfaces of cardol, cardol-methacrylate and cardanol-methacrylate, suggesting the formation of collagen cross-linking by means of hydrophobic interactions (via the long carbon chains) which might have protected the partially demineralized collagen after infiltration of these biomodification agents.

Dentin micropermeability was notably reduced by using dentin biomodification agents able to afford collagen cross-link, once intense presence of fluorescein near hybrid layer in the control specimens on both substrates tested. Nevertheless, the

micropermeability in sound dentin was lower (Fig. 5) after pre-treatments with all biomodification agents evaluated. During the analysis of resin-dentin micropermeability, the fluorescent dye is infiltrated through dentinal tubules under simulated pulpal pressure which may not be properly correlated with resin-dentin bond strength⁹.

The use of CNSL compounds to synthesize new dental monomers exhibits two important advantages. (1) Easy obtainment, since several thousands of tons of CNSL is produced yearly by cashew nut companies, which results in low production costs. (2) Environmental issues, once CNSL cannot be discarded in the nature because it is not biodegradable, which lead to the pursuit for different applications of CNSL and its compounds. It is worth the large concentration of cardol and cardanol containing in CNSL acquired after processing the cashew nut in high temperatures. The resulting CNSL contains 60-65% cardanol and 15-20% cardol. Cardanol and its derivatives have been widely studied and employed to further chemistry purposes such as polymer industry, mineral oil and ferrofluids^{2,13}. Conversely, cardol has been underused and little investigated.

Indeed, the optimal outcomes of bond strength attained by using cardol-methacrylate on both sound and caries-affected dentin highlight a promising agent for dentin biomodification. However, more studies are needed to evaluate the further properties of this molecule, such as the effects on polymerization and metalloproteinases/cathepsins inhibition.

CONCLUSION

(1) On sound dentin, cardol-methacrylate and EGCG provide the overall better dentin bonding as well as dentin sealing ability.

(2) On caries-affected dentin, the pre-treatment with cardol-methacrylate ethanol solution attains high bond strength and low nanoleakage.

REFERENCES

- [1] Aguiar TR, Vidal CMP, Phansalkar RS, Todorova I, Napolitano JG, McAlpine JB, Chen SN, Pauli GF, Bedran-Russo AK. Dentin Biomodification Potential Depends on Polyphenol Source. *J Dent Res* 2014;93:417-22.
- [2] Barreto ACH, Maia FJN, Santiago VR, Ribeiro VGP, Denardin JC, Mele G, Carbone L, Lomonaco D, Mazzetto SE, Fachine PBA. Novel ferrofluids coated with a renewable material obtained from cashew nut shell liquid. *Microfluid Nanofluid* 2012;12:677–686.
- [3] Bedran-Russo AK, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. *Acta Biomater* 2011;7:1735–1741.
- [4] Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, Aguiar TR, Vidal CMP, Napolitano JG, Nam JW, Leme AA. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater* 2014;30:62-76.
- [5]. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Ienarda R, De stefano DE. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008;24:90-101.
- [6] Castellan CS, Pereira PNR, Grande RHM, Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent Mater* 2010;26:968-973.
- [7] Cehreli ZC, Yazici AR, Akca T, Ozgünaltay G. A morphological and microtensile bond strength evaluation of a single bottle adhesive to caries affected human dentin after four different caries removal technique. *J Dent*. 2003;31:429–35

- [8] Dos Santos PH, Karol S, Bedran-Russo AK. Long-term nano-mechanical properties of biomodified dentin-resin interface components. *J Biomech* 2011;44:1691-1694.
- [9] Feitosa VP, Sauro S, Ogliari FA, Ogliari AO, Yoshihara K, Zanchi CH, Correr-Sobrinho L, Sinhorette MA, Correr AB, Watson TF, Van Meerbeek B. Impact of hydrophilicity and length of spacer chains on the bonding of functional monomers. *Dent Mater*. 2014; 30:317-23.
- [10] Haj-Ali R, Walker M, Williams K, Wang Y, Spencer P. Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. *J Prosthodont*. 2006,15: 82–88.
- [11] Lenzi TL, Tedesco TK, Soares FZM, Loguercio AD, Rocha RO. Chlorhexidine application for bond strength preservation in artificially-created caries-affected primary dentin. *Int J Adhes Adhes*, 2014, 51–56.
- [12] Liu Y, Chen M, Yao X, Xu C, Zhang Y, Wang Y. Enhancement in dentin collagen's biological stability after proanthocyanidins treatment in clinically relevant time periods. *Dent Mater* 2013; 29:485-492.
- [13] Maia FJN, Ribeiro VG, Clemente CS, Lomonaco D, Vasconcelos PHM, Mazzetto SE. Thermo-oxidative evaluation of new cardol derivatives as antioxidants for mineral oils. *J Therm Anal Calorim*. 2012;109:1013–8.
- [14] Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015; 94:241-51.
- [15] Mount GJ, Ngo H. Minimal intervention: a new concept for operative dentistry. *Quintessence Int*. 2000; 3:527-33.
- [16] Naik, SV, Shashikiran, ND, Chaitra, NL, & Syed, G. A microtensile bond strength evaluation of a single-bottle adhesive to caries-affected dentin in conventional versus minimal invasive caries removal techniques: An in-vitro study. *Indian J Dent*, 2014, 5: 127–131.

- [17] Nakajima M., Sano H., Urabe I., Tagami J. and Pashley DH.: Bond strengths of single-bottle dentin adhesives to caries-affected dentin. *Oper. Dent.*, 25: 2-10, 2000.
- [18] Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res.* 2011. 90:506-511.
- [19] Ogliairi FA, da Silva Ede O, Lima Gda S, Madruga FC, Henn S, Bueno M, Ceschi MA, Petzhold CL, Piva E. Synthesis of phosphate monomers and bonding to dentin: esterification methods and use of phosphorus pentoxide. *J Dent.* 2008; 36:171-177.
- [20] Qi YP, Li N, Niu LN, Primus CM, Ling JQ, Pashley DH, Tay FR. Remineralization of artificial dentinal caries lesions by biomimetically modified mineral trioxide aggregate. *Acta Biomater.* 2012; 8:836-42.
- [21] Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, Wang Y, Bohaty BS, Singh V, Sene F, Eslick J, Camarda K, Katz JL. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng.* 2010; 38:1989-2003.
- [22] Tay FR, Pashley DH. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. *J Dent Res* 2009;88:719-724.
- [23] Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res.* 2002;81:472-6.
- [24] Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Optimizing dentin bond durability: Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater* 2013;29:116-135.
- [25] Vidal CMP, Aguiar TR, Phansalkar R, McAlpine JB, Napolitano JG, Chen SN, Araújo LSN, Pauli GF, Bedran-Russo AK. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta Biomater* 2014;10:3288–3294.

[26] Wang Y., Spencer P. and Walker MP.: Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J. Biomed. Mater. Res. A.*,2007, 81: 279-286.

[27] Zavgorodniy AV, Rohanizadeh R, Bulcock S, Swain MV. Ultrastructural observations and growth of occluding crystals in carious dentine. *Acta Biomater* 2008;4:1427-39.

Table 1. Resin composite and adhesive compositions and application protocols.

	Composition	Application procedure
TPH Spectrum (Dentsply Caulk, Milford, USA)	Bis-GMA; Bis-EMA; TEGDMA; Photo initiators; Stabilizers; Bariumaluminiumborosilicate glass (mean particle size < 1.5 µm); Highly dispersed silicon dioxide (particle size 0.04 µm)	Incremental placement (in 3 mm levels or less) and curing of composite restorations is recommended to minimise polymerisation shrinkage. Curing each increment separately
Optibond Solo Plus (Kerr, Orange, USA).	BIS-GMA, HEMA, GDMA-P, ethanol, silica, barium glass, camphoroquinone. Approximately 15% silico dioxide fillers (particle size 0.04 µm)	The bonding agent must be actively applied for 30 s, gently air-dried and light-cured for 20s using the LED light-curing unit

*HEMA – hydroxy ethyl methacrylate; Bis-GMA - bisphenol-A glycidyl methacrylate; Bis-EMA – ethoxylated bisphenol-A glycidyl methacrylate; TEGDMA – triethylene glycol-imethacrylate; GDMA-P – glycerol dimethacrylate phosphate.

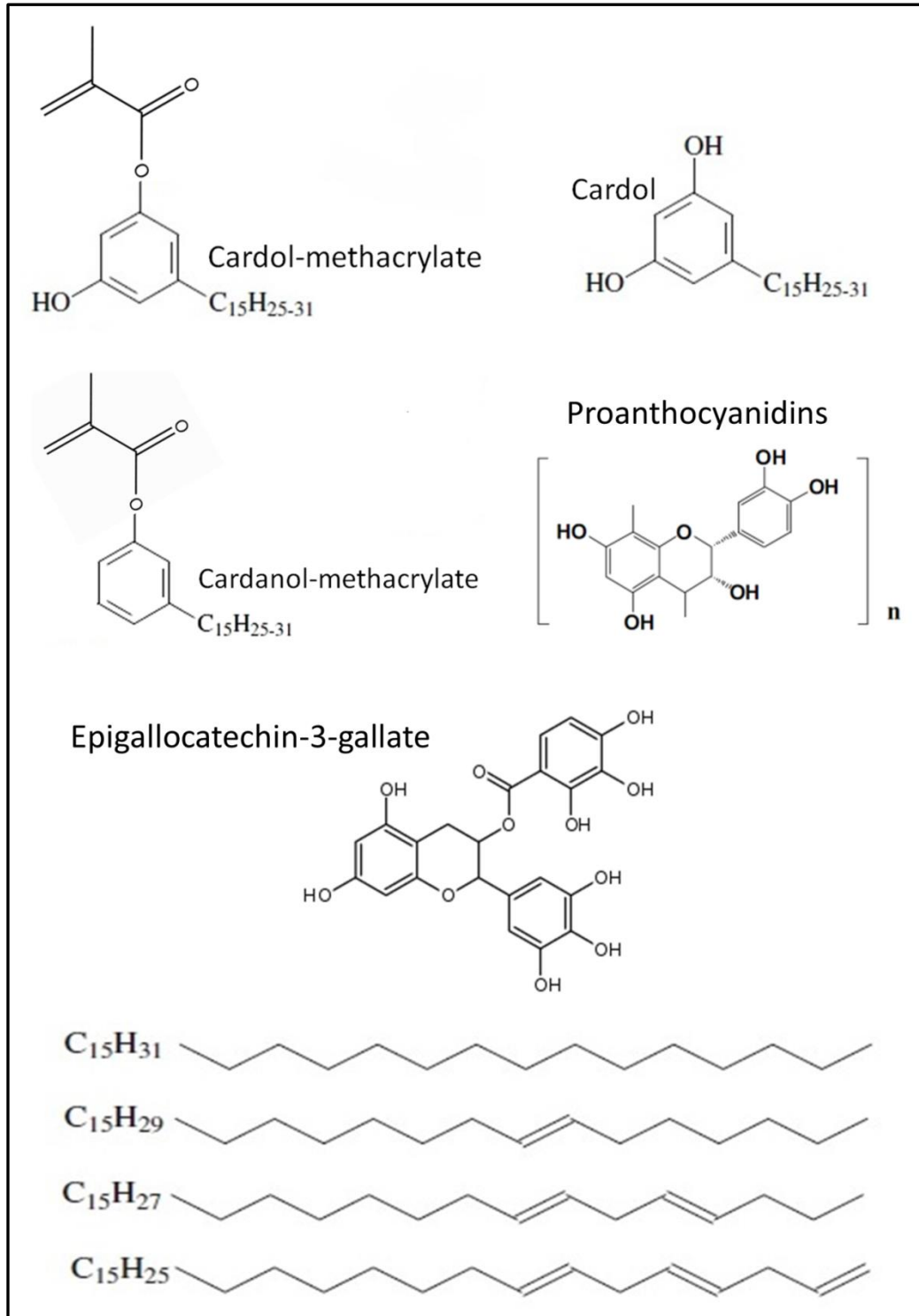


Figure 1 - Chemical structures of the biomodification agents tested.

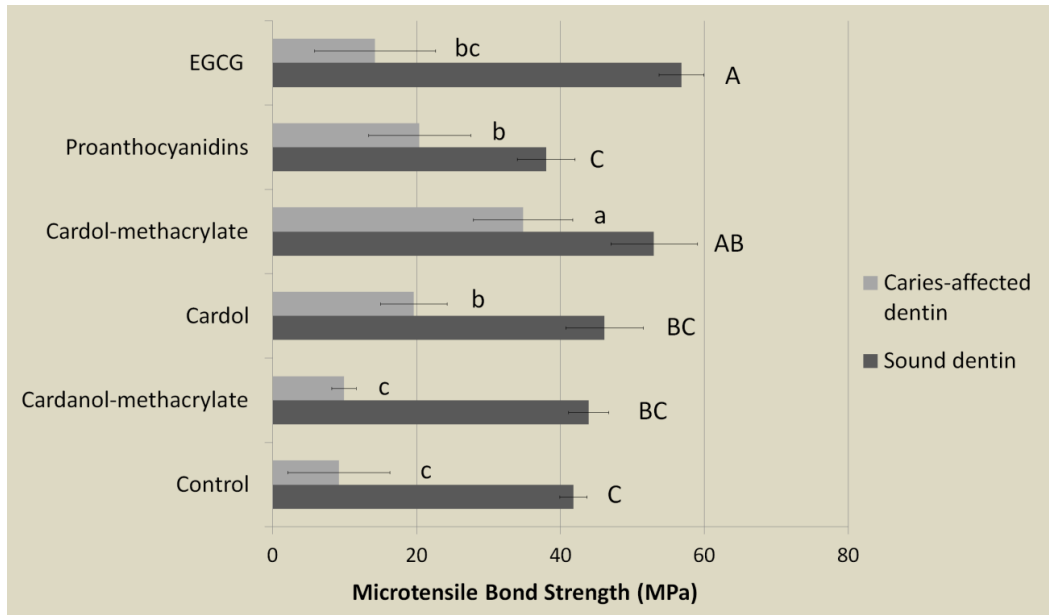


Figure 2. Graph depicting the microtensile bond strength results. Different capital letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) on sound dentin. Different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among groups on caries-affected dentin. The bond strength on sound dentin was significantly higher than on caries-affected dentin for all treatments ($p < 0.001$).

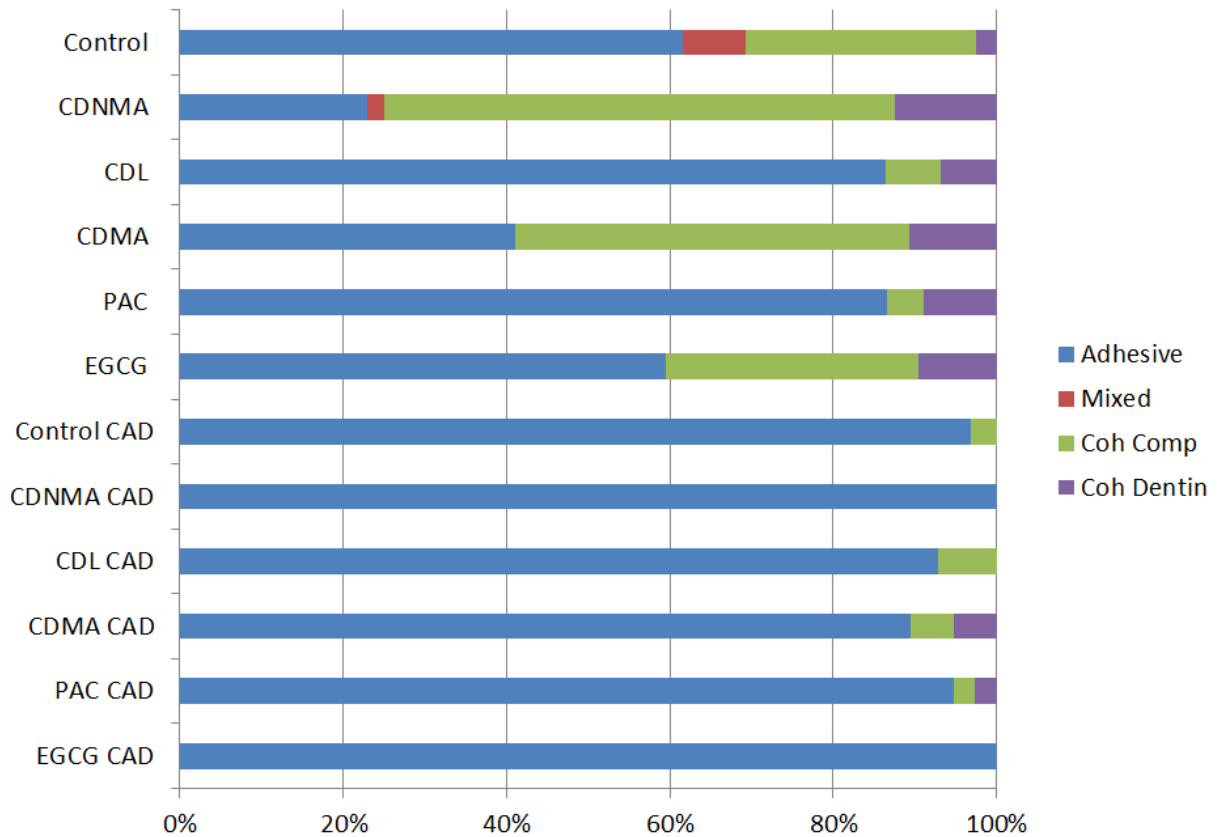


Figure 3. Graph showing the fracture patterns. "CDNMA" means cardanol-methacrylate. "CDL" means cardol. "CDMA" means cardol-methacrylate. "CAD" means caries-affected dentin.

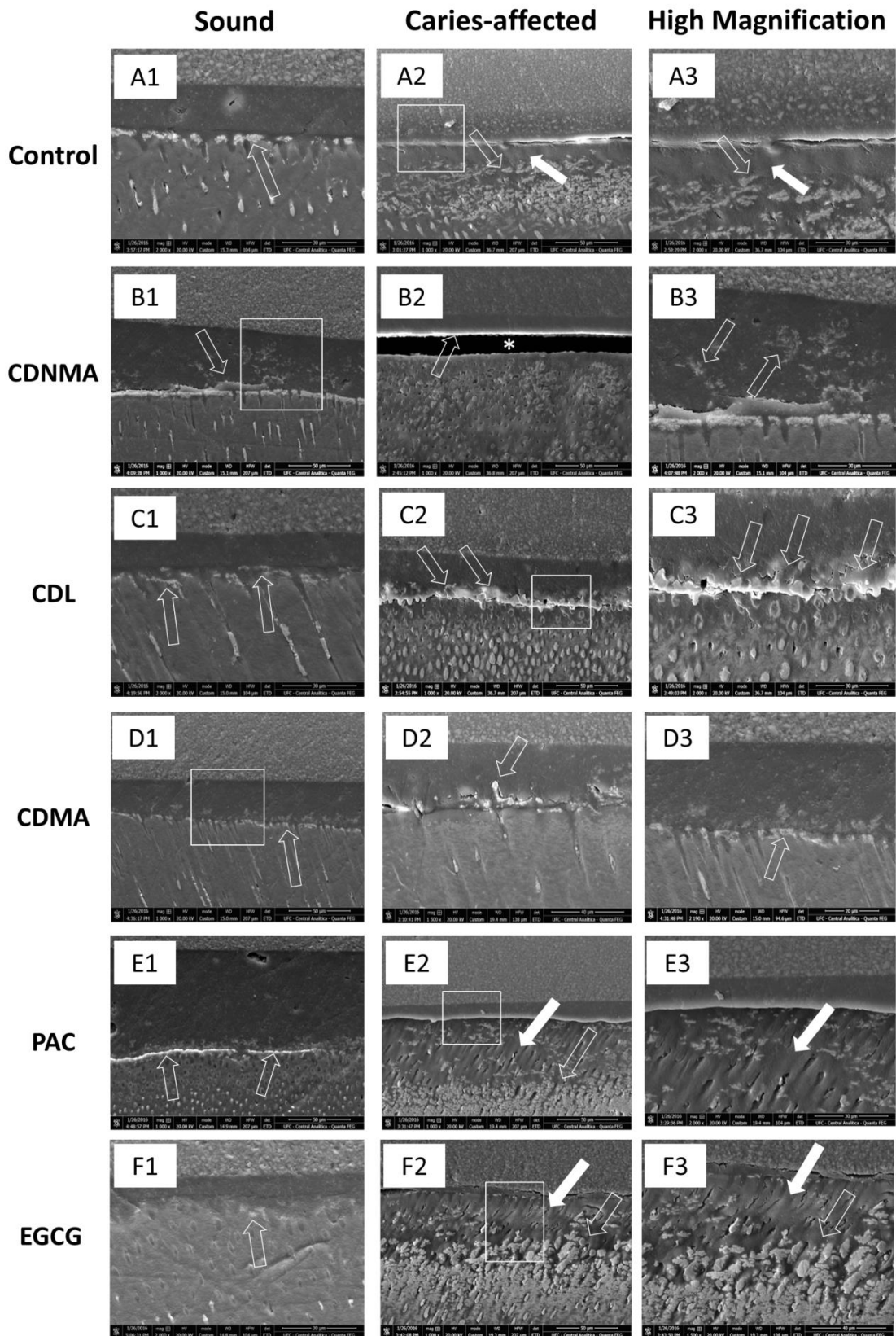


Figure 4. SEM micrographs of resin-dentin interfaces illustrating the most common nanoleakage characteristics observed after silver uptake. Open arrows indicate silver deposits. White arrows indicate the zone between hybrid layer and silver deposits at caries-affected dentin. The asterisk in B2 indicates a gap.

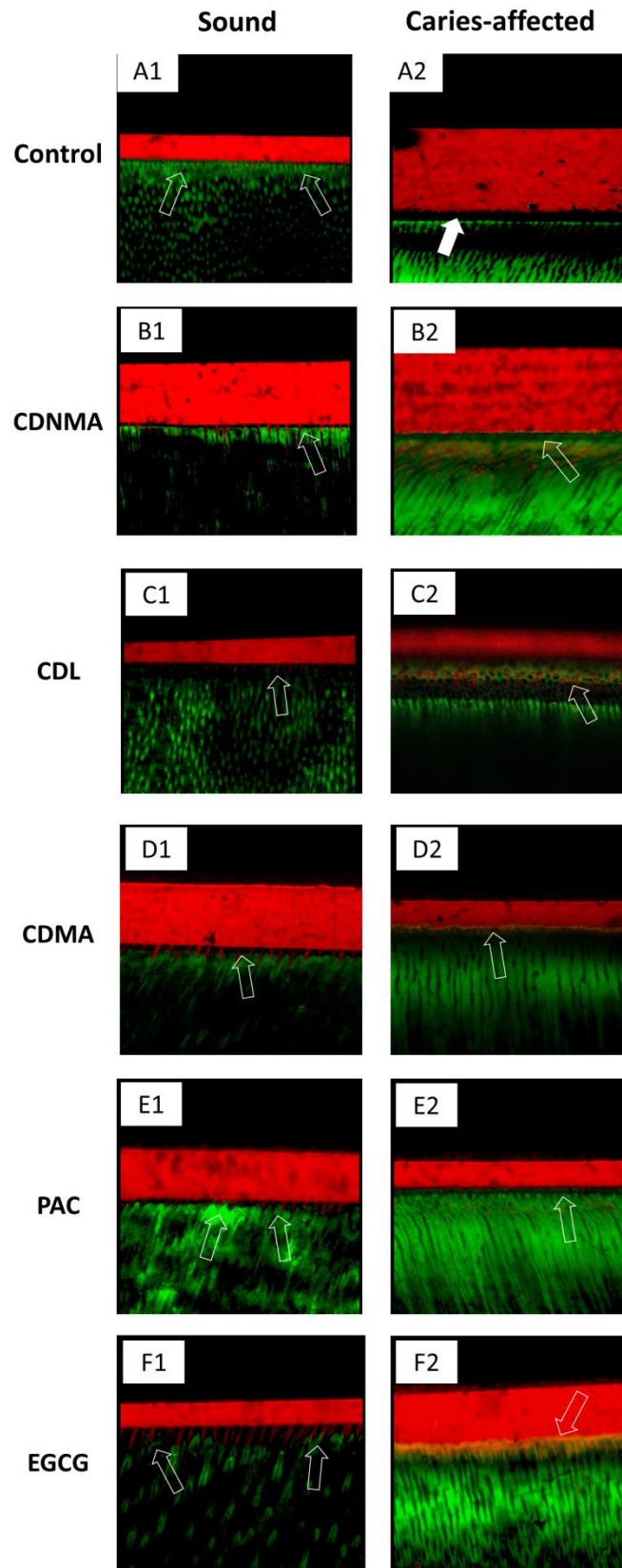


Figure 5. Confocal micrographs showing the main features of fluorescein micropermeability. Open arrows indicate fluorescein infiltration at and near hybrid layer. White arrow in A2 indicates a gap.

Conclusão

4 CONCLUSÃO

Em dentina hígida, o cardol-metacrilato e o EGCG apresentaram melhores resultados de adesão e melhor selamento dentinário.

Em dentina afeta por cárie o pré-tratamento por 60s de cardol-metacrilato demonstrou os melhores resultados de adesão com menor nanoinfiltração.

Referências

REFERÊNCIAS

AGUIAR TR, VIDAL CMP, PHANSALKAR RS, TODOROVA I, NAPOLITANO JG, MCALPINE JB, CHEN SN, PAULI GF, BEDRAN-RUSSO AK. Dentin Biomodification Potential Depends on Polyphenol Source. **J Dent Res**, Chicago, v. 93, n. 4, p. 417-422, abr. 2014.

AL-AMMAR A, DRUMMOND JL, BEDRAN-RUSSO AK. The Use of Collagen Cross-Linking Agents to Enhance Dentin Bond Strength. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, Hoboken, v. 91, n. 1, p. 419–424, out. 2009.

BARRETO ACH, MAIA FJN, SANTIAGO VR, RIBEIRO VGP, DENARDIN JC, MELE G, CARBONE L, LOMONACO D, MAZZETTO SE, FECHINE PBA. Novel ferrofluids coated with a renewable material obtained from cashew nut shell liquid. **Microfluid Nanofluid**, Heidelberg, v.12, p. 677–686, nov. 2012.

BEDRAN-RUSSO AK, VIDAL CM, DOS SANTOS PH, CASTELLAN CS. Long-term effect of carbodiimida on dentin matrix and resin-dentin bonds. **J Biomed Mater Res Part B: Applied Biomaterials**, Hoboken, v. 94, n.1, p. 250-255, jul. 2010.

BEDRAN-RUSSO AK, CASTELLAN CS, SHINOHARA MS, HASSAN L, ANTUNES A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. **Acta Biomater**, Kidlington, v. 7, n. 4, p. 1735–1741, abr. 2011.

BEDRAN-RUSSO AK, PAULI GF, CHEN SN, MCALPINE J, CASTELLAN CS, PHANSALKAR RS, AGUIAR TR, VIDAL CMP, NAPOTILANO JG, NAM JW, LEME AA. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 30, n. 1, p. 62-76, jan. 2014.

BRESCHI L, MAZZONI A, RUGGERI A, CADENARO M, DI LENARDA R, DE STEFANO DE. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 24, n. 1, p. 90-101, jan. 2008.

BROYLES AC, PAVAN S, BEDRAN-RUSSO AK. Effect of dentin surface modification on the microtensile bond strength of self-adhesive resin cements. **J Prosthodont**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 59-62, jan. 2013.

CASTELLAN CS, PEREIRA PNR, GRANDE RHM, BEDRAN-RUSSO AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 26, n. 10, p. 968-973, out. 2010.

CEHRELI ZC, YAZICI AR, AKCA T, OZGÜNALTAY G. A morphological and microtensile bond strength evaluation of a single bottle adhesive to caries affected human dentin after four different caries removal technique. **J Dent**. Bristol, v. 31, n. 6, p. 429–435, ago. 2003.

DELL'AICA I, CANIATO R, BIGGIN S, GARBISA S. Matrix proteases, green tea, and St. John's wort: Biomedical research catches up with folk medicine. **Clin Chem Acta**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 69-77, mai. 2007.

DOS SANTOS PH, KAROL S, BEDRAN-RUSSO AK. Long-term nano-mechanical properties of biomodified dentin-resin interface components. **J Biomech**, New York, v. 44, n. 9, p. 1691-1694, jun. 2011.

FEITOSA VP, SAURO S, OGLIARI FA, OGLIARI AO, YOSHIHARA K, ZANCHI CH, CORRER-SOBRINHO L, SINHORETI MA, CORRER AB, WATSON TF, VAN MEERBEEK B. Impact of hydrophilicity and length of spacer chains on the bonding of functional monomers. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 30, n. 12, p. 317-323, dez. 2014.

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**; New York, v. 91, n. 4, p. 822-832, fev. 2001.

HAIJ-ALI R, WALKER M, WILLIAMS K, WANG Y, SPENCER P. Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. **J Prosthodont**. Philadelphia, v. 6, n. 2, p. 82-88, mar./abr. 2006.

HEBLING J, PASHLEY DH, TJADERHANE L, TAY FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. **J Dent Res**, Chicago, v. 84, n. 8, p. 741–746, ago. 2005.

JACKSON JK, ZHAO J, WONG W, BURT HM. The inhibition of collagenase induced degradation of collagen by the galloyl-containing polyphenols tannic acid, epigallocatechingallate and epicatechingallate. **J Mater Sci Mater Med**, London, v. 21, n. 5, p. 1435-1443, mai. 2010.

LENZI TL, TEDESCO TK, SOARES FZM, LOGUERCIO AD, ROCHA RO. Chlorhexidine application for bond strength preservation in artificially-created caries-affected primary dentin. **Int J Adhes Adhes**, v. 54, p. 51–56, out. 2014.

LIU Y, CHEN M, YAO X, XU C, ZHANG Y, WANG Y. Enhancement in dentin collagen's biological stability after proanthocyanidins treatment in clinically relevant time periods. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 29, n. 4, p. 485-492, abr. 2013.

MACEDO GV, YAMAUCHI M, BEDRAN-RUSSO AK. Effects of chemical cross-linkers on caries-affected dentin bonding. **J Dent Res**, Chicago, v. 88, n. 12, p. 1096-1100, dez. 2009.

MAIA FJN, RIBEIRO VG, CLEMENTE CS, LOMONACO D, VASCONCELOS PHM, MAZZETTO SE. Thermo-oxidative evaluation of new cardol derivatives as antioxidants for mineral oils. **J Therm Anal Calorim**, Dordrecht, v. 109, n. 2, p. 1013–1018, ago. 2012.

MAZZONI A, TJÄDERHANE L, CHECCHI V, DI LENARDA R, SALO T, TAY FR, PASHLEY DH, BRESCHI L. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. **J Dent Res**, Chicago, v. 94, n. 2, p. 241-51, fev. 2015.

MOUNT GJ, NGO H. Minimal intervention: a new concept for operative dentistry. **Quintessence Int**, Berlin, v. 31, n. 8, p. 527-33, set. 2001.

NAIK, SV, SHASHIKIRAN, ND, CHAITRA, NL, & SYED, G. A microtensile bond strength evaluation of a single-bottle adhesive to caries-affected dentin in conventional versus minimal invasive caries removal techniques: An in-vitro study. **Indian J Dent**, Haryana, v. 5, n. 3, p. 127–131, jul. 2014.

NAKABAYASHI N, NAKAMURA M, YASUDA N. Hibrid layer as a dentin-bonding mechanism. **J Esthet Dent**, Berlin, v.3, n. 4, p. 133-138, jul./ago.1991.

NAKAJIMA M., SANO H., URABE I., TAGAMI J. AND PASHLEY DH. Bond strengths of single-bottle dentin adhesives to caries-affected dentin. **Oper Dent**, Seattle, v. 25, n. 1, p. 2-10, jan./fev. 2000.

NASCIMENTO FD, MINCIOTTI CL, GERALDELI S, CARRILHO MR, PASHLEY DH, TAY FR. Cysteine cathepsins in human carious dentin. **J Dent Res**, Chicago, v. 90, n. 4, p. 506-511, abr. 2011.

NIU LN, ZHANG W, PASHLEY DH, BRESCHI L, MAO J, CHEN JH, TAY FR. Biomimetic remineralization of dentin. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 30, n. 1, p. 77-96, jan. 2014.

OGLIARI FA, DA SILVA EDE O, LIMA GDA S, MADRUGA FC, HENN S, BUENO M, CESCHI MA, PETZHOLD CL, PIVA E. Synthesis of phosphate monomers and bonding to dentin: esterification methods and use of phosphorus pentoxide. **J Dent**, Bristol, v. 36, n. 3, p. 171-77, mar. 2008.

OSORIO R, YAMAUTI M, RUIZ-REQUENA ME, TOLEDANO M. MMPs activity and bond strength in deciduous dentine-resin bonded interfaces. **J Dent**, Bristol, v. 41, n. 6, p. 549-555, jun. 2013.

PASHLEY DH, TAY FR, YIU C, HASHIMOTO M, BRESCHI L, CARVALHO RM. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J Dent Res**, Chicago, v. 83, n. 3, p. 216–221, mar. 2004.

PAVAN S, XIE Q, HARA AT, BEDRAN-RUSSO AK. Biomimetic approach for root caries prevention using a proanthocyanidin-rich agent. **Caries Res**, Basel, v. 45, n. 5, p. 443–447, ago. 2011.

QI YP, LI N, NIU LN, PRIMUS CM, LING JQ, PASHLEY DH, TAY FR. Remineralization of artificial dentinal caries lesions by biomimetically modified mineral trioxide aggregate. **Acta Biomater**, Kidlington; v. 8, n. 2, p. 836-842, fev. 2012.

SANTIAGO SL, OSORIO R, NERI JR, CARVALHO RM, TOLEDANO M. Effect of the flavonoid epigallocatechin-3-gallate on resin-dentin bond strength. **J Adhes Dent**; New Malden; v. 15, n. 6, p. 535-540, dez. 2013.

TAY FR, PASHLEY DH. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. **J Dent Res**, Chicago; v. 88, n. 8, p. 719-724, ago. 2009.

TAY FR, PASHLEY DH, YOSHIYAMA M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. **J Dent Res**, Chicago, v. 81, n. 7, p. 472-476, jul. 2002.

TJÄDERHANE L, NASCIMENTO FD, BRESCHI L, MAZZONI A, TERSARIOL ILS, GERALDELI S, TEZVERGIL-MUTLUAY A, CARRILHO MR, CARVALHO RM, TAY FR, PASHLEY DH. Optimizing dentin bond durability: Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 29, n. 1, p. 116-135, jan. 2013.

TOLEDANO M, SAURO S, CABELLO I, WATSON T, OSORIO R. A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 29, n. 8, p. 142-52, ago. 2013.

VAN MEERBEEK B, DHEM A, GORET-NICAISE M, BRAEM M, LAMBRECHTS P, VANHERLE G. Comparative SEM and TEM examination of ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. **J Dent Res**, Chicago, v. 72, n. 2, p. 495-501, fev. 1993.

VIDAL CMP, AGUIAR TR, PHANSALKAR R, MCALPINE JB, NAPOLITANO JG, CHEN SN, ARAÚJO LSN, PAULI GF, BEDRAN-RUSSO AK. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. **Acta Biomater**, Kidlington, v. 10, n. 7, p. 3288–3294, jul. 2014.

WANG Y., SPENCER P. AND WALKER MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. **J Biomed Mater Res**, Hoboken, v. 81, n. 2, p. 279-286, mai. 2007.

ZAVGORODNIY AV, ROHANIZADEH R, BULCOCK S, SWAIN MV. Ultrastructural observations and growth of occluding crystals in carious dentine. **Acta Biomater**, Kidlington, v. 4, n. 5, p. 1427-39, set. 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO CARDOL-METACRILATO E O EFEITO DE SUA APLICAÇÃO SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DA DENTINA E DA INTERFACE ADESIVA

Pesquisador: MARIO AUREO GOMES MOREIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 52463116.0.0000.5054

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.482.602

Apresentação do Projeto:

Será feita uma avaliação da atividade antibacteriana do cardol incorporado com radical metacrilato (monômero cardol-metacrilato) em diferentes concentrações sobre a formação e o desenvolvimento de biofilmes de *Streptococcus mutans* (através de análise com microscopia confocal com corantes live/dead e microscopia eletrônica de varredura), sua ação sobre propriedades superficiais de adesivos sobre a dentina (através de medidas de ângulos de contato) e mecânicas da dentina (nanodureza e módulo de elasticidade) e sua influência quando aplicado como primer e incorporado a um sistema adesivo (Single Bond Universal - 3M-ESPE, St Paul, EUA) sobre a resistência de união ao microcissalhamento. A adesão entre sistemas adesivos e a dentina acontece predominantemente por retenção micromecânica através da penetração desses materiais no emaranhado de fibras colágenas expostas na dentina parcialmente ou completamente desmineralizada. Essa interação entre material adesivo e substrato dentinário faz surgir na interface adesiva uma região com características mistas chamada de camada híbrida. A matriz de colágeno e a camada híbrida são estruturas suscetíveis à biodegradação. A biomodificação das fibrilas colágenas da dentina, com o intuito de melhorar as propriedades mecânicas da camada híbrida e proteger a interface adesiva de fatores de degradação como a ação de proteases endógenas (metaloproteinases da matriz- MMPs e catepsinas) e de outros fatores externos, tem

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 1.482.602

sido uma das estratégias mais estudadas atualmente e é considerada um recurso importante na tentativa de estender a longevidade da adesão entre dentina e resina. O cardol é um dos principais compostos do líquido extraído da casca da castanha do caju e, dentre várias outras propriedades, apresenta potencial antimicrobiano e de biomodificação da dentina. Os objetivos deste projeto de pesquisa são avaliar a atividade antibacteriana do cardol incorporado com radical metacrilato (monômero cardol-metacrilato) em diferentes concentrações sobre a formação e o desenvolvimento de biofilmes de *Streptococcus mutans* (através de análise com microscopia confocal com corantes live/dead e microscopia eletrônica de varredura), sua ação sobre propriedades superficiais de adesivos sobre a dentina (através de medidas de ângulos de contato) e mecânicas da dentina (nanodureza e módulo de elasticidade) e sua influência quando aplicado como primer e incorporado a um sistema adesivo (Single Bond Universal - 3M-ESPE, St Paul, EUA) sobre a resistência de união ao microcissalhamento.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito do uso do cardol-metacrilato nas propriedades físico-químicas da dentina e da interface adesiva dentina-resina e seus potenciais efeitos antimicrobianos.

Objetivo Secundário:

Avaliar atividade antibacteriana do cardol-metacrilato na formação e desenvolvimento do biofilme de *Streptococcus mutans*; Mensurar a energia de superfície da dentina após a aplicação de primers de cardolmetacrilato; Avaliar (após 24 horas e 6 meses) o efeito da aplicação do cardolmetacrilato em diferentes concentrações como primer e incorporado a um sistema adesivo universal na resistência de união ao microcissalhamento; Mensurar (após 24h e 6 meses) a nanodureza da dentina, da camada de adesivo e da camada híbrida após a aplicação do cardol-metacrilato em diferentes concentrações como primer ou incorporado ao adesivo; Analisar o módulo de elasticidade da dentina desmineralizada após a aplicação do cardol-metacrilato em diferentes concentrações através de teste de flexão de três pontos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos envolvidos na pesquisa. Os dentes utilizados serão extraídos por razões que não envolvem a pesquisa e doados por pacientes. TRATA-SE DE ESTUDO LABORATORIAL SEM INTERVENÇÃO EM PACIENTES.

Benefícios:

Possibilidade de desenvolvimento de novos materiais adesivos que possam influenciar na

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000	CEP: 60.430-275
Bairro: Rodolfo Teófilo	
UF: CE	Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344	E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.482.602

durabilidade das restaurações odontológicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de grande relevância para a área da dentística restauradora com possibilidade de ampliação de materiais nessa área restauradora.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou a dispensa do TCLE, termo de doação de dentes, declaração de custeio, projeto com anexos, carta de apreciação pelo comitê, declaração de concordância dos pesquisadores, folha de rosto, carta de autorização do local onde a pesquisa vai ser desenvolvida, currículo lattes e orçamento. O pesquisador atualizou cronograma e inclui termo de fiel depositário.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_488574.pdf	31/03/2016 20:16:42		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO00.pdf	31/03/2016 20:15:59	MARIO AUREO GOMES MOREIRA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMADEEXECUCAO.pdf	31/03/2016 20:13:50	MARIO AUREO GOMES MOREIRA	Aceito
Brochura Pesquisa	PROJETO.pdf	31/03/2016 20:13:34	MARIO AUREO GOMES MOREIRA	Aceito
Outros	termodefieldepositario.jpeg	31/03/2016 20:11:53	MARIO AUREO GOMES MOREIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEdispensanovo.pdf	13/01/2016 22:17:22	MARIO AUREO GOMES MOREIRA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostropdf.pdf	06/01/2016 08:46:12	MARIO AUREO GOMES MOREIRA	Aceito
Orçamento	ORCAMENTODOPROJETO.pdf	03/01/2016 15:41:53	MARIO AUREO GOMES MOREIRA	Aceito
Outros	cartadeencaminhamento.pdf	03/01/2016	MARIO AUREO	Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.482.602

Outros	cartadeencaminhamento.pdf	09:59:43	GOMES MOREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaodeconcordanciaufc.jpg	03/01/2016 09:57:17	MARIO AUREO GOMES MOREIRA	Aceito
Outros	declaracaodecusteio.pdf	03/01/2016 09:53:56	MARIO AUREO GOMES MOREIRA	Aceito
Outros	temodedoacaodentes.pdf	03/01/2016 09:45:49	MARIO AUREO GOMES MOREIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Cartadeautorizacao.jpeg	23/12/2015 12:04:26	MARIO AUREO GOMES MOREIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 07 de Abril de 2016

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-275
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 **E-mail:** comepe@ufc.br