



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

**MARCELO VICTOR SIDOU LEMOS**

**AVALIAÇÃO DE AGENTES BIOATIVOS PARA O APRIMORAMENTO DA**  
**INTERFACE DE UNIÃO EM SUBSTRATO DENTINÁRIO**

**FORTALEZA**

**2020**

**MARCELO VICTOR SIDOU LEMOS**

**AVALIAÇÃO DE AGENTES BIOATIVOS PARA O APRIMORAMENTO DA  
INTERFACE DE UNIÃO EM SUBSTRATO DENTINÁRIO**

Tese 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 Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago

**FORTALEZA**

**2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- L578a Lemos, Marcelo Victor Sidou.  
AVALIAÇÃO DE AGENTES BIOATIVOS PARA O APRIMORAMENTO DA INTERFACE DE  
UNLÃO EM SUBSTRATO DENTINÁRIO / Marcelo Victor Sidou Lemos. – 2020.  
103 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e  
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago.
1. Adesivos Dentinários. 2. Colágeno. 3. Dentina. 4. Polifenóis. 5. Remineralização Dentária. I. Título.  
CDD 617.6
-

MARCELO VICTOR SIDOU LEMOS

AVALIAÇÃO DE AGENTES BIOATIVOS PARA O APRIMORAMENTO DA INTERFACE  
DE UNIÃO EM SUBSTRATO DENTINÁRIO

Tese 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 Doutor em Odontologia.

Aprovada em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonça  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Vicente de Paulo Aragão Sabóia  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gislaine Cristina Padovani  
Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

---

Prof. Dr. Giovanne 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 e são pessoas em quem posso confiar para compartilhar minhas angústias e que sempre procuram me mostrar os melhores caminhos.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia** da Universidade Federal do Ceará, em especial aos funcionários e docentes por todas as possibilidades que me foram apresentadas e por todos os conhecimentos que foram passados.

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, sendo um exemplo e espelho de docente e pesquisador. Obrigado por todos os conhecimentos repassados nesses 9 anos da minha trajetória na Odontologia, se fazendo presente em todas as etapas dessa jornada, desde a iniciação científica até as correções finais desta tese. Deixo expressa toda a minha gratidão pelas lições e “puxões de orelha” que me fizeram crescer além das paredes do laboratório.

À banca, **Prof. Dr. Juliano Sartori, Prof. Dr. Vicente Sabóia, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gislaíne Padovani e Prof. Dr. Jiovane Neri**, pelas contribuições que certamente ajudarão para o engrandecimento do trabalho realizado. A escolha de cada um deveu-se pela grande admiração e competência na realização de seus trabalhos.

À banca de pré-defesa, **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanara Passos, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecília Atem e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidiane Costa**, pela dedicação e pelas contribuições de elevado cunho científico que aprimoraram a presente tese.

A minha noiva, **Talita Arrais**, que me acompanhou em toda essa jornada, sempre tendo paciência e me incentivando a sempre fazer o melhor. Obrigado por ter me acompanhado em todos os momentos, desde os domingos pela manhã no laboratório até as revisões da tese durante as madrugadas.

À equipe de orientandos e ex-orientandos do Prof. Sérgio Santiago, **Ana Laura Mota**, **Gabriela Lourenço**, **Adeilson Alves**, **André Mattos**, **Nadine Albuquerque** e todos os demais que compuseram essa jornada, pela convivência e a parceria que nos permite crescer como um grupo.

Ao grande amigo e ex-técnico do laboratório de pesquisa, **David Queiroz**, que contribuiu de forma ativa para que esse projeto se transformasse em realidade.

## RESUMO

O desenvolvimento de materiais adesivos possibilitou uma revolução na prática da Odontologia restauradora, permitindo a substituição de preparos padronizados e amplos por preparos individualizados e minimamente invasivos. Entretanto, a durabilidade desses procedimentos restauradores passou a ser questionada, principalmente, pela degradação ocorrida na camada híbrida. Logo, a presente tese teve como objetivo avaliar a eficácia e a estabilidade de diferentes agentes bioativos para aumento da longevidade da interface de união promovida por sistemas adesivos em substrato dentinário. Este estudo é composto por três capítulos, onde o primeiro teve como objetivo avaliar o potencial biomodificador do extrato de semente da uva diluído em soluções contendo diferentes pHs (4,42; 6,96; 11,92). Os testes realizados foram flexão de 3 pontos, mensuração de massa, espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e espectroscopia Raman. Pode-se observar que a utilização da solução com pH alcalino apresentou resultados satisfatórios, podendo o mesmo ser utilizado como solvente em biomodificação. O segundo capítulo teve como objetivo comparar a capacidade de formação de ligações cruzadas de colágeno do ácido elágico, hesperidina, apigenina e curcumina, identificando as concentrações mais efetivas de aplicação [20 $\mu$ M (p/v); 200 $\mu$ M (p/v) e 2mM (p/v)]. Para tanto, realizaram-se os testes de flexão de 3 pontos, variação de massa, análise em FT-IR, resistência de união, nanoinfiltração e micropermeabilidade. Todas as substâncias testadas apresentam potencial biomodificador, sendo a concentração de 2mM efetiva em promover tal reticulação. O ácido elágico também se mostrou bastante efetivo em preservar a resistência de união. O terceiro capítulo teve como proposição avaliar a influência da incorporação da epigallocatequina-3-galato (EGCG) associada ou não ao beta-tricalcio fosfato ( $\beta$ TCP) sobre adesão em dentina quando utilizado um sistema adesivo universal. Os testes realizados foram análise em FT-IR, flexão de 3 pontos, grau de conversão, resistência de união, nanoinfiltração e micropermeabilidade. A incorporação de EGCG, isoladamente ou associada ao  $\beta$ TCP, ao sistema adesivo universal, possibilitou a manutenção da resistência de união a dentina após 6 meses de envelhecimento, sem afetar as propriedades mecânicas da blenda adesiva. Dessa forma, pode-se inferir que diferentes agentes bioativos propostos nesse estudo foram efetivos em aprimorar e estabilizar a interface de união em substrato dentinário, destacando-se o ácido elágico e a epigallocatequina-3-galato.

**Palavras-chave:** Adesivos Dentinários. Colágeno. Dentina. Polifenóis. Remineralização Dentária.



## ABSTRACT

The development of adhesive materials enabled a revolution in the practice of restorative dentistry, allowing the replacement of standardized and invasive preparations with individualized and minimally invasive preparations. However, the durability of these restorative procedures came to be questioned, mainly, by the degradation that occurred in the hybrid layer. Therefore, this thesis aimed to evaluate the effectiveness and stability of different bioactive agents for the improvement of the bonding interface promoted by adhesive systems on dentin substrate. This study consists of three chapters, where the first aimed to evaluate the biomodification potential of grape seed extract diluted in solutions containing different pHs (4.42; 6.96; 11.92). The tests performed were 3-point flexion, mass measurement, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and Raman spectroscopy. It can be seen that the use of solutions with alkaline pH showed satisfactory results, which can be used as a solvent in biomodification. The second chapter aimed to compare the ability to form cross-links of ellagic acid, hesperidin, apigenin and curcumin, identifying the most effective concentrations of application [20 $\mu$ M (w/v); 200 $\mu$ M (w / v) and 2mM (w / v)]. For this, the 3-point flexion tests, mass variation, FT-IR analysis, bond strength, nanoinfiltration and micropermeability were performed. All tested substances have biomodification potential, with a concentration of 2mM effective in promoting such cross-linking. Ellagic acid has also been shown to be very effective in preserving bond strength. The third chapter aimed to assess the influence of the incorporation of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) associated or not with beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ TCP) on dentin adhesion when using a universal adhesive system. The tests performed were FT-IR analysis, 3-point flexion, degree of conversion, bond strength, nano-infiltration and micropermeability. It was observed that the incorporation of EGCG, alone or associated with  $\beta$ TCP, into a universal adhesive system maintaining strength after 6 months of aging without affecting the mechanical properties of the adhesive blend. In conclusion, it can be inferred that different bioactive agents proposed in this study were effective in improving and stabilizing the bonding interface in dentin substrate, especially ellagic acid and epigallocatechin-3-gallate.

**Keywords:** Collagen. Dentin. Dentin-bonding Agents. Polyphenols. Tooth Remineralization.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL .....	11
2 PROPOSIÇÃO .....	18
3 CAPÍTULOS .....	20
Capítulo I .....	21
Capítulo II .....	41
Capítulo III .....	69
4. CONCLUSÃO .....	93
5. REFERÊNCIAS .....	95
Anexos .....	100

## *Introdução Geral*

---

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento de materiais adesivos possibilitou uma revolução na prática da Odontologia restauradora, permitindo a substituição de preparos padronizados e invasivos por individualizados e minimamente invasivos (SOFAN et al., 2017). Isso só foi possível, porque os materiais restauradores diretos utilizados atualmente não necessitam de uma retenção macromecânica como as ligas metálicas do passado e tal ligação ocorre por meio de um embricamento micromecânico, além de interações químicas, como as realizadas por monômeros funcionais (VAIDYANATHAN; VAIDYANATHAN, 2009). Entretanto, a durabilidade desses procedimentos restauradores passou a ser bastante questionada devido à complexidade da técnica, aos materiais e aos substratos em que se realizam (PASHLEY et al., 2011; PERDIGÃO; REIS; LOGUERCIO, 2013; TJADERHANE et al., 2015; TJÄDERHANE et al., 1998).

Nesse contexto, diversos pesquisadores têm estudado a interface de união formada pela interação entre monômeros resinosos e componentes orgânicos e inorgânicos dos substratos dentários, visando a simplificar a técnica, tornar os materiais mais resistentes e evitar a degradação de seus componentes (BEDRAN-RUSSO et al., 2014; EKAMBARAM; YIU; MATINLINNA, 2015; HEBLING et al., 2005; PASHLEY et al., 2011; SANTIAGO et al., 2013). Logo, os sistemas adesivos apresentaram grande evolução nas últimas décadas, tendo se tornado confiáveis para aplicação em situações diversas, sendo inseridos de forma consistente na rotina clínica (VAIDYANATHAN; VAIDYANATHAN, 2009). Uma das novidades mais recentes foi a introdução de adesivos universais na prática clínica (HANABUSA et al., 2012). Esses produtos são conhecidos como adesivos "multimodo" ou "multiuso" porque podem ser utilizados empregando-se diversas estratégias, introduzindo a filosofia de que a Odontologia adesiva deve ser cada vez mais versátil (CHEN et al., 2015; JACKER-GUHR; LUEHRS; SANDER, 2019).

Entretanto, todos os sistemas ainda apresentam algumas limitações, sendo de fundamental importância a contínua busca pela compreensão de como ocorre a interação entre os sistemas adesivos e os substratos onde ocorrerá a união (SOFAN et al., 2017). Dentre essas limitações, a degradação da camada híbrida (interface de interdifusão entre fibrilas colágenas da dentina desmineralizada e monômeros resinosos) parece ser o principal motivo de falhas na atualidade (BRAGA; FRONZA, 2020). Essa degradação

pode ocorrer por meio de três mecanismos principais: 1) degradação do colágeno exposto, por meio da ação de enzimas colagenolíticas, como metaloproteinases da matriz (MMP) e cisteíno-catepsinas (CTP); 2) hidrólise da matriz orgânica polimérica e 3) hidrólise do agente de união (silano), resultando em desprendimento de partículas de carga (ABUNA et al., 2016).

No primeiro mecanismo, o incompleto revestimento de fibrilas colágenas por monômeros resinosos do adesivo gera uma zona de colágeno exposto à ação de enzimas colagenolíticas, como MMPs e CTPs (HEBLING et al., 2005; JEE et al., 2016). Essas enzimas são produzidas por leucócitos e fibroblastos durante a síntese da matriz mineralizada da dentina e permanecem inativas até posterior ativação em ambientes ácidos (necessitando-se da presença de cálcio e zinco), como durante processos cariosos ou condicionamento ácido (HEBLING et al., 2005). As MMPs compõem um grupo de 23 enzimas identificadas no organismo humano, sendo as MMP -2, -8 e -9 as mais relacionadas com a degradação do colágeno dentinário. Já as CTPs são proteases que se concentram em regiões peritubulares e próximas à polpa, embora em menor concentração do que as MMPs, em dentina, são importantes no processo de degradação do colágeno (NASCIMENTO et al., 2011; TERSARIOL et al., 2010). São compostas por 11 enzimas identificadas em humanos e, em dentina, identificou-se a presença de CTP-K (colagenase mais potente em mamíferos), CTP-L e CTP-B (CHAUSSAIN et al., 2013; TERSARIOL et al., 2010). Sugere-se haver sinergia entre as atividades de MMPs e CTPs devido à grande proximidade de ação das mesmas e a capacidade das últimas de gerarem um ambiente ácido, resultando em ativação de mais MMPs (CHAUSSAIN et al., 2013; NIU et al., 2011; ZHANG; KERN, 2009).

A camada de adesivo também pode ser degradada por meio de hidrólise das ligações poliméricas formadas durante a polimerização. O uso de monômeros, parcialmente hidrofílicos, como 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA), melhoram o molhamento e a infiltração monomérica, resultando em valores de resistência de união aumentados de forma imediata. Porém, tais componentes hidrofílicos podem estimular uma separação de fases em nível nanométrico, em que os monômeros hidrofílicos se concentram nas regiões mais profundas da camada híbrida e os hidrofóbicos se concentram nas regiões mais superficiais. Além disso, as regiões mais profundas podem apresentar polimerização prejudicada (HASHIMOTO, 2010). Logo, a associação entre esses fatores favorece uma maior sorção do adesivo, resultando em formação de canais

de água (*water trees*) que penetram a camada híbrida (PERDIGÃO; REIS; LOGUERCIO, 2013). A água presente na blenda adesiva polimerizada tem capacidade de hidrolisar as ligações formadas entre os monômeros, resultando, em última análise, em lixiviação e degradação dessa camada (PERDIGÃO; REIS; LOGUERCIO, 2013). Fato semelhante pode ser observado na ligação formada entre agentes de união (silano) e partículas de carga presentes em alguns adesivos (ABUNA et al., 2016).

Diversas estratégias têm sido propostas para diminuir a degradação da camada híbrida e aumentar a longevidade das restaurações, dentre essas, podemos destacar: 1) o uso de inibidores de enzimas colagenolíticas, 2) a biomodificação dentinária por meio de agentes de ligações cruzadas, 3) a remineralização da dentina desmineralizada e 4) a remoção de água por meio da aplicação de etanol (BETANCOURT; BALDION; CASTELLANOS, 2019).

Dentre os inibidores de enzimas colagenolíticas, a substância mais estudada é a clorexidina (CLX), que, comprovadamente, inibe a atividade de MMPs mesmo em baixas concentrações e em curtos períodos de aplicação (HEBLING et al., 2005). No entanto, a durabilidade dessa inibição é bastante questionada, tendo em vista que a interação entre CLX e a dentina é do tipo eletrostática reversível e a ação depende da substantividade em dentina (HEBLING et al., 2005). O mecanismo de ação dessa molécula ainda não foi completamente esclarecido, porém se acredita que tenha capacidade de interagir com o zinco presente no domínio catalítico das MMPs (CARRILHO et al., 2010; SESEOGULLARI-DIRIHAN et al., 2016). Sabe-se, também, que diversas outras moléculas de origem natural têm capacidade de produzir efeito similar, como diversos polifenóis (DE MORAES et al., 2016; NERI et al., 2014; SANTIAGO et al., 2013).

A biomodificação dentinária consiste na tentativa de melhorar as propriedades físicas da dentina por meio da criação de ligações químicas adicionais, semelhantes às ligações presentes durante a formação do elemento dentário (BETANCOURT; BALDION; CASTELLANOS, 2019). Os agentes biomodificadores podem ser divididos em agentes: 1) de ação física, 2) agentes de ligações cruzadas de colágeno sintéticos e 3) agentes de ligações cruzadas de colágeno naturais (BEDRAN-RUSSO et al., 2014). Os agentes físicos necessitam da associação entre um agente físico e um agente sensibilizante, sendo o exemplo mais comum o uso de riboflavina (vitamina B2) associado à luz ultravioleta. Essa vitamina, quando em contato com a luz, pode induzir a

formação de oxigênio singlete (radical livre) e, posteriormente, a formação de ligações covalentes com a dentina (BEDRAN-RUSSO et al., 2014). Os agentes de ligações cruzadas de colágeno (ALC) sintéticos são substâncias que podem se ligar aos grupamentos amino e carboxila presentes nos aminoácidos que compõem o colágeno, sendo os principais representantes o glutaraldeído e a carbodiimida, entretanto, o primeiro apresenta alta toxicidade e o segundo necessita de longo tempo de aplicação (SCHEFFEL et al., 2015), limitando sua utilização na clínica, o que gera uma busca crescente por ALC naturais. Dentre os ALCs naturais, as proantocianidinas (PAC) têm demonstrado efeito benéfico sobre as propriedades mecânicas do colágeno. Apesar de extensamente estudada, a reação exata de reticulação entre colágeno e proantocianidinas (PAC) não foi completamente elucidada. No entanto, sugere-se que a presença de grupamento fenólicos influenciam positivamente no potencial biomodificador (VIDAL et al., 2014). Entretanto, essa substância apresenta a limitação do alto tempo de aplicação e a característica de pigmentar a interface adesiva (AGUIAR et al., 2014; LEME-KRAUS et al., 2017, 2019; VIDAL et al., 2014). Logo, sugere-se que diversos polifenóis, com estruturas moleculares semelhantes às PACs, podem atuar como ALC, apresentando efeito semelhante ou superior e reduzindo a presença de efeitos adversos. Pode-se usar, como exemplo, o ácido elágico, a hesperidina, a apigenina e curcumina, além de catequinas.

O ácido elágico (AE), um membro dos flavonoides, é normalmente produzido por plantas e formado como taninos, conhecidos como elagitaninos. O ácido elágico contém dois grupos lactona e quatro grupos hidroxilas, nos quais o grupo hidroxila é conhecido por aumentar a atividade antioxidante na peroxidação lipídica e por proteger as células dos danos oxidativos (PARI; SIVASANKARI, 2008). Atualmente, o ácido elágico tem recebido atenção especial por causa de sua ampla gama de propriedades biológicas, como a atividade antioxidante (TÜRK et al., 2010), antiapoptótico (TÜRK et al., 2010), antimutagênico (INDIRA PRIYADARSINI et al., 2002), anti-inflamatório (IINO et al., 2002), antibacteriana (AKIYAMA et al., 2001), dentre outras. Além de acelerar a formação óssea após a extração dentária em ratos saudáveis (AL-OBAIDI et al., 2014; M JAMIL AL-OBAIDI et al., 2016).

A hesperidina (HPN), é um flavonoide extraído de frutas cítricas. Os benefícios médicos desse flavonoide citrino incluem efeitos antioxidante, anti-inflamatório e anticarcinogênico (TRZECIAKIEWICZ et al., 2010). A hesperidina tem capacidade de interagir com o colágeno, indicando que essa interação pode contribuir para a preservação

do mesmo, protegendo-o da degradação por meio de collagenases (HIRAISHI et al., 2017). Outro flavonoide de origem natural bastante promissor em Odontologia restauradora é a apigenina (APG), abundantemente presente em frutas e vegetais comuns, como a camomila. É reconhecido como um flavonoide bioativo, já que mostrou possuir propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticarcinogênicas (SHUKLA; GUPTA, 2010).

A curcumina (CM) é o principal componente bioativo da cúrcuma, tempero derivado dos rizomas de *Curcuma longa linn*. Durante séculos, a curcumina demonstrou apresentar excelentes benefícios terapêuticos em doenças sistêmicas. Devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, a curcumina desempenha um papel regulador benéfico significativo em várias condições patológicas, incluindo câncer, doença cardiovascular, doença de Alzheimer, distúrbios inflamatórios e distúrbios neurológicos (YALLAPU et al., 2015). Estudos *in vitro* demonstraram que o pré-tratamento com uma solução de curcumina foi efetivo em preservar colágeno, assim como em inibir a ação de collagenases, como metaloproteinases de matriz e cisteíno-catepsinas (SESEOGULLARI-DIRIHAN et al., 2015; SESEOGULLARI-DIRIHAN et al., 2018).

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 estudada devido ao seu potencial inibidor de MMP-2, -9 e CTPs (DELL'AICA et al., 2007; GARBISA et al., 2001), 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 efetiva em preservar a resistência de união dentina-resina por até 6 meses (ALBUQUERQUE et al., 2019; COSTA et al., 2019; SANTIAGO et al., 2013).

A remineralização da dentina desmineralizada se caracteriza pelo uso de nanoprecursores de sais de fosfato de cálcio amorfo na tentativa de reproduzir a mineralização da fibrila de colágeno, como ocorre durante a formação do elemento dentário (ABUNA et al., 2016; MARAVIC et al., 2017). Essa estratégia visa substituir a água presente na camada híbrida por cristais de sais de apatita, gerando, assim, maior resistência e menor degradação. Para uma otimização da técnica, sugere-se o uso de análogos biomiméticos, que guiam a precipitação mineral, obtendo resultados



satisfatórios em níveis intra e interfibrilares (BRAGA; FRONZA, 2020). As principais substâncias utilizadas, nessa estratégia, são vidros bioativos, silicatos de cálcio, fosfatos de cálcio e óxido de zinco (ABUNA et al., 2016; OSORIO et al., 2014, 2016; TOLEDANO et al., 2012). Dentre os sais de fosfato de cálcio, podemos enfatizar o beta fosfato tricálcio ( $\beta$ TCP), já que o mesmo é uma partícula constituída por cálcio e fosfato com capacidade de remineralizar o tecido em que estiver em contato. Além disso, por ser biocompatível e ter composição semelhante à apatita do dente e da estrutura óssea, tem apresentado resultados satisfatórios nas áreas de Traumatologia (GASIK et al., 2014) e Periodontia (GUIMARÃES, 2016), mostrando-se promissora também como agente antiossivo em esmalte (VIANA et al., 2020).

Tendo em vista as inúmeras limitações das presentes estratégias para estabilização e fortalecimento da interface adesiva, novas pesquisas devem ser realizadas com o objetivo de aprimorar a união em substrato dentinário. Logo, o objetivo da presente tese foi avaliar o uso de diferentes substâncias bioativas como agentes de aprimoramento da camada híbrida quando aplicados sobre substrato dentinário.

## *Proposição*

---

## **2 PROPOSIÇÃO**

O presente trabalho teve como objetivos:

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a eficácia de diferentes agentes bioativos para o aprimoramento da interface de união promovida por sistemas adesivos em substrato dentinário

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Analisar o efeito biomodificador de colágeno do extrato da semente da uva quando utilizadas soluções com diferentes pHs;
- Verificar a capacidade biomodificadora de diferentes flavonóides de origem natural (ácido elágico, curcumina, apigenina e hesperidina);
- Identificar a concentração mais efetiva de diferentes polifenóis de origem natural quando utilizados para biomodificação dentinária;
- Analisar a influência da aplicação de soluções contendo diferentes polifenóis de origem natural como pré-tratamento sobre adesão em dentina;
- Verificar a eficácia da associação entre uma catequina (EGCG) e um agente remineralizante ( $\beta$ TCP) sobre adesão em dentina quando incorporados a um adesivo universal.

# *Capítulos*

---

### 3 CAPÍTULOS

Esta tese 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 (Parecer nº 3.212.734 – Anexo A). Assim sendo, esta tese é composta de três capítulos intitulados:

**Capítulo I:** Efeito do pH no Potencial Biomodificador do Extrato de Semente da Uva sobre Colágeno Dentinário.

A ser submetido ao periódico: *Brazilian Oral Research*.

Link para acesso às normas do periódico: [scielo.br/revistas/bor/iinstruc.htm](http://scielo.br/revistas/bor/iinstruc.htm)

**Capítulo II:** Avaliação da Capacidade de Biomodificação do Colágeno por Diferentes Polifenóis de Origem Natural.

A ser submetido ao periódico: *Dental Materials*.

Link para acesso às normas do periódico: [elsevier.com/journals/dental-materials/guide-for-authors](http://elsevier.com/journals/dental-materials/guide-for-authors)

**Capítulo III:** Eficácia de um Adesivo Universal Incorporado com um Agente de Ligação Cruzada de Colágeno e um Agente Remineralizante sobre União em Dentina.

A ser submetido ao periódico: *Operative Dentistry*.

Link para acesso às normas do periódico: [jopdent.com/subscribe/subInfo.pdf](http://jopdent.com/subscribe/subInfo.pdf)

# *Capítulo I*

---

**EFEITO DO pH NO POTENCIAL BIOMODIFICADOR DO EXTRATO DE  
SEMENTE DA UVA SOBRE COLÁGENO DENTINÁRIO**

LEMON MVS<sup>1</sup>, MENDES TAD<sup>1</sup>, SANTIAGO SL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>- Aluno de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

<sup>2</sup>- Professor Titular do Departamento de Odontologia Restauradora da Universidade Federal do Ceará.

**Autor de correspondência:**

Sérgio Lima Santiago, Dr

Programa de Pós-graduação em Odontologia

Rua Monsenhor Linhares, S/N, Fortaleza, Ceará

e-mail: sergiosantiago@yahoo.com

## **EFEITO DO pH NO POTENCIAL BIOMODIFICADOR DO EXTRATO DE SEMENTE DA UVA SOBRE COLÁGENO DENTINÁRIO**

### **Resumo**

O objetivo do presente estudo foi verificar a efetividade e a estabilidade da ação biomodificadora de soluções de extrato de semente da uva a 6,5%, com diferentes pHs, quando aplicadas sobre colágeno dentinário. Para tanto, confeccionou-se barras de dentina (0,5x1,7x6,0 mm), as quais foram desmineralizadas durante 5 horas em ácido fosfórico a 10% e distribuídas nos seguintes grupos: solução ácida (pH=4,42); neutra (pH=6,96) e básica (pH=11,92), tendo a água destilada como controle (pH=6,75). Realizou-se os testes quantitativos de flexão de 3 pontos (n=10) e variação de massa (n=10), avaliados por meio de máquina de ensaios universais e balança de precisão, respectivamente, em diferentes períodos de tempo (antes e após biomodificação, 7 e 14 dias de armazenamento em solução remineralizante). Os dados foram submetidos a testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, seguido por ANOVA a dois critérios por medidas repetidas e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e espectroscopia Raman (FT-Raman) foram realizadas para análise qualitativa das ligações formadas. Pode-se observar que o grupo tratado com solução alcalina foi efetivo em elevar o módulo de elasticidade, apresentando queda após 7 dias e posterior estabilização após 14 dias de armazenamento. O grupo imerso em solução ácida apresentou maior aumento no módulo de elasticidade de forma imediata após biomodificação, porém não se mostrou estável ao longo dos 14 dias de armazenamento. Apenas o grupo imerso em solução ácida apresentou elevação na massa após biomodificação e 14 dias de armazenamento. Os gráficos de FT-IR e FT-Raman demonstraram que todas as soluções apresentaram interação com o colágeno em algum nível. Pode-se concluir que o pH da solução influencia diretamente na ação do extrato da semente da uva, sendo encontrados resultados satisfatórios em soluções alcalinas.

**Palavras-chave:** Colágeno; Proantocianidinas; Dentina.



## 1. INTRODUÇÃO

Com a crescente demanda por estética, a realização de procedimentos restauradores diretos com a utilização de resinas compostas se tornou rotineiro na prática clínica. Porém, o processo adesivo se apresenta como uma etapa crítica, sendo essa sensível ao substrato em que será realizado, dependente da habilidade do operador e da quantidade de passos operatórios<sup>1</sup>. Sabe-se que, no substrato adamantino, a realização da técnica se mostra mais simples e eficaz, tendo em vista a homogeneidade do mesmo. No entanto, em dentina, observamos grande heterogeneidade, cujo conteúdo é composto, em volume, por porção inorgânica (~50%), orgânica (~30%) e água (~20%)<sup>2</sup>.

Dentre os elementos que compõem a matriz orgânica, podemos destacar o colágeno tipo I, uma proteína que se organiza em tripla-hélice e se apresenta rica em aminoácido prolina<sup>1</sup>. Esse se encontra completamente mineralizado em substrato hígido, contudo pode ser exposto por meio de desmineralização promovida por ácidos fortes<sup>1</sup>. Durante a realização de procedimentos adesivos convencionais, utiliza-se o ácido fosfórico para promover a desmineralização superficial dessas fibras (5-8µm), o que permite uma posterior penetração de monômeros resinosos adesivos entre a trama de colágeno. Esse embricamento, que é de origem micromecânica, permite a criação de uma região denominada camada híbrida. Entretanto, devido à natureza hidrofóbica dos monômeros resinosos e a umidade presente na dentina, o revestimento das fibrilas não ocorre de forma completa, gerando uma região de colágeno exposto, o qual está susceptível a ação de enzimas colagenolíticas, como metaloproteínases da matriz (MMPs) e cisteíno-catepsinas (CTPs)<sup>2</sup>.

Devido à grande importância do colágeno no processo adesivo, diversas estratégias têm sido desenvolvidas para melhorar suas propriedades mecânicas e aumentar a longevidade das restaurações com resinas compostas. Sendo o uso de agentes de ligações cruzadas (ALC) muito relatado na literatura. Sua ação ocorre, prioritariamente, pelo aumento do número de ligações químicas entre as moléculas de colágeno, bem como dentro de sua estrutura, resultando em um colágeno mais rígido e resistente à degradação<sup>3-8</sup>. Existem diversos agentes que podem ser utilizados para essa finalidade, os quais são divididos em sintéticos e naturais, sendo o segundo bastante estudado pela alta biocompatibilidade e por ser obtido de forma sustentável<sup>9</sup>.

Nesse contexto, alguns agentes derivados de plantas podem interagir fortemente com tecidos biológicos aumentando suas propriedades físico-químicas. Dentre esses agentes, as proantocianidinas (PAC), derivadas das sementes de uva (*Vitis vinifera*), são as mais relatadas na literatura<sup>8-13</sup>. Apesar de extensamente estudada, a reação exata de reticulação entre colágeno e proantocianidinas (PAC) não foi completamente elucidada<sup>14</sup>. No entanto, quatro teorias diferentes tentam esclarecer esse mecanismo, em que se sugere a interação entre PAC e colágeno por meio de ligações covalentes<sup>15</sup>, ligações de hidrogênio<sup>16</sup>, interações iônicas<sup>17</sup> e interações hidrofóbicas<sup>18</sup>. A falta de conhecimento sobre como ocorre essa interação ocasiona grande variabilidade nas técnicas de aplicação, formulações e concentrações desse agente biomodificador.

Portanto, o conhecimento sobre a solubilidade dos polifenóis mostra-se de extrema importância, tendo em vista que a solubilidade é de interesse em diversas áreas, por exemplo: materiais, farmacêutica e ambiental. Em particular, na concepção de fármacos, é essencial considerar a solubilidade aquosa, a qual influencia fortemente nas propriedades farmacocinéticas, tais como absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Analisando o princípio de Le Chatelier, podemos notar que o pH pode influenciar diretamente na solubilidade<sup>19</sup>. O presente estudo recorreu a três diferentes pHs para verificação da efetividade das ligações cruzadas, sendo as soluções ácidas<sup>20</sup> e neutras<sup>18,21</sup> já relatadas como efetivas na literatura, todavia nenhum estudo progresso utilizou uma solução alcalina para tanto.

Tendo em vista o pouco conhecimento prévio sobre a temática, faz-se necessário avaliar a influência do pH dos solventes sobre a ação de um agente natural, possibilitando, assim, o estabelecimento de uma técnica mais eficaz. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi verificar a efetividade e a estabilidade da ação biomodificadora de soluções de extrato de semente da uva a 6,5% (ESU), utilizando-se diferentes pHs quando aplicados sobre colágeno dentinário. O presente estudo parte da hipótese de que (1) não haverá diferença no módulo de elasticidade e na estabilidade das ligações formadas entre os grupos tratados com extrato de semente da uva em diferentes pHs e (2) que não haverá diferença entre os tipos de interações químicas quando comparados os diferentes grupos testados.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1- Delineamento Experimental

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (Parecer nº 3.212.734). Trata-se de um estudo laboratorial *in vitro*, utilizando extrato de semente da uva a 6,5%, o qual foi solubilizado em água deionizada e estabilizado em pHs variados, sendo os meios: ácido (pH=4,42); neutro (pH=6,96) e básico (pH=11,92), tendo a água destilada (pH=6,75) como controle. As variáveis dependentes do estudo foram: módulo de elasticidade, alteração de massa, espectroscopia infravermelho e espectroscopia Raman. Para cada grupo experimental, foram utilizados 10 espécimes (n=10).

### 2.2- Preparo dos Espécimes

Para realização deste estudo, foram coletados 40 dentes terceiros molares hígidos com indicação de extração alheia à pesquisa. Os dentes foram limpos e armazenados em timol a 0,01% por um período máximo de três meses. Esses foram acoplados em uma cortadeira metalográfica (Isomet 1000®, Buehler, Uzwil, Suíça) e foram realizados cortes de 0,5mm de espessura, a fim de criar um disco de dentina com o auxílio de um disco diamantado. Posteriormente, foram realizados cortes, com o propósito de se obter barras de dentina de aproximadamente 1,7 mm x 6,0 mm x 0,5 mm (LxHxE) de dimensão. Em seguida, os espécimes foram imersos em solução de ácido fosfórico a 10%, durante 5 horas, sob agitação constante à temperatura ambiente<sup>22</sup>.

### 2.3- Preparo das Soluções

Para preparo das soluções, foi utilizado extrato de semente de uva (*Vitis vinifera*, Mega-Natural Gold; 95% Polifenóis, Madera, EUA). Inicialmente, foi realizada a pesagem do extrato para preparo de 20 mL na concentração de 6,5% (p/v). Em seguida, foi realizada a dissolução em água deionizada e se aferiu o pH, obtendo uma solução com pH= 4,42 (ácida). Para a confecção da solução básica, realizou-se a dissolução da mesma quantidade de extrato, descrito anteriormente, em água deionizada; depois, acrescentou-se NaOH a 1M até obtenção de uma solução básica (pH=11,92); posteriormente, acrescentou-se água até a quantidade previamente determinada (20 mL). Já para o preparo das soluções neutras, procedeu-se a dissolução do extrato em água deionizada, em seguida, utilizou-se tampão fosfato (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, pH de

7,4) para estabilização do pH próximo a 7,0 (pH=6,96). Todas as soluções foram mantidas sob agitação à ou em temperatura ambiente por 30 min até completa dissolução dos polifenóis. As soluções foram usadas imediatamente após o preparo.

#### 2.4- Módulo de Elasticidade (ME)

As barras de dentina desmineralizadas foram submetidas ao teste de flexão de três pontos, utilizando-se uma máquina de ensaios universais (Instron 3345, Canton, MA, EUA), com velocidade de 0,5 mm/min e célula de carga de 5N, obtendo-se, assim, os valores iniciais (*baseline*). Posteriormente, os espécimes foram distribuídos de forma aleatória entre os diferentes grupos e, para verificação da homogeneidade dos valores iniciais, realizou-se um teste estatístico (ANOVA a um critério,  $p=0,853$ ). Em seguida, os espécimes foram imersos durante 1 hora nas respectivas soluções biomodificadoras e, subsequentemente, foram lavados com água destilada por 30 segundos e uma nova aferição do módulo de elasticidade foi realizada<sup>22</sup>.

Para verificação da estabilidade das ligações, os espécimes foram armazenados em saliva artificial (1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,9 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,13 M KCl e 5 mM  $\text{NaN}_3$  tamponado em pH 7,0 com tampão HEPES) a 37°C. Após 7 e 14 dias, foram realizadas novas aferições do módulo de elasticidade. As soluções de armazenamento foram trocadas diariamente.

#### 2.5- Mensuração de Massa

As mesmas barras utilizadas para aferição do módulo de elasticidade foram aferidas antes e após a sua biomodificação com uma balança analítica de precisão de cinco casas decimais (precisão: 0,01mg, AUX-220, Shimadzu®, Tóquio, Japão). Antes da medição, as amostras foram desidratadas em um dessecador a vácuo contendo sílica coloidal, durante 24 horas à temperatura ambiente e avaliados após 7 e 14 dias de armazenamento<sup>22</sup>.

#### 2.6- Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Barras com espessuras semelhantes à descrita nos tópicos anteriores foram preparadas para análise qualitativa (n=3) em espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier a vácuo (VERTEX 70v, Bruker Analytical, Madison, WI, EUA). Antes da leitura, os espécimes foram dessecados por 24 horas. A medida constituiu na

aquisição de um espectro de absorvância na região entre 4000-400 $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 0,5  $\text{cm}^{-1}$  e 32 varreduras para cada espectro adquirido. As leituras foram realizadas na região central dos espécimes, garantindo completa cobertura do cristal.

### 2.7- Espectroscopia Raman (FT-Raman)

Os mesmos espécimes submetidos à FT-IR foram submetidos à análise qualitativa em FT-Raman (Vertex 70-RAM II, Bruker Analytical, Madison, WI, EUA), atuando, assim, como uma análise complementar. Para tanto, foi utilizado um laser de comprimento de onda de 1064 nm com tempo de 120 minutos de aquisição e espectro de 0-4000  $\text{cm}^{-1}$ . A área selecionada para leitura situava-se no centro do espécime. Todas as leituras foram realizadas em ambiente protegido da penetração de luz.

### 2.8- Análise Estatística

Para análise estatística dos dados quantitativos, foi realizado um teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e, para comparação entre os grupos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) a dois critérios por medidas repetidas. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de Tukey (SigmaPlot 14.0, Chicago, IL, EUA). Em todas as situações, foi adotado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS

Quando analisados os resultados de módulo de elasticidade dentro de um mesmo grupo, pode-se observar que todos os grupos-teste promoveram aumento no módulo de elasticidade imediatamente após biomodificação. O grupo tratado com solução ácida não foi efetivo em manter o módulo de elasticidade estável após biomodificação, sendo observados decréscimos constantes após 7 e 14 dias de armazenamento. Analisando o grupo tratado com ESU dissolvida em solvente alcalino, notou-se um aumento no módulo após biomodificação ( $p < 0,001$ ). Entretanto, o ME apresentou redução após 7 dias ( $p < 0,001$ ) e não houve diferença estatística entre 7 e 14 dias ( $p = 0,984$ ). Quando analisados os diferentes grupos dentro de um mesmo período, pode-se notar que o grupo dissolvido em meio ácido apresentou maior aumento no módulo de elasticidade, que, após 14 dias, igualou-se ao grupo imerso em solução alcalina ( $p = 0,971$ ). O grupo, cujo meio foi estabilizado em solução neutra, igualou-se ao grupo controle após 7 dias de armazenamento ( $p = 0,743$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Média (DP) dos valores de módulo de elasticidade, em MPa, das barras de dentina submetidas à imersão em solução de extrato de semente da uva estabilizada em diferentes pHs.

	Inicial	Tratamento	7 dias	14 dias
<b>Controle</b>	1,41 (0,34)Aa	1,53 (0,50)Da	1,70(0,47)Ca	0,96(0,43)Ba
<b>Ácido</b>	1,01 (0,35)Ad	19,37 (3,12)Aa	12,21 (3,81)Ab	5,03(0,78)Ac
<b>Neutro</b>	1,22 (0,47)Ab	6,84(0,94)Ca	2,52(0,68)BCb	1,46(0,52)Bb
<b>Básico</b>	1,11 (0,24)Ac	10,45(1,59)Ba	4,37(0,96)Bb	4,67(0,90)Ab

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas em coluna ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas em linha ( $p < 0,05$ ).

Quando analisados os valores de massa, podemos observar que, após a biomodificação, o grupo tratado com solução ácida apresentou peso superior ao grupo controle ( $p < 0,001$ ), diferença também observada após 14 dias ( $p = 0,005$ ). Não foram observadas diferenças de massa entre os grupos biomodificados dentro de um mesmo período de avaliação (Tabela 2).

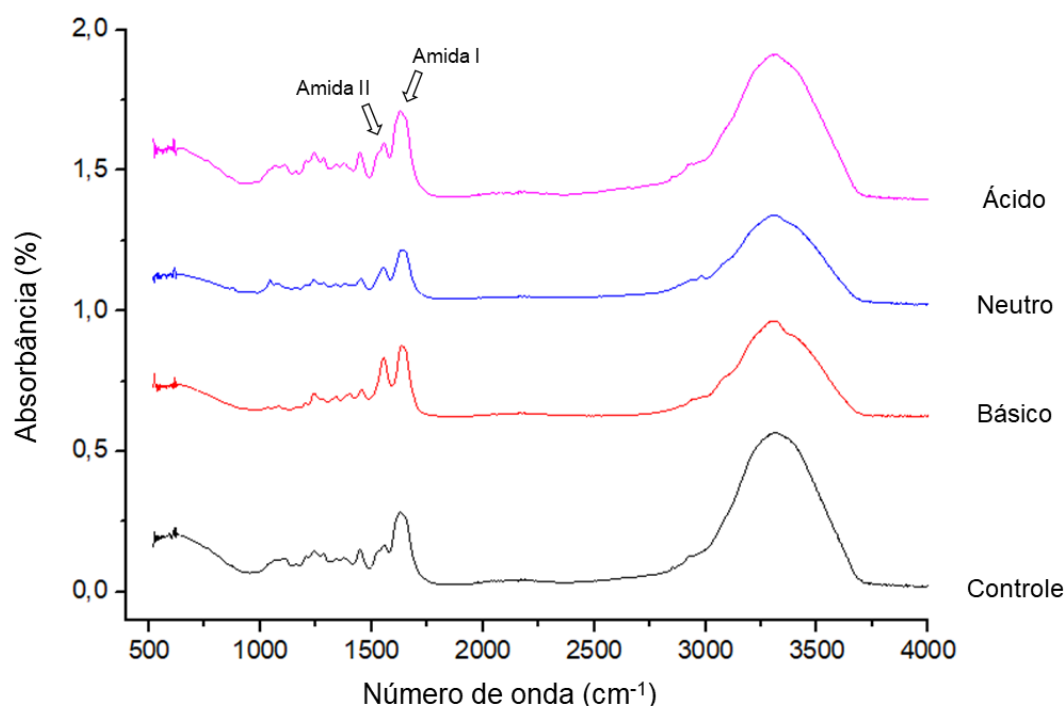
**Tabela 2.** Média (DP) dos valores de massa,  $10^{-4}$ g, das barras de dentina submetidas à imersão em solução de extrato de semente da uva estabilizada em diferentes pHs.

	Inicial	Tratamento	7 dias	14 dias
<b>Controle</b>	38,41(5,36)Aa	34,92(5,77)Ba	33,96(5,33)Aa	33,35(5,03)Ba
<b>Ácido</b>	37,31 (3,70)Ab	43,77(4,41)Aa	39,15 (3,96)Aab	40,16(3,81)Aab
<b>Neutro</b>	37,01 (5,21)Aa	38,81 (5,50)ABa	35,14 (4,65)Aa	34,93 (5,11)ABa
<b>Básico</b>	36,61(3,63)Aa	38,86(3,52)ABa	36,31(3,04)Aa	35,45(4,00)ABa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas em coluna ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas em linha ( $p < 0,05$ ).

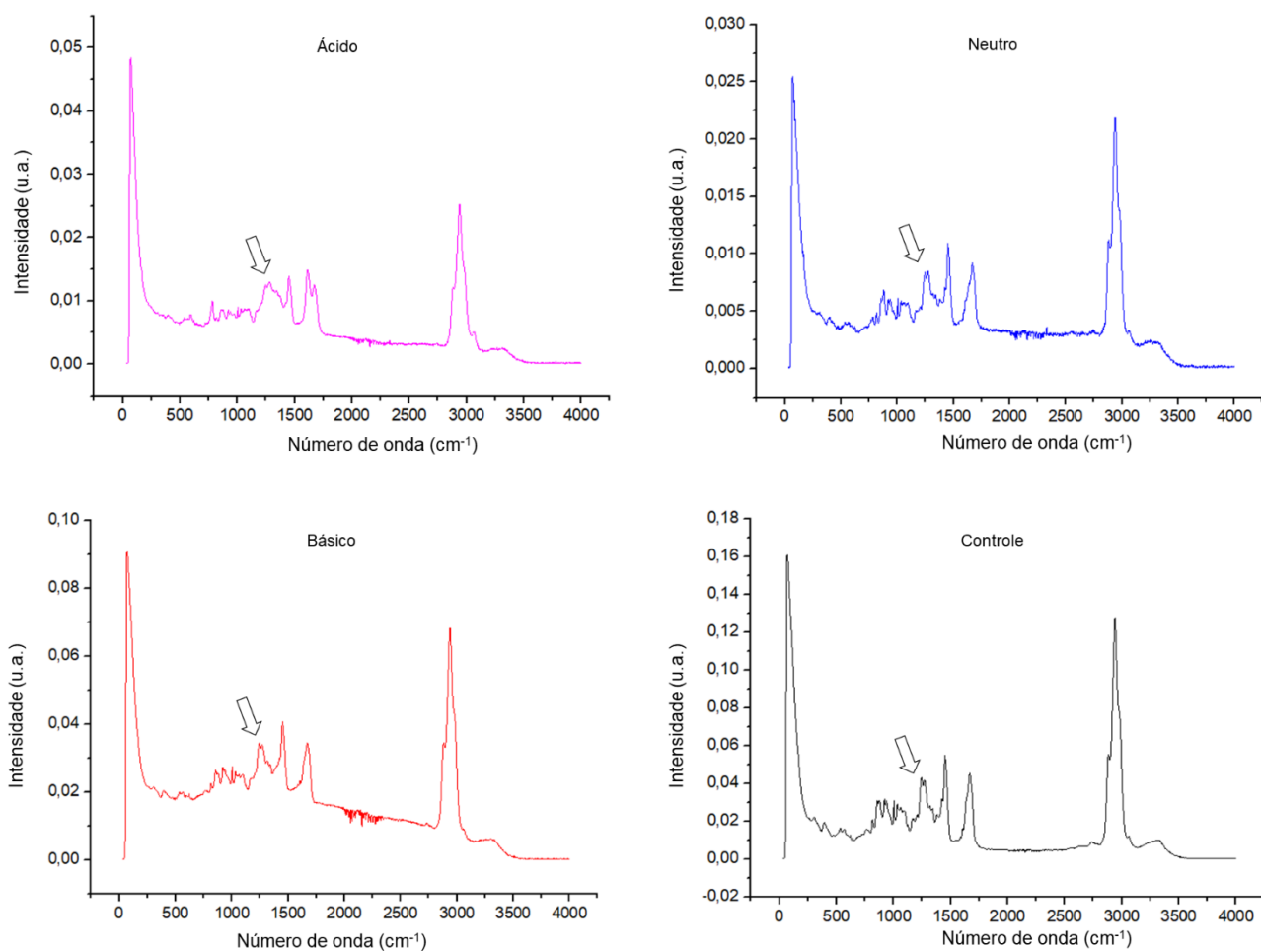
Quando analisados os espectros referentes à espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), pode-se notar que o grupo imerso em extrato de semente da uva dissolvido em solução alcalina apresentou um aumento do pico referente à amida II ( $\sim 1560 \text{ cm}^{-1}$ ). Nota-se, também, uma diminuição do pico localizado entre  $3200\text{-}3600 \text{ cm}^{-1}$ , indicando redução no número de grupos hidroxila livres (O-H). A ausência de picos entre  $500\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) indica completa desmineralização dos espécimes testados (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Espectroscopia Infravermelho por transformada Fourier das barras de colágeno após tratamento com as respectivas soluções testadas.



Quando analisados os gráficos de espectroscopia Raman (FT-Raman), pode-se constatar condições semelhantes às observadas em FT-IR, porém, nessa análise, nota-se o pico referente à amida III (~1240  $\text{cm}^{-1}$ ) mais destacado, o qual se apresenta pouco evidente na análise anterior. Nota-se que, no grupo tratado com solução ácida, houve diminuição e deslocamento desse pico para regiões mais próximas a 1500  $\text{cm}^{-1}$  (Gráfico 2).

**Gráfico 2.** Espectroscopia Raman das barras de colágeno após tratamento com as respectivas soluções testadas (setas abertas indicam picos referentes à amida III).





#### 4. DISCUSSÃO

Sabe-se que as diferentes características de um solvente, dentre elas o pH, podem influenciar diretamente na ação dos ALC, como relatado em um estudo prévio<sup>23</sup>. Porém tal estudo se utilizou de um agente sintético. Nenhum relato anterior avaliou a influência do pH sobre a interação entre as PACs e o colágeno dentinário. O estabelecimento de um pH ideal possibilita a implementação de uma técnica previsível e otimizada. A escolha da PAC como agente biomodificador, no presente estudo, justificou-se pela elevada solubilidade em água nos três pHs testados, além de apresentar comprovada ação biomodificadora. Diversos outros polifenóis se apresentam bastante solúveis em soluções alcalinas (ácido elágico, hesperidina, apigenina), entretanto, apresentam solubilidade limitada em solventes neutros, como a água. Logo, faz-se necessário investigar se o pH pode influenciar a interação entre colágeno e agentes biomodificadores, ampliando-se, portanto, a diversidade de polifenóis que podem ser aplicados para tal finalidade.

Deve-se ressaltar que o extrato da semente da uva apresenta uma variedade muito grande de polifenóis, pois se podem notar aglomerações e formação de agregados complexos, sendo apresentadas 64 estruturas diferentes. Esses aglomerados podem apresentar propriedades diferentes, de acordo com o solvente utilizado, sendo diversos deles insolúveis em solventes orgânicos. As PACs poliméricas, por exemplo, possuem dificuldades significativas de solubilização em solventes orgânicos polares<sup>24</sup>.

Quando analisados os valores de módulo de elasticidade, pode-se observar que o grupo tratado com solução ácida apresentou resultados superiores aos demais, imediatamente após à biomodificação, rejeitando-se a primeira hipótese do estudo. Assim sendo, esse resultado corrobora com os achados de Liu et al.<sup>20</sup>, que confirmaram que a PAC pode, efetivamente, interligar o colágeno e melhorar sua estabilidade biológica quando utilizada em solução ácida. Notou-se, também, que o grupo controle se manteve inalterado durante todo o período testado, fato não observado nos demais grupos. Portanto, a diminuição no módulo de elasticidade, após armazenagem, não ocorreu por degradação do colágeno, mas sim por hidrólise das ligações formadas durante a reticulação. Diversos estudos, com metodologias semelhantes, fazem uso de collagenases para estimular a degradação das fibrilas de colágeno<sup>8,25,26</sup>, no entanto, a adição dessas enzimas não nos permite inferir se o decréscimo no módulo de elasticidade provém de

perda de novas ligações cruzadas ou da degeneração de ligações pré-existentes na fibrila de colágeno.

O decréscimo do ME, após 7 dias de armazenamento, observado em todos os grupos-teste, pode ser explicado, pois, no extrato de semente da uva, encontramos uma grande variedade de PACs, podendo apresentar grupamentos galoil ou não. Esses grupamentos parecem promover uma ligação inicial intensa, porém sofrem processos de hidrólise nas ligações ésteres. Já as moléculas não-galoiladas permanecem estáveis por períodos maiores de tempo, embora apresentem menor reatividade<sup>21,27</sup>. Após 14 dias de imersão do colágeno dentinário em saliva artificial, pode-se notar que os grupos tratados com soluções ácidas e alcalinas foram efetivos em manter o módulo elevado em comparação ao *baseline*, portanto, sugere-se que ambas as soluções podem ser utilizadas para reticulação de colágeno. Outro achado importante se refere ao grupo tratado com solução ácida, em que se nota que o mesmo não se manteve estável nos períodos testados, diferente dos demais grupos-teste. Especula-se que esse fato ocorreu, pois o meio ácido pode promover a quebra de ligações interflavonas do tipo B encontrados na PAC<sup>6,27</sup>, sendo essas ligações menos estáveis em pHs baixos, prejudicando, assim, a atividade deste polifenol<sup>28,29</sup>.

Embora o presente estudo tenha se utilizado de concentrações bastante reduzidas de NaOH, faz-se necessário observar que soluções com pH muito elevados podem apresentar efeitos deletérios sobre a polpa, devendo-se tomar as devidas precauções para evitar o contato direto da solução sobre tecido conjuntivo, logo, sugere-se a neutralização parcial da solução com a utilização de ácidos fracos antes de uma possível aplicação clínica<sup>30</sup>. É importante salientar que as PAC são biocompatíveis e podem promover uma mineralização em nível intrafibrilar e interfibrilar por meio estimulação celular<sup>31-33</sup>.

Quanto à massa das amostras, não se notou variações estatisticamente significantes nos grupos neutro, básico e controle entre os diferentes tempos de aferição. Esse fato se deve às grandes dimensões dos corpos de prova e o baixo índice de degradação do colágeno, o que torna a variação de massa reduzida. A espessura do espécime (0,5mm) também explica o longo tempo de aplicação da substância testada (1 hora), tendo em vista que não condiz com um tempo clinicamente aplicável, porém, em condições clínicas, espera-se camadas de colágeno exposto em escalas micrométricas, sendo esse distanciamento da realidade clínica uma limitação do presente estudo. Como achado

secundário, destaca-se a grande pigmentação promovida pela utilização do extrato de semente de uva, sendo mais intenso nos grupos tratados com soluções ácidas e alcalinas, fato também relatado por Moreira e colaboradores (2017)<sup>4</sup>.

Os espectros de FT-IR e FT-Raman podem ser correlacionados diretamente com a conformação das moléculas de colágeno. Portanto, esses métodos são constantemente aplicados para verificar as alterações na estrutura do colágeno após a reticulação. Os picos de absorção da estrutura clássica do colágeno são denominados amida A, amida B, amida I, amida II e amida III. O pico referente à amida I em  $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$  está associado, predominantemente, com as vibrações de alongamento dos grupos  $\text{C} = \text{O}$  e o pico referente à amida II em  $\sim 1560 \text{ cm}^{-1}$  se deve, principalmente, a vibrações de flexão N-H acopladas a vibrações de alongamento C-N e flexão de  $\text{CH}_2$ . Além disso, o pico referente à amida III a  $\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$  surge, predominantemente, do alongamento C-N, vibrações de flexão N-H e vibrações agitadas de grupos  $\text{CH}_2$  na cadeia principal da glicina e nas cadeias laterais da prolina. Esses três picos são a melhor forma de evidenciar a existência de formação de ligações cruzadas no colágeno. Após reticulação, o pico de absorção da amida II será mais forte, enquanto o pico de absorção da amida I permanecerá inalterado<sup>34</sup>, portanto, a relação entre o pico de amida I e II indica a quantidade de ligações formadas durante o processo de reticulação. No grupo tratado com solução alcalina, pode-se observar que a razão entre os picos se altera, notavelmente, evidenciando que essa solução possibilitou a formação de maior número de ligações cruzadas.

Avaliando-se os gráficos de FT-IR e FT-Raman, observaram-se resultados semelhantes aos encontrados por Liu et al<sup>20</sup>. Pode-se observar que houve um aumento do pico de amida II no grupo tratado com solução alcalina, esse fato pode ser atribuído ao anel aromático C-C que se estica no PAC a  $\sim 1517 \text{ cm}^{-1}$ , indicando que ocorre uma interação entre as ligações terminais dos aminoácidos e o polifenol testado. Em FT-IR, pode se observar uma diminuição nos picos de amida III ( $\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$ ) nos grupos neutro e alcalino. Nenhuma literatura atribuiu claramente o pico a  $\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$  a modos de vibração específicos, mas evidências experimentais indicaram que isso pode ocorrer devido à curvatura do  $\text{CH}_2$  de resíduos de glicina<sup>35</sup>, bem como ao alongamento simétrico das cadeias laterais de carboxilato ( $\text{COO}^-$ ), a partir de resíduos de glutamato e aspartato. Já a redução do pico localizado entre  $3200\text{-}3600 \text{ cm}^{-1}$ , nos grupos neutro e alcalinos, indica uma diminuição de ligações O-H livres, o que pode ser atribuído a uma redução na quantidade de água presente na amostra. Esse é um efeito desejado, pois a aproximação

entre as moléculas da cadeia de tripla-hélice impede o acúmulo de água nessa região por impedimento estérico, logo, com menor quantidade de água, espera-se também uma maior estabilidade das ligações formadas<sup>20</sup>. Em FT-Raman, notou-se uma alteração no pico referente à amida III no grupo imerso em solução ácida, fato não observado em FT-IR, indicando que a complementação entre as metodologias é essencial para uma correta análise das ligações presentes no colágeno<sup>36</sup>. Tendo em vista a variação na presença de picos, pode-se inferir que a segunda hipótese também foi negada.

Embora o presente estudo não tenha avaliado a ação enzimática sobre o colágeno, sabe-se que o uso de ESU pode inibir a ação de enzimas colagenolíticas, como metaloproteinases de matriz<sup>37</sup>, enzimas essas que são ativadas em ambiente ácido<sup>38</sup>, desse modo, acredita-se que a utilização de soluções alcalinas pode reduzir a degradação por essa via, porém novos estudos devem ser realizados para confirmar essa atividade. Outra questão relevante é a grande heterogeneidade da dentina em condições clínicas, o que acarreta variáveis não analisadas no estudo como o efeito tamponante do fluido dentinário sobre a solução e a interferência na polimerização de monômeros adesivos, especialmente, quando utilizadas altas concentrações de PAC<sup>39</sup>. Portanto, sugere-se a realização de ensaios clínicos para verificação da real efetividade de tal tratamento. Por fim, sugere-se a realização de testes imaginológicos, como microscopia eletrônica de transmissão, para verificar possíveis alterações na estrutura do colágeno dentinário.

## **5. CONCLUSÃO**

Após análise dos resultados, podemos concluir que o pH da solução influencia diretamente na ação do extrato de semente da uva (ESU), sendo encontrados resultados promissores em soluções alcalinas, pois melhoram as propriedades mecânicas do colágeno e se mantêm estáveis após 14 dias de armazenamento.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Pashley DH., Tay FR., Breschi L., Tjäderhane L., Carvalho RM., Carrilho M., et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 2011 Jan;27(1):1–16. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016>.
2. Takamizawa T., Imai A., Hirokane E., Tsujimoto A., Barkmeier WW., Erickson RL., et al. SEM observation of novel characteristic of the dentin bond interfaces of universal adhesives. *Dent Mater.* 2019 Dec;35(12):1791–804. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.10.006>.
3. Scheffel DLS., Bianchi L., Soares DG., Basso FG., Sabatini C., de Souza Costa CA., et al. Transdental cytotoxicity of carbodiimide (EDC) and glutaraldehyde on odontoblast-like cells. *Oper Dent.* 2015;40(1):44–54.
4. Moreira MA., Souza NO., Sousa RS., Freitas DQ., Lemos M V., De Paula DM., et al. Efficacy of new natural biomodification agents from Anacardiaceae extracts on dentin collagen cross-linking. *Dent Mater.* 2017 Oct;33(10):1103–9. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.07.003>.
5. Macedo G V., Yamauchi M., Bedran-Russo AK. Effects of chemical cross-linkers on caries-affected dentin bonding. *J Dent Res.* 2009;88(12):1096–100.
6. Phansalkar RS., Nam J-W., Chen S-N., McAlpine JB., Napolitano JG., Leme A., et al. A galloylated dimeric proanthocyanidin from grape seed exhibits dentin biomodification potential. *Fitoterapia.* 2015;101:169–78.
7. Vidal CMP., Aguiar TR., Phansalkar R., McAlpine JB., Napolitano JG., Chen S-N., et al. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta Biomater.* 2014 Jul;10(7):3288–94. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.036>.
8. Aguiar TR., Vidal CMP., Phansalkar RS., Todorova I., Napolitano JG., McAlpine JB., et al. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *J Dent Res.* 2014 Apr;93(4):417–22. <https://doi.org/10.1177/0022034514523783>.
9. Hass V., Luque-Martinez IV., Gutierrez MF., Moreira CG., Gotti VB., Feitosa VP., et al. Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dent Mater.* 2016;32(6):732–41. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.03.008>.
10. de Souza LC., Rodrigues NS., Cunha DA., Feitosa VP., Santiago SL., Reis A., et

- al. Two-year clinical evaluation of proanthocyanidins added to a two-step etch-and-rinse adhesive. *J Dent*. 2019;81:7–16.
11. Aydin B., Hassan LS., Bedran-Russo AK., Viana G. Assessing collagen and micro-permeability at the proanthocyanidin-treated resin-dentin interface. *J Adhes Dent*. 2016;18(6):529–34. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a37359>.
  12. Vidal CMP., Aguiar TR., Phansalkar R., McAlpine JB., Napolitano JG., Chen SN., et al. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta Biomater*. 2014;10(7):3288–94. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.036>.
  13. Leme-Kraus AA., Aydin B., Vidal CMP., Phansalkar RM., Nam JW., McAlpine J., et al. Biostability of the Proanthocyanidins-Dentin Complex and Adhesion Studies. *J Dent Res*. 2017;96(4):406–12. <https://doi.org/10.1177/0022034516680586>.
  14. Balalaie A., Rezvani MB., Mohammadi Basir M. Dual function of proanthocyanidins as both MMP inhibitor and crosslinker in dentin biomodification: A literature review. *Dent Mater J*. 2018:173–82. <https://doi.org/10.4012/dmj.2017-062>.
  15. Bedran-Russo AK., Pauli GF., Chen SN., McAlpine J., Castellan CS., Phansalkar RS., et al. Dentin biomodification: Strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater*. 2014;30(1):62–76. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.10.012>.
  16. Tjaderhane L., Nascimento FD., Breschi L., Mazzoni A., Tersariol ILS., Geraldini S., et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater*. 2013 Jan;29(1):116–35. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.08.004>.
  17. Pierpoint WS. o-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides. *Biochem J*. 1969;112(5):609–16.
  18. Han B., Jaurequi J., Tang BW., Nimni ME. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res Part A An Off J Soc Biomater Japanese Soc Biomater Aust Soc Biomater Korean Soc Biomater*. 2003;65(1):118–24.
  19. Martins CR., Lopes WA., Andrade JB de. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Quim Nova*. 2013;36(8):1248–55. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000800026>.

20. 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 Apr;29(4):485–92. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.01.013>.
21. Leme-Kraus AA., Phansalkar RS., dos Reis MC., Aydin B., Sousa ABS., Alania Y., et al. Dimeric Proanthocyanidins on the Stability of Dentin and Adhesive Biointerfaces. *J Dent Res.* 2019 Dec:002203451989295. <https://doi.org/10.1177/0022034519892959>.
22. Aguiar TR., Vidal CMP., Phansalkar RS., Todorova I., Napolitano JG., McAlpine JB., et al. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *J Dent Res.* 2014 Apr;93(4):417–22. <https://doi.org/10.1177/0022034514523783>.
23. Ekambaram M., Yiu CKY., Matinlinna JP. Effect of solvents on dentin collagen cross-linking potential of carbodiimide. *J Adhes Dent.* 2015;17(3):219–26. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a34137>.
24. Bedran-Russo AKB., Castellan CS., Shinohara MS., Hassan L., Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. *Acta Biomater.* 2011 Apr;7(4):1735–41. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.013>.
25. Nagaoka H., Nagaoka H., Walter R., Boushell LW., Miguez PA., Burton A., et al. Characterization of genipin-modified dentin collagen. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
26. Liu Y., Bai X., Li S., Liu Y., Keightley A., Wang Y. Molecular weight and galloylation affect grape seed extract constituents' ability to cross-link dentin collagen in clinically relevant time. *Dent Mater.* 2015;31(7):814–21.
27. Aydin B., Leme-Kraus AA., Vidal CMP., Aguiar TR., Phansalkar RS., Nam JW., et al. Evidence to the role of interflavan linkages and galloylation of proanthocyanidins at sustaining long-term dentin biomodification. *Dent Mater.* 2019;35(2):328–34. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.11.029>.
28. Xu Z., Wei L., Ge Z., Zhu W., Li C. Comparison of the degradation kinetics of A-type and B-type proanthocyanidins dimers as a function of pH and temperature. *Eur Food Res Technol.* 2015;240(4):707–17.
29. De-Paula DM., Lomonaco D., Ponte AMP., Cordeiro KE., Moreira MM., Mazzetto SE., et al. Influence of collagen cross-linkers addition in phosphoric acid on dentin biomodification and bonding of an etch-and-rinse adhesive. *Dent Mater.* 2019.
30. Xu W., Hong Y., Song A., Hao J. Peptide-assembled hydrogels for pH-controllable



- drug release. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2020;185(June 2019):110567. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110567>.
31. Epasinghe DJ., Burrow MF., Yiu CKY. Effect of proanthocyanidin on ultrastructure and mineralization of dentine collagen. *Arch Oral Biol*. 2017 Dec;84(August 2016):29–36. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.09.012>.
  32. dos Santos AF., Pacheco JM., Silva PAO., Bedran-Russo AK., Rezende TMB., Pereira PNR., et al. Direct and transdental biostimulatory effects of grape seed extract rich in proanthocyanidin on pulp cells. *Int Endod J*. 2019;52(4):424–38. <https://doi.org/10.1111/iej.13019>.
  33. Kulakowski D., Leme-Kraus AA., Nam J., McAlpine J., Chen S-N., Pauli GF., et al. Oligomeric proanthocyanidins released from dentin induce regenerative dental pulp cell response. *Acta Biomater*. 2017;55:262–70.
  34. Du T., Niu X., Li Z., Li P., Feng Q., Fan Y. Crosslinking induces high mineralization of apatite minerals on collagen fibers. *Int J Biol Macromol*. 2018;113(2017):450–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.136>.
  35. Boryskina OP., Bolbukh T V., Semenov MA., Gasan AI., Maleev VY. Energies of peptide-peptide and peptide-water hydrogen bonds in collagen: Evidences from infrared spectroscopy, quartz piezogravimetry and differential scanning calorimetry. *J Mol Struct*. 2007;827(1–3):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2006.05.002>.
  36. Tonhi E., Plepis AM de G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. *Quim Nova*. 2002.
  37. Khaddam M., Salmon B., Le Denmat D., Tjaderhane L., Menashi S., Chaussain C., et al. Grape seed extracts inhibit dentin matrix degradation by MMP-3. *Front Physiol*. 2014;5(OCT):1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00425>.
  38. Mazzoni A., Tjaderhane L., Checchi V., Di Lenarda R., Salo T., Tay FR., et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015 Feb;94(2):241–51. <https://doi.org/10.1177/0022034514562833>.
  39. Fawzy AS., Priyadarshini BM., Selvan ST., Lu TB., Neo J. Proanthocyanidins-Loaded Nanoparticles Enhance Dentin Degradation Resistance. *J Dent Res*. 2017 Jul;96(7):780–9. <https://doi.org/10.1177/0022034517691757>.

## *Capítulo II*

---

## **AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIOMODIFICAÇÃO DO COLÁGENO POR DIFERENTES POLIFENÓIS DE ORIGEM NATURAL**

LEMOS MVS<sup>1</sup>, MENDES TAD<sup>1</sup>, LOURENÇO GA<sup>1</sup>, MOTA ALM<sup>1</sup>, SANTIAGO SL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>- Alunos do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

<sup>2</sup>- Professor Titular do Departamento de Odontologia Restauradora da Universidade Federal do Ceará.

### **Autor de correspondência:**

Sérgio Lima Santiago, Dr

Programa de Pós-graduação em Odontologia

Rua Monsenhor Linhares, S/N, Fortaleza, Ceará

e-mail: sergiosantiago@yahoo.com

## AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIOMODIFICAÇÃO DO COLÁGENO POR DIFERENTES POLIFENÓIS DE ORIGEM NATURAL

### Resumo

*Objetivo:* O objetivo do presente estudo foi comparar a capacidade de formações de ligações cruzadas em colágeno dentinário entre ácido elágico (AE), hesperidina (HPN), apigenina (APG) e curcumina (CM), identificando as concentrações mais efetivas de aplicação [20 $\mu$ M (p/v); 200 $\mu$ M (p/v) e 2mM (p/v)], assim como verificar a influência dessas soluções sobre a união em dentina quando utilizadas como pré-tratamento. Utilizou-se extrato da semente da uva a 6,5% e água destilada, como controles positivo e negativo, respectivamente.

*Métodos:* Para estabelecimento da concentração ideal, realizou-se os testes de flexão de 3 pontos (n=10), variação de massa (n=10) e espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier. Para tanto foram confeccionadas barras de dentina desmineralizada (0,5x1,7x6,0mm). Posteriormente, realizou-se os testes de resistência de união, nanoinfiltração e micropermeabilidade, utilizando-se, respectivamente, uma máquina de ensaios universais, microscópio eletrônico de varredura e microscópio confocal a laser.

*Resultados:* Quando analisados os resultados de flexão, pode-se observar que todas as substâncias testadas foram efetivas em elevar o módulo de elasticidade na concentração de 2mM. Comparando-se os valores de variação de massa entre os diferentes grupos, dentro de uma mesma concentração, pode-se notar que todos os grupos tratados com polifenóis apresentaram aumento significativo em relação ao controle, independente da concentração testada, exceto o HPN a 20 $\mu$ M. Todos os grupos-teste apresentaram um aumento dos picos referentes à amida I e à amida II. Avaliando-se os valores de resistência de união, pode-se notar que, após 6 meses de armazenamento, somente o grupo pré-tratado com AE e o controle positivo (extrato de semente da uva) foram efetivos em preservar a resistência de união. Após 6 meses de armazenamento, todos os grupos mostram alguma quantidade de prata próximo à interface, sendo a menor quantidade notada no grupo AE.

*Significância:* Pode-se concluir que todas as substâncias testadas apresentam potencial biomodificador, sendo a concentração de 2mM efetiva em promover tal reticulação. Quando avaliados os resultados referentes aos testes de união, o ácido elágico se mostrou efetivo em preservar a resistência de união, sendo esse um potencial agente biomodificador a ser utilizado em Odontologia restauradora.

**Palavras-chave:** Colágeno; Polifenóis; Dentina; Proantocianidinas.

## 1. INTRODUÇÃO

Ligação cruzada, ou reticulação polimérica, é um processo em que cadeias poliméricas são interligadas por ligações químicas formando uma rede tridimensional. Como resultado dessa reação, as estruturas tendem a perder sua fluidez e se tornam mais rígidas[1]. Quando aplicados junto ao colágeno tipo I, presente em dentina, algumas substâncias têm a capacidade de promover tal reticulação, tanto intrafibrilar, quanto interfibrilar[1]. Portanto, o uso de estratégias, como a biomodificação da dentina, com intuito de melhorar as propriedades mecânicas da camada híbrida e de reduzir a degradação das fibrilas colágenas, tem ganhado cada vez mais destaque e são recursos importantes na tentativa de estender a longevidade da união entre dentina e resina, uma vez que esse parece ser o elo de maior fragilidade em restaurações com compósitos resinosos[1–3] .

O uso de substâncias que promovem ligações cruzadas de colágeno é bastante difundido na Medicina[4] e nas indústrias de bens de consumo[5]. Em Odontologia restauradora, essas substâncias ainda apresentam aplicações clínicas limitadas, sendo divididas em sintéticas e naturais. Os agentes de ligações cruzadas de colágeno (ALC) sintéticos apresentam efeitos indesejados, como a alta citotoxicidade apresentada pelo glutaraldeído e o longo tempo de aplicação da carbodiimida[1].

Nesse contexto, existe uma busca crescente por ALCs naturais, sendo as proantocianidinas (PACs), extraídas da semente de uva (ESU), destacadas por apresentarem influência positiva sobre as propriedades físico-químicas da dentina, tais como: resistência à tração[6], dureza[4], módulo de elasticidade[7,8], resistência adesiva[9–11], resistência à biodegradação[12] e redução da desmineralização[13]. Entretanto, as PACs apresentam como principal desvantagem a pigmentação do substrato ao qual foi aplicado, o que torna sua utilização pouco atrativa em Odontologia estética, gerando uma busca por novos agentes naturais[8]. Dessa forma, diferentes polifenóis com estruturas químicas semelhantes às proantocianidinas poderiam atuar como agentes de ligações cruzadas[14], dentre esses, pode-se destacar o ácido elágico, a hesperidina, a apigenina e a curcumina (Figura 1).

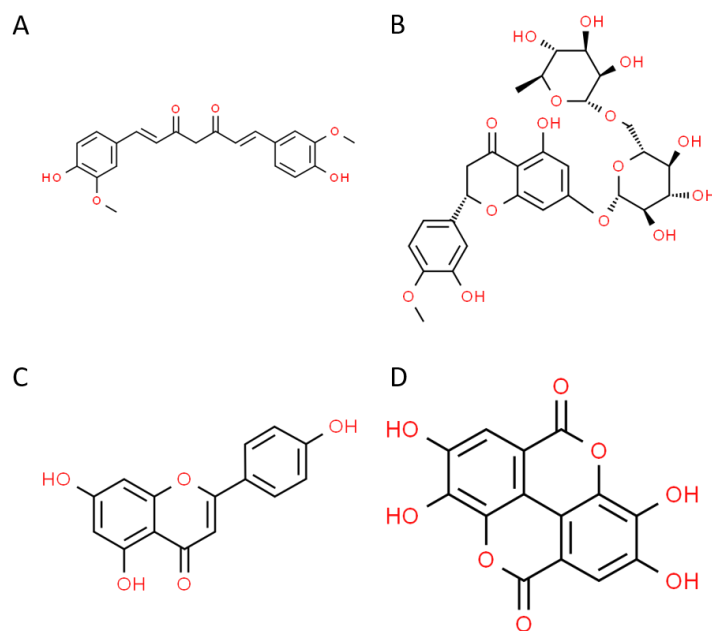


Fig. 1. Estruturas químicas dos polifenóis: (A) Curcumina, (B) Hesperidina, (C), Apigenina e (D) Ácido Elágico.

O ácido elágico (AE) é um flavonoide, normalmente produzido por plantas e formado como taninos, conhecido por elagitanino, contém dois grupos lactona e quatro grupos hidroxilas, nos quais o grupo hidroxila é conhecido por aumentar a atividade antioxidante na peroxidação lipídica e proteger as células dos danos oxidativos[15–18]. A hesperidina (HPN) é um flavonoide extraído de frutas cítricas. Os benefícios médicos desse flavonoide citrino incluem efeitos antioxidante, anti-inflamatório e anticarcinogênico[19–21]. Segundo Hiraishi et al.[19], a HPN tem capacidade de interagir com o colágeno, indicando que essa interação pode contribuir para a preservação do mesmo, protegendo-o da degradação por meio de collagenases. Outro flavonoide de origem natural, com características bioativas, é a apigenina (APG). Está abundantemente presente em frutas e vegetais, como a camomila e, por apresentar propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticarcinogênica, pode ser uma molécula promissora para a preservação da interface de união, tendo em vista que seu uso na Odontologia adesiva ainda não foi reportado [22,23]. Por fim, a curcumina (CM) é o principal componente bioativo da cúrcuma, tempero derivado dos rizomas de *Curcuma longa linn*. Devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, a curcumina desempenha um papel regulador benéfico significativo em várias condições patológicas, incluindo câncer, doença cardiovascular, doença de Alzheimer, distúrbios inflamatórios e distúrbios neurológicos[24,25]. Seseogullari-Dirihan et al.[26], em um estudo *in vitro*,

demonstraram que o pré-tratamento com uma solução de curcumina foi efetivo em preservar colágeno, assim como inibir a ação de collagenases, tais como metaloproteinases de matriz e cisteíno-catepsinas.

Embora todas as substâncias citadas acima se mostrem promissoras em Odontologia restauradora, não existem estudos na literatura comparando a capacidade de formações de ligações cruzadas de colágeno das substâncias citadas. Logo, o objetivo do presente estudo foi comparar a capacidade de formações de ligações cruzadas de colágeno entre ácido elágico, hesperidina, apigenina e curcumina e identificando as concentrações mais efetivas de aplicação, assim como verificar a influência dessas soluções sobre a união resina/dentina, quando utilizadas como pré-tratamento. Parte-se da hipótese de que todas as substâncias testadas apresentam impacto positivo no (1) módulo de elasticidade do colágeno, independente da concentração empregada e (2) na resistência de união de forma imediata e após seis meses de armazenamento.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Delineamento experimental**

Para a verificação do potencial biomodificador e das concentrações mais efetivas, utilizou-se os testes de flexão de 3 pontos (n=10) e variação de massa (n=10), empregando-se uma máquina de ensaios universais e balança de precisão, respectivamente. Além de análise qualitativa por meio de espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Os polifenóis utilizados foram curcumina; hesperidina; apigenina e ácido elágico; tendo, como controles, o extrato de semente da uva a 6,5% (controle positivo) e água destilada (controle negativo). Os mesmos foram avaliados nas concentrações de 20 $\mu$ M (p/v); 200 $\mu$ M (p/v) e 2mM (p/v). Após o estabelecimento da concentração mais efetiva de cada substância, realizou-se o teste de resistência de união, aferida em uma máquina de ensaios universais. Além dessas análises qualitativas de nanoinfiltração e microporabilidade, foram realizadas por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser, respectivamente.

### **2.2 Aspectos éticos**

Os dentes foram obtidos a partir de procedimentos cirúrgicos, com indicação de remoção alheia à pesquisa científica. Para tanto, o paciente precisaria apresentar, no mínimo, 01 (um) dente terceiro molar hígido, semi-incluso ou incluso. Foi considerado hígido o dente que, ao exame de inspeção visual, não apresentou trincas, desgastes ou lesões cariosas. Os termos utilizados seguiram as regulamentações do protocolo de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos, da Universidade Federal do Ceará, sob o número 3.212.734.

### **2.3 Preparo das soluções**

Os polifenóis foram dissolvidos nas respectivas concentrações [20 $\mu$ M (p/v); 200 $\mu$ M (p/v) e 2mM (p/v)] em NaOH 0,5M. Para tanto, as soluções foram mantidas sob constante agitação com o auxílio de um agitador magnético, por 1 hora, e protegidos da presença de luz. Em seguida, o pH foi parcialmente neutralizado com adição de ácido cítrico a 0,2M, após tal procedimento, o pH foi aferido (Tabela 1). Para o preparo da



solução do extrato de semente da uva (ESU), o extrato em pó foi pesado para preparo de 50 mL de solução à concentração de 6,5% (pH=4,42) e o mesmo foi dissolvido em água destilada, a solução foi mantida em agitador magnético por 1 hora à temperatura ambiente. Todas as soluções foram utilizadas imediatamente após o preparo.

## 2.4 Módulo de elasticidade

Um total de 140 barras de dentina, com 1,7 X 0,5 X 6,0 mm de dimensões, foram confeccionadas. Em seguida, os espécimes foram desmineralizados completamente em solução de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 10% durante o período de 5 horas, em temperatura ambiente. Posteriormente, as barras foram lavadas abundantemente e armazenadas em água destilada até a realização do teste de flexão. O módulo de elasticidade (ME) foi determinado em um ensaio de flexão de 3 pontos com uma célula de carga de 5,0 N, acoplada em uma máquina de ensaios mecânicos universal (Instron 3345; Instron Inc., Canton, MA, USA), com velocidade de 0,5 mm/min[8].

Imediatamente após a desmineralização, realizou-se o teste de flexão de três pontos, obtendo-se, assim, os valores iniciais de todas as barras de dentina. Posteriormente, os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em seus respectivos grupos (n=10). As barras foram imersas nas respectivas soluções durante 1 hora e foram novamente testadas, obtendo-se, dessa maneira, os valores de módulo de elasticidade após biomodificação.

Para análise de dados, os valores iniciais e finais foram inseridos na seguinte fórmula, a fim de se obter uma razão entre eles:  $x = \frac{ME \text{ após biomod.}}{ME \text{ inicial}}$ .

## 2.5 Variação de massa

As barras de dentina desmineralizadas foram pesadas antes (M<sub>1</sub>) e após (M<sub>2</sub>) a sua biomodificação, com uma balança analítica de precisão de 0,00001g (AUX-220, Shimadzu<sup>®</sup>, Tóquio, Japão). Todos os espécimes foram desidratados com o auxílio de um dessecador a vácuo contendo sílica coloidal, durante 24 horas à temperatura ambiente. A avaliação da variação de massa (VM%) foi determinada como a porcentagem de ganho ou perda de cada amostra com base na seguinte fórmula:

$$VM\% = \frac{(M_2 \times 100)}{M_1} - 100$$

Onde  $M_1$  é a massa matriz de dentina desmineralizada antes da biomodificação dentina e  $M_2$  é a massa de matriz da dentina biomodificada[8].

## **2.6 Espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier- FT-IR**

Barras de colágeno desmineralizadas (n=3), com dimensões semelhantes às descritas anteriormente, foram submetidas ao teste de espectroscopia por transformada de Fourier (FT-IR) em ambiente de vácuo antes e após a biomodificação. Antes da leitura, todos os espécimes foram armazenados em uma dessecadora a vácuo contendo sílica coloidal por um período de 24 horas. O espectro dos espécimes secos foi feito a partir de espectrômetro (Vertex 70V, Brunker, MA, EUA) na resolução de  $4\text{cm}^{-1}$ , em que foram anexados a uma placa de Reflectância Total Atenuada (ATR), com feixe de transmissão entre  $4000$  e  $400\text{cm}^{-1}$ .

## **2.7 Resistência de união**

Após seleção na concentração mais efetiva de cada polifenol, sessenta terceiros molares hígidos foram seccionados 2 mm acima e abaixo da junção amelo-cementária, a fim de expor a região de dentina intermediária. Posteriormente, a superfície dentinária foi desgastada com lixas de carbetto de sílcio de granulação 600 durante 30s, para padronizar a formação de *smear layer*. Os dentes seccionados foram analisados em lupa estereoscópica para verificar a presença de remanescentes de esmalte ou perfurações pulpares. Em seguida, foram condicionados por 15 segundos, utilizando-se ácido fosfórico a 37% (Densply, York, PA, EUA) e lavado abundantemente com água destilada pelo dobro do tempo. Aplicou-se  $10\mu\text{L}$  da solução de pré-tratamento, de acordo com cada grupo experimental e foi mantida durante 1 minuto, sendo agitada de forma ativa com o auxílio de um *microbrush*. A superfície foi levemente seca com papel absorvente. Foi então aplicado o adesivo (Adper Single Bond 2, 3M ESPE, CA, EUA), sendo realizada de forma ativa em duas camadas e, posteriormente, foi polimerizado por 40 segundos (Optilight Max, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Por fim, foi confeccionado um platô de resina (Z250, 3M ESPE, CA, EUA) de aproximadamente 5 mm de altura.

Após 24 horas armazenados em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , os dentes foram seccionados a fim de se obter barras de aproximadamente  $1\text{mm}^2$  de área em secção transversal. Aproximadamente metade das barras obtidos em cada dente, foram testados de forma

imediate e o restante foi armazenado em água destilada durante 6 meses para envelhecimento. O teste foi realizado em uma máquina de ensaios universais (DL200, EMIC, São José dos Pinhais, PA, Brasil), em uma velocidade de 0,5mm/min e célula de carga de 50kgf (leitura com resolução de 10gf).

As barras fraturadas foram avaliadas em lupa estereoscópica em aumento de 30x (Leica S8APO, Modelo MEB 115, Singapura), com a finalidade de estabelecer o tipo de fratura obtido, podendo ser classificado em fratura adesiva, mista, coesiva em resina e coesiva em dentina.

## **2.8 Teste de nanoinfiltração**

Foram selecionadas seis barras por grupos em cada tempo de envelhecimento. Os mesmos foram imersos em solução de nitrato de prata amoniacal e armazenados livres de luz por 24h. Em seguida, foram imersos em solução reveladora durante 8 horas sob luz intensa [27] e, posteriormente, foram lavados a fim de se eliminar a prata residual e embutidos em resina epóxica. O polimento seguiu o padrão de lixas de carbetto de silício 600, 1200 e 2000, além do polimento com feltro e pasta diamantada 1µm, sendo imersos em cuba ultrassônica por 5 minutos entre cada etapa.

Os espécimes foram desidratados em dessecadora a vácuo durante 24 horas e, posteriormente, metalizados para análise em microscópio eletrônico de varredura (Quanta 450 FEG, FEI Company, Hillsboro, OR, EUA). A interface de união foi avaliada em ampliações de 2000x e 5000x.

## **2.9 Teste de micropermeabilidade**

Três dentes por grupo foram restaurados com sistema adesivo incorporado com Rodamina-B a 0,1% e, subsequentemente, imersos em uma coluna de 15 cm de solução aquosa de fluoresceína a 0,3%, a fim de simular a pressão pulpar, durante 3 horas. Posteriormente, os dentes foram cortados em fatias e desgastados com lixas de carbetto de silício de granulação 600 durante dois minutos em cada lado. Em seguida, os espécimes foram avaliados por microscopia confocal à Laser (LM 710, Zeiss, Oberkochen, ALE) [28].

## **2.10 Análise estatística**

Para a verificação da distribuição normal dos dados, foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, para comparação entre os grupos, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) a dois fatores. Eventuais diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de Tukey (SigmaPlot 14.0, Chicago, IL, EUA). Em todas as situações, foi adotado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Para o teste de resistência de união, as barras, individualmente, foram adotados como unidades amostrais.

**Tabela 1. Agentes de ligações cruzadas utilizados no estudo.**

Agente	Grupo	pH	Pureza	Marca	N° Lote
<b>Curcumina</b>	20µM (p/v)	9,12	65% ( <i>Curcuma longa</i> )	Sigma Aldrich, EUA	MKCD2451
	200µM (p/v)	8,93			
	2mM (p/v)	8,77			
<b>Hesperidina</b>	20µM (p/v)	8,96	80% (citrus species)	Sigma Aldrich, EUA	SLBP3689V
	200µM (p/v)	8,92			
	2mM (p/v)	8,80			
<b>Apigenina</b>	20µM (p/v)	8,79	98% ( <i>Matricaria recutita</i> L.)	KAN Phytochemicals, Haryana, India	-----
	200µM (p/v)	8,85			
	2mM (p/v)	8,47			
<b>Ácido Elágico</b>	20µM (p/v)	8,82	95% (tree bark)	Sigma Aldrich, EUA	BCBV1619
	200µM (p/v)	8,76			
	2mM (p/v)	7,47			
<b>ESU</b>	6,5% (p/v)	4,87	95% Polifenóis ( <i>Vitis vinifera</i> )	GNC, Pittsburgh, PA, EUA	0602BQ1980

### 3. RESULTADOS

Quando analisados os dados de razão do módulo de elasticidade (Tabela 2), pode-se observar que, em todas as concentrações testadas, o grupo ESU foi superior aos demais grupos, exceto para AE a 2 mM ( $p=0,763$ ). Todos os grupos tratados com polifenóis, na concentração de 2 mM, foram superiores ao grupo controle negativo (água destilada - AD), sendo essa a concentração escolhida para realização dos testes de resistência de união. Analisando-se os tratamentos em separado, notou-se que, nos grupos CM, APG e AE, houve diferença significativa entre as concentrações de 20 $\mu$ M e 2Mm ( $p=0,002$ ;  $p=0,004$  e  $p<0,001$ , respectivamente), porém tal diferença não foi detectada no grupo HPN.

Comparando-se os valores de variação de massa entre os diferentes grupos dentro de uma mesma concentração, pode-se notar que todos os grupos tratados com polifenóis apresentaram aumento significativo em relação ao controle, independente da concentração testada, exceto o HPN a 20 $\mu$ M ( $p=0,055$ ). Quando comparado às diferentes concentrações dentro de um mesmo tratamento, pode-se observar que, em todos os grupos-teste, houve diferença entre as concentrações de 20 $\mu$ M e 2mM. Nos grupos CR, HPN e AE não foram observadas diferenças entre a variação quando comparados às concentrações 200 $\mu$ M e 2mM ( $p=0,647$ ;  $p=0,912$  e  $p=0,054$ , respectivamente).

Os resultados de FT-IR estão apresentados na Figura 2. Todos os grupos tratados com polifenóis, à exceção do ESU, apresentaram um aumento dos picos referentes à amida I (~1650  $\text{cm}^{-1}$ ) e à amida II (~1560  $\text{cm}^{-1}$ ). No grupo ESU, observou-se um aumento do pico referente à amida III (~1250  $\text{cm}^{-1}$ ), achado não observado nos demais grupos. Nota-se, em todos os grupos, uma diminuição do pico localizado entre 3200-3600  $\text{cm}^{-1}$ , indicando redução no número de grupos hidroxila livres (O-H), o que pode indicar uma redução na quantidade de água adsorvida na amostra. A ausência de picos entre 500-1000  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) indica completa desmineralização dos espécimes testados.

Avaliando-se os valores de resistência de união, testadas após 24 horas de armazenamento (Gráfico 1), pode-se notar que os grupos CM e HPN foram superiores ao grupo tratado com água destilada ( $p<0,001$ , para ambas as comparações). Após 6 meses de armazenamento, somente os grupos AE, HPN e ESU apresentaram resultados superiores ao controle negativo ( $p<0,001$ , para as três comparações). Quando comparados os diferentes períodos dentro de um mesmo grupo, pode-se observar que somente os

grupos pré-tratados com AE e ESU foram efetivos em preservar a resistência de união após 6 meses ( $p=0,658$  e  $p=0,053$ , respectivamente). Em todos os grupos testados, houve predominância de fraturas adesivas (Gráficos 2).

Pode-se observar que não houve infiltração de prata nos espécimes pré-tratados com curcumina, hesperidina, ácido elágico e extrato de semente da uva quando avaliados de forma imediata (Figura 3 - B1, C1, D1 e F1). Já nos grupos apigenina e controle negativo, foi detectada a presença de prata próxima à interface de união (Figura 3 - A1 e E1). Após 6 meses de armazenamentos, todos os grupos mostram alguma quantidade de prata próxima à interface, sendo a menor quantidade notada no grupo AE (Figura 3 - F2 e F3). Os grupos APG e controle negativo apresentaram fendas após 6 meses de envelhecimento (Fig.3–A2 e E2).

Observando-se os achados de micropermeabilidade (Fig. 4), pode-se notar que os grupos pré-tratados com curcumina, hesperidina e ácido elágico apresentaram uma zona de proteção, em que se verifica uma separação entre a fluoresceína infiltrada e a camada de adesivo. Já nos grupos controle negativo, apigenina e extrato de semente da uva, nota-se uma grande aproximação entre os corantes, indicando pouco ou nenhum vedamento.

**Tabela 2. Média (Desvio-padrão) da razão entre o módulo de elasticidade (MPa) após biomodificação/módulo de elasticidade inicial.**

	CN	ESU	Curcumina	Hesperidina	Apigenina	Ácido Elágico
<b>20µM</b>	1,11 (0,19)Ac	3,99 (1,01)Aa	1,77 (0,41)Bbc	1,48 (0,41)Abc	1,79 (0,31)Bbc	2,21 (0,52)Bb
<b>200µM</b>	1,11 (0,19)Ac	3,99 (1,01)Aa	2,20 (0,33)ABbc	1,85 (0,32)Ac	2,11 (0,40)ABbc	2,95 (0,69)ABb
<b>2mM</b>	1,11 (0,19)Ad	3,99 (1,01)Aa	2,97 (0,54)Abc	2,27 (0,25)Ac	2,89 (0,68)Abc	3,54 (0,65)Aab

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas em coluna ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas em linha ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3. Variação de massa (Desvio-padrão), em porcentagem (%), após biomodificação.**

	CN	ESU	Curcumina	Hesperidina	Apigenina	Ácido Elágico
<b>20µM</b>	0,43 (0,16)Ad	3,94 (1,32)Ab	1,86 (0,58)Bb	1,66 (0,40)Bcd	3,63 (0,63)Cbc	6,45 (1,06)Ba
<b>200µM</b>	0,43 (0,16)Ad	3,94 (1,32)Ac	7,36 (2,12)Ab	5,02 (0,97)Ac	10,02 (2,17)Aa	10,98 (1,68)Aa
<b>2mM</b>	0,43 (0,16)Ac	3,94 (1,32)Ab	8,02 (2,53)Aa	5,32 (1,37)Ab	7,52 (1,28)Ba	9,41 (2,95)Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas em coluna ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas em linha ( $p < 0,05$ ).



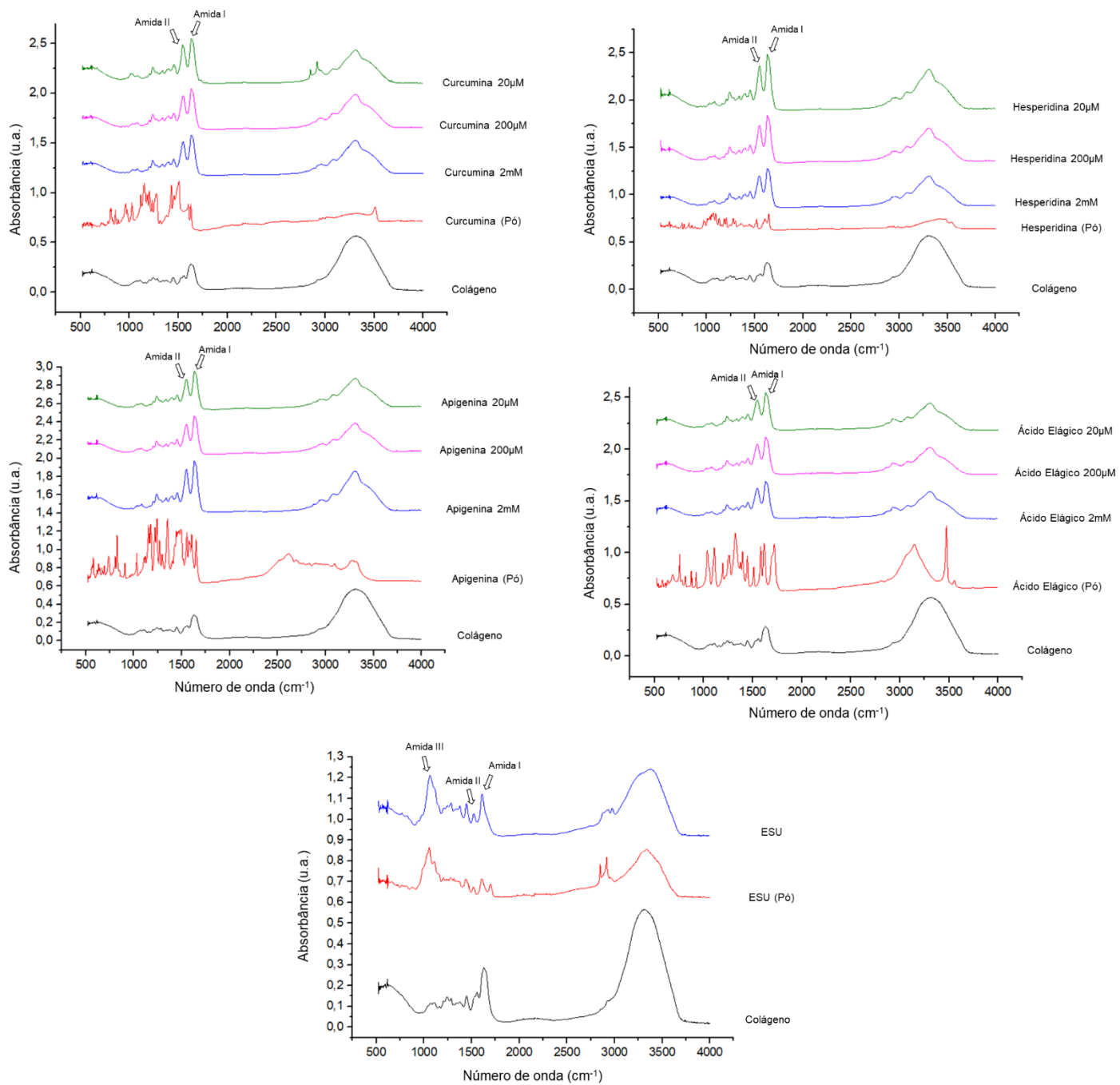
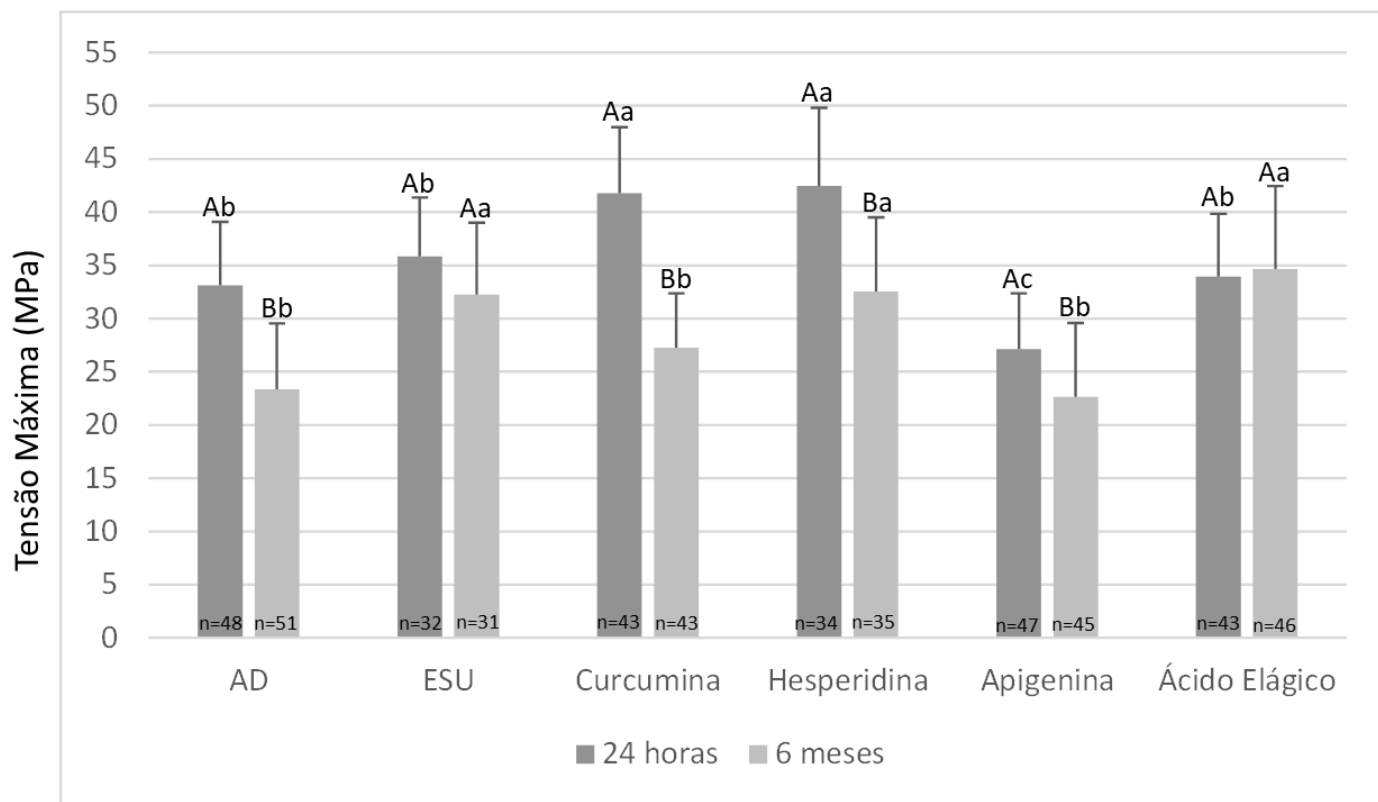


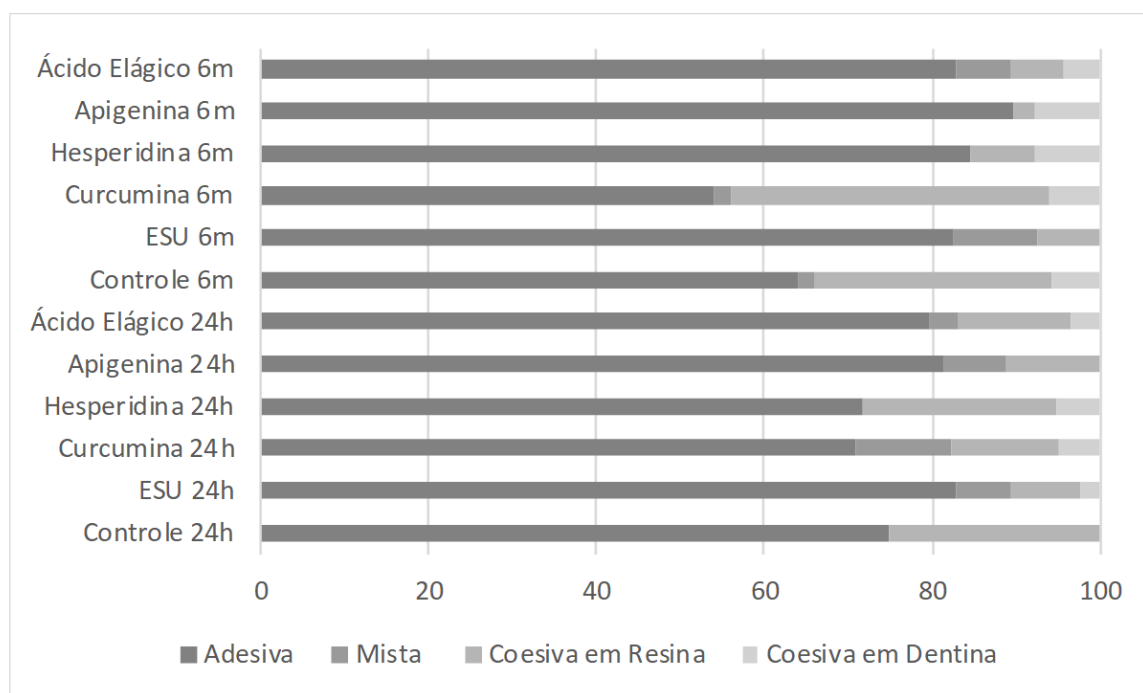
Fig. 2. Espectros de FT-IR dos espécimes submetidos a tratamento com os diferentes polifenóis nas diferentes concentrações testadas.

Gráfico 1. Valores de média (desvio-padrão) de resistência de união, em MPa, após diferentes pré-tratamentos dentinários.



Legenda: Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas em tempos diferentes dentro de um mesmo grupo. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre grupos dentro de um mesmo tempo (p<0,05).

Gráfico 2. Padrão de fratura, em %, dos palitos testados nos períodos testados.



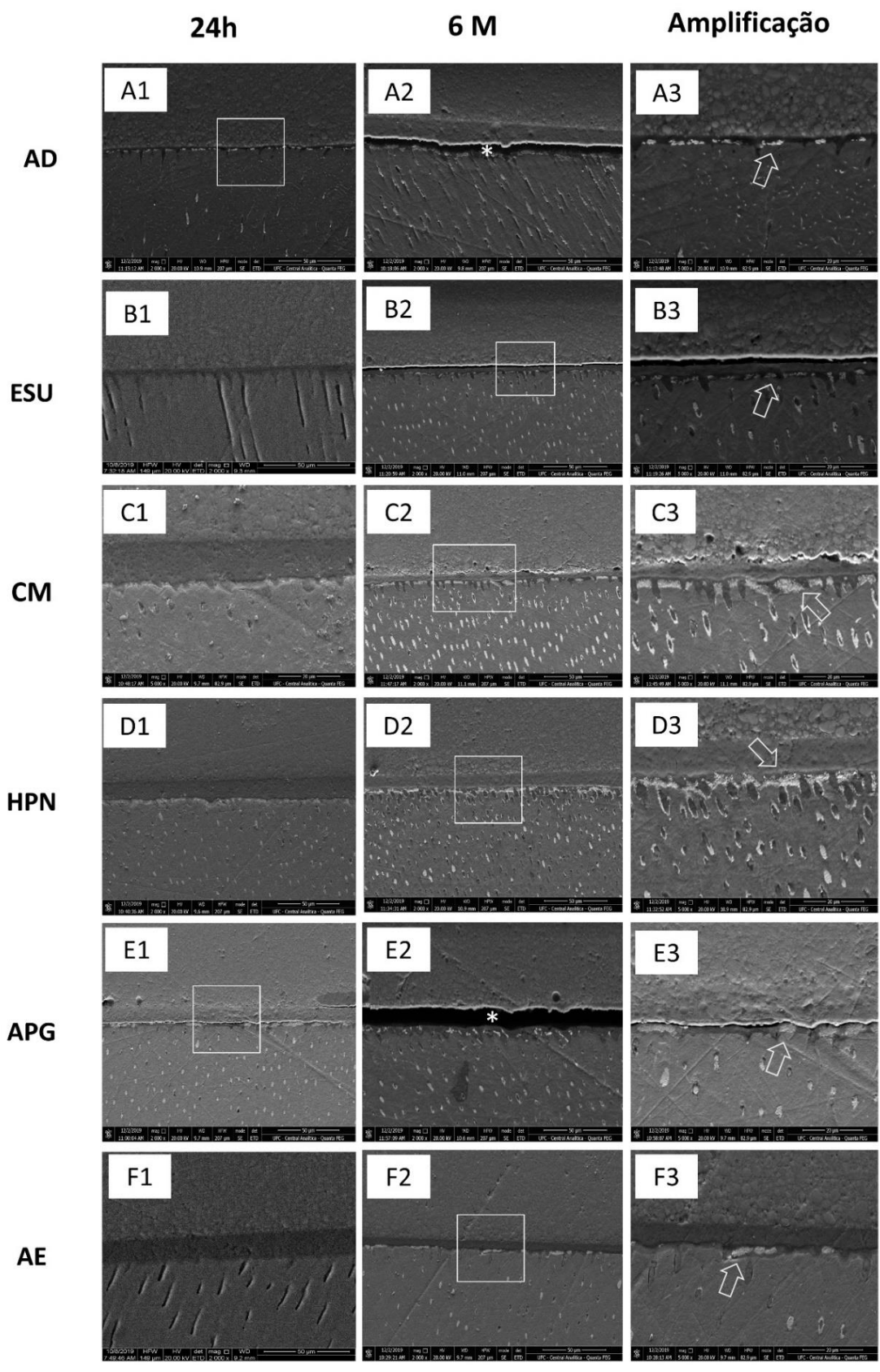


Figura 3. Micrografias da interface resina-dentina dos espécimes submetidos ao teste de nanoinfiltração. As setas abertas indicam presença de prata próxima à interface. O asterisco indica fratura. As regiões demarcadas pelo quadrado indicam as áreas de maior magnitude da imagem apresentada na coluna amplificação.

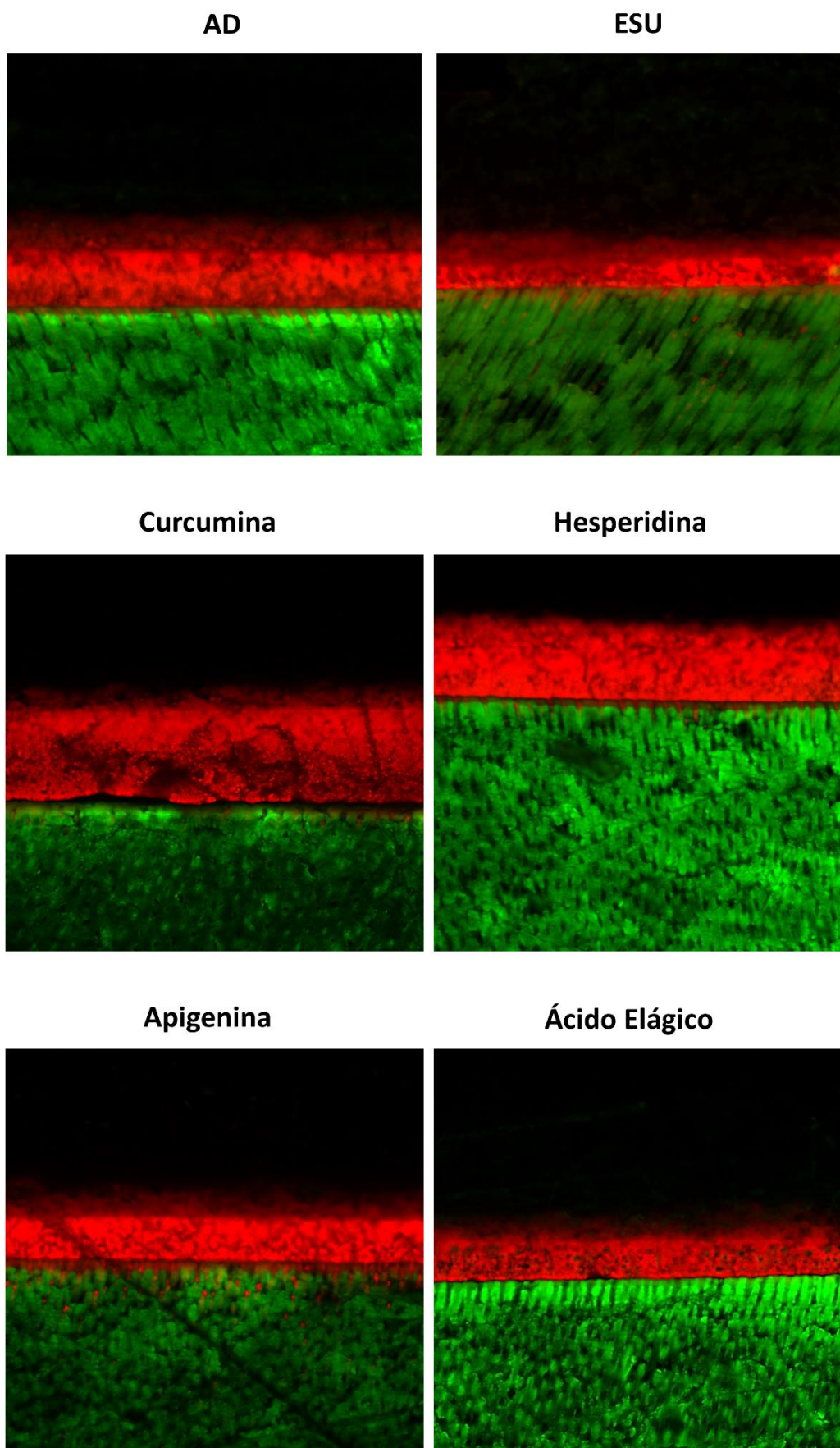


Figura 4. Micrografias dos espécimes submetidos ao teste de micropermeabilidade.

#### 4. DISCUSSÃO

Recentemente, a biomodificação da dentina, usando agentes de ligações cruzadas de colágeno, foi introduzida para melhorar a estabilidade mecânica da dentina [29,30]. Vários agentes naturais foram identificados por terem um efeito de promover tais interações[8,26,30]. Os polifenóis são encontrados naturalmente em vegetais, cereais, frutas e bebidas. Apresentam efeitos positivos contra condições de saúde, como câncer, osteoporose, asma, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas[31]. Diferem entre si de acordo com o número de anéis fenólicos, planta de origem, técnica de obtenção do extrato e origem geográfica [32,33]. Existe pouca literatura a respeito de biomodificação utilizando as substâncias testadas (curcumina, hesperidina, apigenina e ácido elágico). O presente estudo teve como proposição avaliar qual a concentração das substâncias biomodificadoras é mais eficaz, além de verificar a influência das mesmas sobre a união em dentina.

Quando avaliados os módulos de elasticidade nas concentrações de 20  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$ , somente o grupo tratado com AE foi efetivo em melhorar essa propriedade mecânica quando comparado ao controle negativo. Logo, pode-se afirmar que a primeira hipótese do estudo foi rejeitada. Segundo Hiraishi et al[19], a interação dos agentes biomodificadores ocorre entre os grupamentos fenólicos e o nitrogênio presente em proteínas ricas em prolina, como o colágeno. Tal fato parece explicar o grande potencial biomodificador do ácido elágico observado no presente estudo, pois, dentre todas as substâncias testadas, o AE apresenta maior número de hidroxilas ligados ao anel benzênico (4 ao total), seguido de APG (3 ao total) e CR e HPN (2 ao total em cada molécula).

Também se sabe que a presença de hidroxilas adicionais potencializa a formação de pontes de hidrogênio[30]. Embora as moléculas tenham estruturas semelhantes quando analisadas em perspectiva 2D (Figura 1), vários outros fatores devem ser levados em consideração para avaliar o potencial bioativo de uma molécula. Essas moléculas são, de fato, muito diferentes em perspectivas 3D, assim, as formas distintamente diferentes, arranjos espaciais e propriedades químicas de estruturas, aparentemente semelhantes, precisam ser consideradas ao interpretar suas atividades biológicas[1].

Na concentração de 2mM, todas as substâncias testadas foram efetivas em elevar o módulo de elasticidade quando comparado ao grupo pré-tratado com água destilada, mostrando que apresentam efeitos bioativos como já relatado na literatura em diversas áreas da Saúde. Este estudo corrobora com os achados de Seseogullari-Dirihan et al[34], que utilizaram a curcumina

como agente biomodificador de colágeno e obtiveram resultados positivos. Os achados também reforçam as observações de Hiraishi[21] et al e Islam et al [20] , que indicaram um efeito positivo da hesperidina quando utilizada em Odontologia restauradora. Vale salientar a ausência de estudos prévios, utilizando-se ácido elágico e apigenina como agentes biomodificadores de colágeno dentinário, sendo a presente análise pioneira nessa avaliação.

Avaliando-se os resultados obtidos em FT-IR, observou-se, em todos os grupos experimentais, aumento nos picos referentes à amida I e à amida II, isso parece indicar uma variedade de interações entre a fibrila de colágeno e a substância reticuladora, resultando em aumento de ligações simples e duplas com os grupamentos amida. Em contrapartida, não se observou um aumento no pico referente à amida III ( $\sim 1250\text{ cm}^{-1}$ ), diferentemente do observado no grupo pré-tratado com extrato de semente de uva, sugerindo que as interações ocorrem de formas distintas entre tais tratamentos [35]. Também se notou uma redução do pico localizado entre  $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ , indicando uma diminuição de ligações O-H, o que pode ser atribuído a uma redução na quantidade de água presente na amostra. Esse efeito é esperado em reação de reticulação de colágeno, pois a aproximação entre as moléculas da cadeia de tripla-hélice impede o acúmulo de água nessa região por impedimento estérico. Dessa forma, com menor quantidade de água, espera-se também uma menor degradação do colágeno e uma maior estabilidade das ligações formadas[12]. Nota-se, ainda, que não houve deslocamentos de picos, o que sugere que a conformação do colágeno foi mantida, embora o número de ligações tenha sido aumentado.

Após realização da varredura de concentração, pode-se observar que a 2mM todas as substâncias experimentais foi efetiva em elevar o módulo de elasticidade, sendo essa a concentração escolhida para realização dos experimentos referentes à adesão. Embora os pré-tratamentos com curcumina e hesperidina tenham apresentado resultados imediatos superiores ao controle negativo, esses não foram efetivos em manter a resistência após 6 meses de armazenamento em água destilada. Logo, pode-se afirmar que a segunda hipótese deste estudo também foi rejeitada. A redução da resistência de união, após envelhecimento, observado em todos os grupos experimentais, à exceção do AE, pode ser atribuído à reversibilidade das ligações formadas, que podem ser rompidas através de hidrólise, uma vez que todas as moléculas são polares em algum nível (moléculas menores se apresentam menos polares)[36,37]. Tais achados corroboram com estudos prévios na literatura, em que se observa uma redução na resistência de união após longos períodos de armazenamento de espécimes

tratados com hesperidina, sendo a ação dependente da concentração da substância aplicada [20]. Além disso, esse decréscimo na resistência de união também pode ser atribuído ao curto período de aplicação das soluções [36,38]. Segundo Seseogullari-Dirihan et al [39], a ação inibitória de metaloproteínases da matriz (MMP) promovida por agentes reticuladores de colágeno é reversível, o que também corrobora com a ausência de estabilidade na resistência de união após 6 meses de armazenamento no presente estudo.

Quando avaliados os tratamentos em diferentes períodos, nota-se que, dentre todos os grupos experimentais, somente o AE foi efetivo em preservar a resistência de união, assemelhando-se ao controle positivo. Pode-se presumir, portanto, que a utilização de tal substância pode ser promissora em Odontologia. Embora tenhamos uma literatura escassa sobre o uso do ácido elágico em Ciências da Saúde, sabe-se que pode favorecer o processo de cicatrização, tanto pela ação antimicrobiana, como pela atividade anti-inflamatória e o aumento da resistência do colágeno [14,17,40], sabe-se, também, que pode auxiliar em reparos ósseos após exodontia em ratos [41,42].

Quando analisados os resultados de nanoinfiltração e micropermeabilidade, observar-se que os grupos pré-tratados com CM, HPN e AE foram efetivos em criar uma zona protetora à penetração de água para região de camada híbrida. Esse fato pode ser atribuído à grande simetria apresentada pelas moléculas e ao baixo peso molecular. Essas características as tornam menos polares e menos susceptíveis à ação de hidrólise, além de favorecer a ação em nível intrafibrilar. Em última análise, o colágeno se torna mais denso e menos propenso à degradação [43]. Nos demais grupos, pode-se observar uma zona de contato entre a fluoresceína e a rodamina, o que pode induzir uma grande degradação do colágeno exposto na região, fato esse que corrobora com os resultados da resistência de união após 6 meses de envelhecimento. No grupo controle negativo, pode-se constatar grande presença de árvores de água na camada de adesivo, mesmo no período de 24 horas de armazenamento. Os achados do presente estudo divergem de Aydin et al [44], que observaram uma redução na permeabilidade dentinária após uso de primers contendo PAC, porém esse estudo se utilizou da verificação da fluorescência intrínseca do colágeno tipo I para avaliar tal efeito, metodologia diferente do presente estudo, que se utilizou de permeabilidade por pressão pulpar para verificar a efetividade do vedamento [28].

Como limitações do presente estudo, podemos citar a ausência de avaliação dessas substâncias em dentina afetada por cárie, situação mais próxima à realidade clínica [45]. Também se faz necessário investigar, de forma mais detalhada, como ocorre a interação entre

os polifenóis testados e o colágeno dentinário. Por fim, sugere-se a realização de ensaios clínicos antes da extrapolação dos resultados para aplicação cotidiana.



## **5. CONCLUSÃO**

Pode-se concluir que todas as substâncias testadas apresentam potencial biomodificador, sendo a concentração de 2mM efetiva em promover essa reticulação. Quando avaliados os resultados referentes ao processo adesivo, o ácido elágico se mostrou bastante efetivo em preservar a resistência de união, sendo esse um potencial agente biomodificador a ser utilizado em Odontologia restauradora.

## 6. REFERÊNCIAS

- [1] Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen S-N, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater* 2014;30:62–76. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.10.012>.
- [2] Tay FR, Pashley DH. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. *J Dent Res* 2009;88:719–24. <https://doi.org/10.1177/0022034509341826>.
- [3] Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater* 2013;29:116–35.
- [4] Dos Santos PH, Karol S, Bedran-Russo AK. Long-term nano-mechanical properties of biomodified dentin-resin interface components. *J Biomech* 2011;44:1691–4. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2011.03.030>.
- [5] Bedran-Russo AK, Zamperini CA. New Preventive Approaches Part II: Role of Dentin Biomodifiers in Caries Progression. *Monogr Oral Sci* 2017;26:97–105. <https://doi.org/10.1159/000479351>.
- [6] Bedran-Russo AKB, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. *Acta Biomater* 2011;7:1735–41. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.013>.
- [7] Castellan CS, Pereira PN, Grande RHM, Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent Mater* 2010;26:968–73. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.06.001>.
- [8] Aguiar TR, Vidal CMP, Phansalkar RS, Todorova I, Napolitano JG, McAlpine JB, et al. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *J Dent Res* 2014;93:417–22. <https://doi.org/10.1177/0022034514523783>.
- [9] Macedo G V, Yamauchi M, Bedran-Russo AK. Effects of chemical cross-linkers on caries-affected dentin bonding. *J Dent Res* 2009;88:1096–100.
- [10] Al-Ammar A, Drummond JL, Bedran-Russo AK. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2009;91:419–24.
- [11] Broyles AC, Pavan S, Bedran-Russo AK. Effect of dentin surface modification on the microtensile bond strength of self-adhesive resin cements. *J Prosthodont Implant Esthet Reconstr Dent* 2013;22:59–62.
- [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;29:485–92. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.01.013>.
- [13] Pavan S, Xie Q, Hara AT, Bedran-Russo AK. Biomimetic approach for root caries prevention using a proanthocyanidin-rich agent. *Caries Res* 2011;45:443–7.
- [14] Vidal CMP, Aguiar TR, Phansalkar R, McAlpine JB, Napolitano JG, Chen SN, et al.

- Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta Biomater* 2014;10:3288–94. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.036>.
- [15] Pari L, Sivasankari R. Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2008;22:395–401.
- [16] Lukiswanto BS, Miranti A, Sudjarwo SA, Primarizky H, Yuniarti WM. Evaluation of wound healing potential of pomegranate (*Punica granatum*) whole fruit extract on skin burn wound in rats (*Rattus norvegicus*). *J Adv Vet Anim Res* 2019;6:202–7. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f333>.
- [17] Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem* 2002;50:2200–6. <https://doi.org/10.1021/jf011275g>.
- [18] Türk G, Çeribaşı AO, Sakin F, Sönmez M, Ateşşahin A. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. *Reprod Fertil Dev* 2010;22:587–96. <https://doi.org/10.1071/RD09078>.
- [19] Hiraishi N, Maruno T, Tochio N, Sono R, Otsuki M, Takatsuka T, et al. Hesperidin interaction to collagen detected by physico-chemical techniques. *Dent Mater* 2017;33:33–42. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.09.035>.
- [20] Islam MS, Hiraishi N, Nassar M, Yiu C, Otsuki M, Tagami J. Effect of hesperidin incorporation into a self-etching primer on durability of dentin bond. *Dent Mater* 2014;30:1205–12. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.08.371>.
- [21] Hiraishi N, Sono R, Islam MS, Otsuki M, Tagami J, Takatsuka T. Effect of hesperidin in vitro on root dentine collagen and demineralization. *J Dent* 2011;39:391–6. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.03.002>.
- [22] Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res* 2010;27:962–78.
- [23] Zhu B, Li X, Xu X, Li J, Ding C, Zhao C, et al. One-step phosphorylated poly(amide-amine) dendrimer loaded with apigenin for simultaneous remineralization and antibacterial of dentine. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2018;172:760–8. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.036>.
- [24] Seseogullari-Dirihan R, Tekbas Atay M, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Inhibitory effect of curcuminoid pretreatments on endogenous dentin proteases. *Dent Mater J* 2018;37:445–52. <https://doi.org/10.4012/dmj.2017-116>.
- [25] Yallapu MM, Nagesh PKB, Jaggi M, Chauhan SC. Therapeutic applications of curcumin nanoformulations. *AAPS J* 2015;17:1341–56.
- [26] Seseogullari-Dirihan R, ATAY MT, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Inhibitory effect of curcuminoid pretreatments on endogenous dentin proteases. *Dent Mater J* 2018;37:445–52.
- [27] Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res* 2002;81:472–6.

- [28] Feitosa VP, Sauro S, Ogliari FA, Ogliari AO, Yoshihara K, Zanchi CH, et al. Impact of hydrophilicity and length of spacer chains on the bonding of functional monomers. *Dent Mater* 2014;30:e317-23. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.06.006>.
- [29] Daood U, Iqbal K, Nitisusanta LI, Fawzy AS. Effect of chitosan/riboflavin modification on resin/dentin interface: Spectroscopic and microscopic investigations. *J Biomed Mater Res - Part A* 2013;101 A:1846–56. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34482>.
- [30] Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellán CS, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification: Strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater* 2014;30:62–76. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.10.012>.
- [31] Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2:270–8.
- [32] Castellán CS, Pereira PN, Grande RHM, Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent Mater* 2010;26:968–73. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.06.001>.
- [33] Aguiar TR, Vidal CMP, Phansalkar RS, Todorova I, Napolitano JG, McAlpine JB, et al. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *J Dent Res* 2014;93:417–22. <https://doi.org/10.1177/0022034514523783>.
- [34] Seseogullari-Dirihan R, Mutluay MM, Vallittu P, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. *Dent Mater* 2015;31:941–7.
- [35] Du T, Niu X, Li Z, Li P, Feng Q, Fan Y. Crosslinking induces high mineralization of apatite minerals on collagen fibers. *Int J Biol Macromol* 2018;113:450–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.136>.
- [36] De-Paula DM, Lomonaco D, Ponte AMP, Cordeiro KE, Moreira MM, Mazzetto SE, et al. Influence of collagen cross-linkers addition in phosphoric acid on dentin biomodification and bonding of an etch-and-rinse adhesive. *Dent Mater* 2019.
- [37] Seseogullari-Dirihan R, Mutluay MM, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Is the inactivation of dentin proteases by crosslinkers reversible? *Dent Mater* 2017;33. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.09.036>.
- [38] Moreira MA, Souza NO, Sousa RS, Freitas DQ, Lemos M V, De Paula DM, et al. Efficacy of new natural biomodification agents from Anacardiaceae extracts on dentin collagen cross-linking. *Dent Mater* 2017;33:1103–9. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.07.003>.
- [39] Seseogullari-Dirihan R, Mutluay MM, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Is the inactivation of dentin proteases by crosslinkers reversible? *Dent Mater* 2017;33:e62–8. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.09.036>.
- [40] Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem* 2002;50:2200–6.
- [41] Al-Obaidi MMJ, Al-Bayaty FH, Al Batran R, Hussaini J, Khor GH. Impact of ellagic acid in bone formation after tooth extraction: An experimental study on diabetic rats. *Sci*

World J 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/908098>.

- [42] M Jamil Al-Obaidi M, Hussain Al-Bayaty F, Al Batran R, Emad Ibrahim O. Ellagic acid increases osteocalcin and alkaline phosphatase after tooth extraction in nicotinic-treated rats. *Curr Pharm Des* 2016;22:2403–10.
- [43] Bertassoni LE, Marshall GW, Swain M V. Mechanical heterogeneity of dentin at different length scales as determined by AFM phase contrast. *Micron* 2012;43:1364–71.
- [44] Aydin B, Hassan LS, Bedran-Russo AK, Viana G. Assessing collagen and micro-permeability at the proanthocyanidin-treated resin-dentin interface. *J Adhes Dent* 2016;18:529–34. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a37359>.
- [45] Betancourt DE, Baldion PA, Castellanos JE. Resin-dentin bonding interface: Mechanisms of degradation and strategies for stabilization of the hybrid layer. *Int J Biomater* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5268342>.

## *Capítulo III*

---

**EFICÁCIA DE UM ADESIVO UNIVERSAL INCORPORADO COM UM AGENTE  
DE LIGAÇÃO CRUZADA DE COLÁGENO E UM AGENTE REMINERALIZANTE  
SOBRE UNIÃO EM DENTINA**

LEMOS MVS<sup>1</sup>, ALBUQUERQUE NL<sup>2</sup>, MANSO AP<sup>3</sup>, CARVALHO RM<sup>3</sup>,  
SANTIGO SL<sup>4</sup>

<sup>1</sup> - Aluno de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

<sup>2</sup> - Doutora pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

<sup>3</sup> - Professor do Departamento de Biologia Oral e Ciências Médicas, Divisão de Biomateriais, da Faculdade de Odontologia da Universidade de British Columbia.

<sup>4</sup> - Professor Titular do Departamento de Odontologia Restauradora da Universidade Federal do Ceará.

**Autor de correspondência:**

Sérgio Lima Santiago, Dr

Programa de Pós-graduação em Odontologia

Rua Monsenhor Linhares, S/N, Fortaleza, Ceará

e-mail: sergiosantiago@yahoo.com

## **EFICÁCIA DE UM ADESIVO UNIVERSAL INCORPORADO COM UM AGENTE DE LIGAÇÃO CRUZADA DE COLÁGENO E UM AGENTE REMINERALIZANTE SOBRE UNIÃO EM DENTINA**

### **Resumo**

**OBJETIVOS:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da incorporação do beta-tricálcio fosfato ( $\beta$ TCP) e da epigallocatequina-3-galato (EGCG), associados ou separadamente, sobre união em dentina quando utilizado um sistema adesivo universal.

**MÉTODOS:** O presente estudo teve os seguintes grupos: Single Bond Universal (SBU); SBU+EGCG; SBU+  $\beta$ TCP; SBU+EGCG+ $\beta$ TCP. Para avaliar a interação entre os agentes bioativos e colágeno, realizou-se teste de espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Para a avaliação da influência da incorporação sobre a blenda, aferiu-se a resistência flexural (n=10), o módulo de elasticidade (n=10) e o grau de conversão (n=5). Para avaliar a influência sobre adesão em dentina, realizaram-se os testes de resistência de união, nanoinfiltração e micropermeabilidade em dois períodos de envelhecimento (24 horas e 6 meses). Para todos os casos utilizou-se a estratégia autocondicionante.

**RESULTADOS:** A partir da análise dos resultados obtidos por espectroscopia infravermelho, foi observado o aumento dos picos amida II e amida III no grupo tratado com EGCG +  $\beta$ TCP. A incorporação dos agentes não afetou negativamente as propriedades físico-químicas, à exceção do grau de conversão do grupo SBU + EGCG +  $\beta$ TCP, que se apresentou aumentado. Avaliando-se os valores de resistência de união, somente os grupos SBU + EGCG e SBU + EGCG +  $\beta$ TCP foram efetivos em preservar a resistência de união após 6 meses. Quando analisados os testes de microscopia, todos os grupos apresentaram infiltração de prata e fluoresceína após 6 meses de armazenamento em água destilada.

**CONCLUSÕES:** A incorporação de EGCG, isoladamente ou associado ao  $\beta$ TCP, a um sistema adesivo universal possibilitou a manutenção da resistência de união à dentina após 6 meses de envelhecimento sem afetar negativamente as propriedades físico-químicas da blenda adesiva, apresentando-se, assim, como um promissor meio para preservação da interface adesiva.

**Palavras-chave:** colágeno, dentina, remineralização, polifenóis.



## 1. INTRODUÇÃO

Em busca de uma simplificação técnica, os adesivos universais, ou adesivos multimodo, têm ganhado grande destaque na Odontologia restauradora atual, podendo os mesmos serem utilizados em três estratégias distintas: autocondicionante, condicionamento total e condicionamento seletivo em esmalte, além de possibilitar a adesão entre diferentes materiais restauradores, a depender de sua composição<sup>1</sup>. Podemos inferir que esses adesivos tratam de uma evolução dos adesivos autocondicionantes<sup>2</sup>, pois todos apresentam, em sua composição, a presença de monômeros funcionais que promovem a desmineralização e a incorporação da lama dentinária à camada híbrida quando utilizados em dentina sem aplicação prévia de ácido fosfórico<sup>3</sup>.

Estudos recentes demonstraram não haver diferença entre a resistência de união de adesivos multimodais entre as diferentes técnicas de aplicação<sup>4</sup>, porém também se observa que a estabilidade dessa adesão não se mantém após diferentes períodos de envelhecimento<sup>5</sup>, sugerindo que, embora promovam uma maior proteção ao colágeno presente na camada híbrida, a degradação continua a ocorrer<sup>6</sup>. Logo, observa-se que o aumento da versatilidade dos adesivos universais não é acompanhado por avanços para superar os desafios associados à degradação de componentes da camada híbrida e de regiões adjacentes<sup>2</sup>. Essa degradação pode acontecer por meio de três mecanismos principais: 1) degradação do colágeno exposto, por meio da ação de enzimas colagenolíticas, como metaloproteínases da matriz (MMP) e cisteíno-catepsinas (CTP); 2) hidrólise da matriz orgânica polimérica e 3) hidrólise do agente de união (silano), resultando em desprendimento de partículas de carga<sup>7</sup>.

Nesse contexto, diversas estratégias têm sido utilizadas para aumentar a longevidade desse tipo de procedimento adesivo. Dentre elas, a utilização de inibidores de MMPs e CTPs<sup>8</sup> e o uso de agentes de ligações cruzadas de colágeno (ALC)<sup>9</sup> são as mais relatadas na literatura. Vários estudos têm sido realizados para encontrar possíveis agentes capazes de promover as duas ações simultaneamente, sendo a epigalocatequina-3-galato (EGCG) bastante efetiva nos dois aspectos<sup>10</sup>. O EGCG é o principal polifenol encontrado no chá verde (*Camellia sinensis*), correspondendo a mais de 65% das catequinas encontradas nesse chá<sup>11</sup>, tendo ganhado destaque por seu efeito biomodificador positivo sobre a dentina, sendo capaz de prevenir a desmineralização, inibindo a progressão das lesões de cárie<sup>12,13</sup>. Apresenta, ainda, a capacidade de estabilizar o colágeno, induzindo as ligações cruzadas e impedindo o livre acesso das colagenases às cadeias dos sítios ativos de colágeno<sup>12,13</sup>. Além disso, Santiago e colaboradores

(2013)<sup>14</sup> demonstraram essa substância tem a capacidade de preservação da resistência de união dentina-resina por até 6 meses.

Entretanto, essas estratégias não conseguem remover a água que permanece confinada dentro das fibrilas de colágeno após a polimerização, sendo esse um fator crítico de falha das restaurações adesivas. Essa água que fica aprisionada se torna um meio enfraquecedor do colágeno, servindo também como meio funcional para as MMPs<sup>15</sup>.

Uma alternativa para diminuir a quantidade de água presente na interface adesiva é a utilização de sais que promovam a remineralização das fibrilas que foram expostas por ação de ácidos bacterianos, ácido fosfórico ou monômeros funcionais<sup>7</sup>. A desidratação progressiva das fibrilas de colágeno, via apatita intrafibrilar, ocorre naturalmente no processo de mineralização e pode proteger a matriz orgânica da degradação por um período de tempo muito mais longo do que o alcançado pelos inibidores de MMPs ou agentes de reticulação do colágeno<sup>16</sup>. As apatitas são depositadas nos compartimentos internos das fibrilas de colágeno onde a água se armazena, essa compressão das fibrilas, ocasionada pela remineralização intrafibrilar, desloca água causando a desidratação, devolvendo a função protetora do colágeno<sup>16</sup>.

Dentre os sais utilizados para obter esse efeito, encontra-se o beta-fostato tricálcio ( $\beta$ TCP), que é uma partícula constituída por cálcio e fosfato com capacidade de remineralizar o tecido em que estiver em contato<sup>7, 17</sup>. Além disso, por ser biocompatível e ter composição semelhante à apatita do dente e da estrutura óssea, tem apresentado resultados promissores nas áreas de Traumatologia<sup>18</sup> e Periodontia<sup>19</sup>, bem como, quando utilizado como agente antierosivo em esmalte<sup>17</sup>.

Entretanto, sua ação remineralizante ocorre de forma lenta e gradual, logo, a preservação da matriz de colágeno é essencial para que essa remineralização ocorra, pois o fortalecimento do colágeno o torna mais resistente e fornece uma estrutura para receber o mineral proveniente da remineralização<sup>7</sup>. Alternativas, que viabilizem essa preservação e que ao mesmo tempo promovam a remineralização mostram-se essenciais para a longevidade do procedimento adesivo. No entanto, os agentes remineralizantes usados atualmente não possuem um efeito protetor simultâneo de colágeno<sup>20</sup>.

Tendo em vista as dificuldades da ação dos agentes utilizados isoladamente, fazem-se necessários mais estudos que avaliem a ação sinérgica entre substâncias reticuladoras de colágeno e sais remineralizantes. Nesse contexto, nenhum artigo prévio avaliou o efeito da

associação entre EGCG e  $\beta$ TCP para preservação da camada híbrida quando incorporados e sistemas adesivos universais. Logo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da incorporação do  $\beta$ TCP e do EGCG, associados ou separadamente, sobre a estabilidade da união em dentina quando utilizado um sistema adesivo universal na estratégia autocondicionante. Sendo as hipóteses propostas por esse estudo que a incorporação do  $\beta$ TCP e do EGCG, associados ou separadamente, em um adesivo universal (1), não irá afetar as propriedades físico-químicas do sistema adesivo e (2) irão aperfeiçoar a união resina/dentina promovida em dentina.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Delineamento experimental**

O fator de estudo sob investigação foi a incorporação de diferentes substâncias bioativas em um sistema adesivo universal, sendo avaliado em 4 níveis: (1) Single Bond Universal (SBU); (2) SBU + Epigallocatequina-3-galato a 0,1% (p/v) (EGCG); (3) SBU + Beta fosfato tricálcio a 0,1% (p/v) ( $\beta$ TCP) e (4) SBU + EGCG +  $\beta$ TCP. A fim de se avaliar a influência da incorporação sobre as propriedades físico-químicas do adesivo, realizaram-se os testes de flexão de 3 pontos, obtendo-se o módulo de elasticidade e a resistência flexural, e grau de conversão, avaliados por meio de espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Para avaliar a influência sobre o procedimento adesivo, utilizou-se o teste de microtração por meio de uma máquina de ensaios universais. Já para análise qualitativa, realizaram-se os testes de nanoinfiltração e micropermeabilidade, por meio de um microscópio eletrônico de varredura e microscópio confocal a laser, respectivamente. Todos os testes referentes a união foram realizados em dois períodos de armazenamento em água destilada: 24 horas e 6 meses. Para investigação da interação entre as diferentes substâncias e o colágeno, realizou-se um teste qualitativo de FT-IR.

### **2.2 Aspectos éticos**

Os dentes foram obtidos a partir de procedimentos cirúrgicos com indicação de remoção alheia à pesquisa científica, para tanto, o paciente precisaria apresentar, no mínimo, 01 (um) dente terceiro molar hígido, semi-incluso ou incluso. Foi considerado hígido o dente que, ao exame de inspeção visual, não apresentava trincas, desgastes ou lesões cariosas. Os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sob a regulamentação do protocolo de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos, da Universidade Federal do Ceará, sob o número 3.212.734.

### **2.3 Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)**

Para realização desse teste, foram confeccionadas 4 barras de dentina média com dimensões de 1,7 mm x 6,0 mm x 0,5 mm (LxHxE). Em seguida, os espécimes foram imersos

em solução de ácido fosfórico 10% durante 5 horas, sob agitação constante à temperatura ambiente, a fim de remover todo o conteúdo mineral. Posteriormente, os espécimes foram lavados com água destilada e imersos em solução contendo: (1) água destilada; (2) EGCG 0,1%; (3)  $\beta$ TCP 0,1% e (4) EGCG 0,1% +  $\beta$ TCP 0,1% por 1 minuto e, em seguida, foram lavados abundantemente com água destilada. Os espécimes foram avaliados por espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier a vácuo (VERTEX 70v, Bruker Analytical, Madison, WI). Antes da leitura, os espécimes foram dessecados por 24 horas. A medida constituiu na aquisição de um espectro de absorbância na região entre 4000-800 $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 0,5  $\text{cm}^{-1}$  e 32 varreduras para cada espectro adquirido.

#### **2.4 Incorporação dos Agentes Bioativos**

Para preparo dos grupos experimentais, utilizou-se um adesivo comercial (Single Bond Universal, 3M ESPE, CA, EUA). Coletou-se 1 mL do adesivo comercial e se colocou em um microtubo de polietileno (1,5 mL, Eppendorf, Hamburgo, ALE) protegido da luz. Posteriormente, acrescentou-se a quantidade, previamente pesada, dos agentes bioativos, a fim de gerar a concentração pré-definida [0,1% (p/v)], de acordo com cada grupo-teste. O microtubo foi colocado sob agitação em agitador do tipo vórtex durante 10 segundos e os adesivos incorporados foram utilizados imediatamente após o preparo, não sendo armazenados para uso posterior.

#### **2.5 Módulo de Elasticidade e Resistência Flexural**

Um teste de flexão de 3 pontos (n=10) foi usado para determinar o módulo de elasticidade e a resistência flexural, para tanto, foram confeccionadas barras de adesivos em uma matriz de Teflon de 25x2x2 mm de dimensões (ISO 4049). O sistema adesivo foi seco com jato de ar por 40 segundos e, em seguida, foi fotopolimerizado por 40 segundos (Bluephase, Ivoclar-Vivadent, Schaan, Liechtenstein). Após a primeira fotoativação, a blenda adesiva foi removida da matriz e uma nova fotoativação foi realizada por 40 segundos, a fim de complementar a polimerização na região que estava em contato com a matriz. As amostras foram armazenadas por 24 horas a 37°C. Antes do teste, os espécimes foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital. O teste de flexão de 3 pontos foi realizado em uma máquina de ensaios universais (KES-G1 Kawabata, Kato Tech Co, Quioto, Japão). Para a avaliação de possíveis diferenças estatísticas, realizou-se um teste ANOVA a um critério (p<0,05).

## 2.6 Grau de Conversão

O grau de conversão (n=5) foi determinado usando um FT-IR (IRPrestige21 FTIR-8400S, Shimadzu, Quioto, Japão). Inicialmente, foi coletado o espectro dos adesivos não polimerizados, utilizando-se uma abrangência de 700-1800 cm<sup>-1</sup>. Posteriormente, os mesmos foram fotopolimerizados durante 40s e uma nova medida foi realizada. Para avaliar a realização do cálculo, foram considerados os picos 1640 e 1610 cm<sup>-1</sup>. Os valores foram inseridos na seguinte fórmula:

$$\%GC = 100x \frac{\text{Diferença entre os picos polimerizados}}{\text{Diferença entre os picos não polimerizados}}$$

Para análise estatística, realizou-se um teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, seguido de ANOVA a um critério e pós-teste de Tukey (p<0,05).

## 2.7 Resistência de União

Vinte e oito dentes terceiros molares hígidos, sete por grupo, extraídos por motivação clínica alheia à pesquisa, foram seccionados 2 mm acima e abaixo da junção amelo-cementária, a fim de expor a região de dentina intermediária. Posteriormente, a superfície dentinária foi desgastada com lixas de carbetto de sílcio de granulação 600 durante 30s, com a finalidade de padronizar a formação da lama dentinária (*smear layer*). Os dentes seccionados foram analisados em lupa estereoscópica (Leica S8APO, Modelo MEB 115, Singapura) para verificar a presença de remanescentes de esmalte ou perfurações pulpares. Aplicou-se, de forma ativa, 10µL do adesivo sobre a superfície de dentina exposta, subsequentemente, foi polimerizado (Optilight Max, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 40 segundos (estratégia autocondicionante). Por fim, foi confeccionado um platô de resina de aproximadamente 5 mm de altura, construído a partir de incrementos de até 2mm (Z250, 3M ESPE, CA, EUA).

Após 24 horas armazenados em estufa a 37°C, os dentes foram seccionados para se obter espécimes em formato de palitos com, aproximadamente, 1mm<sup>2</sup> de área em secção transversal. Metade dos espécimes obtidos, em cada dente, foram testados de forma imediata e o restante foi armazenado em água destilada durante 6 meses para envelhecimento, sendo a mesma trocada semanalmente. O teste foi realizado em uma máquina de ensaios universais (DL200, EMIC, São José dos Pinhais, PA, Brasil) em uma velocidade de 0,5mm/min e célula de carga de 50kgf (leitura com resolução de 10gf).

Os espécimes fraturados foram avaliados em lupa estereoscópica em aumento de 30x (Leica S8APO, Modelo MEB 115, Singapura) com o propósito de estabelecer o tipo de fratura obtido, classificando-as em fratura adesiva, mista, coesiva em resina e coesiva em dentina.

Os dados foram tabulados em uma planilha (Excel, Microsoft, CA, EUA), em que se considerou cada espécime como uma unidade amostral e, inseridos em um programa estatístico (SigmaPlot 14.0, Chicago, IL, EUA), foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e ao teste de análise de variância (ANOVA) a dois fatores, seguido de pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **2.8 Teste de Nanoinfiltração**

Foram selecionados seis palitos por grupo em cada tempo de envelhecimento. Os mesmos foram imersos em solução de nitrato de prata amoniacal e armazenados livres de luz por 24h, em seguida, foram imersos em solução reveladora durante 8 horas sob luz intensa<sup>21</sup>. Posteriormente, foram lavados, a fim de se eliminar a prata residual e embutidos em resina epóxica. O polimento seguiu o padrão de lixas de carvão de silício 600, 1200 e 2000, além do polimento com feltro e pasta diamantada 1 $\mu$ m, sendo imersos em cuba ultrassônica por 5 minutos entre cada etapa.

Os espécimes foram desidratados em dessecadora a vácuo durante 24 horas e metalizados para análise em microscópio eletrônico de varredura (Quanta 450 FEG, FEI Company, Hillsboro, OR, EUA). A interface de união foi avaliada em ampliações de 2000x.

## **2.9 Teste de Micropermeabilidade**

Três dentes por grupo foram restaurados com adesivo incorporado com Rodamina-B à 0,1% e, posteriormente, imersos em uma coluna de 15 cm de solução aquosa de fluoresceína a 0,3%, com a intenção de simular a pressão pulpar, durante 3 horas. Subsequentemente, os dentes foram cortados em fatias e desgastados com lixas de carvão de silício de granulação 600 durante dois minutos em cada lado. Em seguida, os espécimes foram avaliados por microscopia confocal a Laser (LM 710, Zeiss, Oberkochen, ALE)<sup>22</sup>.

### 3. RESULTADOS

A partir da análise dos resultados obtidos por espectroscopia infravermelho (Gráfico 1), foi observado o aumento dos picos amida II ( $\sim 1560\text{ cm}^{-1}$ ) e amida III ( $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$ ) no grupo tratado com EGCG +  $\beta$ TCP. Também se pode observar um aumento dos picos referentes à presença de grupos fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\sim 1092$  e  $1031\text{ cm}^{-1}$ ), o que sugere intensa deposição de sais de fosfato de cálcio, além de um aumento no número de ligações saturadas -C-H ( $\sim 2917\text{ cm}^{-1}$ ).

Em relação às propriedades físico-químicas do sistema adesivo incorporado (Tabela 1), pode-se notar que não houve diferença estatisticamente significativa, quando analisados os valores de módulo de elasticidade e de resistência flexural, porém, notou-se um aumento do grau de conversão no grupo SBU + EGCG +  $\beta$ TCP em relação aos demais grupos.

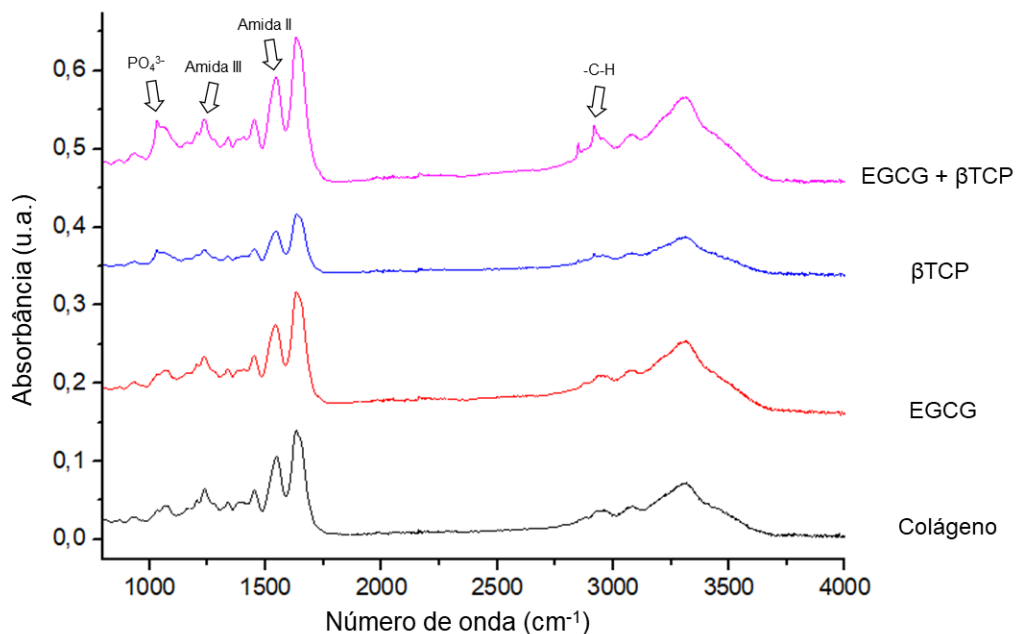
Avaliando-se os valores de resistência de união (Gráfico 2), observa-se que o grupo controle (SBU) apresentou resultados superiores aos demais grupos no período de 24 horas, contudo, após 6 meses, igualou-se ao grupo SBU + EGCG ( $p=0,927$ ). Somente os grupos SBU + EGCG e SBU + EGCG +  $\beta$ TCP foram efetivos em preservar a resistência de união após 6 meses ( $p=0,490$  e  $p=0,908$ , respectivamente). Em todos os grupos testados, houve predominância de fraturas adesivas (Gráfico 3).

Analisando-se as imagens obtidas pelo teste de nanoinfiltração (Figura 1), nota-se que, em todos os grupos, houve presença de prata próxima à interface no período de 24 horas e a presença de “árvores de água” na camada de adesivo após 6 meses de armazenamento. No grupo SBU + EGCG +  $\beta$ TCP, pode-se observar a presença de micelas e a presença de falha nos dois períodos testados.

Os resultados de micropermeabilidade (Figura 2) revelam que o grupo SBU + EGCG +  $\beta$ TCP apresentou menor quantidade de fluoresceína próxima à interface no período de 24 horas, porém, após 6 meses, todos os grupos demonstraram grande quantidade de corante em região de camada híbrida.



**Gráfico 1.** Espectroscopia Infravermelho por transformada Fourier das barras de colágeno após tratamento com as respectivas soluções testadas.

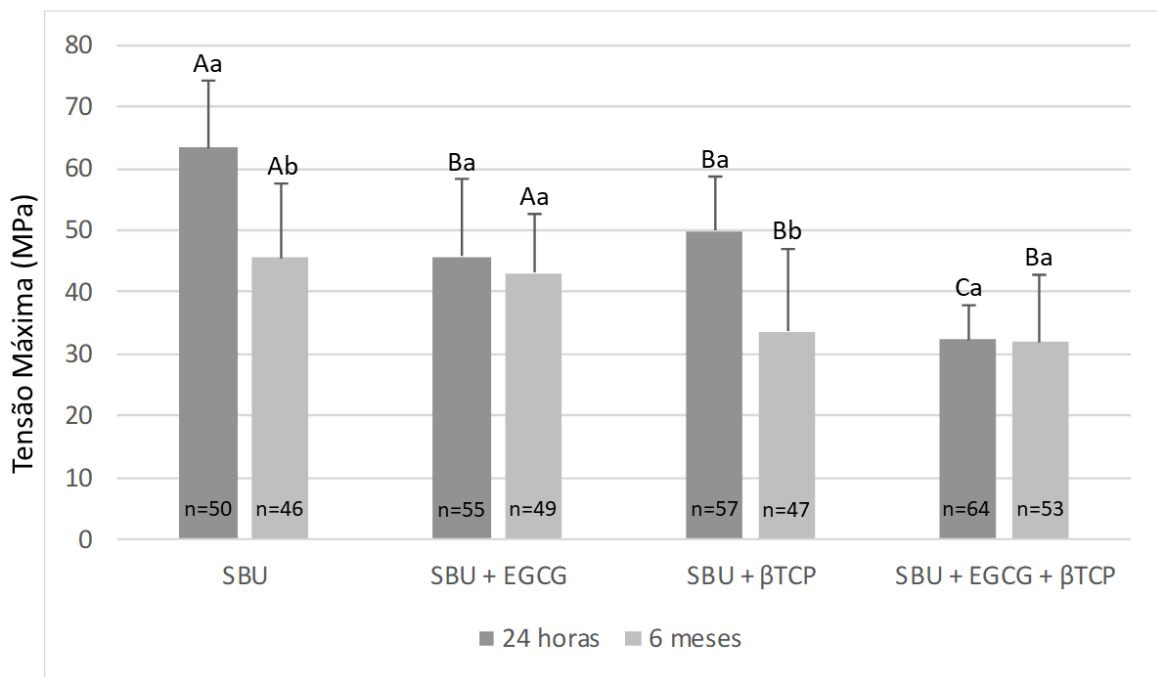


**Tabela 1.** Valores de média (desvio-padrão) de grau de conversão (%), resistência flexural (MPa) e módulo de elasticidade (GPa).

Grupos	Grau de conversão (%)	Resistência flexural (MPa)	Módulo de elasticidade (GPa)
<b>SBU</b>	56,1 (2,7)b	43,1 (7,9)	1,31 (0,48)
<b>SBU + EGCG</b>	51,7 (9,3)b	48,3 (8,2)	1,43 (0,23)
<b>SBU + βTCP</b>	50,1 (4,4)b	50,2 (3,8)	1,16 (0,11)
<b>SBU + EGCG + βTCP</b>	71,8 (2,8)a	46,2 (4,0)	1,09 (0,16)

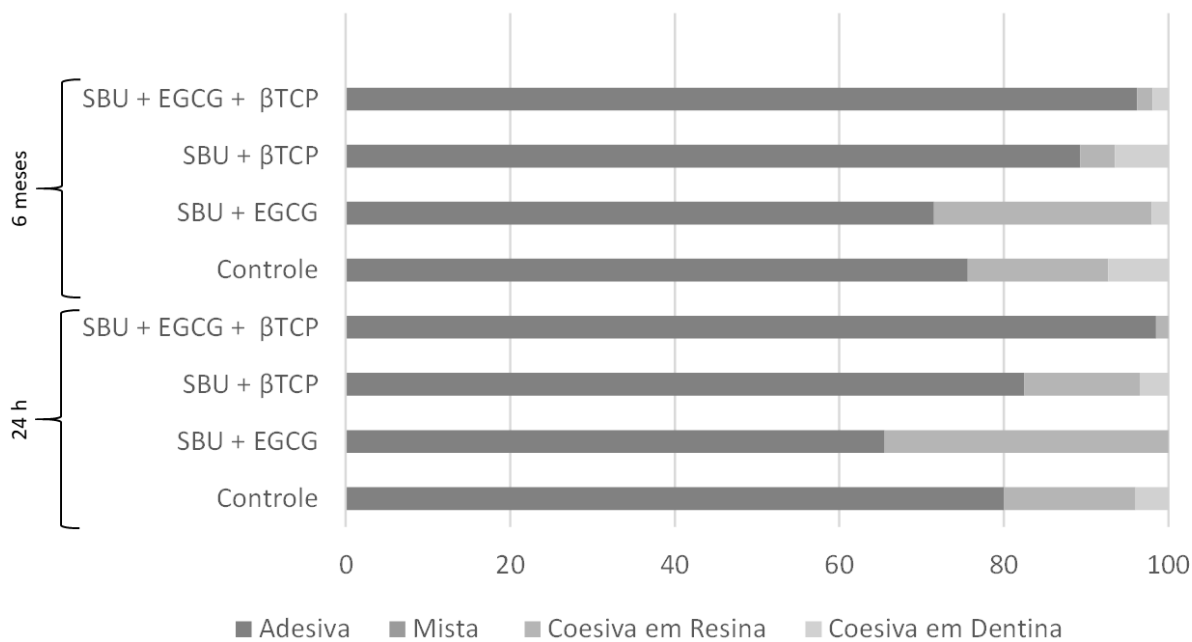
Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ). A ausência de letras em uma coluna indica semelhança estatística entre todos os grupos ( $p < 0,05$ ).

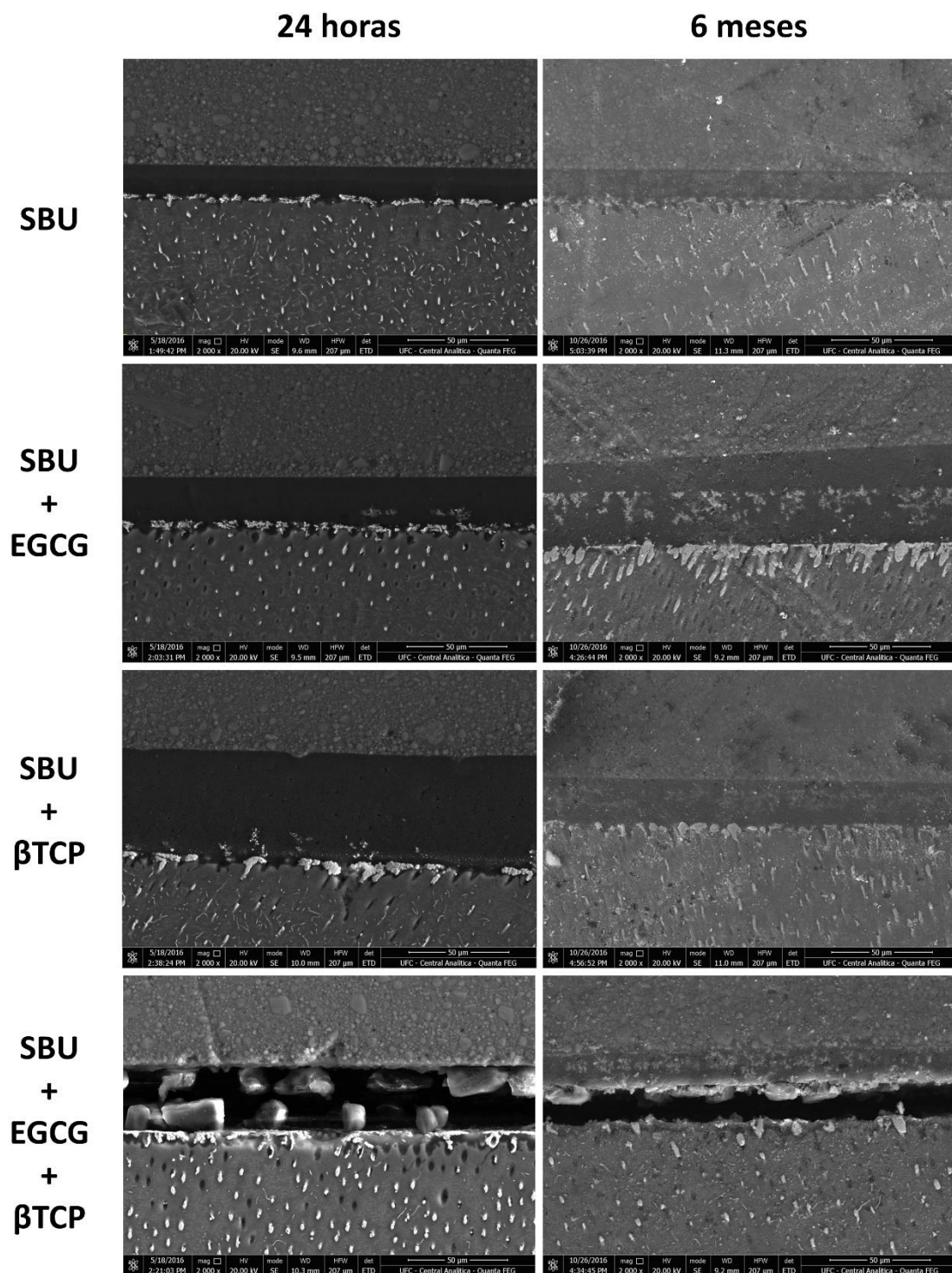
**Gráfico 2.** Valores de média (desvio-padrão) de resistência de união, em MPa, dos diferentes adesivos utilizados.



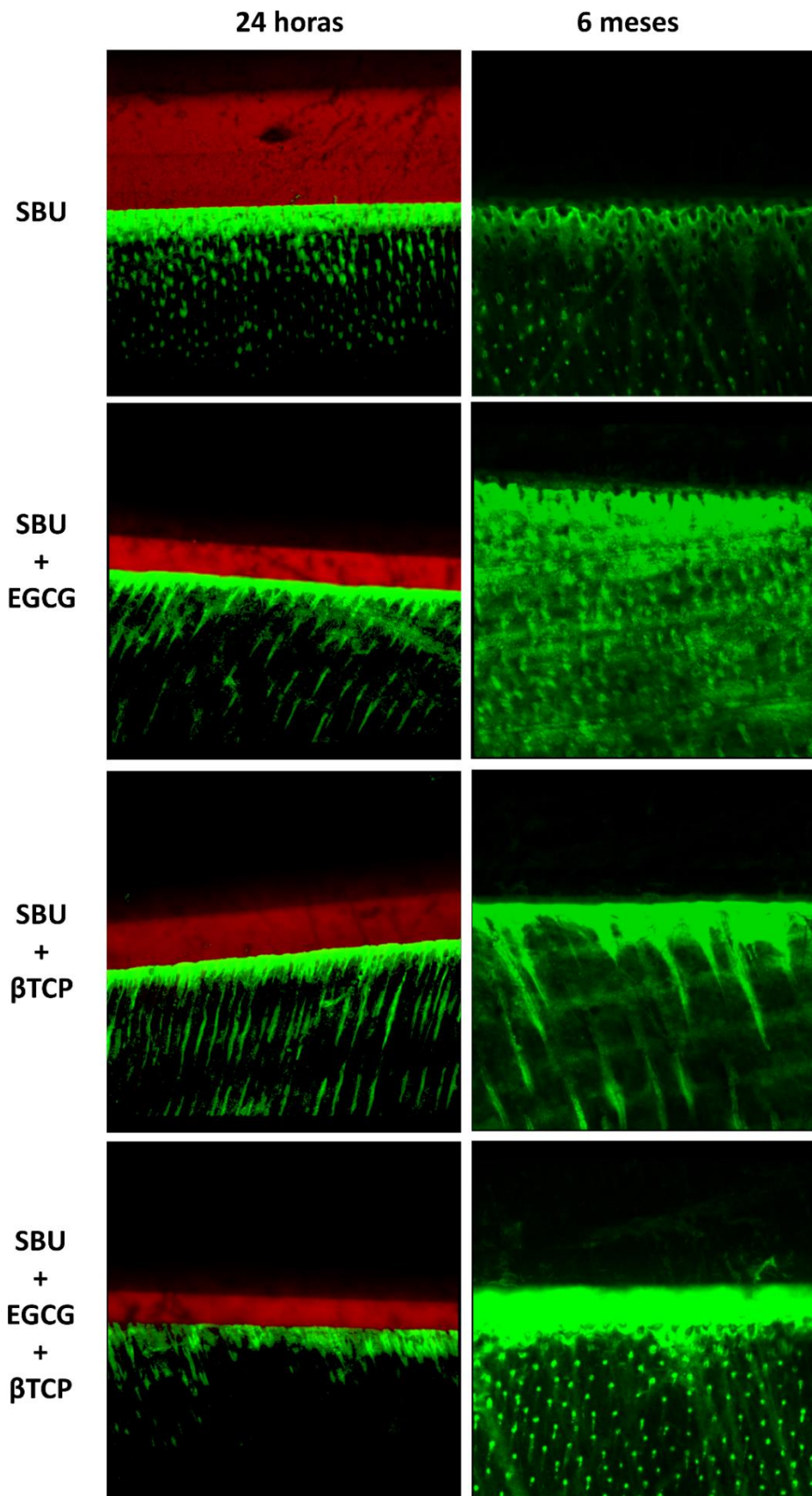
Legenda: Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas em tempos diferentes dentro de um mesmo grupo. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre grupos dentro de um mesmo tempo ( $p < 0,05$ ). “n” representa o número de palitos avaliados por grupo.

**Gráfico 3.** Padrão de fratura, em %, dos palitos testados nos diferentes períodos testados.





**Figura 1.** Micrografias da interface resina-dentina dos espécimes submetidos ao teste de nanoinfiltração.



**Figura 2.** Micrografias dos espécimes submetidos ao teste de micropermeabilidade.

#### 4. DISCUSSÃO

É consenso, na literatura, que o uso de adesivos de condicionamento total e autocondicionantes tem capacidade de ativar enzimas colagenolíticas, tais como MMP-2 e MMP-9, devido aos seus mecanismos de ação<sup>23, 24</sup>, fato que pode ser extrapolado para os adesivos universais que apresentam pH bastante reduzido. Também se sabe que, durante o procedimento restaurador, algumas fibrilas de colágeno não são completamente recobertas por monômeros, o que as tornam susceptíveis à degradação em um período de 1-2 anos<sup>25, 26</sup>. Logo, faz-se necessário o desenvolvimento/aprimoramento de adesivos que tenham função ativa na manutenção da integridade do colágeno. Nesse contexto, a utilização de diferentes estratégias tem sido empregada como uso de inibidores de enzimas colagenolíticas, o uso de agentes de reticulação de colágeno e o uso de sais que possibilitam a remineralização da fibrila. Porém, essas estratégias apresentam limitações, tendo as duas primeiras durabilidade bastante reduzida em ambientes úmidos, como a dentina<sup>27</sup>, já a terceira, tem ação lenta e gradual, necessitando-se de uma estrutura íntegra para guiar sua deposição, como colágeno<sup>28</sup>. Logo, a importância do presente estudo se apresenta no aprimoramento de um adesivo multimodo, possibilitando que ele tenha capacidade de preservar a fibrila colágena e fornece minerais que possibilitam uma posterior remineralização.

Os gráficos de espectroscopia infravermelho (FT-IR) indicam que a utilização da associação entre EGCG +  $\beta$ TCP foi efetiva em interagir com colágeno, mesmo em período curto de aplicação. Notou-se um aumento dos picos referentes à amida II e amida III. Os espectros de FT-IR podem ser correlacionados diretamente com a conformação das moléculas de colágeno. Portanto, esse método foi aplicado para medir as alterações na estrutura do colágeno após a reticulação e mineralização. Os picos de absorção da estrutura clássica do colágeno são denominados amida A, amida B, amida I, amida II e amida III. O pico referente à amida I em  $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$  está associado, predominantemente, com as vibrações de alongamento dos grupos C = O e o pico referente à amida II em  $\sim 1560\text{ cm}^{-1}$  se deve, principalmente, a vibrações de flexão N-H acopladas a vibrações de alongamento C-N e flexão de CH<sub>2</sub>. Além disso, o pico referente à amida III a  $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$  surge, predominantemente, do alongamento C-N, vibrações de flexão N-H e vibrações agitadas de grupos CH<sub>2</sub> na cadeia principal da glicina e nas cadeias laterais da prolina. Esses três picos são a melhor forma de evidenciar a existência de formação de ligações cruzadas e remineralização do colágeno<sup>29</sup>. Portanto, a relação entre o pico de amida I e II pode indicar a quantidade de ligações formadas durante o processo de

reticulação. Enquanto isso, os picos de absorção de fosfato em  $1031\text{ cm}^{-1}$  mostraram grande taxa de formação de hidroxiapatita nas fibrilas colágenas após mineralização<sup>30</sup>.

Quando analisados os resultados de módulo de elasticidade e resistência flexural, não foram observadas diferenças entre o grupo controle e os demais grupos experimentais, resultados que concordam com achados prévios da literatura<sup>13, 31</sup>, em que se verificou que a adição de EGCG, livre ou encapsulado, não interfere nesse tipo de propriedade. Já ao avaliar o grau de conversão, nota-se um aumento no grupo SBU + EGCG +  $\beta$ TCP e a manutenção do grau nos demais grupos-teste, achados que corroboram com estudos prévios na literatura<sup>13, 31, 32</sup>. Vale ressaltar que essas propriedades devem ser avaliadas em conjunto, tendo-se informações sobre o número e a densidade das ligações formadas<sup>33, 34</sup>. A avaliação dessas propriedades, em conjunto, indica que a incorporação dos agentes bioativos não afeta negativamente as propriedades físico-químicas da blenda, sendo, portanto, a primeira hipótese aceita.

Os resultados de resistência de união, observados no presente estudo, demonstram que apenas os grupos incorporados com EGCG e EGCG +  $\beta$ TCP foram efetivos em preservar a resistência de união após 6 meses de armazenamento em água destilada, logo, podemos inferir que a segunda hipótese do estudo foi rejeitada. Esses resultados podem ser suportados por achados prévios da literatura, que observaram que a aplicação de EGCG como pré-tratamento<sup>14, 35</sup> ou incorporado a um adesivo autocondicionante<sup>31</sup> pode preservar a resistência de união por até um ano de armazenamento. Credita-se tal efeito à capacidade do EGCG em interagir de forma direta com o colágeno, promovendo reticulação e melhora das propriedades mecânicas por meio da grande afinidade entre os grupamentos galoil e as proteínas ricas em prolina<sup>10</sup>, além da capacidade de inibir MMP-2,-8 e -9<sup>36, 37</sup>, uma vez que o EGCG parece exibir ligações de hidrogênio e uma interação hidrofóbica com collagenases que, mediante contato, possuem estrutura secundária modificada e são inibidas<sup>37</sup>.

Por outro lado, o grupo em que se acrescentou somente  $\beta$ TCP não foi efetivo em manter a resistência de união, atribui-se esse resultado a uma possível reação precoce entre o cálcio presente nesse mineral e o 10-MDP, monômero funcional, que tem capacidade de formar MDP-cálcio, um sal insolúvel. Além disso, os grupos fosfato no MDP formam ligações covalentes com os grupos fosfato correspondentes dos cristais de fosfato de cálcio para formar sais insolúveis<sup>4</sup>. Esse fato pode ser evidenciado pelas micrografias de microscopia eletrônica de

varredura do grupo SBU + EGCG +  $\beta$ TCP, em que se observa micelas, sugerindo o agrupamento desses dois componentes, o que pode prejudicar a adesão.

Avaliando-se as micrografias obtidas no ensaio de nanoinfiltração após 24 horas do grupo SBU +  $\beta$ TCP, nota-se a presença de espaços vazios dentro da camada de adesivo, isso pode ter acontecido devido à lixiviação de partículas de  $\beta$ TCP, permitindo posterior penetração de água, como observado na micrografia após envelhecimento. Já após 6 meses de armazenamento, pode-se observar uma intensa formação de árvores de água em SBU + EGCG e SBU + EGCG +  $\beta$ TCP. Credita-se tal achado à diferença de polaridade entre o EGCG e os monômeros adesivos<sup>38, 39</sup>, logo, a hidrofiliçidade apresentada pelo polifenol pode ter possibilitado a penetração de água por entre os polímeros.

Analisando-se as micrografias de micropermeabilidade, nenhum dos grupos apresentou zonas de proteção à permeabilidade de água ou presença de remineralização adjacente à camada híbrida. Sabe-se que remineralização “epitaxial” da interface adesiva depende do conteúdo mineral restante no substrato, o que deveria favorecer a estratégia autocondicionante escolhida para esse estudo. No entanto, essa abordagem pode não ser aplicável à dentina completamente desmineralizada, cujos cristais precursores estão ausentes, fato encontrado e observado em condicionamentos com ácido fosfórico e na utilização de adesivos autocondicionantes muito agressivos. Nessas situações, sugere-se a utilização de uma remineralização com uso de nanoprecursores minerais metaestáveis assistidos por análogos biomiméticos de proteínas não colágenas. Essas moléculas servem como estabilizadores para a deposição mineral (evitando cristalização extrafibrilar prematura), assim como para hierarquizar a deposição mineral<sup>28</sup>. Deve-se acrescentar que, no processo de biomineralização do colágeno, os íons cálcio e fósforo primeiro se combinam para formar precursores amorfos de fosfato de cálcio (ACP), então, o precursor ACP anuclear se cristaliza e cresce ao longo das fibrilas de colágeno, em último estágio, apresenta-se como um cristal de hidroxiapatita<sup>40, 41</sup>. Além disso, sabe-se que a estabilidade de ligações cruzadas de colágeno é bastante limitada quando o armazenamento ocorre em meio aquoso<sup>27</sup>, podendo não ser observada após o período de envelhecimento apresentado no estudo.

Como limitações do presente estudo, podemos citar a ausência de avaliação dessas substâncias em dentina afetada por cárie, situação mais próxima à realidade clínica. Também se faz necessário investigar, de forma mais detalhada, como ocorre a interação entre os componentes adicionados (EGCG e BTCP) e blenda adesiva e como isso pode afetar as

propriedades físicas e químicas do mesmo. Por fim, sugere-se a realização de ensaios clínicos antes da extrapolação dos resultados para aplicação cotidiana.

## **5. CONCLUSÃO**

A incorporação de EGCG, isoladamente ou associado ao  $\beta$ TCP, a um sistema adesivo universal possibilitou a manutenção da resistência após 6 meses de envelhecimento sem afetar negativamente as propriedades mecânicas da blenda adesiva, apresentando-se, assim, como um promissor meio para preservação da interface adesiva.



## 6. REFERÊNCIAS

1. Erhardt MC, Osorio E, Aguilera FS, Proenca JP, Osorio R, & Toledano M (2008) Influence of dentin acid-etching and NaOCl-treatment on bond strengths of self-etch adhesives. *Am J Dent* **21(1)** 44–48.
2. Chen C, Niu LN, Xie H, Zhang ZY, Zhou LQ, Jiao K, Chen JH, Pashley DH, & Tay FR (2015) Bonding of universal adhesives to dentine-Old wine in new bottles? *J Dent* **43(5)** 525–536, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.03.004>.
3. Jacker-Guhr S, Luehrs AK, & Sander J (2019) How “Universal” is Adhesion? Shear bond strength of multi-mode adhesives to enamel and dentin *J Adhes Dent* **21(1)** 87–95, <https://doi.org/10.3290/j.jad.a41974>.
4. Elkaffas AA, Hamama HHH, & Mahmoud SH (2018) Do universal adhesives promote bonding to dentin? A systematic review and meta-analysis *Restor Dent Endod* **43(3)** 1–13, <https://doi.org/10.5395/rde.2018.43.e29>.
5. Marchesi G, Frassetto A, Mazzoni A, Apolonio F, Diolosà M, Cadenaro M, Di Lenarda R, Pashley DH, Tay F, & Breschi L (2014) Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-Year in vitro study *J Dent* **42(5)** 603–612, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.008>.
6. Hanabusa M, Mine A, Kuboki T, Momoi Y, Van Ende A, Van Meerbeek B, & De Munck J (2012) Bonding effectiveness of a new “multi-mode” adhesive to enamel and dentine *J Dent* **40(6)** 475–484, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.02.012>.
7. Abuna G, Feitosa VP, Correr AB, Cama G, Giannini M, Sinhoreti MA, Pashley DH, & Sauro S (2016) Bonding performance of experimental bioactive/biomimetic self-etch adhesives doped with calcium-phosphate fillers and biomimetic analogs of phosphoproteins *J Dent* **52** 79–86, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.07.016>.
8. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, & Tay FR (2005) Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo *J Dent Res* **84(8)** 741–746.
9. Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellán CS, Phansalkar RS, Aguiar TR, Vidal CMP, Napotilano JG, Nam JW, & Leme AA (2014) Dentin biomodification: Strategies, renewable resources and clinical applications *Dent Mater* **30(1)** 62–76, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.10.012>.
10. Vidal CMP, Aguiar TR, Phansalkar R, McAlpine JB, Napolitano JG, Chen SN, Araújo LSN, Pauli GF, & Bedran-Russo A (2014) Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins *Acta Biomater* **10(7)** 3288–3294, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.036>.
11. Demeule M, Brossard M, Pagé M, Gingras D, & Béliveau R (2000) Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta* **1478(1)** 51–60, [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00009-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00009-1).
12. Jackson JK, Zhao J, Wong W, & Burt HM (2010) The inhibition of collagenase induced degradation of collagen by the galloyl-containing polyphenols tannic acid, epigallocatechin gallate and epicatechin gallate *J Mater Sci Mater Med* **21(5)** 1435–1443.

13. Neri JR, Yamauti M, Feitosa VP, Pires APM, Araújo R dos S, & Santiago SL (2014) Physicochemical properties of a methacrylate-based dental adhesive incorporated with epigallocatechin-3-gallate *Braz Dent J* **25(6)** 528–531.
14. Santiago SL, Osorio R, Neri JR, Carvalho RM, & Toledano M (2013) Effect of the flavonoid epigallocatechin-3-gallate on resin-dentin bond strength *J Adhes Dent* **15(6)** 535–540.
15. Perdigão J, Reis A, & Loguercio AD (2013) Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review *J Esthet Restor Dent* **25(4)** 219–241.
16. Brackett MG, Li N, Brackett WW, Sword RJ, Qi YP, Niu LN, Pucci CR, Dib A, Pashley DH, & Tay FR (2011) The critical barrier to progress in dentine bonding with the etch-and-rinse technique *J Dent* **39(3)** 238–248.
17. Viana ÍEL, Lopes RM, Silva FRO, Lima NB, Aranha ACC, Feitosa S, & Scaramucci T (2020) Novel fluoride and stannous-functionalized  $\beta$ -tricalcium phosphate nanoparticles for the management of dental erosion *J Dent* **92** 103263.
18. Gasik M, Keski-Honkola A, Bilotsky Y, & Friman M (2014) Development and optimisation of hydroxyapatite- $\beta$ -TCP functionally gradated biomaterial *J Mech Behav Biomed Mater* **30** 266–273.
19. Guimarães MRF de S (2016) Reparo ósseo de defeitos cirúrgicos críticos preenchidos ou não com  $\beta$ -fosfato tricálcio (RTR®–Septodont): estudo histológico e histométrico em tíbias de ratos Universidade Estadual Paulista (UNESP).
20. Epasinghe DJ, Burrow MF, & Yiu CKY (2017) Effect of proanthocyanidin on ultrastructure and mineralization of dentine collagen *Arch Oral Biol* **84(August 2016)** 29–36, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.09.012>.
21. Tay FR, Pashley DH, & Yoshiyama M (2002) Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res* **81(7)** 472–476.
22. Feitosa VP, Sauro S, Ogliari FA, Ogliari AO, Yoshihara K, Zanchi CH, Correr-Sobrinho L, Sinhoreti MA, Correr AB, Watson TF, & Van Meerbeek B (2014) Impact of hydrophilicity and length of spacer chains on the bonding of functional monomers. *Dent Mater* **30(12)** e317-23, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.06.006>.
23. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, & Tjäderhane L (2001) The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats *J Dent Res* **80(6)** 1545–1549.
24. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, & Pashley DH (2006) Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives *Eur J Oral Sci* **114(2)** 160–166.
25. De Munck J de, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, & Van Meerbeek B (2005) A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results *J Dent Res* **84(2)** 118–132.
26. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, & Tezvergil-

- Mutluay A (2011) State of the art etch-and-rinse adhesives *Dent Mater* **27(1)** 1–16, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016>.
27. Seseogullari-Dirihan R, Mutluay MM, Pashley DH, & Tezvergil-Mutluay A (2017) Is the inactivation of dentin proteases by crosslinkers reversible? *Dent Mater*, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.09.036>.
  28. Braga RR, & Fronza BM (2020) The use of bioactive particles and biomimetic analogues for increasing the longevity of resin-dentin interfaces: A literature review , <https://doi.org/10.4012/dmj.2019-293>.
  29. Du T, Niu X, Li Z, Li P, Feng Q, & Fan Y (2018) Crosslinking induces high mineralization of apatite minerals on collagen fibers *Int J Biol Macromol* **113(2017)** 450–457, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.136>.
  30. Wang Y, Von Euw S, Fernandes FM, Cassaignon S, Selmane M, Laurent G, Pehau-Arnaudet G, Coelho C, Bonhomme-Coury L, & Giraud-Guille M-M (2013) Water-mediated structuring of bone apatite *Nat Mater* **12(12)** 1144.
  31. Albuquerque N, Neri JR, Lemos M, Yamauti M, de Sousa F, & Santiago SL (2019) Effect of Polymeric Microparticles Loaded With Catechin on the Physicochemical Properties of an Adhesive System. *Oper Dent* 18-112–L, <https://doi.org/10.2341/18-112-L>.
  32. Du X, Huang X, Huang C, Wang Y, & Zhang Y (2012) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive *J Dent* **40(6)** 485–492.
  33. Arrais CAG, Pontes FM, Santos LPS dos, Leite ER, & Giannini M (2007) Degree of conversion of adhesive systems light-cured by LED and halogen light *Braz Dent J* **18(1)** 54–59.
  34. Ferracane JL (1985) Correlation between hardness and degree of conversion during the setting reaction of unfilled dental restorative resins *Dent Mater* **1(1)** 11–14.
  35. de Araújo Costaa CAG, Passosb VF, Neric JR, Mendonçad JS, & Santiagoe SL (2019) Effect of Metalloproteinase Inhibitors on Bond Strength of a Self-etching Adhesive on Erosively Demineralized Dentin. *J. Adhes. Dent.* 21:.
  36. Khamverdi Z, Rezaei-Soufi L, & Rostamzadeh T (2015) The effect of epigallocatechin gallate on the dentin bond durability of two self-etch adhesives *J Dent* **16(2)** 68.
  37. Oliveira-Reis B, Maluly-Proni AT, Fagundes TC, Vasconcelos G, Bresciani E, Prakki A, & dos Santos PH (2019) Influence of protease inhibitors on the degradation of sound, sclerotic and caries-affected demineralized dentin *J Mech Behav Biomed Mater* **97(May)** 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.05.003>.
  38. Pallan S, Araujo MVF, Cilli R, & Prakki A (2012) Mechanical properties and characteristics of developmental copolymers incorporating catechin or chlorhexidine *Dent Mater* **28(6)** 687–694.
  39. de Macedo FAA, Souza NO, Lemos MVS, De-Paula DM, Santiago SL, & Feitosa VP (2019) Dentin bonding and physicochemical properties of adhesives incorporated with epigallocatechin-3-gallate *Odontology* **107(1)** 23–28, <https://doi.org/10.1007/s10266->

018-0367-0.

40. Delgado-López JM, Bertolotti F, Lyngsø J, Pedersen JS, Cervellino A, Masciocchi N, & Guagliardi A (2017) The synergic role of collagen and citrate in stabilizing amorphous calcium phosphate precursors with platy morphology *Acta Biomater* **49** 555–562.
41. Liu Y, Mai S, Li N, Yiu CKY, Mao J, Pashley DH, & Tay FR (2011) Differences between top-down and bottom-up approaches in mineralizing thick, partially demineralized collagen scaffolds *Acta Biomater* **7(4)** 1742–1751.

## *Conclusão*

---

#### **4. CONCLUSÃO**

Após observação dos diferentes achados apresentados nesta tese, pode-se inferir que: (1) o uso de soluções alcalinas de ESU é efetiva em promover biomodificação, (2) todos os polifenóis testados (ácido elágico, curcumina, hesperidina e apigenina) são efetivos em promover reticulação de colágeno desmineralizado, (3) o ácido elágico se mostrou mais efetivo entre todos os agentes experimentais quando aplicado como pré-tratamento dentinário e (4) a incorporação de epigallocatequina-3-galato, associada ou não ao betatricálcio fosfato, foi efetiva em preservar a resistência de união de um adesivo universal em dentina, sem afetar negativamente as propriedades físico-químicas.

## *Referências*

---

## 5. REFERÊNCIAS

ABUNA, G. et al. Bonding performance of experimental bioactive/biomimetic self-etch adhesives doped with calcium-phosphate fillers and biomimetic analogs of phosphoproteins. **Journal of Dentistry**, v. 52, p. 79–86, 2016.

AGUIAR, T. R. et al. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 4, p. 417–422, 2014.

AKIYAMA, H. et al. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 487–491, 2001.

AL-OBAIDI, M. M. J. et al. Impact of ellagic acid in bone formation after tooth extraction: An experimental study on diabetic rats. **Scientific World Journal**, 2014 [*On-line*].

ALBUQUERQUE, N. et al. Effect of Polymeric Microparticles Loaded With Catechin on the Physicochemical Properties of an Adhesive System. **Operative Dentistry**, v. 44, n. 4, p. 202–212, 2019.

BEDRAN-RUSSO, A. K. et al. Dentin biomodification: Strategies, renewable resources and clinical applications. **Dental Materials**, v. 30, n. 1, p. 62–76, 2014.

BETANCOURT, D. E.; BALDION, P. A.; CASTELLANOS, J. E. **Resin-dentin bonding interface: Mechanisms of degradation and strategies for stabilization of the hybrid layer**. **International Journal of Biomaterials**, 2019.

BRAGA, R. R.; FRONZA, B. M. The use of bioactive particles and biomimetic analogues for increasing the longevity of resin-dentin interfaces : A literature review. **Dental Materials Journal**, v. 39, n. 1, p.62-68, 2020.

CARRILHO, M. R. et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. **Dental Materials**, v. 26, n. 8, p. 779–785, 2010.

CHAUSSAIN, C. et al. Dentin matrix degradation by host matrix metalloproteinases: inhibition and clinical perspectives toward regeneration. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 308-333, 2013.

CHEN, C. et al. Bonding of universal adhesives to dentine- Old wine in new bottles? **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 5, p. 525–536, 2015.



- COSTA, C. A. G. et al. Effect of Matrix Metalloproteinase Inhibitors on Bond Strength of a Self-etching Adhesive on Erosively Demineralized Dentin. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 21, n. 4, p. 337-344, 2019.
- DE MORAES, M. D. R. et al. Effect of green tea as a protective measure against dental erosion in coronary dentine. **Brazilian oral research**, v. 30, n. 1, p. 1–6, 2016.
- DELL’AICA, I. et al. Matrix proteases, green tea, and St. John’s wort: Biomedical research catches up with folk medicine. **Clinica Chimica Acta**, v. 381, n. 1, p. 69–77, 2007.
- EKAMBARAM, M.; YIU, C. K. Y.; MATINLINNA, J. P. Effect of solvents on dentin collagen cross-linking potential of carbodiimide. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 17, n. 3, p. 219–226, 2015.
- GARBISA, S. et al. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. **Cancer**, v. 91, n. 4, p. 822–832, 2001.
- GASIK, M. et al. Development and optimisation of hydroxyapatite- $\beta$ -TCP functionally graded biomaterial. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 30, p. 266–273, 2014.
- GUIMARÃES, M. R. F. DE S. **Reparo ósseo de defeitos cirúrgicos críticos preenchidos ou não com  $\beta$ -fosfato tricálcio (RTR®–Septodont): estudo histológico e histométrico em tíbias de ratos**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2016.
- HANABUSA, M. et al. Bonding effectiveness of a new “multi-mode” adhesive to enamel and dentine. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 6, p. 475–484, 2012.
- HASHIMOTO, M. A Review—Micromorphological evidence of degradation in resin-dentin bonds and potential preventional solutions. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 92, n. 1, p. 268–280, 2010.
- HEBLING, J. et al. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. **Journal of Dental Research**, v. 84, n. 8, p. 741–746, 2005.
- HIRAISHI, N. et al. Hesperidin interaction to collagen detected by physico-chemical techniques. **Dental Materials**, v. 33, n. 1, p. 33–42, 2017.

- IINO, T. et al. Effect of ellagic acid on gastric damage induced in ischemic rat stomachs following ammonia or reperfusion. **Life Sciences**, v. 70, n. 10, p. 1139–1150, 2002.
- PRIYADARSINI, K. et al. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2200–2206, 2002.
- JACKER-GUHR, S.; LUEHRS, A. K.; SANDER, J. How “Universal” is Adhesion? Shear bond strength of multi-mode adhesives to enamel and dentin. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 21, n. 1, p. 87–95, 2019.
- JACKSON, J. K. et al. The inhibition of collagenase induced degradation of collagen by the galloyl-containing polyphenols tannic acid, epigallocatechin gallate and epicatechin gallate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 5, p. 1435–1443, 2010.
- JEE, S. E. et al. Investigation of ethanol infiltration into demineralized dentin collagen fibrils using molecular dynamics simulations. **Acta Biomaterialia**, v. 36, p. 175–185, 2016.
- LEME-KRAUS, A. A. et al. Biostability of the Proanthocyanidins-Dentin Complex and Adhesion Studies. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 4, p. 406–412, 2017.
- LEME-KRAUS, A. A. et al. Dimeric Proanthocyanidins on the Stability of Dentin and Adhesive Biointerfaces. **Journal of Dental Research**, p. 002203451989295, 11 dez. 2019.
- M JAMIL AL-OBAIDI, M. et al. Ellagic acid increases osteocalcin and alkaline phosphatase after tooth extraction in nicotinic-treated rats. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 16, p. 2403–2410, 2016.
- MARAVIC, T. et al. How stable is dentin as a substrate for bonding? **Current Oral Health Reports**, v. 4, n. 3, p. 248–257, 2017.
- NASCIMENTO, F. D. et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. **Journal of Dental research**, v. 90, n. 4, p. 506–511, abr. 2011.
- NERI, J. R. et al. Physicochemical properties of a methacrylate-based dental adhesive incorporated with epigallocatechin-3-gallate. **Brazilian Dental Journal**, v. 25, n. 6, p. 528–531, 2014.
- NIU, L. N. et al. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. **Journal of Dentistry**, v. 39, n. 8, p. 536–542, 2011.

- OSORIO, R. et al. Zinc incorporation improves biological activity of beta-tricalcium silicate resin-based cement. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 11, p. 1840–1845, 2014.
- OSORIO, R. et al. Zinc-modified nanopolymers improve the quality of resin–dentin bonded interfaces. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 9, p. 2411–2420, 2016.
- PARI, L.; SIVASANKARI, R. Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 4, p. 395–401, 2008.
- PASHLEY, D. H. et al. State of the art of etch-and-rinse adhesives. **Dental Materials**, v. 27, n. 1, p. 1–16, jan. 2011.
- PERDIGÃO, J.; REIS, A.; LOGUERCIO, A. D. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 25, n. 4, p. 219–241, 2013.
- SANTIAGO, S. L. et al. Effect of the flavonoid epigallocatechin-3-gallate on resin-dentin bond strength. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 15, n. 6, p. 535–540, 2013.
- SCHEFFEL, D. L. S. et al. Transdental cytotoxicity of carbodiimide (EDC) and glutaraldehyde on odontoblast-like cells. **Operative Dentistry**, v. 40, n. 1, p. 44–54, 2015.
- SESEOGULLARI-DIRIHAN, R. et al. Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. **Dental Materials**, v. 31, n. 8, p. 941–947, 2015.
- SESEOGULLARI-DIRIHAN, R. et al. Use of crosslinkers to inactivate dentin MMPs. **Dental Materials**, v. 32, n. 3, p. 423–432, 2016.
- SESEOGULLARI-DIRIHAN, R. et al. Inhibitory effect of curcuminoid pretreatments on endogenous dentin proteases. **Dental Materials Journal**, v. 37, n. 3, p. 445–452, 2018.
- SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 6, p. 962–978, 2010.
- SOFAN, E. et al. Classification review of dental adhesive systems: from the IV generation to the universal type. **Annali di Stomatologia**, v. 8, n. 1, p. 1, 2017.
- TERSARIOL, I. L. et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 3, p. 475–481, 2010.

TJADERHANE, L. et al. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of “dentin degradomics”. **Caries Research**, v. 49, n. 3, p. 193–208, 2015.

TJÄDERHANE, L. et al. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **Journal of Dental Research**, v. 77, n. 8, p. 1622–9, ago. 1998.

TOLEDANO, M. et al. A ZnO-doped adhesive reduced collagen degradation favouring dentine remineralization. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 9, p. 756–765, 2012.

TRZECIAKIEWICZ, A. et al. Hesperetin stimulates differentiation of primary rat osteoblasts involving the BMP signalling pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 5, p. 424–431, 2010.

TÜRK, G. et al. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 4, p. 587–596, 2010.

VAIDYANATHAN, T. K.; VAIDYANATHAN, J. Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 88, n. 2, p. 558–578, 2009.

VIANA, Í. E. L. et al. Novel fluoride and stannous-functionalized  $\beta$ -tricalcium phosphate nanoparticles for the management of dental erosion. **Journal of Dentistry**, v. 92, p. 103-133, 2020.

VIDAL, C. M. P. et al. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 7, p. 3288–3294, 2014.

YALLAPU, M. M. et al. Therapeutic applications of curcumin nanoformulations. **The AAPS Journal**, v. 17, n. 6, p. 1341–1356, 2015.

ZHANG, S.; KERN, M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. **International Journal of Oral Science**, v. 1, n. 4, p. 163-176, 2009.

*Anexos*

---

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOMODIFICAÇÃO DENTINÁRIA DE DIFERENTES SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM NATURAL.

**Pesquisador:** Marcelo Victor Sidou Lemos

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 06381318.3.0000.5054

**Instituição Proponente:** Departamento de Odontologia Restauradora

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.212.734

#### Apresentação do Projeto:

A durabilidade de restaurações resinosas continua a ser um desafio em Odontologia restauradora. Nesse contexto, o uso de agentes de ligações cruzadas de colágeno dentinário de origem natural tem ganhado cada vez mais espaço na literatura, sendo as proantocianidinas, extraídas da semente da uva, as mais pesquisadas. Entretanto, seu emprego apresenta diversas desvantagens tais como a pigmentação do substrato e o longo tempo de aplicação. Na busca por novos agentes naturais de biomodificação dentinária foi proposto que diferentes polifenóis poderiam apresentar efeito semelhante, tais como o ácido elágico, a hesperidina, a apigenina, a curcumina e a epigallocatequina-3-galato. Também foi sugerido que o uso da quitosana, um biopolímero natural, poderia atuar de forma coadjuvante no reforço do colágeno. O trabalho será dividido em 5 fases, sendo a primeira delas denominada - Fase I: "Avaliação da capacidade de biomodificação do colágeno de diferentes polifenóis de origem natural" utilizando-se as metodologias de teste de flexão de 3 pontos (n=10), alteração de massa (n=10), taxa de biodegradação (n=10) e alteração de cor (n=10). Em seguida será realizada a Fase II: "Avaliação da incorporação de diferentes polifenóis de origem natural em ácido fósfórico" utilizando-se as metodologias de resistência de união (n=10), nanoinfiltração (n=6) e micropermeabilidade (n=3). A terceira Fase será denominada: "Avaliação da capacidade de biomodificação do colágeno após pré-tratamento com quitosana", para tanto serão realizados os testes de

resistência de união (n=10), flexão de 3 pontos (n=10) e alteração de massa (n=10). Para a

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: [comepo@ufc.br](mailto:comepo@ufc.br)

Continuação do Parecer: 3.212.734

realização da Fase IV: "Avaliação da associação entre polifenóis de origem natural e quitosana sobre a união em dentina hígida e afetada por cárie", serão realizados os testes de resistência de união (n=10), nanoinfiltração (n=6) e microporabilidade (n=3). Por fim, será realizada a Fase V: "Avaliação das propriedades físicas e químicas de um adesivo simplificado incorporado com agentes de biomodificação associados à quitosana" através dos testes de resistência de união (n=10), grau de conversão (n=3).

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar a capacidade de biomodificação dentinária do ácido elágico, hesperidina, apigenina, curcumina, epigallocatequina-3-galato e proantocianidinas, associadas ou não a quitosana.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar a capacidade de formação de ligações cruzadas dos polifenóis de origem natural.
2. Determinar a melhor concentração e tempo de aplicação dos polifenóis e da quitosana sobre dentina.
3. Analisar a influência do uso da quitosana sobre o colágeno dentinário.
4. Avaliar a influência da associação dos agentes de ligações cruzadas e quitosana sobre sistemas adesivos simplificados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Para o estudo serão utilizados terceiros molares extraídos por motivos alheios a pesquisa. Logo por se tratar de uma pesquisa laboratorial "in vitro", a mesma não oferece riscos aos doadores.

Benefícios:

Possibilidade de desenvolvimento de novos materiais adesivos que possam influenciar na durabilidade das restaurações odontológicas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa muito relevante para a área da dentística.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos apresentados. Conforme solicitado o pesquisador incluiu a Declaração de Concordância dos envolvidos com o projeto.

**Recomendações:**

Não se aplica.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: [comepa@ufc.br](mailto:comepa@ufc.br)

Continuação do Parecer: 3.212.734

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**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_1194687.pdf	27/02/2019 12:26:23		Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLAR.pdf	27/02/2019 12:25:51	Marcelo Victor Sidou Lemos	Aceito
Outros	CARTA.pdf	25/01/2019 17:54:54	Marcelo Victor Sidou Lemos	Aceito
Orçamento	ORCANOVO.pdf	25/01/2019 17:37:51	Marcelo Victor Sidou Lemos	Aceito
Cronograma	CRONONOVO__.pdf	25/01/2019 17:34:08	Marcelo Victor Sidou Lemos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochuraprojeto__.pdf	21/01/2019 11:30:09	Marcelo Victor Sidou Lemos	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTRO.pdf	21/01/2019 11:27:39	Marcelo Victor Sidou Lemos	Aceito
Outros	termodefidepositario.pdf	09/08/2018 12:05:02	Marcelo Victor Sidou Lemos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Cartadeautorizacao.pdf	09/08/2018 12:03:44	Marcelo Victor Sidou Lemos	Aceito
Declaração do Patrocinador	custeio.pdf	06/08/2018 14:27:39	Marcelo Victor Sidou Lemos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termodedispensa.pdf	06/08/2018 14:25:50	Marcelo Victor Sidou Lemos	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

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](mailto:comepe@ufc.br)



Continuação do Parecer: 9.212.734

FORTALEZA, 21 de Março de 2019

---

**Assinado por:**  
**FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA**  
**(Coordenador(a))**

**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](mailto:comepe@ufc.br)