



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

TALITA ARRAIS DANIEL MENDES

**Efeito de diferentes agentes bioativos de origem natural e sintética na estabilidade de
união em dentina**

FORTALEZA

2022

TALITA ARRAIS DANIEL MENDES

**Efeito de diferentes agentes bioativos de origem natural e sintética na estabilidade de
união em dentina**

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 Doutora em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonça.

FORTALEZA

2022

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)

M492e Mendes, Talita Arrais Daniel.
Efeito de diferentes agentes bioativos de origem natural e sintética na estabilidade de união em dentina
/ Talita Arrais Daniel Mendes. – 2022.
107 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonça.

1. dentina. 2. polifenóis. 3. colágeno. I. Título.

CDD 617.6

TALITA ARRAIS DANIEL MENDES

Efeito de diferentes agentes bioativos de origem natural e sintética na estabilidade de união em dentina

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 Doutora em Odontologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof^ª. Dr^ª. Vanara Florêncio Passos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Juliana Fraga Soares Bombonatti
Universidade Federal do Ceará (USP)

Prof^ª. Dr^ª. Cecilia Atem Goncalves de Araujo Costa
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Aos meus pais, Maria Zilná e Raimundo Eriberto, pelo incentivo, apoio e todo esforço realizados para minha educação. Exemplo de humildade, caráter e honestidade, sempre guiando em todos os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sempre estar presente em minha vida, sendo meu guia.

Aos meus avós **Maria Mirian Nunes Mendes** (*in memoriam*), **Maria Telma Arrais Daniel**, **José Salustiano Mendes** que são meus maiores exemplo de força, batalha de vida e perseverança. Sempre participaram da minha criação, ativamente. Sem vocês, eu jamais teria chegado até aqui.

À minha família, em especial meus pais, **Maria Zilná Arrais Daniel Mendes e Raimundo Eriberto Mendes**; minha irmã **Sarah Arrais Daniel Mendes**; e meus sobrinhos **João Miguel Arrais Mendes Vasconcelos e Gabriel Arrais Mendes Vasconcelos**, que sempre me incentivaram e acreditaram muito em mim. Sem vocês essa conquista não seria possível.

À todos os meus familiares em especial, **Zildene Arrais Daniel, Bemmunda Machado Mendes, Heitor Nunes Mendes, Renata Cristina Machado Mendes, Rebeca Machado Mendes, Raquel Machado Mendes** que foram grandes incentivadores durante todo esse período.

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, **Dr. Juliano Sartori Mendonça**, a pessoa em quem eu mais me espelho profissionalmente, que me acolheu desde a graduação, me incentivando e abraçando minhas ideias. Obrigada por todo o conhecimento repassado, por toda paciência durante todos esses 10 anos de convivência. O senhor é inspiração em todos os aspectos, desde a primeira aula que eu assisti pensei “quero dar aula igual a ele, ser didático dessa maneira”, quando vi os seus casos clínicos pensei: “nossa, ele é o melhor que existe, será que conseguirei ser assim?!”, quando lhe vi acolher e entender alunos que passavam por dificuldades “é esse o tipo de professor, humano, que quero ser”. Obrigada por ter entrado em minha trajetória e me guiado dentro de toda ética profissional que o senhor tem.

Ao meu querido professor, **Dr Sérgio Lima Santiago**, obrigada por me acolher no mundo da pesquisa, em 2013 me abordou após uma aula: “Talita, você deseja acompanhar

pesquisas no laboratório?” e eu prontamente aceitei, mal sabia que era um dos meus maiores desejos, ingressas na pesquisa. Desde então o senhor me concedeu grandes oportunidades as quais jamais irei esquecer, o senhor é um grande exemplo para mim, de honestidade, de pesquisador e professor. Gratidão sempre.

À minha banca, **Dra. Cecilia Atem Goncalves de Araujo Costa, Dra. Vanara Florêncio Passos, Dra. Juliana Fraga Soares Bombonatti**, 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.

Ao meu companheiro **Marcelo Victor Sidou Lemos** que me apoiou em todos os momentos, desde a graduação, além de companheiro de vida é de trabalho e pesquisa. Obrigada por acreditar em mim, por me incentivar e contribuir tão ativamente para confecção deste trabalho. Eu me inspiro muito no ser humano e pesquisador que és.

À minha equipe de pesquisa, **Maria Clara Ayres Estellita e Samuel Chillavert Dias Pascoal**, não consigo descrever a sorte que eu tive quando vocês cruzaram meu caminho, em 2016. Vocês são sensacionais, sempre dispostos a ajudar, muito dedicados e com muita força de vontade. Agradeço muito por toda ajuda e amizade. Espero ter vocês em minha vida para sempre. Sem vocês eu jamais teria conseguido.

Aos meus amigos, **Natasha Muniz Fontes, Raul Anderson Domingues Alves da Silva, Pedro Henrique Chaves Isaias, Ernanda Maria de Araújo Sales, Karlos Eduardo Rodrigues Lima, Zidane Hurtado Rabelo, David Queiroz de Freitas** que estivem comigo durante períodos bem difíceis e se mostram muito solícitos. Sempre acreditando em minha capacidade e torcendo por minhas conquistas.

À **Central analítica** e ao **curso de física** da Universidade Federal do Ceará que possibilitaram a realização de alguns testes para finalização dos experimentos científicos.

RESUMO

A utilização de polifenóis (PF) como estratégia biomodificadora tem sido bastante frequente dentro da Odontologia Restauradora, com a finalidade de melhorar o processo adesivo, reduzindo mecanismos de degradação que ocorrem na camada híbrida. Logo, o objetivo da presente tese é avaliar o efeito de diferentes agentes bioativos de origem natural e sintética na estabilidade de união de restaurações com resina composta em dentina. Esse estudo é composto por três capítulos, no qual o primeiro capítulo teve como objetivo avaliar, por meio de uma revisão sistemática e meta-análise, o efeito do extrato da semente de uva (ESU) na estabilidade de restaurações com resina composta em dentina. Realizou-se uma busca em 4 bancos de dados: Sistema Online de Busca e Análise de Literatura, *Web of Science*, *Science Direct* e *Scopus*. Utilizou-se como descritores: *Proanthocyanidins*, *Cross-Linking Reagents* e *Dentin* com seus respectivos *entry terms*. Um total de 1074 artigos foram encontrados e, após a aplicação do *checklist* do fluxograma do PRISMA, nove artigos foram selecionados. Pôde-se concluir que o ESU, utilizado como pré-tratamento, melhora a estabilidade de união de sistemas adesivos à dentina, em estudos *in vitro*. O segundo capítulo teve como objetivo analisar o efeito biomodificador de ésteres galoilados de origem natural sobre o colágeno dentinário, e sua influencia no processo adesivo em dentina. Para tanto usaram-se os seguintes agentes de biomodificação como pré-tratamento de dentina: epigallocatequina-3-galato 0,1% (EGCG), ácido tânico 1% (AT), proantocianidina 6,5% (PAC) e água destilada (AD), como controle negativo. As variáveis dependentes do estudo foram o módulo de elasticidade (ME), avaliada quantitativamente por meio do teste de flexão de 3 pontos (n=12), variação de massa (n=12), em balança analítica de precisão e resistência de união à dentina (n=8), (μ TSB), realizado por uma máquina de ensaios mecânicos universais. Realizou-se, ainda, análise qualitativa do colágeno, por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) (n=3) e teste de micropermeabilidade (n=3) da interface de união dentina/resina. Notou-se que o AT aumentou significativamente o ME do colágeno. A PAC e o AT foram capazes de manter a estabilidade de união da resina à dentina, após 6 meses. Porém, conclui-se que a presença de grupamentos galoil em polifenóis naturais não melhora a estabilidade de união de uma restauração em dentina. O objetivo do terceiro capítulo foi verificar o uso do propilgalato como agente biomodificador de colágeno dentinário no processo adesivo em dentina. Utilizaram-se as seguintes substâncias como pré-tratamento em dentina: propilgalato 0,1% (PGa0,1%); propilgalato 1% (PGa1%); propilgalato a 10% (PGa10%); glutaraldeído a 5% (GA5%); e água destilada (AD). Analisou-se a dentina tratada pelas diferentes soluções de pré-tratamento, com 1 minuto de aplicação, por meio de FT-IR (n=3), bem como avaliou-se a resistência de união

de um sistema adesivo de condicionamento e lavagem à dentina (n=10), com 24 horas e 6 meses de envelhecimento. O PGa, em diferentes concentrações, foi capaz de realizar ligações químicas com a dentina desmineralizada. O PGa10% foi capaz de gerar um aumento da resistência de união da dentina à resina em uma análise imediata, porém, após 6 meses, houve um decréscimo dela. Os grupos GA5%, PGa0,1% e PGa1% foram capazes de manter essa estabilidade. Assim sendo, a busca por polifenóis naturais e sintéticos que tenham elevada capacidade bioativa, como os ésteres galoilados, tem sido promissora; assim sendo, esses compostos desempenham um papel eficiente em manter a estabilidade dessas ligações ao longo do tempo.

Palavras-chave: dentina, polifenóis, colágeno, proantocianidinas, galato de propila.

ABSTRACT

The use of polyphenols (PF) as a biomodifying strategy has been quite frequent within Restorative Dentistry, with the purpose of improving the adhesive strategy, reducing degradation mechanisms that occur in the hybrid layer. Therefore, the objective of the present thesis is to evaluate the effect of different bioactive agents of natural and synthetic origin on the bond stability of restorations with composite resin in dentin. This study consists of three chapters, where the first chapter aimed to evaluate, through a systematic review and meta-analysis, the effect of grape seed extract (GSE) on the stability of restorations with composite resin in dentin. A search was carried out in 4 databases: Online System of Literature Search and Analysis, Web of Science, Science Direct and Scopus. The following descriptors were used: Proanthocyanidins, Cross-Linking Reagents and Dentin with their respective entry terms. A total of 1074 articles were found and, after applying the PRISMA flowchart checklist, nine articles were selected. It can be concluded that ESU, used as a pre-treatment, improves the bond stability of adhesive systems to dentin in *in vitro* studies. The second chapter aimed to analyze the biomodifying effect of galloylated esters of natural origin on dentinal collagen. For this purpose, the following biomodification agents were used as dentin pretreatment: epigallocatechin-3-gallate 0.1% (EGCG), tannic acid 1% (TA), proanthocyanidin 6.5% (PAC) and distilled water (DW) as a negative control. The dependent variables of the study were the modulus of elasticity (ME), quantitatively evaluated through the 3-point bending test (n=15), mass change (n=15), on an analytical precision balance and bond strength to dentin (n=8), (μ TSB), performed by a universal mechanical testing machine. A qualitative analysis of collagen was also performed using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) (n=3) and micropermeability test (n=3) of the dentin/resin bonding interface. It was noted that AT significantly increased collagen ME. PAC and AT are able to maintain the stability of bonding the resin to dentin after 6 months. However, it was concluded that the presence of galloil groups in natural polyphenols does not seem to improve the bonding stability of a dentin restoration. The objective of the third chapter was to verify the use of propyl gallate as a biomodifying agent of dentin collagen in the dentin bonding process. The following substances were used as dentin pretreatment: 0,1% propyl gallate (PGa0.1%); 1% propyl gallate (PGa1%); 10% propyl gallate (PGa10%); 5% glutaraldehyde (GA5%); and distilled water (DW). The dentin treated by the different pre-treatment solutions was analyzed by means of FT-IR (n=3), as well as the bond strength of an adhesive system for conditioning and washing dentin (n=8), with 24 hours and 6 months of aging. PGa, at different concentrations, was able to perform chemical bonds with

demineralized dentin. PGa10% was able to generate an increase in the bond strength of dentin to resin in an immediate analysis, but after 6 months there was a decrease in it. The GA5%, PGa0,1% and PGa1% groups were able to maintain this stability. Therefore, the search for natural and synthetic polyphenols that have a high bioactive capacity, such as galloylated esters, has been promising; however, despite the more pronounced chemical interaction with dentinal collagen, in general, these compounds do not play an efficient role in maintaining the stability of these bonds over time.

Keywords: dentin, polyphenols, collagen, proanthocyanidins, dental adhesives, propyl gallate.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 PROPOSIÇÃO	18
3 CAPÍTULOS	20
CAPÍTULO I	22
CAPÍTULO II	55
CAPÍTULO III	77
CONCLUSÃO GERAL	93
REFERÊNCIAS	95
ANEXOS	102

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

O crescente aumento de procedimentos restauradores que mimetizam o substrato dentário tem sido uma realidade constante nos últimos anos. Esse mimetismo só tem se tornado possível devido ao desenvolvimento de sistemas adesivos de alta performance, que permitem a união entre materiais dentários, como as resinas compostas, e a estrutura dentária. Os sistemas adesivos contemporâneos podem ser divididos em três tipos quanto à sua forma de aplicação: os de condicionamento e lavagem, os autocondicionantes e os universais (GIANNINI *et al.*, 2015; VAN-MEERBEEK *et al.*, 2020).

Os sistemas adesivos de condicionamento e lavagem têm sido foco de muitos estudos devido à hibridização formada em dentina ser menos eficaz, quando comparados aos autocondicionantes (HEBLING *et al.*, 2005; PASHLEY *et al.*, 2011; EKAMBARAM; YIU; MATINLINNA, 2015; VAN-MEERBEEK *et al.*, 2020). Em dentina, o condicionamento ácido causa uma desmineralização mais profunda, o que dificulta a infiltração completa dos monômeros resinosos (VAN-MEERBEEK *et al.*, 2020). Esses sistemas adesivos também exigem uma técnica adesiva mais sensível, sendo obrigatória a aplicabilidade de uma técnica úmida para união eficaz. Nesse substrato dental, o excesso ou falta de água pode prejudicar em um adequado processo adesivo. Assim, a interface de união, também denominada camada híbrida, consiste em uma zona de maior fragilidade de uma restauração (SPENCER *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2019), estando sujeita a vários mecanismos de degradação, podendo ser dos tipos: enzimática, hidrolítica e polimérica; reduzindo o tempo de vida útil das restaurações adesivas (PASHLEY *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2019).

As enzimas metaloproteínases de matriz (MMP) e cisteíno catepsinas (CTPs) estão presentes na matriz de colágeno e, ao se realizar o condicionamento ácido da dentina, durante a realização do procedimento adesivo, ocorre a ativação das mesmas devido à redução do pH do meio (PASHLEY *et al.*, 2011). Após serem ativadas as MMPs e CTPs, inicia-se um processo de degradação nas fibrilas de colágeno do tipo I, presentes em abundância no substrato dentinário (PASHLEY *et al.*, 2011; LEMOS *et al.*, 2021). Adicionalmente, durante a desmineralização dentinária, cerca de 70% do componente mineral dentário perdido é sobreposto por água; entretanto, esse conteúdo não consegue ser completamente substituído pela matriz resinosa dos sistemas adesivos, devido ao excesso de solvente não volatilizado e movimento de fluidos no substrato dentinário, gerando sítios ricos em água dentro da camada

híbrida, que podem levar a um processo de degradação por meio de hidrólise (PASHLEY *et al.*, 2011). Além desses mecanismos de degradação, pode-se, ainda, mencionar a lixiviação de monômeros que não foram completamente polimerizados, gerando nanoporos na interface de união da resina à dentina que vão ser mais susceptíveis à ação hidrolítica (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2017).

Tendo em vista esses diversos problemas em relação à estabilidade de união de restaurações de resinas compostas ao substrato dentinário, diversas estratégias utilizando compostos bioativos para minimizar tais danos têm sido propostas (TAY *et al.*, 2009; VIDAL *et al.*, 2014). Dentre elas, pode-se destacar o uso de agentes remineralizantes (TAY *et al.*, 2009), agentes químicos para a formação de ligações cruzadas do colágeno (LEME-KRAUS *et al.*, 2017) e inibidores de proteases endógenas (KATO *et al.*, 2021).

Dentre essas estratégias, pode-se destacar os agentes químicos de ligações cruzadas de colágeno, também conhecidos por agentes biomodificadores de colágeno, que têm sido amplamente utilizados para otimizar o processo adesivo em dentina, em uma estratégia adesiva de condicionamento e lavagem (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2017). Os agentes biomodificadores de colágeno multifuncionais podem ser classificados como sintéticos ou naturais. Os de origem natural têm ganhado uma maior atenção de pesquisadores devido à sua maior potencialidade em reticular o colágeno, biodisponibilidade e biocompatibilidade (VIDAL *et al.*, 2014). Dentre esses, destacam-se as proantocianidinas (PACs), agente natural rico em polifenóis, obtidas a partir da semente de uva (*Vitis vinifera*). A PAC promove ligações químicas dos tipos covalentes, iônicas, de hidrogênio e interações hidrofóbicas com o colágeno do tipo I presente na dentina (SCHEFFEL *et al.*, 2014), reforçando as propriedades mecânicas da matriz colágena, além de promover inibição da atividade de MMPs e CTPs (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2014). Ademais, estudos indicam que a PAC pode formar complexo de cálcio amorfo (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2014) e que a sua atividade é otimizada devido à rica diversidade estrutural da molécula (VIDAL *et al.*, 2014), posicionamento dos grupamentos hidroxilas (AYDIN *et al.*, 2019) e a presença de grupamentos químicos galoil (AYDIN *et al.*, 2019).

No entanto, a PAC tem como grande desvantagem de pigmentar o substrato dentinário, o que é extremamente crítico para a estética dentária (MOREIRA *et al.*, 2017; DE SOUZA *et al.*, 2019), além de ainda não existir consenso sobre a estabilidade de união gerada por esse composto em longo prazo (EPASINGHE *et al.*, 2015; HASS *et al.*, 2016; LEME-

KRAUS *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2016; LOGUERCIO *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2017; GRÉ *et al.*, 2018; DE SIQUEIRA *et al.*, 2019; DE PAULA *et al.*, 2019); desta forma, ainda há a necessidade de se avaliar novos compostos químicos que possuam potencial biomodificador estável e aplicável em restaurações estéticas.

Nessa perspectiva, moléculas polifenóis que possuam estrutura semelhante à PAC têm sido amplamente estudados, a fim de aumentar a estabilidade da interface de união entre o sistema adesivo e a superfície dentinária. Nesse contexto, polifenóis com a presença de grupamentos galoil em sua molécula têm sido alvo de pesquisas por demonstrarem uma maior bioatividade (KARAS *et al.*, 2017) e maior capacidade de biomodificação dentinária (AYDIN *et al.*, 2019).

Os polifenóis galoilados (PG) são formados por meio de uma reação de esterificação de um polifenol qualquer com o ácido gálico, originando, dessa forma, um éster galoilado; esse processo reacional pode ocorrer de forma natural e sintética. Assim sendo, esses compostos químicos podem ser classificados, quanto à sua origem, em naturais ou sintéticos (KARAS *et al.*, 2017). Os naturais são encontrados em várias plantas, podendo-se destacar, dentro dessa categoria, as catequinas, teaflavinas, elagitaninas, o ácido elágico e o flavanol (KARAS *et al.*, 2017). Dentre os compostos naturais, observa-se que a epigalocatequina-3-galato (EGCG), derivada de uma reação química da epigalocatequina (EGC) com o ácido gálico apresenta apenas um grupamento do tipo galoil em sua molécula e está presente em uma expressiva quantidade no chá verde (KARAS *et al.*, 2017). Sabe-se que a EGCG apresenta propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes (LI *et al.*, 2013), bem como ação contra MMPs (SUN *et al.*, 2015). A EGCG tem sido estudada para melhorar a união da resina composta à dentina (DE MACEDO *et al.*, 2018); no entanto, ainda não foi comprovada a sua estabilidade de união (FIALHO *et al.*, 2019). O ácido tânico também é uma molécula galoilada de origem natural, que vem sendo amplamente estudada na Odontologia com a função de agente biomodificador de colágeno. Apresenta potencial reativo extremamente expressivo por apresentar cinco grupamentos galoil em sua composição (MENDES *et al.*, 2019), possuindo também ação antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória, demonstrando, assim, o seu potencial reativo (XIAO *et al.*, 2013).

Os ésteres de galoil sintéticos foram desenvolvidos visando reduzir a instabilidade oxidativa de algumas moléculas e, dentre esses, encontra-se o propilgalato (PGa) (BADHANI *et al.*, 2015), composto amplamente utilizado dentro da indústria cosmética e tem

sido pouco estudado em âmbito odontológico. Trata-se um éster formado por meio da esterificação do ácido gálico com o composto n-propanol (KARAS *et al.*, 2017) e apresenta atividade anticancerígena, antioxidante (INOUE *et al.*, 2000). Estudos prévios denotam que seu efeito biomodificador de colágeno é discreto quando em uma concentração pequena (0,65% m:V) (VIDAL *et al.*, 2014), sendo necessários estudos mais aprofundados nesta temática, tendo em vista o potencial promissor desta molécula.

Sabe-se que a atividade molecular de um éster galoilado está intimamente correlacionado à presença de grupamentos hidroxilas em sua molécula (VIDAL *et al.*, 2014), porém a estabilidade da interação com o colágeno pode ser influenciada diretamente pela dinâmica intrínseca da água e o tipo de interação molecular com o colágeno, sendo que algumas moléculas podem possuir a capacidade de formação de bolsas hidrofóbicas protetoras (ALANIA *et al.*, 2022).

Na Odontologia, poucos estudos relataram o seu uso como agente biomodificador de colágeno. Sabe-se de seu efeito em melhorar a propriedade mecânica do colágeno em até 7 vezes (LEME-KRAUS *et al.*, 2020); comprovando que a presença desse grupamento químico pode modificar o mecanismo de biomodificação quando comparado a compostos fenólicos convencionais (LEME-KRAUS *et al.*, 2020). Assim sendo, esses compostos podem ser promissores no processo de união de resinas à dentina e, tendo em vista que a maioria dos agentes biomodificadores de dentina não apresentam uma estabilidade clinicamente aceitável, e por muitas vezes, prejudicam a estética do substrato dentário, pretende-se investigar o efeito de ésteres galoilados na biomodificação do colágeno, bem como sua estabilidade no processo adesivo em dentina.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos:

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito *in vitro* de diferentes agentes bioativos de origem natural e sintética na estabilidade de união em dentina.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar, por meio de uma revisão sistemática e meta-análise o efeito do extrato da semente de uva na estabilidade de restaurações de resina composta em dentina.
- Avaliar o efeito biomodificador de ésteres galoilados de origem natural sob o colágeno dentinário e no procedimento adesivo, em dentina.
- Verificar, por meio de um estudo laboratorial *in vitro*, o uso do propilgalato como agente biomodificador de colágeno dentinário no processo adesivo em dentina.

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 sob o Parecer n. 4.597.236, de 17 de março de 2021 (ANEXO A). Assim sendo, esta tese é composta de três capítulos intitulados:

Capítulo I: Effect of grape seed extract on stability of restorations with composites resin: a systematic review and meta-analysis.

Talita Arrais Daniel Mendes, Samuel Chillavert Dias Pascoal, Maria Clara Ayres Estellita, Marcelo Victor Sidou Lemos, Paulo Goberlânio Barros de Silva, Juliano Sartori Mendonça.

Publicado no periódico: *International Journal of Adhesion and Adhesives*.

Capítulo II: Efeito biomodificador de ésteres galoilados de origem natural sobre o colágeno dentinário.

Talita Arrais Daniel Mendes, Samuel Chillavert Dias Pascoal, Maria Clara Ayres Estellita, Marcelo Victor Sidou Lemos, Juliano Sartori Mendonça.

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

Capítulo III: Efeito do propilgalato como agente biomodificador de colágeno no processo adesivo em dentina: estudo *in vitro*.

Talita Arrais Daniel Mendes, Samuel Chillavert Dias Pascoal, Maria Clara Ayres Estellita, Juliano Sartori Mendonça.

A ser submetido ao periódico: *Brazilian Dental Journal*.

Capítulo I

EFFECT OF GRAPE SEED EXTRACT ON STABILITY OF RESTORATIONS WITH COMPOSITES RESIN: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

Talita Arrais Daniel MENDES¹, Samuel Chillavert Dias PASCOAL², Maria Clara Ayres ESTELLITA², Marcelo Victor Sidou LEMOS³, Paulo Goberlânio Barros de SILVA⁴, Juliano Sartori MENDONÇA⁴.

¹ - Discente de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

²- Discente do curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

³- Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

⁴- Professor do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

Autor de correspondência:

Talita Arrais Daniel Mendes, Me

Programa de Pós-graduação em Odontologia

Rua Monsenhor Linhares, S/N, Fortaleza, Ceará

e-mail: talita_arrais@hotmail.com

EFFECT OF GRAPE SEED EXTRACT ON STABILITY OF RESTORATIONS WITH COMPOSITES RESIN: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

ABSTRACT

Grape Seed Extract (GSE), rich in proanthocyanidins (PAC), has been extensively researched to optimize the stability of the hybrid layer in dentin substrate. Therefore, this study aims to evaluate the use of grape seed extract in the stability of restorations with resinous composites in dentin, by a review and meta-analysis. The search was carried out in 4 different databases: Online Medical Literature Search and Analysis System (Medline – PubMed), Web of Science, Science Direct, and Scopus. Proanthocyanidins, Cross-Linking Reagents, and Dentin descriptors were used with their respective entry terms connected by the boolean operators AND and OR. We found 1074 articles, which, after applying the PRISMA flowchart checklist, resulted in 9 articles selected according to the eligibility criteria. We tabulated the qualitative results and assessed the risk of bias in each of them. Of the selected articles, 2 presented low risk, 5 medium risk and 2 high risk of bias. We compiled and tabulated the numerical data of bond strength to perform the meta-analysis ($p < 0.05$) of the articles that presented the GSE as a pretreatment and incorporated into the conditioning agent. We noted that, as a pre-treatment, the GSE improves the bonding stability, but incorporated with phosphoric acid it decreases the stability when compared to the control group.

Keywords: Dentine, Proanthocyanidins, Cross-Linking Reagents.

1. Introduction

The dentin collagen biomodifying agents (CBA) have been widely used in adhesive dentistry with the intention of improving the mechanical properties of the dentin substrate, and to effectively inhibit matrix metalloproteinase enzymes (MMPs) and Cysteine Cathepsins (CTPs) to improve the clinical durability of restorations using adhesive systems, increasing the stability of the hybrid layer in dentin (BEDRAN-RUSSO et al., 2008; BEDRAN-RUSSO et al., 2014).

In this context, natural origin CBAs have been widely used to improve the hybrid layer, with Proanthocyanidins (PAC) being the most widespread (LEME-KRAUS et al., 2017). These compounds can be classified as catechins present in several natural extracts such as grape seed (*Vitis vinífera*) [GSE], cocoa (*Theobroma cacao*), Indian tea (*Camellia sinensis*), among others (AGUIAR et al., 2014). The GSE has a significant number of PACs, which can amount to around 90 to 95% of the extract (AGUIAR et al., 2014) and has already proven its effectiveness regarding the effective formation of cross-links in dentin collagen (VIDAL et al., 2014; AGUIAR et al., 2014; VENIGALLA et al., 2016; EPASINGE et al., 2017).

PACs action mechanism interaction with dentin collagen is unspecified (BEDRAN-RUSSO et al., 2014); however, speculations suggest that connections of different kinds occur, such as stable covalent, hydrogen bonds – through interaction between the aromatic ring of catechin and the amino acid proline, present in the triple helix structure of collagen –, this molecule is also able to form complexes of amorphous calcium, indicating the mineralization of previously demineralized dentin, which makes it very promising in the promotion of a stable hybrid layer, mainly regarding the dentin

substrate, where the process is more critical due to the various degradation means that are possible (EPASINGE et al., 2017).

Although the interaction of these molecules with collagen has already been proven, in an immediate analysis, data about the longevity and stability of bond strength in the long term are still scarce (EPASINGHE et al., 2015; HASS et al., 2016; LEME-KRAUS et al., 2016; SOUSA et al., 2016; LOGUERCIO et al., 2017; ZHENG et al., 2017; GRÉ et al., 2018; DE SIQUEIRA et al., 2019; DE PAULA et al., 2019), therefore our study aimed to systematically review the literature about the use of GSE, rich in PACs, in the stability of restorations with resin composites in dentin.

2. Methodology

This study was registered on the PROSPERO platform (<https://www.crd.york.ac.uk/prospero>) under number CRD42020196063 following all PRISMA systematic review recommendations.

2.1 Research information and research strategy

Descriptors registered in MeSH and DeCS were used, together with their Entry Terms by using various search strategies (Table 1 and Table 2), based on PICOT elements for a systematic review:

Population (P): Dentin;

Intervention (I): restoration with grape seed extract (GSE) as a treatment for dentin;

Comparison (C): restorations without grape extract, as a control group;

Most important outcome (O): maintenance of the bond strength of the composite bonding restoration interfaces;

Study types (T): *in vitro* and *in situ* laboratory studies.

2.2 Eligibility Criteria

The literature search was carried out by two independent reviewers until June 18, 2020, considering articles with an unlimited year of publication, in 4 different databases: Online Medical Literature Search and Analysis System (Medline – PubMed), Web of Science, Science Direct and Scopus. Descriptors registered in the Medical Subject Headings (Mesh) (Tables 1 and 2) were used. Figure 1 shows the eligibility criteria. We included only *in vitro* laboratory studies that evaluated the bond strength of different adhesive strategies with the use of GSE on dentin with an aging period of the tested samples and even with a control group without the use of any collagen cross-linking agent. Randomized clinical trials, editorial letters, pilot studies, literature reviews, cohort, observational, and descriptive studies were excluded. The primary outcome should be an assessment of the maintenance of the bond strength of the adhesive interface after storage. We did not limit the language of the studies.

Table1: Research Strategy using PubMed (MEDLINE)

#1 (Proanthocyanidins) [Mesh] (Condensed Tannin) OR (Condensed Tannins) OR (Tannins, Condensed) OR (Anthocyanidin Polymers) OR (Polymers, Anthocyanidin) OR (Tannin, Condensed) OR (Procyanidins)

#2 (Cross-Linking Reagents) [Mesh] (Reagents, Cross-Linking) OR (Crosslinking Reagents) OR (Reagents, Crosslinking) OR (Bifunctional Reagents) OR (Reagents, Bifunctional) OR (Cross Linking Reagents) OR (Linking Reagents, Cross) OR (Reagents, Cross Linking)

#3 (Dentin) [Mesh] (Dentins) OR (Dentine) OR (Dentines)

#4 Search #1 AND #2 AND #3

#5 Search #1 AND #2

#6 Search #2 AND #3

#7 Search #1 AND #3

Table 2: Research Strategy using other databases (Web of Science, Science Direct and Scopus)

#1 TITLE-ABS-KEY (Proanthocyanidins) OR (Condensed Tannin) OR (Condensed Tannins)

#2 TITLE-ABS-KEY (Cross-Linking Reagents) OR (Reagents, Cross-Linking) OR (Crosslinking Reagents)

#3 TITLE-ABS-KEY (Dentin) OR (Dentins) OR (Dentine) OR (Dentines)

#4 TITLE-ABS-KEY (Collagen) OR (Avicon) OR (Avitene) OR (Collagen Felt)

Science Direct

#5 Search #1 AND #2 AND #3

#6 Search #1 AND #3 AND #4

Scopus

#7 Search #1 AND #2 AND #3

#8 Search #1 AND #3 AND #4

Web of Science

#9 Search #1 AND #2 AND #3

#10 Search #1 AND #3 AND #4

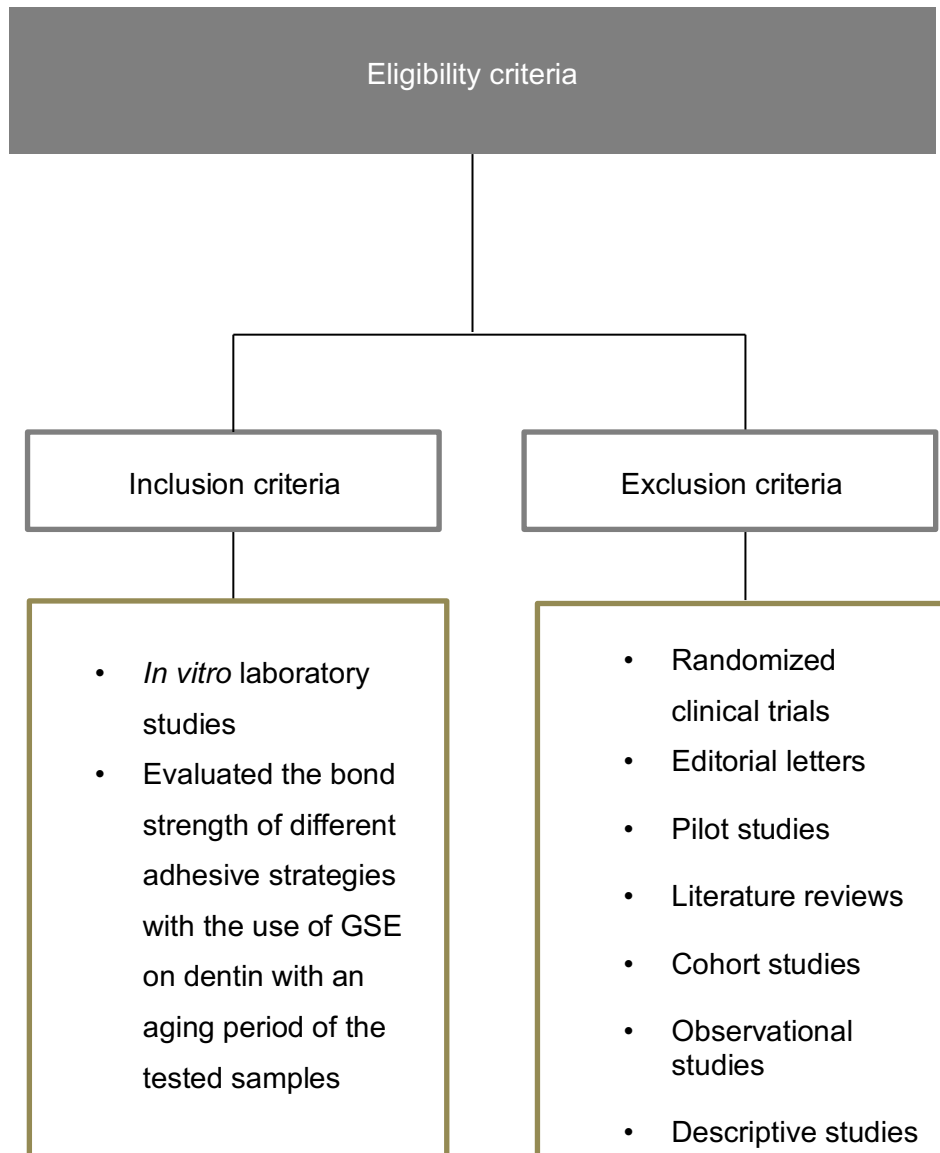


Figure 1: Selection studies eligibility criteria.

After carrying out the research strategy, the evaluators found a total of 1074 articles, 297 of which were duplicates, 405 were discarded by reading titles and abstracts, 165 were read in full, and 156 excluded according to the eligibility criteria. Finally, 9 studies were selected according to the established eligibility criteria (Figure 2).

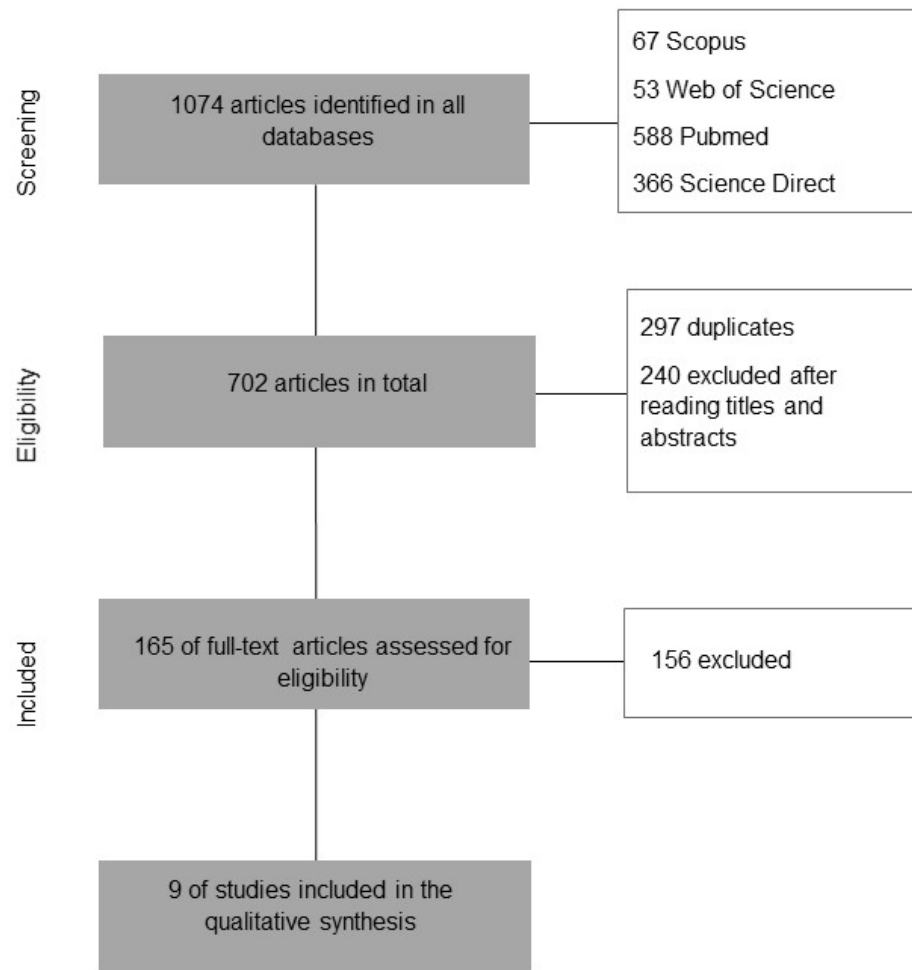


Figure 2: Article selection flowchart according to the PRISMA checklist. In the screening, a quick reading of titles and abstracts was performed, after which the duplicates that appear in several databases were counted and excluded. In the eligibility stage, the full reading of the articles in which the reviewers considered the eligibility criteria established in this review, shown in Figure 1.

2.3 Data extraction

The data obtained were tabulated in the Microsoft Office Excel 2016 software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) with the respective years of publication,

primary outcome, tested groups with the GSE concentration, time and form of application prior to restorative procedure, and main results obtained regarding dentin bond strength and aging method (Table 3).

Table 3: Selected articles results evaluation

Author, year	Primary outcome	Tested groups (values of μ TSB)	Type of adhesive system/ composite resin	Form/application time	Time/method of aging	Main results
Epasinghe et al., 2015	Microtensile bond strength	<ul style="list-style-type: none"> • CONT 24h IE (36.57 ± 3.88 MPa) • 1% GSE 24h IE (36.35 ± 3.67 MPa) • 2% GSE 24h IE (41.15 ± 2.16 MPa) • 3% GSE 24h IE (22.70 ± 1.37 MPa) • CONT 6 M IE (22.38 ± 3.12 MPa) • 1% SE 6M IE (15.77 ± 3.58 MPa) • 2% GSE 6 M IE (10.10 ± 3.53 MPa) • 3% GSE 6 M IE (8.21 ± 2.45 MPa) • CONT 6 M DE (14.98 ± 2.65 MPa) • 1% GSE 6 M DE (13.06 ± 2.35 MPa) • 2% GSE 6 M DE (9.75 ± 0.96 MPa) • 3% GSE 6 M DE (6.26 ± 1.17 MPa) 	Experimental adhesive etch and rinse/ micro hybrid resin	It was incorporated into the experimental adhesive in the respective concentrations, applied to dentin and photoactivated. Aging was evaluated by different forms of storage in saliva and water.	6 months in artificial saliva and distilled water	The μ TSB values of the adhesives incorporated with GSE showed a reduction after aging. The 2% and 3% GSE showed lower μ TSB after 6 months, in both forms of storage, while 1% GSE did not.
Hass et al., 2016	Microtensile bond strength	<ul style="list-style-type: none"> • CONT (29.1 ± 3.7 MPa) • 6.5% GSE (36.7 ± 7.1 MPa) • 0.1% RIB (29.7 ± 4.4 MPa) • 5.0% GA (30.5 ± 1.2 MPa) 	Adhesive etch and rinse/ resin microhybrid	The dentin blocks were etched with 35% phosphoric acid for 15 seconds followed by the application of the GSE primer for 60 seconds followed by	14 days using an intraoral cariogenic cycle (<i>in situ</i>)	The groups showed no immediate difference; however, after aging the CONT and RIB groups showed a decrease of μ TSB.

Leme-Kraus et al., 2016	Microtensile bond strength	<ul style="list-style-type: none"> • CONT ($0.79 \pm 0.5\text{MPa}$) • 30% GSE adhesive without HEMA ($73.9 \pm 3.2\text{MPa}$) • 30% GSE adhesive with 6% HEMA ($71.2 \pm 4.3\text{MPa}$) • 30% GSE adhesive with 18% HEMA ($66.7 \pm 1.1\text{MPa}$) • HEMA 6% + CONT ($13.8 \pm 21.2\text{MPa}$) HEMA 18% + CONT ($16.4 \pm 12.3\text{MPa}$) 	Adhesive etch and rinse/ resin microhybrid	<p>the bonding process.</p> <p>Conditioning with 35% glycolic acid for 15 seconds, then GSE was applied for 60 seconds, followed by a bonding procedure that used adhesive without HEMA, with 6%, and 18% HEMA.</p>	1 year in artificial saliva	The groups that contained GSE had better values of μTSB and remained stable after 1 year, when compared to CONT.
Sousa et al., 2016	Microtensile bond strength	<ul style="list-style-type: none"> • CONT ($43.6 \pm 3.1\text{MPa}$) • 15% GSE ($35.5 \pm 3.0\text{MPa}$) • 3% DCX ($34.3 \pm 3.4\text{MPa}$) 0.2% CHX ($33.4 \pm 7.9\text{MPa}$) 	Adhesive etch and rinse/ nanohybrid resin	<p>After conditioning with phosphoric acid 35% for 15 seconds, GSE was applied for 60 seconds followed by the bonding procedure.</p>	9 days in a thermocycling (10^6 cycles)	The groups showed no difference in an immediate analysis and after aging.

Loguercio et al., 2017	Microtensile bond strength	<ul style="list-style-type: none"> • 37% PA (CONT) (24.3 ± 5.6 MPa) • 37% PA + 2% CHX (15.1 ± 4.2 MPa) • 37% PA + 1% BAC (17.4 ± 5.6 MPa) • 10% PA + 20% ET + 2% GSE (16.4 ± 4.0 MPa) 	Adhesive etch and rinse / nanoparticulate resin	<p>The GSE was incorporated in 10% phosphoric acid and 20% ethanol before applied. However the application time information was lacking. After that, the washing was carried out for 30 seconds followed by the bonding procedure.</p> <p>After conditioning with phosphoric acid 35% for 15 seconds,</p>	1 year in distilled water	<p>Immediately, all groups obtained good μTSB results. However, after aging, only CONT showed significant reductions.</p>
Zheng et al., 2017	Microtensile bond strength	<ul style="list-style-type: none"> • CONT (27.9 ± 3.8 MPa) • 2% CHX (42.0 ± 4.1 MPa) • 5% GSE (27.9 ± 3.7 MPa) • 2% DCX (30.8 ± 3.9 MPa) 	Adhesive etch and rinse / micro hybrid resin	<p>the dentin was washed and GSE was applied for 1 minute followed by the bonding procedure.</p>	3 months using a method that the author didn't make it clear	<p>2% CLX obtained the highest value μTSB between all groups in an immediate analysis and after 3 months. However, all groups maintained the values after 3 months of aging.</p>

Gré et al., 2018	Tenacity to fracture	<ul style="list-style-type: none"> • OFL + CONT (0.91 ± 0.20 MPa) • OFL + 6.5% GSE (1.04 ± 0.27 MPa) • OFL + 0.5% RIB (1.54 ± 0.29 MPa) • OFL + 5% GA (1.70 ± 0.07MPa) • GLSE + CONT (1.33 ± 0.36 MPa) • GLSE + 5% GA (1.81 ± 0.32 MPa) • GLSE + 6.5% GSE (1.16 ± 0.19 MPa) • GLSE + 0.5% RIB (1.80 ± 0.79 MPa) • GP (CW) +CONT (0.95 ± 0.17 MPa) • GP (CW) + 6.5% GSE (1.08 ± 0.28 MPa) • GP (CW) + 0.5% RIB (0.90 ± 0.22 MPa) • GP (CW) + 5% GA (1.20 ± 0.12 MPa) • GP (SE) + CONT (0.87 ± 0.19 MPa) • GP (SE) + 6.5% GSE (0.84 ± 0.07 MPa) 	OFL: Adhesive etch and rinse; GLSE: self-etching; GP: self-etching; PB: self-etching/ micro hybrid resin	After conditioning with 35% phosphoric acid, it was washed off and applied for 60 seconds, before the application of the self-etching adhesive for 60 seconds followed by the bonding procedure.	6 months in artificial saliva	The adhesives application method did not affect the bond strength values. However, after 6 months of storage, strength showed significant reduction except for the group treated with GSE.
------------------	----------------------	---	--	--	-------------------------------	--

De Siqueira et al., 2019	Microtensile bond strength	<ul style="list-style-type: none"> • GP (SE) + 0.5% RIB (0.85 ± 0.32 MPa) • GP (SE) + 5% GA (1.20 ± 0.18 MPa) • PB (CW) + CONT (1.03 ± 0.25 MPa) • PB (CW) + 6.5% GSE (1.46 ± 0.29 MPa) • PB (CL) + 0.5% RIB (0.85 ± 0.32 MPa) • PB (CW) + 5% GA (1.78 ± 0.26 MPa) • PB (SE) + CONT (1.45 ± 0.30 MPa) • PB (SE) + 6.5% GSE (1.28 ± 0.40 MPa) • PB (SE) + 0.5% RIB (1.17 ± 0.26 MPa) • PB (AT) + 5% GA (1.22 ± 0.24 MPa) • DES: PBE + CONT (15.9 ± 3.5 MPa) • DES: PBE + GSE (24.2 ± 4.8 MPa) • DES: PBE + RIB (24.1 ± 3.7 MPa) • DES: SBU + CONT (21.1 ± 2.4 MPa) • DES: SBU + GSE (40.0 ± 5.1 MPa) • DES: SBU + RIB (44.7 ± 4.3 MPa) 	Multimode adhesives with etch and rinse strategies/ Opallis, FGM	The specimens were subjected to an erosive cycle by soft drink for 90 seconds and by 0.05 M citric acid for	2 years in distilled water	DECA performed worse than DES, regardless of adhesive systems, in the two periods evaluated. The incorporation of cross-linking agents showed satisfactory
--------------------------	----------------------------	---	--	---	----------------------------	--

	<ul style="list-style-type: none"> • DES: TBU + CONT (20.8 ± 2.3 MPa) • DES: TBU + GSE (33.5 ± 4.5 MPa) • DES: TBU + RIB (38.9 ± 4.8 MPa) • DECA: PBE + CONT (10.5 ± 2.0 MPa) • DECA: PBE + GSE (19.8 ± 4.1 MPa) • DECA: PBE + RIB (20.1 ± 4.1 MPa) • DECA: SBU + CONT (14.7 ± 1.6 MPa) • DECA: SBU + GSE (26.9 ± 3.3 MPa) • DECA: SBU + RIB (27.9 ± 3.9 MPa) • DECA: TBU + CONT (14.1 ± 2.0 MPa) • DECA: TBU + GSE (26.9 ± 4.1 MPa) • DECA: TBU + RIB (28.8 ± 4.0 MPa) 		5 minutes, interspersed with 60 seconds in the groups followed by the bonding procedure.		performance immediately. After two years, only the control group values showed reductions, regardless of the adhesive used. The use of RIB or GSE maintained the results of bond strength in the PBE adhesive, when compared to the control.
De Paula et al., 2019	Microtensile bond strength <ul style="list-style-type: none"> • 37% EPA (CONT) (24.8 ± 3.3 MPa) • 37% CPA (CONT) (35.6 ± 5.3 MPa) • 37% PA + 2% GSE (9.9 ± 2.3 MPa) • 37% PA + 2% CARD (28.9 ± 4.3 MPa) • AF 37% + 2% LIG (30.9 ± 4.2 MPa) 	Adhesive etch and rinse / resin nanohybrid	Incorporation of GSE to 37% phosphoric acid and application for 15 seconds followed by the bonding procedure.	The aging method used was thermocycling (1000 cycles), but the author left the time unclear.	Initially, all groups showed similar μ TSB values, after thermocycling only the groups containing CARD and LIG maintained the values.

Legend: IE – Indirect exposure; DE – Direct exposure; GSE - Grape seed extract rich in Proanthocyanidins, CONT – Control ; AF – Phosphoric acid; ET – Ethanol; RIB – Riboflavin; GA – Glutaraldehyde; HEMA – Hydroxyethyl methacrylate; DCX – Doxycycline; CHX – Chlorhexidine; BAC – Benzalkonium chloride; OFL – OptiBond FL (Kerr); GLSE – Clearfil SE Bond 2 (Kuraray Noritake); GP – G-Premio Bond (GS); PB- Prime&Bond Active (Dentsply); CW – Conditioning and washing; SE – Self-etching; DES – Dentin eroded with

soda; DECA – Dentin eroded with citric acid; PBE - Prime&Bond Elect; SBU – Scotchbond Universal; TBU – Tetric n-bond Universal; CARD – Cardanol; LIG – Lignin; EPA – Experimental phosphoric acid; CPA – Commercial phosphoric acid.

2.4 Bias Risk Assessment

All authors performed a risk of bias analysis. The risk of bias assessment was carried out to assess the reliability of the findings, using the parameters: randomization of the teeth, absence of caries in the teeth, presence of a control group, standardization of the sample dimensions, evaluation of the failure mode, description of the variation coefficient, presence of sample calculation and blinding of the examiner. When the authors reported these parameters, a positive response was marked, if not, the negative response was marked. Studies with up to 3 parameters were called high risk, while articles between 4 and 6 were medium risk and between 6 and 8 were considered low risk (DA ROSA; PIVA; DA SILVA, 2015).

2.5 Meta-analysis

For this analysis the immediate and after aging means of bond strength were used. The data were tabulated in Microsoft Excel and exported to Revman where a meta-analysis was calculated for continuous data using the inverse variance method in random effects. The coefficients I^2 and Tau^2 were used for the analysis of heterogeneity and the Egger and Beggs tests to analyze the risk of publication bias. One-of-out analysis was performed by removing individual results from each article to verify the weight of each parameter in the meta-analysis. When meta-analysis found significant improvement in the parameters evaluated, Cohen's coefficient and its confidence interval were calculated to estimate the size of the effect.

3. Results

We found a total of 1.074 articles, of which we screened 702, removed 297 duplicates and other 240 after reading the titles and abstracts, leaving 165 studies that met the eligibility criteria and, after careful reading, 9 articles that contemplated the inclusion criteria requirements remained.

3.1 Descriptive analysis

Seven different concentrations of extracts were used in the 9 selected studies, with different forms of applications. One study incorporated the GSE into the adhesive systems, three studies incorporated in the conditioning agent, and six used it as pretreatment of dentin prior to the application of the adhesive system.

3.2 Bias Risk Assessment

Of the 9 studies evaluated, we considered two as low risk, two as high risk, and five as medium risk (DA ROSA; PIVA; DA SILVA, 2015) (Table 4).

Table 4: Bias Risk Assessment

Study	Randomization	Caries Free Teeth	Control Group	Samples with similar dimensions	Failure mode evaluation	Description of the coefficient of variation	Sample calculation	Examiner Blinding	Bias Risk
Epasinghe et al., 2015	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	Low risk
Hass et al., 2016	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	Low risk
Leme-Kraus et al., 2016	No	No	Yes	No	No	Yes	No	No	High risk
Sousa et al., 2016	No	No	Yes	Yes	No	Yes	No	No	High risk
Loguercio et al., 2017	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	Medium risk
Zheng et al., 2017	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	Medium risk
Gré et al., 2018	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	Medium risk
De Siqueira et al., 2019	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	Medium risk
De Paula et al., 2019	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	Medium risk

3.3 Qualitative Results

The articles evaluated the GSE in different concentrations and forms of application, incorporated into adhesives (EPASINGHE et al., 2015), as pre-treatments (LEME-KRAUS et al., 2016; HASS et al., 2016; SOUSA et al., 2016; ZHENG et al., 2017; GRÉ et al., 2018; DE SIQUEIRA et al., 2019), and incorporated into the conditioning agent (LOGUERCIO et al., 2017; DE PAULA et al., 2019), in the adhesive process in dentin.

In nine studies, the tensile bond strength was assessed with a microtensile test and a study using fracture toughness.

The aging of the samples was carried out by means of Thermocycling (SOUSA et al., 2016; DE PAULA et al., 2019), distilled water (EPASINGHE et al., 2015; LOGUERCIO et al., 2017; DE SIQUEIRA et al., 2019), artificial saliva (EPASINGHE et al., 2015; LOGUERCIO et al., 2017; GRÉ et al., 2018; DE SIQUEIRA et al., 2019) and in the intraoral environment (HASS et al., 2016).

3.4 Quantitative Results

We performed the meta-analysis only on articles with GSE on pre-treatment and incorporated into conditioning agents, since they were the only ones that had at least 2 articles with similar methodologies for performance. Only one article evaluated the incorporation into an adhesive system, so the quantitative evaluation was impossible.

The meta-analysis revealed that the experimental groups have a significant benefit in bond strength ($p < 0.001$). It increased an average of 16.69 Mpa (95%CI = 14.23 to 19.16) after using protocyandin derivatives generating a very high effect size (Cohen's $d = 2.07$, 95%CI = 1.17 to 2.97). Heterogeneity was significant ($p < 0.001$, I^2

= 88%, $Tau^2 = 3.33$). Removal of the findings of each article (one-of-out analysis) did not significantly reduce the effect achieved ($p < 0.001$) or the heterogeneity between the studies ($p < 0.001$) (Figure 3).

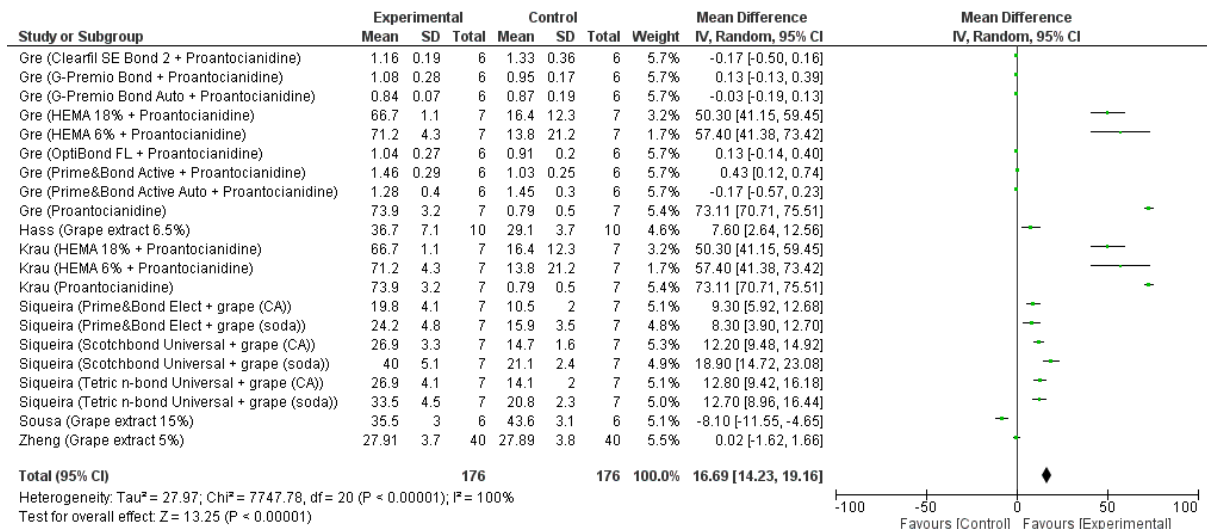


Figure 3: Evaluation by meta-analysis of the bonding stability between dentin / resin with the GSE used as a pre-treatment in the adhesive process.

The Figure 4 shows the high risk of publication bias (Egger's test, $p < 0.001$; Begg's test, $p < 0.001$).

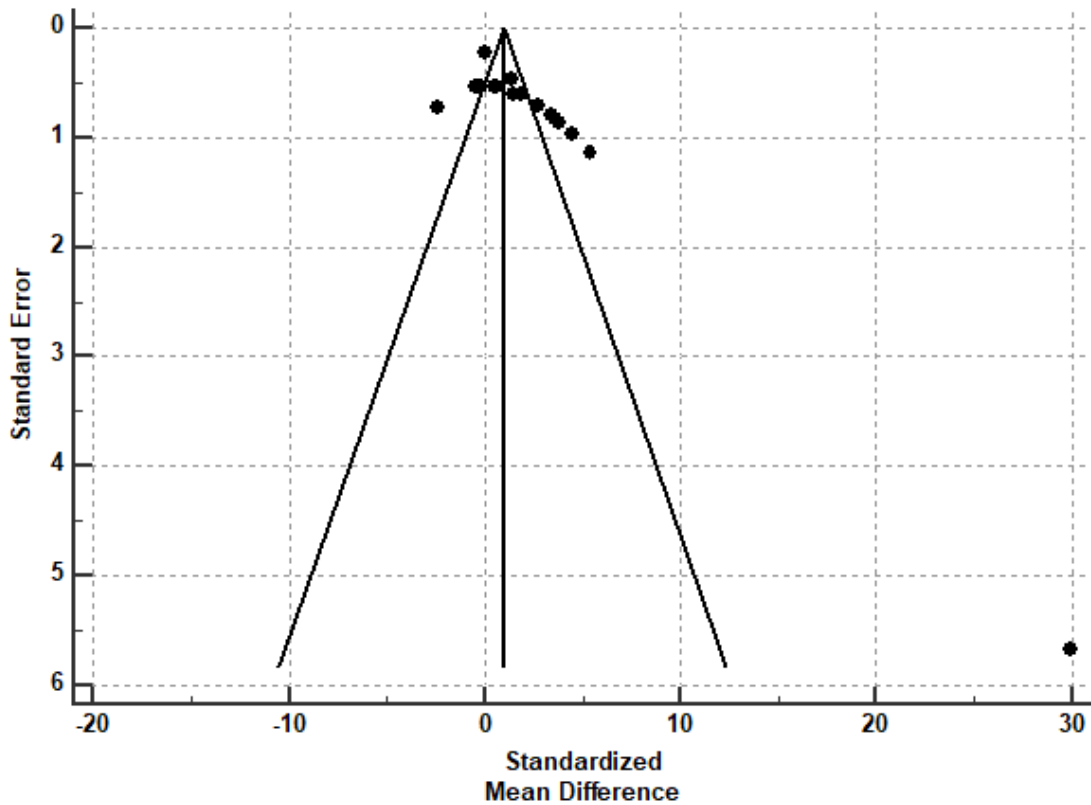


Figure 4: Risk of publication bias.

On the other hand, the second parameter evaluated reduced significantly ($p = 0.0008$) by -11.72 Mpa (95%CI = -18.55 to -4.89), but with a non-significant effect size (Cohen’s $d = -3.05$, 95%CI = -6.35 to 0.25) (Figure 5). Heterogeneity was significant ($p = 0.020$, $I^2 = 91\%$, $Tau^2 = 19.66$).

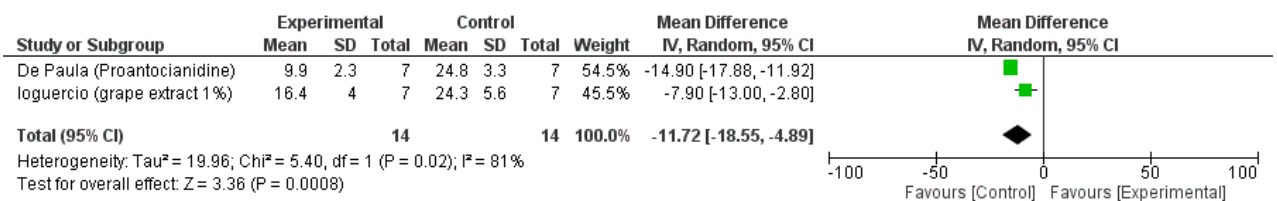


Figure 5: Evaluation by meta-analysis of the bonding stability between dentin / resin with the GSE incorporated into the conditioning agent in the adhesive process.

4. Discussion

The use of GSE has been reported as an effective and viable alternative in the stability and improvement of the bond between resin and dentin. However, its effectiveness is not a consensus. In this context, note that, among the several studies that analyze the GSE in dental collagen, few observe its action over time, that is, its effect on the stability of the hybrid dental layer (EPASINGHE et al., 2015; HASS et al., 2016; LEME-KRAUS et al., 2016; SOUSA et al., 2016; LOGUERCIO et al., 2017; ZHENG et al., 2017; GRÉ et al., 2018; DE SIQUEIRA et al., 2019; DE PAULA et al., 2019).

As much as the materials involved in the adhesive process evolved to improve clinical results they need to simplify the technique to optimize the time of dental care. Therefore, note that the addition of GSE to an existing step would be more acceptable to the dental community, such as the incorporation in the adhesive itself (EPASINGHE et al., 2015) or the conditioning agent (LOGUERCIO et al., 2017; DE PAULA et al., 2019), instead of being used as a pre-treatment, which concerns most studies (HASS et al., 2016; LEME-KRAUS et al., 2016; SOUSA et al., 2016; ZHENG et al., 2017; GRÉ et al., 2018; DE SIQUEIRA et al., 2019).

The way the GSE is applied during the adhesive process can influence the improvement in the composite-dentin bonding. When incorporated into the adhesive system, the best concentration to significantly improve the adhesive interface is 1%. In this same study, the samples were aged in different environments, distilled water and artificial saliva – the latter showed a higher rate of degradation of the bonding interface, with reduced results in dentin/resin bond strength after the 28-day period. This

phenomenon was more evident in adhesives with greater incorporation of GSE, which can be justified due to the PAC molecule present in the GSE, catechin, having a high polarity that causes greater water sorption leading to greater degradation. The referred polarity also facilitates the creation of nanopores, due to its molecular topography (EPASINGHE et al., 2015). Note that the aging period considered in the referred study is very short, which does not simulate real clinical conditions of stability of resin restorations; however, it has a low risk of bias in its methodology, which could be considered an important result.

The incorporation of the extract in the dentin conditioning agent is a promising alternative in clinical practice, since studies report efficacy in the bonding stability of the adhesive interface (LOGUERCIO et al., 2017; DE PAULA et al., 2019). However, in one of these studies, despite the good efficacy of that PAC after aging, the result is inferior compared to another biomodifying agent called lignin. Nevertheless, the results obtained must be correctly evaluated since they demonstrate methodological shortcomings. The study adopts 1000 cycles of aging by thermocycling, this number being hardly feasible and below those recommended in the literature, which on average has around 10^6 cycles (SOUSA et al., 2016) to properly observe a more reliable simulation of what occurs in the oral cavity (DE PAULA et al., 2019). Furthermore, most studies use a PAC concentration equal to or greater than 6.5% (DE SIQUEIRA et al., 2016; HASS et al., 2016; LEME-KRAUS et al., 2016; SOUSA et al., 2016; GRE et al., 2018), and in that research a concentration of 2% was used, which may generate a bias in the results found (DE PAULA et al., 2019). Another study also evaluated the influence of MMPs inhibiting agents, chlorhexidine (CLX), benzalkonium chloride (BAC) and PAC-rich grape seed extract (GSE), in the adhesive process and noted the effectiveness of three agents; however, it points out that the mechanism of

interaction of the PAC with the collagen can happen through ways, such as hydrophobic, hydrogen, covalent, and ionic bonds, that confer an advantage over the other agents that only inhibit MMPs and CTPs. Additionally, the PAC shows good stability in a low pH environment, which makes it effective in incorporating phosphoric acid while keeping its evident activity (LOGUERCIO et al., 2017). Aging for one year in distilled water with a temperature like that of the oral cavity can be a significant differential, since it is a substantial time, considering that other studies use a shorter time and have no parameter to simulate what actually occurs in clinical conditions (LOGUERCIO et al., 2017).

Although these studies bring a certain efficacy of the GSE incorporated to the conditioning agent, if we observe the data from the meta-analysis, we notice a significant reduction, of 11.72 MPa, in the bond stability when compared to the control group. Note that, the analysis was done with two studies only, due to the scarcity of more literary data that judge the stability of union as the main outcome, which becomes a limitation to transpose these data to a clinical level.

Leme-Kraus and collaborators (2016), also used the GSE in the adhesive process and evaluated the stability of bond strength after 1 year of storage of the samples, obtaining satisfactory results. However, they applied it as a pre-treatment primer at a concentration of 30%, which is a high concentration for such a function. The study applied different adhesives formulated after this previous procedure and noted that the PACs present in the GSE was effective in keeping the hybrid layer stable even in adhesives with highly hydrophilic monomers, which is justified by the way these molecules interact with collagen since they remove chains of glycosaminoglycans responsible for affinity with water, leaving an interfibrillar space of collagen for infiltration of resin monomers, resulting in a more effective union. Although these

results were satisfactory, we considered this study to be at high risk of bias, and it did not take into account some relevant aspects such as randomization, standardization of the samples, assessment of the failure mode, blinding of the examiner, and sample calculation, which are of paramount importance to make its results reliable (LEME-KRAUS et al., 2016).

In this context, note that using of polyphenol chemical compounds, including GSE in a concentration of 5%, as a pre-treatment improves the bond strength of dentin adhesive since it favors the penetration of resin monomers, producing a more stable composite/tooth interface (ZHENG et al., 2017). Corroborating these data, others claim that ethanol-based adhesives, when used in conjunction with GSE, can optimize hydrogen bonds between the PAC in the extract and dentin, thus when compared to other biomodifying agents such as glutaraldehyde and riboflavin, this becomes more effective (GRE et al., 2018). Data indicate that dentin pretreated with GSE keeps its bond strength thanks to the stability of the bonds formed between proline, present in great quantity in collagen, and the phenol group in the molecular structure of PAC, in which GSE is rich (GRE et al., 2018). Despite the satisfactory results when it comes to using the extract, the study presented a medium risk of bias, and since it does not show a sample calculation or even randomization of the samples, the data must be cautiously extrapolated to a clinical dental reality.

In agreement with the beneficial action of the GSE at a concentration of 6.5%, studies report the maintenance of the union stability after aging with various methods for assessing this stability (HASS et al., 2016; DE SIQUEIRA et al., 2016). Note that an *in situ* study, where the real conditions of the oral environment are better simulated due to the constant action of demineralization and remineralization processes, because of the action of sugar metabolism by bacteria and salivary buffer effect

respectively, the GSE still manages to keep the dentin / composite bond interface stable, although 14 days of aging through a cariogenic challenge may still be a short period when considering composite resin restoration longevity (HASS et al., 2016). This information has significant relevance, since the study has a low risk of bias.

Highlighting the importance of evaluating dentin with commonly encountered conditions as subjected to a biocorrosion process should be emphasized. Depending on the type of acid challenge dentin is submitted to, it can negatively influence the bonding of the adhesive system, regardless of the pre-treatment used. Data show that citric acid negatively influences the bonding strength to dentin; however, if used with PAC-rich GSE, a retention of bond stability even after a long period of storage, such as 2 years, is noted. This result can be explained by the several types of chemical bonds possible with collagen, thus during this process the PAC changes the water dynamics, facilitating its displacement together with the proteoglycans and improving the entry of resinous monomers, which optimizes the formation of the hybrid layer (DE SIQUEIRA et al., 2016).

On the other hand, some data demonstrate that the use of PAC-rich GSE does not influence the maintenance of the bond strength over time, despite its proven effective action in the complete inhibition of MMP-2. This may be due to differences of the aging method of the samples to the reality, since the evaluation time may have been reduced to extrapolate to the clinical reality. Even so, the samples were prepared by making a Black Class I preparation. This can generate a significant influence of stress due to the factor of cavity configuration, so this limitation may have been unfavorable to the PAC treatment (SOUSA et al., 2016). Note that this study was classified as a high risk of bias and important aspects such as examiner blinding, sample calculation, failure mode assessment, and randomization and standardization

of the samples were not reported in its methodology. All these factors can generate a flawed method of transposing data to a clinical reality.

Data obtained in the meta-analysis on the use of GSE as pretreatment of dentin, can emphasize how this extract can significantly improve the bonding stability. It increases 16.69 MPa on average when compared to the control groups. This result shows us that although some isolated studies have not reached this conclusion (SOUSA et al., 2016), the consensus of literary data shows that using this substance during the adhesive process, as a pre-treatment, may be beneficial despite the increased clinical step in the restorative process, requiring a longer time in the patient's chair.

5. Conclusion

The use of the PAC-rich GSE can be advantageous from a clinical point of view; however, the way it is used in the adhesive process significantly influences the bonding stability. Used with pre-treatment, it significantly improves the bonding stability when compared to the control. When incorporated into the conditioning agent, it has no advantage in the bonding process. Note the importance of future clinical research to better elucidate the applicability of the GSE.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

[1] Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, Mcalpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, Aguiar TR, Vidal CMP, Napolitano JG, Nam JW, Leme AA. Dentin biomodification:

strategies, renewable resources and clinical applications. Dent Mater 2014; 30:62-76.

[tps://doi.org/10.1016/j.dental.2013.10.012](https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.10.012)

[2] Leme-Kraus AA, Aydin B, Vidas CMP, Phansalkar RM, Nam JW, McAlpine J, Pauli GF, Chen S, Bedran-Russo AK. Biostability of the proanthocyanidins-dentin complex and adhesion studies. J Dent Res 2017; 96: 406-12.

<https://doi.org/10.1177/0022034516680586>

[3] Vidal CMP, Zhu W, Manohar S, Aydin B, Keiderling TA, Messersmith PB, Bedran-Russo AK. Collagen-collagen interactions mediated by plant-derived proanthocyanidins: A spectroscopic and atomic force microscopy study. Acta biomaterialia 2016; 41: 110-18.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.05.026>

[4] Aguiar TR, Vidal CMP, Phansalkar RS, Todorova I, Napolitano JC, McAlpine JB, Chen SN, Pauli GF, Bedran-Russo AK. Dentin Biomodification Potential Depends on Polyphenol Source. J Dent Res 2014; 93: 417-22.

<https://doi.org/10.1177/0022034514523783>

[5] Venigalla BS, Jyothi P, Kamishetty S, Reddy S, Cherukupalli RC, Reddy DA. Resin bond strength to water versus ethanol-saturated human dentin pretreated with three different cross-linking agents. J of conserv dent 2016;19: 555-59.

<https://doi.org/10.4103/0972-0707.194019>

[6] Epasinge DJ, Burrow MF, Yiu CKY. Effect of proanthocyanidin on ultrastructure and mineralization of dentin collagen. Arch Oral Biol 2017; 84:29-36.

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.09.012>

- [7] Epasinghe DJ, Yiu CKY, Burrow MF. Effect of proanthocyanidin incorporation into dental adhesive on durability of resin–dentin bond. *International Journal of Adhesion and Adhesives* 2015; 63: 145-51. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2015.09.006>
- [8] Hass V, de Paula AM, Parreiras S, Gutiérrez MF, Luque-Martinez I, Matos TP, Bandeca MC, Loguercio AD, Yao X, Wang Y, Reis A. Degradation of dentin-bonded interfaces treated with collagen cross-linking agents in a cariogenic oral environment: an in situ study. *J Dent* 2016; 49: 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.02.009>
- [9] Sousa ABS, Vidal CMP, Leme-Kraus AA, Pires-de-Souza FCP, Bedran-Russo AK. Experimental primers containing synthetic and natural compounds reduce enzymatic activity at the dentin–adhesive interface under cyclic loading. *Dent Mater* 2016; 32: 1248-1255. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.07.012>
- [10] Loguercio AD, Malaquias P, Dos Santos FP, Hass V, Stanislawczuk R, Lima SNL, Bandeca MC, Reis A. Acid etching with modified phosphoric acid to increase the longevity of the bonded interface. *J Adhes Dent* 2017; 19: 195-201. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a38413>
- [11] Zheng P, Chen H. Evaluate the effect of different mmps inhibitors on adhesive physical properties of dental adhesives, bond strength and mmp substarte activity. *Sci Rep* 2017; 7: 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04340-1>
- [12] Gré CP, Lise DP, Ayres AP, De Munck J, Tezvergil-Mutluay A, Seseogullari-Dirihan R, Lopes GC, Van Landuyt K, Van Meerbeek. Do collagen cross-linkers improve dentin's bonding receptiveness? *Dent Mater* 2018; 34: 1679-1689. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.08.303>

[13] De Siqueira FSF, Hilgemberg B, Araujo LCR, Hass V, Bandeca MC, Gomes JC, Reis A, Loguercio AD, Cardenas AFM. Improving bonding to eroded dentin by using collagen cross-linking agents: 2 years of water storage. *Clin Oral Investig* 2020; 24: 809-822. [https://doi.org/ 10.1007/s00784-019-02918-9](https://doi.org/10.1007/s00784-019-02918-9)

[14] De-Paula DM, Lomonaco D, Ponte AMP, Cordeiro KE, Moreira MM, Mazzetto SE, Feitosa VP. Influence of collagen cross-linkers addition in phosphoric acid on dentin biomodification and bonding of an etch-and-rinse adhesive. *Dent Mater* 2020; 36:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.11.019>

[15] Galvão TF, Pansani TSA, Harrad D. Principais itens para relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises: A recomendação PRISMA. *Epidemiol. Serv. Saúde* 2015; 24: 335-342. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742015000200017>

[16] Da Rosa WLO, Piva E, Da Silva AF. Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *J Dent* 2015; 43: 765-776. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.04.003>

Capítulo II

Efeito biomodificador de ésteres galoilados de origem natural sobre o colágeno dentinário

Talita Arrais Daniel Mendes¹, Samuel Chillavert Dias Pascoal², Maria Clara Ayres Estellita²,
Marcelo Victor Sidou Lemos³, Juliano Sartori Mendonça⁴.

- 1- Discente de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará.
- 2- Discente de Graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará.
- 3- Professor do Curso de Odontologia da Universidade de Fortaleza.
- 4- Professor Adjunto do Departamento de Odontologia Restauradora da Universidade Federal do Ceará.

Autor de correspondência:

Talita Arrais Daniel Mendes

Programa de Pós-graduação em Odontologia

Rua Monsenhor Linhares, S/N, Fortaleza, Ceará

e-mail: talitaarrais@alu.ufc.br

Efeito biomodificador de ésteres galoilados de origem natural sobre o colágeno dentinário

RESUMO

A presença de grupamento galoil em uma molécula desempenha um potencial aumentado de reatividade com o colágeno. Assim sendo, o presente estudo objetiva avaliar efeito biomodificador de moléculas galoiladas de origem natural no colágeno dentinário. Trata-se de um estudo experimental laboratorial *in vitro*, no qual avaliou-se a influência, imediata e após 6 meses de envelhecimento, de agentes de biomodificação como pré-tratamento de dentina - epigallocatequina-3-galato 0,1% (EGCG), ácido tânico 1% (TAN), proantocianidinas 6,5% (PAC) e água destilada (CN), como controle negativo - aplicados por 1 minuto, previamente ao procedimento adesivo. As variáveis dependentes do estudo foram o módulo de elasticidade (ME), avaliado por meio do teste de flexão de 3 pontos (n=15); variação de massa (VM) (n=15) e resistência de união à dentina (n=8), por meio do teste de microtração. Realizaram-se também análises qualitativas, por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) (n=3) e teste de micropermeabilidade (n=3). A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA a 2 critérios, seguido de pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). O grupo TAN demonstrou melhores resultados de ME em relação aos demais. Todos os grupos foram capazes de melhorar o ME, porém apenas a EGCG foi capaz de manter esses valores após 3 meses ($p > 0,05$). Na VM percebe-se que EGCG e TAN apresentaram ganho de massa em relação aos demais ($p < 0,05$), mantendo-se estável após a degradação. Em termos de resistência de união, TAN e PAC mantiveram a estabilidade de interface após 6 meses, corroborando com os achados da qualidade de camada híbrida obtidos no teste de micropermeabilidade. Em relação ao FT-IR, TAN e PAC apresentaram uma vibração mais proeminente em amida I e II em relação aos demais. Dessa forma, pode-se concluir que os agentes naturais testados são eficazes na biomodificação do colágeno, porém apenas TAN e PAC são capazes de manter a estabilidade de união da resina em dentina, após 6 meses.

Palavras-chave: Polifenóis; Colágeno Tipo I; Adesivos Dentinários.

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios em Odontologia restauradora é o estabelecimento de uma união eficaz entre sistemas resinosos e a estrutura dentária. Para que tal interação ocorra, faz-se necessária a utilização de sistemas adesivos (SAs). A maioria dos SAs atuais apresentam boa eficácia em curto prazo, porém, quando investigados em longos períodos, a sua durabilidade passa a ser questionada, uma vez que a interface de união entre dente e material restaurador continua sendo o elo mais frágil dessa união^{1,2}.

O processo de união mais crítico ocorre no substrato dentinário, devido à sua característica morfofuncional. A dentina apresenta uma maior quantidade de conteúdo orgânico e umidade quando comparada ao esmalte, onde a união de restaurações é bem estabelecida e duradoura³. A camada híbrida (CH), zona de interdifusão de monômeros resinosos e dentina, é a principal responsável pela união da resina composta ao dente, entretanto é susceptível a mecanismos de degradação, principalmente em sistemas adesivos de condicionamento e lavagem, nos quais o processo adesivo se torna mais crítico em relação aos autocondicionantes². Os mecanismos de degradação da CH podem ocorrer devido à ação de enzimas colagenolíticas, metaloproteinases de matriz (MMPs) e cisteíno catepsinas (CTPs), além do processo de hidrólise, ocasionada pela presença de água em excesso, bem como degradação polimérica¹.

Existem várias estratégias utilizadas para aumentar a longevidade da união, como inibidores de MMPs e CTPs^{2,4}, técnica úmida etanólica, agentes de ligações cruzadas de colágeno, dentre outros. Os agentes de ligações cruzadas de colágeno (ALC) dentinário⁴ consistem em compostos químicos de origem natural ou sintética que irão biomodificar a estrutura dentinária desmineralizada, melhorando propriedades mecânicas da rede de colágeno exposta, bem como reduzindo taxas de biodegradação da matriz extracelular. A interação com o colágeno ocorre, na maioria das vezes, através de ligações químicas entre ALC e prolina e hidroxiprolina presentes na estrutura molecular do colágeno, sendo que essas ligações podem ocorrer tanto em nível interfibrilar quanto intrafibrilar⁴.

Nessa perspectiva, os ALC de origem natural têm ganhado um grande destaque na literatura devido à sua biodisponibilidade e sustentabilidade. Sendo as proantocianidinas (PACs) derivadas da semente da uva (*Vitis vinífera*) as mais citadas na literatura⁴. As PACs são definidas como taninos condensados, cujos polímeros são formados por unidades de flavan-3-ol^{4,5,6}. Essa molécula tem ganhado destaque por sua ação com o colágeno dentinário ter sido bem relatada, além de promover uma remineralização significativa. Porém clinicamente não tem sido relatado bom desempenho^{7,8}, tendo 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 com tal capacidade^{9,10}.

Dessa forma, outros polifenóis têm surgido como potenciais agentes biomodificadores. A presença de um número maior de ligações insaturadas na molécula dos polifenóis irá aumentar sua atividade; dessa forma, ao reagir com o ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico), por meio de uma reação de esterificação, os polifenóis irão originar ésteres com a presença de grupamentos galoil em sua molécula. Essa reação modifica completamente as atividades biológicas da molécula original, pois irá inserir novos grupamentos fenólicos, originando uma nova estrutura¹¹.

Dentre os ésteres galoilados podemos destacar a epigalocatequina-3-galato (EGCG), uma catequina proveniente do chá verde, apresentando características antioxidantes, reatividade com proteínas e atividade antiproliferativa tumoral, além de possuir comprovada ação inibidora de MMPs e reticuladora de colágeno⁶. Sua estrutura molecular caracteriza-se pela presença de apenas um grupamento galoil^{11,12}. O ácido tânico (TAN), pertencente ao grupo dos galotaninos, apresenta cinco grupamentos galoil em sua estrutura, tendo excelentes capacidade de inibição enzimática e reatividade biológica, eliminando radicais livres^{11,13,14}. As hipóteses do presente estudo são: quando existe grupamento galoil na molécula biomodificadora, maior será o módulo de elasticidade e menor biodegradação o colágeno dentinário irá sofrer (1); ganho de massa do colágeno dentinário será maior quando há uma peça de grupamento gaoil (2); os ALC proporcionarão maior estabilidade de união após o procedimento adesivo (3). Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de potenciais agentes biomodificadores galoilados de origem natural sobre o colágeno dentinário.

2. METODOLOGIA

2.1 Delineamento experimental

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sendo aprovado sob o protocolo de número 4.651.833. Trata-se de um estudo experimental laboratorial *in vitro*, no qual os fatores sob investigação foram o período de avaliação e o uso de diferentes agentes de biomodificação como pré-tratamento de dentina em quatro níveis: epigalocatequina-3-galato 0,1 p/v % (EGCG) [pó, 99% EGCG Sigma Aldrich, St. Louis, USA]; ácido tânico 1 p/v % (AT) [pó, 98% ácido tânico Sigma Aldrich, St. Louis, USA]; proantocianidinas 6,5 p/v % (PAC) [90% PACs, *Vitis vinifera*, Gold Mega-Natural, polyphenols, Madera, USA], como controle positivo; e água destilada (CN), como controle negativo. As variáveis dependentes do estudo foram: módulo de elasticidade, avaliado

quantitativamente através do teste de flexão de 3 pontos (n=15); variação de massa (n=15), aferida em balança analítica de precisão; resistência de união à dentina (n=8), por meio do teste de microtração realizado em uma máquina de ensaios mecânicos universais. Realizaram-se, ainda, análises qualitativas, por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) (n=3) e teste de micropermeabilidade (n=3).

2.2 Preparo das soluções

Todos os agentes de biomodificação foram submetidos à aferição de massa, com auxílio de uma balança analítica de 0,0000 de precisão; e, em seguida, diluídos em solução de água destilada e etanol 100% (50%-50%) na concentração pertinente a cada grupo, com o auxílio de um agitador magnético, até a sua completa diluição, seguido de filtragem da solução com uso de papel filtro. Foram aferidos os respectivos pHs dos grupos testados, onde EGCG obteve pH de 8,7; o TAN de 5,4 e PAC de 9,6. As soluções foram utilizadas imediatamente após o preparo.

2.3 Potencial de Biomodificação da Dentina

2.3.1 Preparo dos espécimes

Um total de 12 dentes hígidos (terceiros molares humanos) foram selecionados para confecção de barras de dentina média com 1,7 X 0,5 X 6 mm de dimensão, um dente utilizado produziu em média 5 barras de dentina. Em seguida, os espécimes foram desmineralizados completamente em solução de ácido fosfórico a 10(v/v) % por um período de 5 horas, em temperatura ambiente, sob constante agitação com auxílio de um agitador magnético (MA85, Marconi, Piracicaba, Brasil). As barras de dentina foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos distintos (n=15) e mantidas em suas respectivas soluções por um período de um minuto⁵.

2.3.2 Módulo de Elasticidade (ME)

As barras de dentina desmineralizadas (n=15) 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*). Os espécimes foram distribuídos de forma aleatória entre os diferentes grupos e, para verificação da homogeneidade dos valores iniciais, realizou-se análise de variância a um critério (ANOVA *one way*, p=0,783). Posteriormente, essas amostras foram imersas durante 1 minuto nas respectivas soluções biomodificadoras e, em seguida, lavadas

com água destilada e uma nova aferição do módulo de elasticidade foi realizada⁵. Para verificação da estabilidade das ligações estabelecidas, os espécimes foram armazenados em água destilada por 3 meses, em estufa à 37° C. A água destilada foi trocada semanalmente e, após o período de armazenamento, realizaram-se novas aferições do ME para o cálculo da variação do ME.

2.3.3 Variação de Massa

As mesmas barras de dentina desmineralizadas (n=15) utilizadas no ensaio de flexão foram empregadas para a análise de variação de massa (VM%). Aferiram-se as massas antes (M1) e após (M2) a biomodificação com uma balança analítica de precisão de cinco casas decimais (0,00001g), o valor obtido foi armazenado após a estabilização da massa. As amostras foram desidratadas em um dessecador a vácuo por 24 horas em temperatura ambiente, entre uma aferição e outra da massa. A avaliação da variação de massa (VM%) foi determinada como a porcentagem de ganho ou perda de massa de matriz de dentina desmineralizada de cada amostra, com base na seguinte fórmula:

$$VM\% = \left(\frac{M2 \times 100}{M1} \right) - 100$$

sendo que M1 é a massa de matriz de dentina desmineralizada antes da biomodificação dentinária e M2 é a massa de matriz da dentina biomodificada⁵.

Por sua vez, a taxa de biodegradação de massa foi realizada da seguinte forma: após a aferição de massa em balança analítica das barras de dentinas biomodificadas, as barras foram imersas em água destilada e armazenadas em estufa por 3 meses, realizando-se trocas semanais do meio de armazenamento. Após o processo, as amostras foram dessecadas e as massas foram aferidas individualmente (M3), como descrito anteriormente. A fórmula utilizada para avaliar a porcentagem de taxas de biodegradação hidrolítica (R) foi:

$$R (\%) = 100 - \left(\frac{M3 \times 100}{M2} \right)$$

sendo M2 a massa de matriz dentinária biomodificada, e M3, a massa dentina após o período de degradação em água destilada⁵.

2.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Barras de colágeno desmineralizadas (n=3) com dimensões semelhantes às anteriores foram submetidas ao teste de espectroscopia por transformada de Fourier (FT-IR), em ambiente de vácuo antes e após biomodificação. Previamente às leituras, as amostras foram

imersas nas respectivas soluções e, em seguida, dissecadas 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 4cm^{-1} , ao qual foi anexado uma placa de Reflectância Total Atenuada (ATR, seleneto de zinco - ZnSe), com feixe de transmissão entre 4000 e 400cm^{-1} ⁸.

2.5 Resistência de união à dentina

2.5.1 Procedimento adesivo em dentina

O esmalte oclusal e as raízes de cada dente foram removidos com um disco diamantado (Isomet 4000; Buehler, Lake Bluff, Estados Unidos) em baixa velocidade para expor a superfície plana de dentina média. Essa dentina exposta foi polida com lixa de carbeto de silício de granulação 320, sob constante irrigação com água durante 30 segundos, para criar uma *smear-layer* padrão ³.

Todos os blocos de dentina média foram condicionados com ácido fosfórico a 37% em gel (Condac 37%, FGM, Joinville, Brasil) durante 15 segundos, em seguida, lavados abundantemente pelo dobro do tempo. Usaram-se os respectivos grupos como pré-tratamento de dentina por 60 segundos, seguido de lavagem abundante. Em seguida retirou-se umidade excessiva dos espécimes, com papel absorvente, e, com o auxílio de um *microbrush*, foi aplicado o adesivo (Single Bond 2, 3M ESPE Indiana, EUA,) ativamente por 30 segundos, em 2 camadas e ele foi polimerizado por 40 segundos por um fotopolimerizador de LED a 1100 mW/cm^2 (DB-685, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, Brasil). Confeccionou-se um platô de resina (Filtek Z350 XT- 3M ESPE, Indiana, EUA) de 4 milímetros. Esse procedimento restaurador foi realizado para os testes microtração e micropermeabilidade.

2.5.2 Teste de microtração

Após o procedimento restaurador, os espécimes foram armazenados em estufa por 24 horas a 37°C , os dentes foram seccionados ($n=8$) a fim de se obter espécimes de aproximadamente 1 mm^2 de área em secção transversal. Metade das amostras obtidas em cada dente foi testada de forma imediata e o restante foi armazenado em água destilada durante 6 meses para envelhecimento, com troca semanal da água destilada. Para realização do teste, os espécimes foram fixados em um dispositivo Geraldelli, utilizando adesivo à base de cianoacrilato (Super Bonder Gel, Loctite, Henkel Co., Diadema, Brasil), o qual foi acoplado a uma máquina universal de ensaios mecânicos (Instron 3345, Canton, MA, EUA) e tracionados até a fratura do espécime, utilizando uma célula de carga de 500N e velocidade de $0,5\text{ mm/min}$,

os resultados foram obtidos em MegaPascal (MPa). As falhas prematuras foram consideradas como 0 MPa.

2.6 Teste de micropermeabilidade

Para o teste de micropermeabilidade, utilizaram-se três dentes por grupo (n=3), sendo realizada uma leitura imediata após o processo adesivo. O procedimento adesivo foi realizado de forma semelhante à descrita anteriormente, porém houve uma prévia incorporação do sistema adesivo com Rodamina-B a 0,1%. Posteriormente, os espécimes foram imersos em uma coluna de 15 cm de altura, de solução aquosa de fluoresceína 0,3%, a fim de simular a pressão pulpar, por um período de 3h. Os espécimes foram cortados em fatias de 1 mm de espessura, no sentido longitudinal e desgastados com lixas de carvão de silício, de granulação #600, durante 2 minutos em cada lado. Em seguida, os espécimes foram avaliados qualitativamente por microscopia confocal a Laser (LSM 710, Carl Zeiss, Munchen, Alemanha), equipado com uma lente de imersão em óleo 63 × / 1.4 usando 488 nm e 568 nm laser de iluminação. Cada interface resina/dentina foi caracterizada e as imagens da interface de união que representam a característica micropermeabilidade de cada grupo foram capturadas aleatoriamente ¹⁵.

2.7 Análise estatística

Para a análise estatística utilizou-se o software SigmaPlot 14.0, onde realizou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk para todos os testes quantitativos ($p < 0,05$). Em relação à avaliação do ME após a biomodificação e após biodegradação, utilizou-se ANOVA *two-way* para medidas repetidas, seguido de pós-teste de Tukey. Para os testes de variação de massa e resistência de união, realizou-se ANOVA *two-way*, seguido de pós-teste de *Tukey*. Todos os testes estatísticos foram empregados adotando-se um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

A análise estatística empregada para avaliação do ME demonstrou haver uma interação significativa entre o tipo de tratamento utilizado e o tempo de avaliação ($p \leq 0,001$). Pôde-se notar que, quando comparados os resultados intragrupos no período de análise após o tratamento, TAN apresentou os melhores resultados de ME em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Após 3 meses de avaliação, TAN ($0,61 \pm 0,21$ MPa) e EGCG ($0,52 \pm 0,15$ MPa) demonstraram resultados semelhantes entre si e superiores aos obtidos por PAC ($0,28 \pm 0,20$

MPa) e CN ($0,24 \pm 0,20$ MPa) ($p < 0,001$). Todos os grupos demonstraram melhora em relação ao ME após um minuto de aplicação das soluções de pré-tratamento ($p < 0,05$), com exceção da CN. Entretanto apenas EGCG foi capaz de manter esses valores após 3 meses de avaliação em relação aos obtidos imediatamente após a aplicação dos ALC ($p > 0,05$).

Tabela 1: Módulo de elasticidade (MPa, n=15) para os diferentes grupos sem tratamento (baseline), após pré-tratamento por um minuto e após envelhecimento por 3 meses em água destilada.

Grupos	Baseline	1 minuto	3 meses
EGCG	$0,21 \pm 0,09$ Aa	$0,57 \pm 0,26$ Bb	$0,52 \pm 0,15$ Ab
TAN	$0,56 \pm 0,29$ Aa	$1,07 \pm 0,20$ Ab	$0,61 \pm 0,21$ Ac
PAC	$0,20 \pm 0,15$ Aa	$0,55 \pm 0,18$ Bb	$0,28 \pm 0,20$ Ba
CN	$0,36 \pm 0,23$ Aa	$0,32 \pm 0,27$ Ca	$0,24 \pm 0,20$ Ba

Legenda: Para cada coluna, valores com letras maiúsculas idênticas indicam ausência de diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Para cada linha, letras minúsculas idênticas indicam não haver diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

Em relação à variação de massa (VM%), o efeito dos tratamentos em colágeno dentinário se mostrou dependente do tempo de análise ($p < 0,001$). Após 24h de aplicação dos agentes biomodificadores, PAC proporcionou um ganho de massa significativo quando comparado ao TAN ($p < 0,05$) e não demonstrou diferença estatisticamente significante em relação à EGCG e ao CN. Após 3 meses de armazenamento em água destilada, verificou-se que EGCG e TAN tiveram melhores resultados que os demais ($p < 0,05$). PAC e CN não foram capazes de manter a estabilidade de massa obtida após 3 meses de envelhecimento ($p < 0,05$) (Gráfico 01).

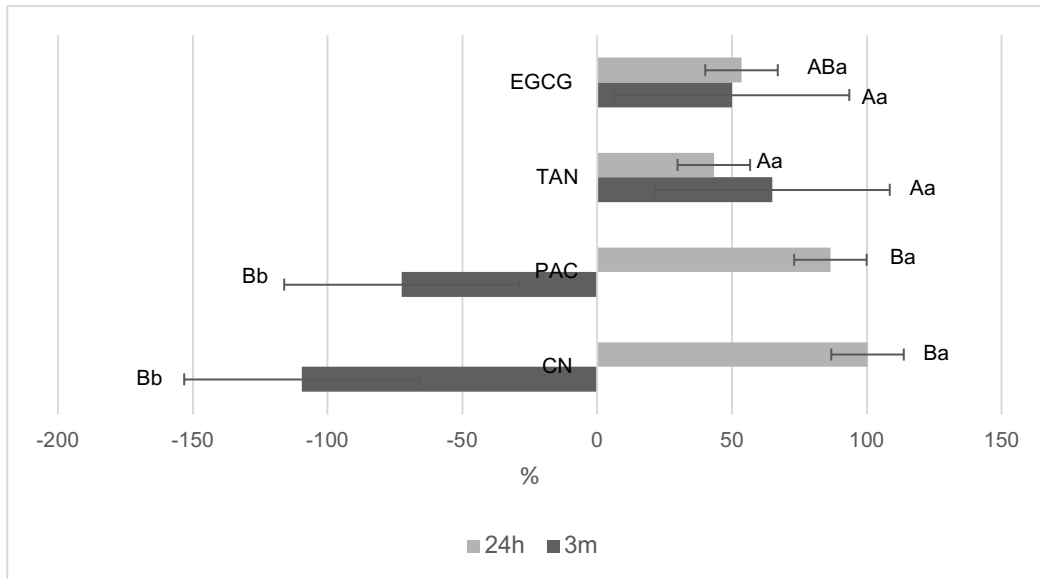


Gráfico 1: Variação de massa (VM%, n=15) do colágeno dentinário após os respectivos tratamentos de maneira imediata, e após 3 meses de armazenamento em água destilada. Letras maiúsculas indicam comparações intergrupos em um mesmo período de avaliação. Letras minúsculas indicam comparações intragrupos em diferentes tempos.

Os espectros de FT-IR demonstrados são característicos de colágeno tipo I, presente em matriz desmineralizada de colágeno, com presença de picos referentes ao C=O alongando-se em amida I ($\sim 1633 \text{ cm}^{-1}$), dobra referente ao N-H e alongamento em C-N, amida II ($\sim 1544 \text{ cm}^{-1}$) e pico em amina III (entre 1200 cm^{-1} e 1350 cm^{-1}) (Figura 1A). O colágeno tratado com os ALC demonstrou picos em $\sim 1517 \text{ cm}^{-1}$ e 1450 cm^{-1} , indicando alongamento da ligação C-C referente ao anel aromático, gerando mudança no colágeno, por meio de um complexo ALC-colágeno, sendo que todos os grupos experimentais causaram essa modificação estrutural na matriz de colágeno desmineralizada; no entanto, percebe-se uma maior alteração no grupo TAN, EGCG e PAC. Sendo que o TAN obteve uma discreta maior alteração no colágeno (Figura 1B).

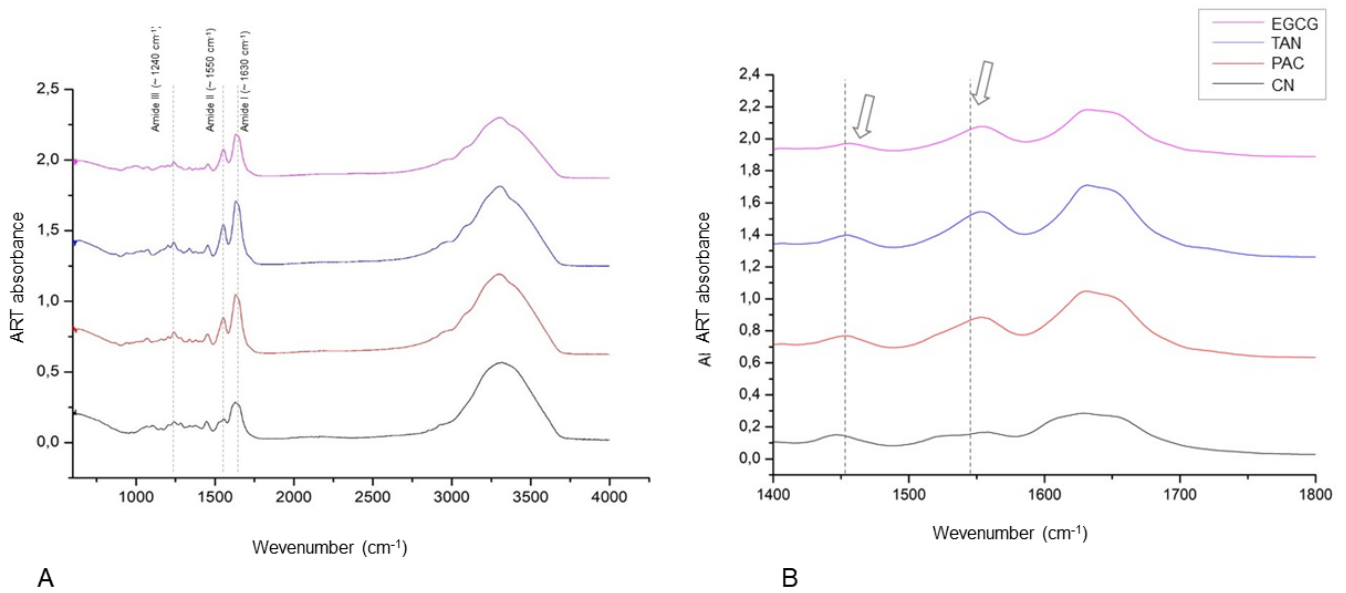


Figura 1: Espectros de FT-IR das amostras de colágeno tipo I, após aplicação dos agentes de pré-tratamento por um minuto com o tratamento - PAC (vermelho), TAN (azul), EGCG (roxo) e CN (preto). Na Figura 1A, pode-se notar a presença de aminas tipo I, II e III, sendo menos evidente o estiramento dessas vibrações no CN (Figura 1A). Na Figura 1B, nota-se a vibração nos picos ~1517 e ~1450 referentes ao anel aromático se alongando.

Em relação à resistência de união, pode-se observar que a eficácia dos grupos de pré-tratamento depende do fator tempo, no qual há uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Em uma análise imediata, após 24h do procedimento adesivo, não há uma diferença estatística entre os grupos testados ($p > 0,05$). Na avaliação intergrupos, para o período de 6 meses, observou-se que TAN e PAC apresentaram valores de resistência de união semelhante entre si e estatisticamente superiores aos obtidos por EGCG e CN ($p < 0,05$). EGCG, por sua vez, apresentou resistência de união estatisticamente superior ao CN ($p < 0,05$). Na análise intragrupos em diferentes tempos de avaliação, pode-se notar que TAN e PAC mantiveram os resultados obtidos no período imediato após 6 meses de envelhecimento. EGCG e CN demonstraram uma redução significativa da resistência de união após 6 meses de armazenamento em água destilada ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2: Resistência de união (MPa \pm desvio padrão, n=8) das amostras após ensaio de microtração, imediato e após 6 meses

Grupos	24 horas	6 meses
EGCG	23,6 \pm 3,0 Aa	13,8 \pm 2,7 Bb
TAN	23,7 \pm 2,6 Aa	21,5 \pm 4,2 Aa
PAC	23,2 \pm 3,1 Aa	22,2 \pm 2,8 Aa
CN	22,2 \pm 3,2 Aa	9,1 \pm 1,13 Cb

Legenda: Para cada coluna, valores com letras maiúsculas idênticas indicam ausência de diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Para cada linha, letras minúsculas idênticas indicam não haver diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

Na análise de micropermeabilidade em microscopia confocal a laser, percebe-se que todos os grupos experimentais com ALC apresentaram um vedamento efetivo da interface de união entre adesivo/dentina (Figura 2), com destaque para os agentes biomodificadores EGCG, TAN e PAC, no qual pode-se notar a completa separação dos corantes rhodamina e fluoresceína; quando os corantes não se misturam significa que há um maior vedamento da camada híbrida, sendo essa menos permeável, e a formação dos *tags* de resina de maneira efetiva (Figura 2B).

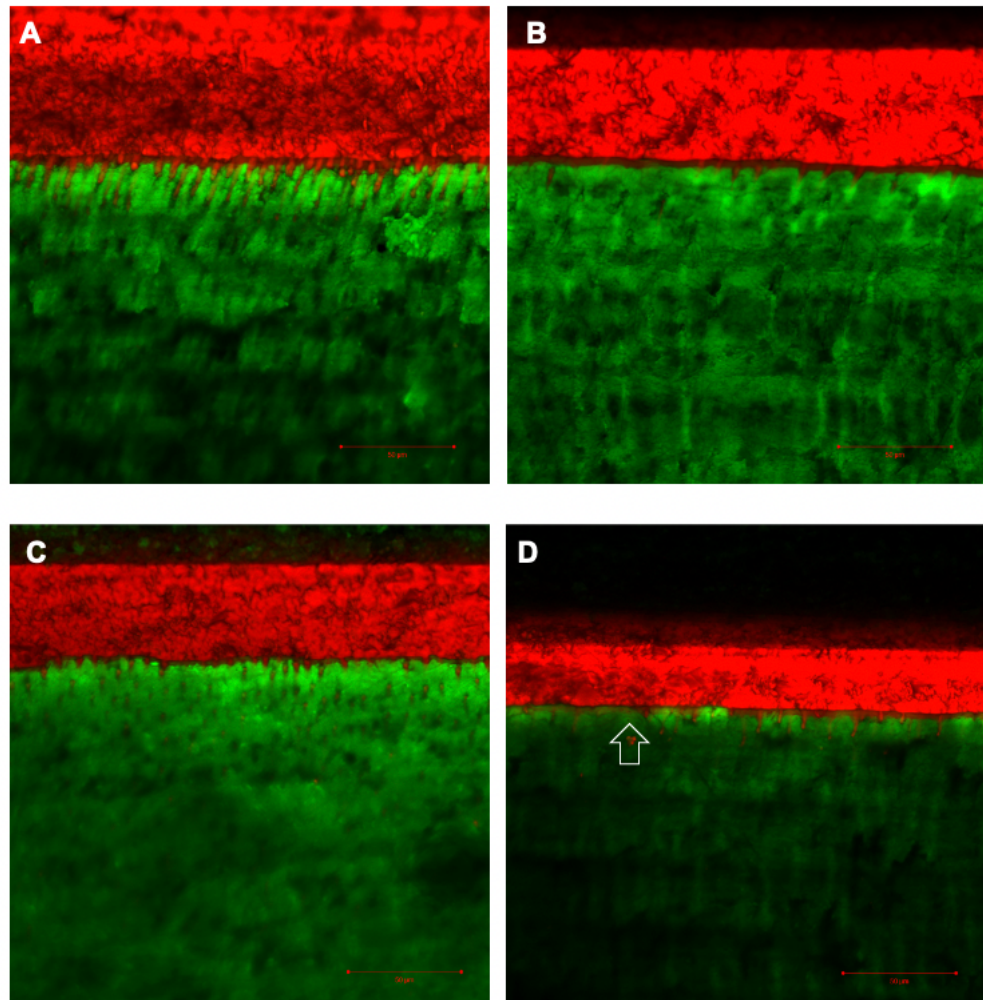


Figura 2: Imagens em microscopia confocal a laser da interface de união adesivo/dentina, nos quais notam-se os grupos pré-tratados EGCG (A), TAN (B), PAC (C) e CN (D). Pode-se perceber que o TAN, PAC e EGCG demonstraram eficácia em reduzir a permeabilidade da camada híbrida. Para CN, embora tenha se mostrado também eficaz, nota-se a presença de um microespaço na interface de união (D - seta).

4. DISCUSSÃO

Não há um consenso acerca da efetividade clínica dos ALC naturais em meio a um processo restaurador⁴. Embora estudos tragam que a presença do grupamento químico galoil em uma molécula vai aumentar a sua bioatividade^{7,11,16}, não se sabe, até o presente momento, se a quantidade desses grupamentos influencia no grau de atividade dela, a ponto de melhorar o processo adesivo em dentina, porém que a simples presença desse grupamento pode influenciar em sua reatividade. Assim sendo, um dos métodos mais utilizados atualmente para mensurar a formação de ligação cruzadas é por meio da confecção das barras de colágeno

dentinário e tratamento das mesmas para mensurar ME e VM, método esse reproduzido no presente estudo^{5,6,14}.

Ao analisar o ME, nota-se um aumento pronunciado em todos os grupos experimentais após o tratamento por 1 minuto; todavia, avaliando-se os dados entre os grupos em um determinado momento, após aplicação dos tratamentos, TAN proporcionou uma maior rigidez ao colágeno quando comparado à EGCG, PAC e ao CN. No entanto, esse grupo não foi capaz de manter a estabilidade do ME após 3 meses de envelhecimento em água destilada, o que denota o fato da primeira hipótese do estudo não ter sido aceita, pois, embora o grupo com maior quantidade de grupamento galoil ter o maior módulo de elasticidade, o mesmo grupo não foi capaz de resistir à degradação.

O ácido tânico é uma molécula que apresenta uma quantidade de cinco grupamentos galoil, e essa quantidade confere a presença pronunciada de hidroxilas (-OH), o que enfatiza o significativo potencial antioxidante da mesma, bem como uma maior hidrofilicidade, características que sugerem uma maior capacidade de formação de ligações cruzadas, o que pode ser observado pelo aumento do ME imediato, que a quantidade de galoil é proporcional à reatividade molecular^{17,18,19}. O mecanismo de interação do TAN com o colágeno vai ocorrer por meio da reação entre o grupo amida (-NH) presente na estrutura de tripla hélice do colágeno e o fenol oriundo do ácido tânico^{20,21}.

Embora os resultados iniciais demonstrassem um efeito promissor do TAN ($1,07 \pm 0,20$ MPa) no quesito de ganho de rigidez do colágeno, com o passar do tempo essas ligações formadas parecem não se mostrar estáveis, havendo um considerável decréscimo ($0,61 \pm 0,21$ MPa), contrariando com achados prévios que afirmam que o TAN, além de aumentar o módulo de elasticidade de colágeno dentinário, consegue manter a estabilidade do mesmo²¹, o que pode ser justificado pela elevada concentração em que ele foi utilizado, de 20 (p/v) % em comparação à concentração de 1 (p/v) %, utilizada no presente estudo. Entretanto, optou-se por uma concentração reduzida, pois essa se mostrou farmacologicamente eficaz e semelhante à de 10%, por meio de um estudo prévio, quando analisado o módulo de elasticidade¹⁹.

Vale salientar que o colágeno exposto ao meio sem proteção mineral ou polimérica fica susceptível a uma degradação hidrolítica e enzimática¹, o que pode justificar essa não manutenção dos valores de ME do colágeno pré-tratado com TAN. Autores também embasam a justificativa que a estabilidade das ligações formadas por grupamentos galoil apresenta-se reduzida, pois esse grupamento possui uma ampla afinidade com água, o que torna as ligações formadas mais propensas à hidrólise²². Adicionalmente a isso, um fator que deve ser levado em consideração acerca da aplicabilidade de um ALC é o tempo de aplicação que pode fazer total

diferença nesses resultados. O tempo utilizado no presente estudo foi de 1 minuto⁹, tendo em vista uma transposição de dados frente a uma realidade clínica; todavia a literatura demonstra que uma hora de aplicação da substância, na presente metodologia, pode ter uma direta correlação com aumento da propriedade mecânica do colágeno, quando utilizado o ALC TAN²¹.

Nota-se, ainda, que a EGCG demonstrou um ganho pronunciado de rigidez do colágeno na avaliação imediata, concordando com dados prévios que avaliaram a nanodureza da dentina pré-tratada com diferentes substâncias. A EGCG demonstrou um aumento dessa propriedade devido à presença do grupamento galoil na composição, otimizando a atividade molecular e potencializando o seu efeito devido à presença de hidroxilas e grupamentos fenólicos^{23,24}. Além disso, outros resultados provam que essa catequina apresenta baixas taxas de biodegradação de colágeno, ou seja, manutenção da propriedade de ME do colágeno, como comprovado no presente estudo, podendo ser atribuída esta característica à sua bem estabelecida atividade inibitória de MMPs e CTPs⁶. A EGCG ($0,52 \pm 0,15$ MPa) e o TAN ($0,61 \pm 0,21$ MPa) apresentaram resultados semelhantes entre si e estatisticamente superiores em relação à PAC ($0,28 \pm 0,20$ MPa) e ao CN ($0,24 \pm 0,20$ MPa) após 3 meses de envelhecimento. O desempenho da EGCG pode ser considerado melhor que o TAN neste aspecto de ganho de propriedade mecânica do colágeno, pois foi capaz de manter o resultado imediato obtido após 3 meses de envelhecimento em água destilada. Denota-se, dessa forma, que a EGCG foi capaz de manter a estabilidade do colágeno não protegido⁶.

Em relação à VM%, verificou-se que PAC demonstrou um ganho significativo de massa após o tratamento, mas não foi capaz de manter estabilidade de ganho de massa após 3 meses. Esse ganho imediato de massa já é bem percebido por achados prévios, que provam interações químicas significativas da PAC com a estrutura do colágeno dentinário²⁴. Esse achado enfatiza dados prévios que atribuem uma alta hidrofiliabilidade das PACs, o que torna essa molécula susceptível à degradação do tipo hidrolítica²⁵. Essa informação vai de encontro com outros achados que comprovam que essa molécula tende a permanecer estável em dentina após 1 ano de armazenamento em água destilada²⁶; entretanto, vale salientar que, no teste de VM% realizado no presente estudo, o colágeno foi armazenado em água sem proteção de monômeros resinosos, o que pode acelerar o processo de degradação hidrolítica¹; rejeitando, assim, a segunda hipótese do estudo.

A reação de ligação cruzada inter e intramolecular que ocorre no colágeno dentinário é mediada por interação dos grupamentos amina com o ácido carboxílico presente na lisina, hidroxilisina ou arginina, para formação de uma amida. O grupo fenólico presente em

polifenóis, como EGCG, TAN e PAC, forma ligação de hidrogênio, bem como ligações covalentes estáveis e hidrofóbicas. Adicionalmente, esse tipo de interação ocasiona inibição inespecífica de proteases e proteoglicanos⁴. Pode-se observar, na análise do FT-IR, a caracterização do colágeno tipo I em todos os grupos testados com o alongamento das vibrações do grupo C=O, referente à presença do grupo amida I, além de vibração N-H e curvatura do CH₂, referente à amina II (-1550 cm⁻¹)²⁶. Após biomodificação, há uma interação notória dos agentes biomodificadores com o colágeno, formando um complexo de colágeno-ALC. Pode-se notar essas alterações pelos alongamentos bem evidentes dos picos ~ 1517 cm⁻¹ e 1450 cm⁻¹ referentes à C-C presente no anel aromático; entretanto, nota-se que essa mudança é mais significativa no TAN, indicando que quanto maior a quantidade de grupamentos galoil na composição, maior a disponibilidade de hidroxilas para interagir diretamente com o colágeno dentinário^{2,24}. Esse resultado concorda com a avaliação do ME, uma vez que melhores interações com o colágeno podem gerar um ganho de propriedade mecânica de maneira imediata. Pequenas mudanças ocorrem nos picos do grupo EGCG, denotando picos menos acentuados, o que ressalta uma menor atividade dessas moléculas²⁷.

Acerca da avaliação da resistência de união à dentina, observou-se que os grupos que conseguiram manter a estabilidade de união, após 6 meses de envelhecimento, foram a PAC e TAN, o que nos permite aceitar a quarta hipótese do estudo. A PAC é o ALC natural mais utilizado na atualidade, apresentando resultados satisfatórios devido à versatilidade de ligações cruzadas que podem ser formadas. Estas podem ser do tipo ligação de hidrogênio, covalente estável e hidrofóbicas^{4,24}, além da formação adicional de um complexo de cálcio amorfo que tem o benefício de mineralização do substrato, melhorando a estabilidade do colágeno²⁸. Sabe-se que o uso de PAC como pré-tratamento dentinário melhora a molhabilidade do adesivo em dentina, além de ter ação contra proteases²⁵, resultado observado no presente estudo com a manutenção da longevidade de restaurações adesivas, corroborando com dados na literatura^{4,25}. Vale ressaltar, contudo, que em dados clínicos mostram resultados insatisfatórios em retenções de restauração em resina composta, com pré-tratamento de PAC 2% e 5% após 6 meses; além disso, manchamento mais pronunciado foi encontrado nesses dentes restaurados com PAC como tratamento de dentina¹⁰.

No entanto, em relação ao TAN, não existem estudos prévios que avaliem a resistência de união em dentina quando utilizado como agente de pré-tratamento. Todavia, avaliou-se o efeito do TAN incorporado a um sistema adesivo, sendo que esta incorporação não parece ter sido benéfica ao procedimento de união da resina à dentina²⁹. Pressupõe-se que a interação do TAN com o colágeno dentinário seria melhorada devido à presença dos

grupamentos galoi¹⁷, além da quantidade de ligações formadas pelos inúmeros grupamentos hidroxilas presentes na molécula, gerando, assim, uma melhor manutenção da interface de união². Esse dado complementa a avaliação do ME da matriz de colágeno pré-tratada por TAN, que demonstrou um potencial expressivo no ganho de propriedade mecânica do colágeno; e devido a esse teste não avaliar apenas o colágeno desprotegido, mas também aquele com o envolvimento de monômeros presentes no sistema adesivo na formação da camada híbrida, pode ser bem fidedigno com a realidade da odontologia restauradora .

Os resultados de resistência de união são complementados pela análise qualitativa da microporabilidade, na qual se pode observar uma camada híbrida bem-definida, com perceptível distinção dos corantes no grupo TAN, indicando sua impermeabilidade, bem como a formação efetiva dos *tags* de resina no interior dos túbulos dentinários. Dessa forma, quanto maior a capacidade de reticulação do colágeno de um ALC, mais facilmente irá ocorrer a penetração do sistema adesivo na rede de fibrilas colágenas, devido à mudança da dinâmica da água livre presente no colágeno dentinário. Quanto melhor essa impregnação monomérica, menor taxa de degradação aquele substrato sofrerá³⁰.

Embora os dados de manutenção do ME pelo EGCG tenham sido comprovados, na avaliação da resistência de união isso parece não ser observado, contrariando dados que demonstram a eficácia desse agente como pré-tratamento de dentina em um processo de adesão com sistema adesivo de condicionamento e lavagem de dois passos, utilizando o mesmo meio de armazenamento^{12; 31}.

Vale salientar que o presente estudo apresenta algumas limitações, como o tempo de envelhecimento de 6 meses, o que frente a uma realidade clínica pode não ser tão relevante; bem como, por ser um estudo laboratorial, não demonstre o que ocorreria, de fato, em cavidade oral.

É interessante notar que falhas de restaurações diretas ocorrem frequentemente, gerando custos exacerbados aos cirurgiões-dentistas, além de que, a cada troca de restauração, há desgaste da estrutura dentária remanescente sadia³². Assim sendo, estratégias que otimizem a durabilidade desses procedimentos são de grande valia. Nessa perspectiva, torna-se essencial a busca por ALC que apresentem atividade pronunciada e duradoura clinicamente, com o passar do tempo. Desta forma, seria interessante haver futuros estudos clínicos para elucidar a utilização desses ALC na prática Odontológica, em um longo prazo de avaliação, principalmente no que tange à utilização do TAN.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a presença de grupamentos galoil é um fator que pode contribuir na interação mais efetiva com o colágeno dentinário, porém não é determinante para melhorar o processo adesivo em longo prazo, sendo que os agentes biomodificadores de origem natural, ácido tânico, epigalocatequina-3-galato e proantocianidinas efetivos no processo de biomodificação do colágeno.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Central Analítica-UFC (financiada pelos programas Finep-CT-INFRA, Pró-Equipamentos CAPES, e MCTI-CNPq-SisNano2.0) pelas medidas de microscopia.

7. REFERÊNCIAS

1. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, Tezvergilmutluay A. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dental materials*. 2011; 27 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016>
2. Phansalkar RS, Nam J, Chen S, McAlpine JB, Napolitano JG, Leme A, Vidal CMP, Aguiar T, Bedran-Russo AK, Pauli GF.. A galloylated dimeric proanthocyanidin from grape seed exhibits dentin biomodification potential. *Fitoterapia*, 2015; 101: 169-178. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.12.006>
3. Frassetto A, Brechi L, Turco G, Marchesi G, Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Cadenaro M. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability—A literature review. *Dental Materials*, 2016; 32 (2): e41-e53. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.11.007>
4. Bedran-russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, Aguiar TR, Vidal CMP, Napolitano JG, Leme AA. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dental materials*, 2014; 30(1): 62-76, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.10.012>
5. Aguiar TR, Vidal CMP, Phansalkar RS, Todorova L, Napolitano JG, Chen SN, Pauli GF, Bedran-Russo AK. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *Journal of dental research*, 2014; 93 (4): 417-422. <https://doi.org/10.1177/0022034514523783>
6. Vidal CMP, Aguiar TR, Phansalkar R, McAlpine J, Napolitano JG, Chen SN, Araújo LSN, Pauli GF, Bedran-Russo AK. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification

- potential of plant-derived catechins. *Acta biomaterialia*, 2014; 10 (7): 3288-3294. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.036>
7. Rajachan OA, Hongtanee L, Chalermnaen K, Kanokmedhakul K, Kanokmedhakul S. Bioactive galloyl flavans from the stems of *Helixanthera parasitica*. *Journal of Asian natural products research*, 2020; 22(5): 405-412. <https://doi.org/10.1080/10286020.2019.1592165>
 8. 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. *Dental Materials*, 2013; 29(4):485-492. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.01.013>
 9. Moreira MA, Souza NO, Sousa RS, Freitas DQ, Lemos MVS, De Paula DM, Maia FJN, Lomonaco D, Mazzetto SE, Feitosa VP. Efficacy of new natural biomodification agents from Anacardiaceae extracts on dentin collagen cross-linking. *Dental Materials*, 2017; 33 (10): 1103-1109. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.07.003>
 10. Souza LC, Rodrigues NS, Cunha DA, Feitosa VP, Santiago SL, Reis A, Loguercio AD, Matos TP, Saboia VPA, Perdigão J. Two-year clinical evaluation of proanthocyanidins added to a two-step etch-and-rinse adhesive. *Journal of Dentistry*, 2019. 81:7-16. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.12.012>
 11. Karas D, Ulrichová J; Valentová K. Galloylation of polyphenols alters their biological activity. *Food and Chemical Toxicology*, 2017; 105: 223-240. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.021>
 12. Santiago SL, Osorio R, Neri JR, Carvalho RM, Toledano M. Effect of the flavonoid epigallocatechin-3-gallate on resin-dentin bond strength. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 2013; 15(6): 535-540. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a29532>
 13. He Q, Shi B, Yao K, Luo Y, Ma Z. Synthesis of gallotannins. *Carbohydrate Research*, 2001; 335 (4): 245-250. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00236-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00236-1)
 14. 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. *Dental Materials*, 2015; 31(7): 814-821, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.04.006>
 15. Feitosa VP, Sauro S, Ogliari FA, Ogliari AO, Yoshihara K, Zanchi CH, Sobrinho LC, Sinhorette MA, Correr ABM, Watson TF, VanMeerbeek B. Impact of hydrophilicity and length of spacer chains on the bonding of functional monomers. *Dental Materials*, 2014; 30(12): e317-e323. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.06.006>

16. Sun L, Song Y, Chen Y, Ma Y, Fu M, Liu X. The galloyl moiety enhances the inhibitory activity of catechins and theaflavins against α -glucosidase by increasing the polyphenol-enzyme binding interactions. *Food & Function*, 2021; 12 (1): 215-229. <https://doi.org/10.1039/D0FO02689A>
17. Orabi MAA, Yoshimura M, Amakura Y, Hatano T. Ellagitannins, gallotannins, and gallo-ellagitannins from the galls of *Tamarix aphylla*. *Fitoterapia*, 2015; 104: 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.05.008>
18. Ku CS, Sathishkumar M, Mun SP. Binding affinity of proanthocyanidin from waste *Pinus radiata* bark onto proline-rich bovine achilles tendon collagen type I. *Chemosphere*, 2007; 67 (8):1618-1627. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.037>
19. Mendes TAD, Pascoal SCD, Lemos MVS, Santiago SL, Mendonça JS. [Ácido tânico como agente biomodificador de dentina]. *Journal of Health & Biological Sciences*, 2019; 7(2):182-186. <http://dx.doi.org/10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2389.p182-186.2019>
20. Jastrzebska M, Zalewska-Rejda J, Wrzalik R, Kocot A, Mroz A, Barwinski B, Turek A, Cwalina B. Tannic acid-stabilized pericardium tissue: IR spectroscopy, atomic force microscopy, and dielectric spectroscopy investigations. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006; 78 (1):148-156. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30717>
21. Bedran-russo AKB, Yoo KJ, Ema KC, Pashley DH. Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. *Journal of dental research*, 2009; 88 (9): 807-811. <https://doi.org/10.1177/0022034509342556>
22. Lee RJ, Viola S, Lee Y, Janson T, Tzen C, Lee MR. Study of the release of gallic acid from (-) - epigallocatechin gallate in old oolong tea by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010; 24(7): 851-858. <https://doi.org/10.1002/rcm.4442>
23. Oliveira-Reis B, Maluly-Próni AT, Fagundes TC, Vasconcelos G, Bresciani E, Prakki A, Dos Santos PH. Influence of protease inhibitors on the degradation of sound, sclerotic and caries-affected demineralized dentin. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 2019; 97:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.05.003>
24. Vidal CMP, Zhu W, Manohar S, Aydin B, Keiderling TA, Messersmith PB, Bedran-Russo AK. Collagen-collagen interactions mediated by plant-derived proanthocyanidins: A spectroscopic and atomic force microscopy study. *Acta biomaterialia*, 2016; 41:110-118. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.05.026>
25. Leme-kraus AA, Phasalkar RS, Reis MC, Aydin B, Sousa ABS, Alania Y, McAlpine J, Chen SN, Pauli GF, Bedran-Russo AK. Dimeric proanthocyanidins on the stability of

dentin and adhesive biointerfaces. *Journal of dental research*, 2020; 99 (2): 175-181. <https://doi.org/10.1177/0022034519892959>

26. Beck F, Ilie N. Antioxidants and Collagen-Crosslinking: Benefit on Bond Strength and Clinical Applicability. *Materials*, 2020; 13 (23): 5486. <https://doi.org/10.3390/ma13235483>
27. Liu Y; Wang Y. Proanthocyanidins' efficacy in stabilizing dentin collagen against enzymatic degradation: MALDI-TOF and FTIR analyses. *Journal of dentistry*, 2013; 41(6): 535-542. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.03.007>
28. Epasinghe DJ, Burrow MF, Yiu CKY. Effect of proanthocyanidin on ultrastructure and mineralization of dentine collagen. *Archives of Oral Biology*, 2017; 84: 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.09.012>
29. Ebrahimi M, Shurazi AS, Abdolhoseinpour F, Abdollahi F. Effect of tannic acid on bond strength of etch and rinse and self-etch adhesive systems in dentin of primary teeth. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 2017; 18 (1):34-38. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1984>
30. Leme-Kraus AA, Aydin B, Vidal CPM, Phansalkar RM, Nam JW, McAlpine J, Pauli GF, Biostability of the proanthocyanidins-dentin complex and adhesion studies. *Journal of dental research*, 2017; 96 (4):406-412. <https://doi.org/10.1177/0022034516680586>
31. Singh P, Nagpal R, Singh UP. Effect of dentin biomodifiers on the immediate and long-term bond strengths of a simplified etch and rinse adhesive to dentin. *Restorative dentistry & endodontics*, 2017; 42 (3):188-199. <https://doi.org/10.5395/rde.2017.42.3.188>
32. Demarco FF; Corrêa MB, Cenci MS, Moraes RR, Niek JM, Opdam JM. Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. *Dental materials*, 2012; 28 (1):87-101. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.09.003>

Capítulo III

Efeito do propilgalato como agente biomodificador de colágeno no processo adesivo em dentina: estudo *in vitro*

Talita Arrais Daniel Mendes¹, Samuel Chillavert Dias Passcoal², Maria Clara Ayres Estellita²,
Juliano Sartori Mendonça³

¹- Aluna de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

²- Aluno do Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

³- Professor Adjunto do Departamento de Odontologia Restauradora da Universidade Federal do Ceará.

Autor de correspondência:

Juliano Sartori Mendonça, Dr

Programa de Pós-graduação em Odontologia

Rua Monsenhor Linhares, S/N, Fortaleza, Ceará

e-mail: mendoncajs@hotmail.com

Efeito do propilgalato como agente biomodificador de colágeno no processo adesivo em dentina: estudo *in vitro*

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a bioatividade e bioestabilidade do propilgalato em colágeno dentinário e seu efeito na estabilidade da união no processo adesivo em dentina. Os grupos sob investigação foram pré-tratamento de dentina com: (1) propilgalato 0,1(p/v)% (PGa0,1%); (2) propilgalato 1(p/v)% (PGa1%); (3) propilgalato 10(p/v)% (PGa10%); (4) glutaraldeído 5(v/v)% (GA5%); e (5) água destilada, como controle negativo (CN). Confeccionaram-se espécimes de dentina para a realização da análise química da dentina por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) [n=3]. Em seguida, obtiveram-se blocos de dentina média, foram aplicados os pré-tratamentos e posteriormente a realização do procedimento adesivo. Avaliou-se a resistência de união à dentina (μ TSB), por meio de ensaios de microtração [n=10], realizados após 24 horas e 6 meses do procedimento adesivo. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA *two way*, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Quanto à avaliação química pelo FT-IR, foi possível observar que o PGa1% apresentou uma maior taxa de absorvância de água, carbonato, colágeno e amida. Por outro lado, as curvas de absorvância dos grupos GA e CN apresentaram-se muito semelhantes entre si, bem como PGa0,1% e PGa10% se assemelham. Em relação à resistência de união à dentina, pode-se observar que o PGa0,1% e PGa10% obtiveram resultados estatisticamente superiores ao CN no período de 24h. Após 6 meses de armazenamento, todos os grupos conseguiram apresentar estabilidade de união entre resina e dentina, exceto o CN e PGa10%, em relação aos valores de resistência de união obtidos ($p > 0,05$). Conclui-se que o PGa em diferentes concentrações é capaz de realizar ligações químicas com a dentina desmineralizada, possibilitando aumentar a resistência de união à dentina pelo sistema adesivo, bem como proporcionar estabilidade de união entre resina e dentina após o período de 6 meses.

Palavras-chave: Galato de Propila, Glutaral e Adesivos Dentinários

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the bioactivity and biostability of propyl gallate in dentin collagen and its effect on bond stability in the dentin bonding process. The groups under investigation were pre-treated dentin with: (1) 0.1(w/v)% propyl gallate (PGa0.1%); (2)

propyl gallate 1(w/v)% (PGa1%); (3) 10(w/v)% propyl gallate (PGa10%); (4) glutaraldehyde 5(v/v)% (GA5%); and (5) distilled water as a negative control (NC). Dentin specimens were prepared for chemical analysis of dentin by means of Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) [n=3]. Then, blocks of middle dentin were obtained, pre-treatments were applied and later the adhesive procedure was performed. The bond strength to dentin (σ TSB) was evaluated by means of microtensile tests [n=10], performed after 24 hours and 6 months of the bonding procedure. The data obtained were submitted to two-way ANOVA, followed by Tukey's post-test ($p < 0.05$). As for the chemical evaluation by FT-IR, it was possible to observe that PGa1% showed a higher rate of absorbance of water, carbonate, collagen and amide. On the other hand, the absorbance curves of the GA and CN groups were very similar to each other, as well as PGA0.1% and PGA10% are similar. Regarding the bond strength to dentin, it can be observed that PGa0.1% and PGa10% obtained statistically better results than NC in the 24-hour period. After 6 months of storage, all groups were able to show bond stability between resin and dentin, except for CN and PGa10%, in relation to the bond strength values obtained ($p > 0.05$). It is concluded that PGa at different concentrations is capable of performing chemical bonds with demineralized dentin, making it possible to increase the bond strength to dentin by the adhesive system, as well as providing bond stability between resin and dentin after a period of 6 months.

Key- words: Propyl Gallate, Glutaral e Dentin-Bonding Agents

1. Introdução

A manutenção da estabilidade de união das resinas compostas à estrutura dentária tem se tornado objeto de investigação de vários estudos, devido à crescente utilização desses materiais na Odontologia. No entanto, a estabilidade de união em dentina, avaliada por meio de estudos *in vitro*, tem sido contraditória. Isso ocorre devido aos diversos mecanismos de degradação da interface de união resina/dente que ocorrem principalmente em substrato dentinário^{1,2}.

Dentre os diversos mecanismos de deterioração da camada híbrida, pode-se destacar a ação de enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs) e cisteíno catepsinas (CTPs); e hidrólise dos monômeros dos sistemas adesivos. Sendo assim, muitos estudos avaliam o uso de estratégias para reduzir ou cessar a ação dos meios de degradação. Dentre elas, destaca-se o uso de agentes biomodificadores de colágeno (ABC), que atuam por meio de formação de ligações químicas cruzadas entre os aminoácidos presentes na estrutura da tripla hélice do colágeno dentinário, reduzindo a ação das MMPs e CTPs, bem como melhorando as

propriedades mecânicas desse substrato e, conseqüentemente, a qualidade da camada híbrida^{1,3,4}.

Existem diversos tipos de ABC com capacidade de formação de ligações cruzadas em colágeno (LCC), podendo ser classificados como de origem natural e sintética⁴. Mesmo com a vasta gama de agentes sendo estudados nessa perspectiva, os agentes naturais, em especial os polifenóis, apresentam uma certa instabilidade fisiológica, podendo desenvolver degradação oxidativa com certa facilidade^{5,6}. Moléculas que possuem grupamentos químicos galoilados em sua composição têm sido promissoras na otimização das LCC e, dentre estas, os agentes galoilados sintéticos acabam por incitar relevante interesse em novos estudos acerca dos mecanismos de ação dos ABC^{7,8}.

Dentre os polifenóis galoilados sintéticos ainda não testados como agente biomodificador de colágeno, o propilgalato (PGa) (Figura 1), produzido por meio da esterificação do ácido gálico com o composto n-propanol e apresenta um grupamento do tipo galoil em sua molécula^{7,9}, já tem sido utilizado na indústria cosmética e alimentícia, como conservante, demonstrando efeitos antioxidantes potentes, além de possuir efeito anti-inflamatório e antitumoral¹⁰. O ácido gálico (éster n-propílico do ácido 1,3,5-tri-hidroxi-benzóico) é produzido por hidrólise alcalina e ácida de taninos (galotanino, ácido tânico, ácido galotânico), e costumeiramente extraído a partir de nozes. O processo de esterificação do ácido gálico em propilgalato é ativado pela presença de um ácido forte, como o ácido sulfúrico ou clorídrico, na forma anidra⁷.

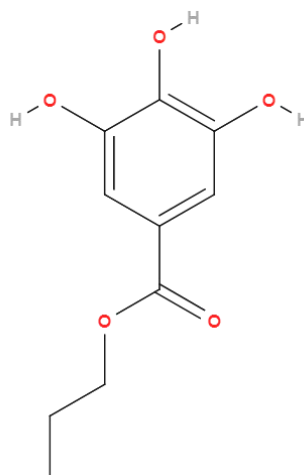


Figura 1: Estrutura química do Propilgalato (PGa), podendo ser observada a presença de um grupamento galoil.

Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade biomodificadora do PGa em colágeno dentinário e o seu efeito na estabilidade de união entre dentina/resina composta, levando-se em consideração a seguinte hipótese: O PGa irá otimizar o procedimento adesivo em dentina e melhorar a estabilidade de união, independentemente de sua concentração.

2. Material e métodos

2.1 Delineamento experimental

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob o parecer 4.651.833. Trata-se de um estudo laboratorial *in vitro*. A variável de estudo sob investigação foi o uso de diferentes agentes de biomodificação sintéticos como soluções de pré-tratamento de dentina, em 5 níveis: (1) Propilgalato a 0,1(p/v)% (PGa0,1%); (2) Propilgalato a 1(p/v)% (PGa1%); (3) Propilgalato a 10(p/v)% (PGa10%), (4) Glutaraldeído a 5(v/v)% (GA5%), como controle positivo; e (5) água destilada, como controle de técnica (CN). As concentrações foram definidas previamente por um estudo-piloto. As variáveis dependentes do estudo foram a resistência de união em dentina [µTSB] (n=10), por meio de ensaios de microtração, realizados em máquina de ensaios mecânicos universais, e análise química por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) (n=3).

2.2 Preparo das soluções

O propilgalato (*Propyl gallate* 99%, Pó, Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) foi pesado em uma balança analítica de precisão (Shimadzu, Kyoto, Japan) e posteriormente foi diluído em 50% de etanol absoluto (100% Etanol Absoluto, Cequímica, Fortaleza, Brasil) e 50% água destilada nas respectivas concentrações.

Já para o preparo de solução com o Glutaraldeído (95% Sigma Aldrich, St. Louis, USA), apresentado na forma de líquido, foi separada uma quantidade, com auxílio de uma pipeta, e diluído em 50% de etanol absoluto (100% Etanol Absoluto, Cequímica, Fortaleza,

Brasil) e 50% de água destilada para se chegar a uma solução com a concentração de 5(v/v)% de GA.

As soluções foram obtidas após a completa diluição com o auxílio de um agitador magnético por 2 minutos.

2.3 Análise química da dentina por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

Cinco terceiros molares hígidos foram aleatoriamente selecionados para a análise por FT-IR. Os dentes tiveram as suas porções radiculares, quando presentes, e o terço oclusal seccionados por meio de máquina de corte (Minitom, Struers, Dinamarca). As superfícies oclusais foram lixadas em politriz com lixas de carbetto de silício #360 e #600 para remoção total do esmalte remanescente tanto na superfície dentinária oclusal como em toda a periferia do dente, restando um disco contendo apenas dentina.

Em seguida, foram confeccionadas barras de dentina com 1,7 X 0,5 X 6 mm de dimensão, sendo gerado por dente um total de 3 barras por grupo (n=3). As barras de dentina foram previamente desmineralizadas em solução de ácido fosfórico 10% por 5 horas e submetidas ao tratamento com as respectivas soluções por 1 minuto, em seguida foram mantidas em ambiente seco até a leitura no FT-IR. As amostras foram posicionadas sobre o detector de Attenuated Total Reflectance (ATR) de diamante, com diâmetro de 2 mm (Durascope, Smiths Detection, USA), acoplado ao espectrômetro de transformada de Fourier (Nicolet-380, Nicolet, USA). A medida experimental consistiu na aquisição do espectro de absorvância na região entre 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 0,5 cm^{-1} e 32 varreduras para cada espectro adquirido. Todo espécime teve uma determinada quantidade de raspas dentinárias removidas em triplicata, gerando, assim, 3 espectros de absorção para cada espécime analisado, em cada etapa da análise.

2.4 Avaliação da resistência de união à dentina

2.4.1 Procedimento adesivo em dentina

Um total de 40 dentes foram utilizados para realização do processo adesivo (n=8). O esmalte oclusal e as raízes de cada dente foram removidos com um disco diamantado (Isomet

4000; Buehler, Lake Bluff, Estados Unidos) em baixa velocidade, sob refrigeração constante, para expor uma superfície plana da dentina média. Em seguida, realizou-se um processo de regularização com lixa de carbetto de silício de granulação #320, sob constante irrigação com água durante 30 segundos, para criar uma *smear-layer* padrão.

Todos os blocos de dentina média foram condicionados com ácido fosfórico a 37% em gel (Condac 37%, FGM, Joinville, Brasil) durante 15 segundos e, em seguida, lavados abundantemente pelo dobro do tempo. As soluções foram aplicadas como agentes de pré-tratamento, em suas respectivas concentrações, por 1 minuto. Removeu-se a umidade excessiva dos espécimes com papel absorvente e, com o auxílio de um *microbrush*, realizou-se a aplicação do sistema adesivo (Single Bond 2, 3M ESPE, Indiana, EUA) ativamente por 30 segundos, sendo o mesmo fotoativado por 40 segundos por um aparelho fotopolimerizador LED a 600 mW/cm² (Ortus LEDLUX II, Ortus Ind. E Com. LTDA, Campo Mourão, Brasil). Posteriormente, confeccionou-se um platô de resina composta (Filtek Z350 XT, 3M ESPE, Indiana, EUA), de aproximadamente 4 mm de altura, sendo cada incremento de 1 mm fotoativado por 40s.

2.4.2 Realização dos ensaios de microtração

Um número de oito dentes por grupo foi utilizado no teste de microtração (n=8). Após o procedimento adesivo, os dentes foram armazenados em estufa por 24 horas a 37°C e posteriormente foram seccionados em dois sentidos perpendiculares entre si, a fim de se obter espécimes em forma de palitos com área de secção transversal de aproximadamente 1 mm². Metade dos espécimes foram testados imediatamente após a secção e a outra metade foi armazenada em água destilada por 6 meses, com troca da solução semanalmente. Para realização do ensaio mecânico de microtração, os espécimes foram fixados em um dispositivo Geraldelli, utilizando-se um adesivo à base de cianoacrilato (Super Bonder Gel, Loctite, Henkel Co., Diadema, Brasil) em suas extremidades, acoplado a uma máquina de ensaios mecânicos universais (Instron 3345, Canton, MA, EUA) e tracionados até a fratura, empregando-se uma célula de carga de 500 N, a uma velocidade de 0,5 mm/min. Os resultados obtidos foram expressos em MegaPascal (MPa).

2.5 Análise estatística

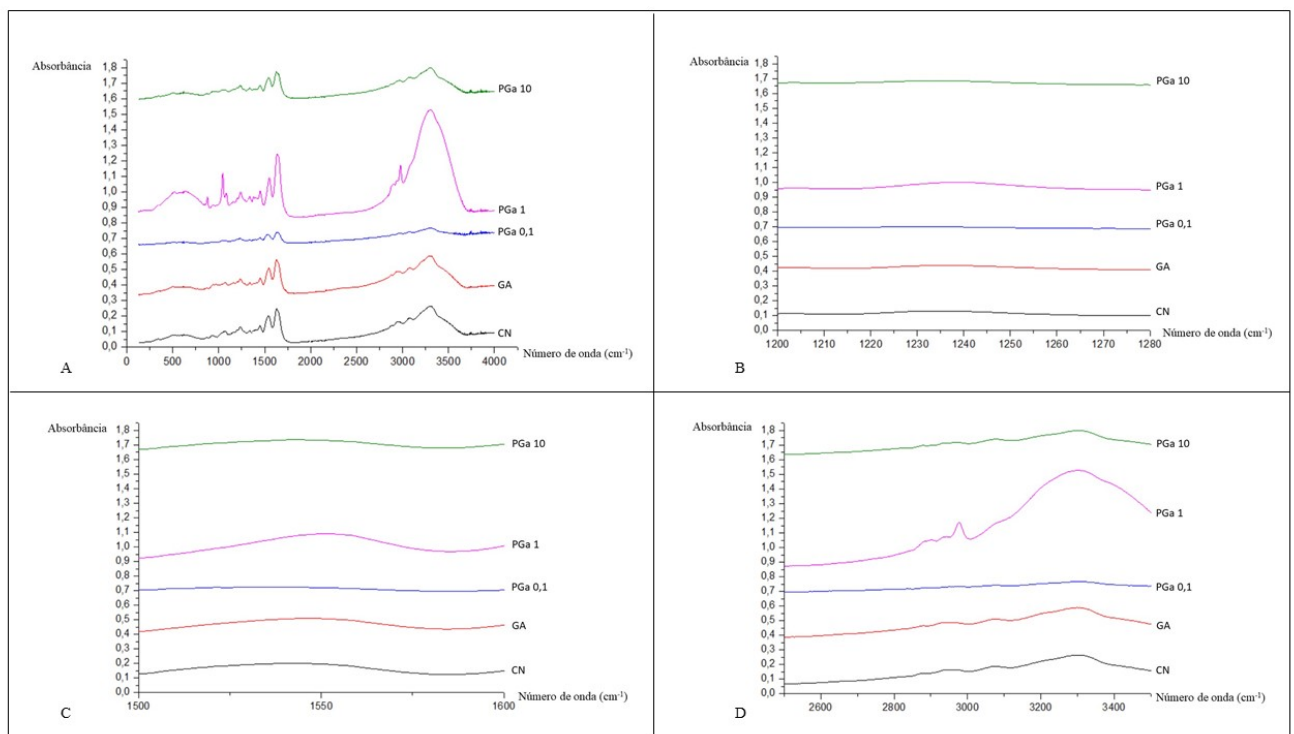
Os dados de resistência de união à dentina obtidos foram tabulados no programa Microsoft Excel, as falhas prematuras foram consideradas como 0 MPa e incluídas na análise de dados, e, em seguida, exportados para o *software* SigmaPlot 14.0, no qual a unidade amostral adotada foi elemento dentário. Os dados foram expressos na forma de média e desvio-padrão e submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* e à análise de variância (ANOVA *two way*), seguida do pós-teste de *Tukey* para comparações múltiplas, adotando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados

Os espectros de absorvância foram analisados pelo programa Origin 8.0 (Microcal Origin 8.0®, OriginLab, USA). Inicialmente, os espectros tiveram o seu sinal de fundo removido. Após a divisão, removeu-se o sinal de fundo dos espectros utilizando a ferramenta “subtract straight line” do programa Origin 8.0.

Foi possível observar que o grupo PGa1% apresentou uma grande faixa de absorção de água na banda 2500-3500 cm^{-1} (Figura 1D), enquanto os grupos PGa0,1% e PGa10% apresentaram uma redução na absorção de água. GA e CN apresentaram curvas com bandas de absorvância muito semelhantes entre si (Figura 1A).

O grupo PGa1% apresentou uma extensa faixa de absorvância de carbonato (CO_3)



e amida II (Figura 2B; Figura 2C), quando comparado com os outros grupos experimentais. Além disso, é possível observar picos na banda 1200-1280 cm^{-1} no grupo PGa1%, demonstrando também um alto nível de absorvência de colágeno e amida.

Figura 2: Espectro de absorção por FT-IR de 0 - 4000 cm^{-1} (A). Espectro de absorção do colágeno e amida III dos espécimes de 1200 - 1280 cm^{-1} (B). Espectro de absorção de CO_3 e amida II dos espécimes de 1500 - 1600 cm^{-1} (C). Espectro de absorção do radical C-H e água dos espécimes de 2500 - 3500 cm^{-1} (D).

Na análise dos valores de resistência de união, observou-se que, com 24 horas, o PGa10% [$38,2 \pm 11,9$ MPa] e o PGa0,1% [$32,8 \pm 11,5$ MPa] demonstraram resultados estatisticamente superiores aos obtidos por CN [$21,6 \pm 5,0$ MPa] ($p < 0,001$ e $p = 0,027$, respectivamente). Após 6 meses de envelhecimento, notou-se que o PGa0,1% [$29,0 \pm 4,3$ MPa] e PGa10% [$24,1 \pm 3,6$] apresentaram resultados superiores aos do grupo CN ($12,2 \pm 2,6$ MPa). Ao realizar a análise entre cada grupo nos dois períodos distintos, nota-se que o CN demonstrou um decréscimo da η TSB, demonstrando uma diferença significativamente estatística ($p = 0,013$). Denota-se que os grupos GA5% ($p = 0,101$), PGa0,1% ($p = 0,306$) e PGa1% ($p = 0,091$) não apresentaram diferença estatisticamente significativa após 6 meses de envelhecimento, demonstrando uma estabilidade de união, diferentemente do PGa10% que demonstrou um decréscimo significativo de η TSB após 6 meses de envelhecimento ($p < 0,001$) (Tabela 1).

Tabela 1: Resistências de união à dentina (MPa \pm desvio-padrão, n=8) obtidas pelos grupos experimentais nos diferentes períodos de observação.

Grupos	24 horas		6 meses	
CN	$21,6 \pm 5,0$	A, a	$12,2 \pm 2,6$	A, b
GA5%	$22,6 \pm 4,0$	AB, a	$16,4 \pm 4,5$	AB, a
PGa0,1%	$32,8 \pm 11,5$	BC, a	$29,0 \pm 4,3$	C, a
PGa1%	$28,3 \pm 12,7$	ABC, a	$22,0 \pm 4,1$	ABC, a
PGa10%	$38,2 \pm 11,9$	C, a	$24,1 \pm 3,6$	BC, b

Legenda: Valores cujas letras maiúsculas são semelhantes entre si em uma mesma coluna não apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$). Valores cujas letras minúsculas são semelhantes entre si em uma mesma linha não apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

4. Discussão

Dentre as estratégias disponíveis na literatura, ainda não existe um consenso sobre qual é o agente biomodificador definitivo para manutenção e aumento de durabilidade de interface adesiva de restaurações com resina composta^{4,11,12, 13, 14, 15, 16}. Assim, a reticulação de colágeno em dentina tem a capacidade de fornecer novas perspectivas em relação ao desenvolvimento de biomateriais de reparação tecidual¹².

O presente estudo apresenta significativa relevância ao ser pioneiro em realizar uma avaliação química em dentina do desempenho do PGa, em diferentes concentrações, utilizado como agente de pré-tratamento. Na análise química da dentina, realizada por meio do FT-IR, foi possível identificar os compostos químicos através do nível de absorbância pelo comprimento de onda emitido entre 400 e 4000 cm^{-1} e o substrato em análise, resultando em espectros de absorção constituídos pela somatória das bandas de absorção originárias dos compostos químicos presentes no substrato¹⁷.

Diante disso, por meio das análises em FT-IR, pode-se observar que a curva do PGa1% é a que apresenta os achados mais relevantes quanto a suas taxas de absorbância. PGa1% apresentou a maior taxa de absorção de matéria orgânica (amida, amida III e carbonato), matriz essa de suma importância para a formação adequada da camada híbrida em interfaces adesivas, uma vez que o colágeno desempenha um papel fundamental na substituição da estrutura dentária ausente, assim como fornece retenção micromecânica de compósitos resinosos, bem como suporte para remineralização do tecido⁴. A alta absorbância da banda da amida II atribui-se principalmente à vibração de flexão da ligação N-H e à vibração de alongamento da ligação C-N, onde bandas mais largas e mais altas das amidas I e II implicam em maior envolvimento de ligações de hidrogênio, aumentando, assim, a reticulação do colágeno dentinário¹⁷. Entretanto, ao mesmo tempo, o grupo PGa1% apresenta a maior taxa de absorbância de água no seu substrato, o que, no âmbito micromecânico, pode significar uma propriedade crítica na interface de união, uma vez que a grande presença de conteúdo hídrico pode aumentar a ação enzimática por hidrólise dos monômeros do sistema adesivo¹².

O potencial biomodificador de uma molécula química está intimamente associado ao tipo de molécula, sendo os polifenóis compostos químicos com ação biomodificadora comprovada¹⁸, e seu potencial de interação com o colágeno está correlacionado com o

comportamento estérico, tamanho e quantidade de grupamentos hidroxilas presentes¹². Assim sendo, o PGa é uma molécula que possui características favoráveis para uma boa interação com o colágeno, o que já foi demonstrado em associação com as proantocianidinas¹², corroborando com os achados deste estudo, que utilizou o PGa isoladamente, mostrando-se eficaz na melhoria da união do sistema adesivo à dentina. O presente estudo notou um melhor resultado de μ TBS para o PGa10% e PGa0,1% em relação à AD, em 24 horas; e nota-se que a concentração do PGa não configura um fator primordial para o aumento da resistência de união de restaurações de resina composta em dentina. Esse aumento na resistência de união à dentina pode ocorrer devido à capacidade de formação de ligações cruzadas próximas aos locais de clivagem do colágeno por MMPs e CTPs, apoiando a afirmação de que a presença de hidroxilas na estrutura molecular do ABC está associada com formação de ligação cruzada¹². A formação de ligação cruzada a nível intermicrofibrilar melhora a propriedade mecânica do colágeno¹², o que indica que o PGa atua nesse tipo de ligação com o colágeno tipo I, presente em abundância na dentina; entretanto, ainda não se sabe ao certo como funciona esse mecanismo de interação. Sugere-se que alta bioatividade da molécula galoilada resulta da presença do grupamento galoil em sua composição, propiciando flexibilidade à molécula e facilidade de interagir com a prolina presente no colágeno dentinário, esse potencial reativo promissor também possui relação direta com o peso molecular^{7,12}.

A estabilidade de união em uma restauração com resina composta é um parâmetro de extrema importância para validar um tratamento que envolva dentina, tendo em vista que esse substrato dentário demonstra, ainda nos dias de hoje, ser desafiador². O GA ainda é considerado um “padrão-ouro” como ABC, pois, por mais que realize poucas ligações cruzadas, essas são bastante estáveis, propiciando uma maior estabilidade da matriz de colágeno, mesmo reduzindo a viabilidade celular²⁰. O GA foi utilizado como controle positivo por ser uma molécula de origem sintética, semelhante ao PGa, e seu efeito satisfatório na formação de ligações cruzadas³. Nessa perspectiva verificou-se que o GA5% não obteve um aumento considerável de μ TSB em 24h, podendo-se ressaltar achados prévios que denotam que o GA possui efeito deteriorante em calcificação de materiais, apresentando, assim, significativas falhas de adesão. Além disso, o GA possui alta citotoxicidade, necessitando, portanto, de uma aplicação em baixas concentrações, como a utilizada no presente estudo, que foi de 5%^{21, 22}.

O presente estudo observou a presença de estabilidade de união, após 6 meses de envelhecimento, para os grupos GA5%, PGa0,1% e PGA1%, demonstrando que os tratamentos foram eficazes na manutenção de resistência de união de um sistema adesivo de

condicionamento e lavagem à dentina, exceto pelo grupo Pga10%. Desta forma, a hipótese do estudo foi aceita, pois a concentração de PGa não é um fator preponderante no desempenho desse ABC. Por outro lado, verifica-se que o PGa pode conseguir atuar bem como um ABC ainda mantendo a estabilidade de união após 6 meses, mesmo em concentrações pequenas como de 0,1%. Dados prévios já haviam demonstrado que o PGa tinha efeito biomodificador de colágeno, mas enfatizou a limitada ação desse agente¹². Como mencionado anteriormente, não se sabe ao certo o mecanismo de ação do PGa, porém o do GA já é bem estabelecido, e ocorre em função de sua interação com o colágeno por meio de ligações intramoleculares e intermoleculares, através dos grupamentos amino (ϵ amino; n-amino terminal e amino mercaptano) com o aminoácido lisina, formando uma estrutura conjugada e cíclica de Schiff (compostos com ligações entre carbono e nitrogênio – C=N), capaz de estabilizar as ligações formadas na estrutura do colágeno²³.

Pode-se observar, ainda, que o Pga10%, apesar de ter obtido um excelente resultado de μ TSB com 24 horas, não foi capaz de manter esses valores após 6 meses. Porém ressalta-se que, apesar deste decréscimo significativo, esse grupo demonstrou ser equivalente ao Pga0,1% e ao Pga1% no período de 6 meses de armazenamento.

Dentre as limitações do presente estudo, destaca-se o fato de que não foi analisada a influência do PGa na propriedade mecânica do colágeno, bem como sua citotoxicidade em células pulpares, sendo necessários estudos com este enfoque, tendo em vista seu resultado promissor na estabilidade de união *in vitro* de restaurações com resinas compostas.

Conclui-se que o PGa em diferentes concentrações é capaz de realizar ligações químicas com a dentina desmineralizada, sendo que na concentração de 1% demonstra uma maior biomodificação e modificação do colágeno dentinário. Esse composto químico possibilita um aumento da μ TSB após 24 horas do processo de restauração, nas concentrações de 0,1% e 10%, quando comparados à AD. Pode-se notar, ainda, que o Pga10% não foi capaz de manter a estabilidade de união após 6 meses, diferentemente dos grupos Pga0,1%, Pga1% e GA5% que mantiveram bons resultados da μ TSB após esse período.

5. Referências

[1] Gré CP, Lise DP, Ayres AP, Munck J, Mutluay AT, Dirihan RS, Lopes GC, Landuyt V, Meerbeek BV. Do collagen cross-linkers improve dentin's bonding receptiveness? Dent

Mater, 2018; 34 (11): 1679-1689.

[2] Mendes TAD, Pascoal SCD, Estellita MCA, Lemos MVS, Silva PGB, Mendonça JS. Effect of Grape Seed Extract on Stability of Restorations with Composites Resin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2022; 113:1030-39.

[3] Bedran-Russo AK, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. *Acta Biomater*, 2011; 7(4):1735–1741.

[4] Bedran-russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, Aguiar TR, Vidal CMP, Napolitano JG, Leme AA. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater*, 2014; 30(1): 62-76, 2014.

[5] Kuntz S, Rudloff S, Assburg H, Borsch C, Frohling B, Unger F, Dold S, Spengler B, Romp A, Kunz C. Uptake and bioavailability of anthocyanins and phenolic acids from grape/blueberry juice and smoothie in vitro and in vivo. *British Journal of Nutrition*. *Br J Nutr*, 2015; 113 (7): 1044-1055.

[6] Pandareesh MD, Mythri RB, Bharath MMS. Bioavailability of dietary polyphenols: Factors contributing to their clinical application in CNS diseases. *Neurochem Int*, 2015; 89: 198-208.

[7] Karas D, Ulrichová J; Valentová K. Galloylation of polyphenols alters their biological activity. *Food Chem Toxicol*, 2017; 105: 223-240.

[8] He Q, Shi B, Yao K, Luo Y, Ma Z. Synthesis of gallotannins. *Carbohydr Res*, 2001; 335 (4): 245-250.

[9] Fujisawa S, Kadoma Y. Comparative study of the alkyl and peroxy radical scavenging activities of polyphenols. *Chemosphere*, 2006; 62 (1): 71-79.

[10] Wei PL, Huang CY, Chang YJ. Propyl Gallate Inhibits Hepatocellular Carcinoma Cell Growth through the Induction of ROS and the Activation of Autophagy. *PLoS One*, 2019; 14 (1): e0210513.

[11] Aguiar TR, Vidal CMP, Phansalkar RS, Todorova L, Napolitano JG, Chen SN, Pauli GF, Bedran-Russo AK. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *J Dent Res*, 2014; 93 (4): 417-422.

- [12] Vidal CMP, Aguiar TR, Phansalkar R, McAlpine J, Napolitano JG, Chen SN, Araújo LSN, Pauli GF, Bedran-Russo AK. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta biomater*, 2014; 10 (7): 3288-3294.
- [13] Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *Journal of dental research. J Dent Res*, 2004; 83 (3): 216-221.
- [14] Scheffel DLS, Delgado CC, Soares DGS, Basso FG, Costa CAS, Pashley DH, Hebling J. Increased durability of resin-dentin bonds following cross-linking treatment. *Oper dent*, 2015; 40 (5): 533-539.
- [15] Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Cadenaro M. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability: A literature review. *Dent Mater*, 2016; 32 (2):41-53.
- [16] Boddeda KR, Rani RC, Vanga NR, Chandrabhatla SK. Comparative evaluation of biodentine, 2% chlorhexidine with RMGIC and calcium hydroxide as indirect pulp capping materials in primary molars: An *in vivo* study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 2018; 37 (1): 60-66.
- [17] Yang H, Xie B, Wang Y, Cui Y, Yang H, Wang X, Yang X, Bao G. Effect of tea root-derived proanthocyanidin fractions on protection of dentin collagen. *J Int Med Res*, 2020; 48(5): 0300060519891303.
- [18] Lemos MVS, Araújo-Neto VG, Lomonaco D, Mazzetto SE, Feitosa VP, Santiago SL. Evaluation of Novel Plant-Derived Monomers-Based Pretreatment on Bonding to Sound and Caries-Affected Dentin. *Oper Dent*, 2022; 47(1): e12-e21.
- [19] Souza LC, Rodrigues NS, Cunha DA, Feitosa VP, Santiago SL, Reis A, Loguercio AD, Matos TP, Saboia VPA, Perdigão J. Two-year clinical evaluation of proanthocyanidins added to a two-step etch-and-rinse adhesive. *J Dent*, 2019. 81:7-16.
- [20] Lee J, Sabatini C. Glutaraldehyde collagen cross-linking stabilizes resin–dentin interfaces and reduces bond degradation. *Eur J Oral Sci*, 2017; 125 (1): 63-71.
- [21] Dos Santos PH, Karol S, Bedran-Russo AK. Long-term nano-mechanical properties of biomodified dentin–resin interface components. *J Biomech*, 2011; 44 (9): 1691-1694.

[22] Chen C, Mao C, Sun C, Che Y, Wang W, Pan H, Tang R, Gu X. Glutaraldehyde-induced remineralization improves the mechanical properties and biostability of dentin collagen.

Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016; 67:657-665.

[23] Chen C, Liu F, Yu Z, Ma, Goff HD, Zhong F. Improvement in Physicochemical

Properties of Collagen Casings by Glutaraldehyde Cross-Linking and Drying Temperature Regulating. *Food Chemist*, 2020; 318 (15):126404.

Conclusão Geral

4 CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que diversas estratégias biomodificadoras vêm ganhando um espaço dentro da Odontologia adesiva e podem ser eficazes. A PAC tem sido a molécula de maior destaque em estudos recentes e, tendo a sua capacidade de reticular o colágeno e manter esse efeito em longo prazo tem sido bastante eficaz, em estudos *in vitro*, principalmente quando utilizada como pré-tratamento de dentina. A busca por polifenóis naturais que tenham elevada capacidade bioativa, como os ésteres galoilados, tem sido promissora. O ácido tânico e a epigalocatequina-3-galato desempenham um papel eficiente em manter a estabilidade dessas ligações cruzadas com o colágeno com o passar do tempo. Por sua vez, o Propilgalato é eficaz no processo adesivo, em manter a estabilidade de união em dentina, independente da concentração utilizada.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALANIA, Y.; ZHOU, B.; REIS, M.; LEME-KRAUS, A.A.; MCALPINE, J.B.; CHEN, S.N.; PAULI, G.F.; BEDRAN-RUSSO, A.K. Paradoxical effects of galloyl motifs in the interactions of proanthocyanidins with collagen-rich dentin. **J Biomed Mater Res A**. Hoboken. v. 110, n. 1, p. 190-203. Jan. 2022.
- AYDIN, B.; LEME-KRAUS, A.A.; VIDAL, C.M.P.; AGUIAR, T.R.; PHANSALKAR, R.S.; NAM, J.W.; MCALPINE, J.B.; CHEN, S.N.; PAULI, G.F.; BEDRAN-RUSSO, A.K. Evidence to the role of interflavan linkages and galloylation of proanthocyanidins at sustaining long-term dentin biomodification. **Dent Mater**, Copenhagen. v. 35, n. 2, p. 328–334. Fev. 2019.
- BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, Cambridge. v. 5, n. 35, p. 27540–57. Mar. 2015.
- BEDRAN-RUSSO, A. K.; PAULI, G. F.; CHEN, S. N.; MCALPINE, J.; CASTELLAN, C. S.; PHANSALKAR, R. S.; AGUIAR, T. R.; VIDAL, C. M. P.; NAPOTILANO, J. G.; NAM, J. W.; LEME, A. A. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. **Dent. Mater**. Copenhagen. v. 30, n. 1, p. 62-76, Jan. 2014.
- BEDRAN-RUSSO, A. K; LEME-KRAUS, A.A; VIDAL, C. M. P.; TEIXEIRA, E.C. An Overview of Dental Adhesive Systems and the Dynamic Tooth-Adhesive Interface. **Dent Clin North Am**. Philadelphia. v. 61, n. 4, p. 713-731. Out. 2017.
- DE MACEDO, F.A.A.; SOUZA, N.O.; LEMOS, M.V.S.; DE PAULA, D.M.; SANTIAGO, S.L.; FEITOSA, V.P. Dentin bonding and physicochemical properties of adhesives incorporated with epigallocatechin-3-gallate. **Odontology**. Tokyo. v. 107, n. 1, p. 23-28. Jan. 2018.
- DE PAULA, D. M.; LOMONACO, D.; PONTE, A.M.P.; CORDEIRO, K.E.; MOREIRA, M.M.; MAZZETTO, S.E.; FEITOSA, V.P. Influence of collagen cross-linkers addition in phosphoric

acid on dentin biomodification and bonding of an etch-and-rinse adhesive. **Dent Mater.** Copenhagen. v. 36, n. 1, p. e1-e8. Jan. 2019.

DE SIQUEIRA, F.S.F.; HILGEMBERG, B.; ARAUJO, L.C.R.; HASS, V.; BANDECA, M.C.; GOMES, J.C.; ALESSANDRA, R.; LOGUERCIO, A.D.; CARDENAS, A.F.M. Improving bonding to eroded dentin by using collagen cross-linking agents: 2 years of water storage. **Clin Oral Investig.** Berlin. v. 24, n. 2, p. 809-822. Fev. 2019.

DE SOUZA, L.C.; RODRIGUES, N.S.; CUNHA, D.A.; FEITOSA, V.P.; SANTIAGO, S.L.; REIS, A.; LOGUERCIO, A.D.; MATOS, T.P.; SABOIA, V.P.A.; PERDIGÃO, J. Two-year clinical evaluation of proanthocyanidins added to a two-step etch-and-rinse adhesive. **J Dent,** Guildford. v. 81, p. 7-16. Fev. 2019.

EKAMBARAM, M.; YIU, C. K. Y.; MATINLINNA, J. P. Effect of solvents on dentin collagen cross-linking potential of carbodiimide. **J Adhes Dent,** New Malden. v. 17, n. 3, p. 219– 226, 2015.

EPASINGHE, D.J.; YIU, C.K.Y.; BURROW, M.F. Effect of proanthocyanidin incorporation into dental adhesive on durability of resin–dentin bond. **International Journal of Adhesion and Adhesives.** United Kingdom. v. 63, n. 10, p. 145-151. Out. 2015.

EPASINGE, D.J.; BURROW, M.F.; YIU, C.K.Y. Effect of proanthocyanidin on ultrastructure and mineralization of dentin collagen. **Arch Oral Biol.** Oxford. v. 84, p. 29-36. Dez. 2017.

FIALHO, M.P.N.; HASS, V.; NOGUEIRA, R.P.; FRANÇA, F.M.G.; BASTING, R.T.; AMARAL, F.L.B. Effect of epigallocatechin-3- gallate solutions on bond durability at the adhesive interface in caries-affected dentin. **J Mech Behav Biomed Mater.** v. 91, p. 398-405. Mar. 2019.

GIANNINI, M.; MZKISHI, P.; AYRES, A.P.A.; VERMELHO, P.M.; FRONZA, B.M.; NIKAIDO, T.; TAGAMI, J. Self-etch adhesive systems: a literature review. **Braz Dent J.** Ribeirão Preto. v. 26, n. 1, p. 3-10. Fev. 2015.

GRÉ, C.P.; LISE, D.P.; AYRES, A.P. MUNCK, D.; TEZVERGIL-MUTLUAY A.; DIRIHAN, R.S.; LOPES, C.G.; LANDUYT, K.V.; MEERBEEK, B.V. Do collagen cross-linkers improve dentin's bonding receptiveness? **Dent Mater**. Copenhagen. v. 34, n. 11, p. 1679-1689. Nov. 2018.

HASS, V.; PAULA, A.M.; PARREIRAS, S.; GUTIÉRREZ, M.F.; MARTINEZ, I.I.; MATOS, T.P.; BANDECA, M.C.; LOGUERCIO, A.D.; YAO, X.; WANG, Y.; REIS, A. Degradation of dentin-bonded interfaces treated with collagen cross-linking agents in a cariogenic oral environment: An in situ study. **J Dent**. Guildford. v. 49, p. 60-67. Jun. 2016.

HEBLING, J.; PASHLEY, D.H.; TJÄDERHANE, L.; TAY, F.R. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. **J Dent Res**. Washington. v. 84, n. 8, p. 741-746, Agu 2005.

INOUE, M.; SAKAGUICHI, N.; ISUZUGAWA, K.; TANI, H.; OGIHARA, Y. Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. **Biol Pharm Bull**. Tokyo. v. 23, n. 10, p. 1153-1157. Out. 2000.

KARAS, D.; ULRICHOVÁ, J.; VALENTOVÁ, K. Galloylation of polyphenols alters their biological activity. **Food Chem Toxicol**. Oxford. v. 105, p. 223-240. Jul. 2017.

KATO, M.T.; HANNAS, A.R.; CARDOSO, C.A.B.; CASSIANO, L.P.S.; NAVES, P.A.; MAGALHÃES, A.C.; TJADERHANE, L.; BUZALAF, M.A.R. Dentifrices or gels containing MMP inhibitors prevent dentine loss: in situ studies. **Clin Oral Investig**. Berlin. v. 25, n. 4, p. 2183-2190. Abr. 2021.

LEME-KRAUS, A.A. AYDIN, B.; VIDAL, C.M.P. PHANSALKAR, R.S.; NAM, J.W. MCALFINE, J.; PAULO G.F.; CHEN, S.; BEDRAN-RUSSO, A.K. Biostability of the proanthocyanidins-dentin complex and adhesion studies. **J Dent Res**. Washington. v. 96, n. 4, p. 406-412, 2017

LEME-KRAUS, A.A.; PHANSALKAR, R.S.; DOS REIS, M.C. AYDIN, B.; SOUSA, A.B.S.; ALANIA, Y.; MCALPINE, J.; CHEN, S.N.; PAULI, G.F.; BEDRAN-RUSSO, A.K. Dimeric Proanthocyanidins on the Stability of Dentin and Adhesive Bointerfaces. **J Dent Res**. Washington. v. 99, n. 2, p. 175-181. Fev. 2020.

LEMONS, M.V.S.; NETO-ARAÚJO, V.G.; LOMONACO, D.; MAZZETTO, S.E.; FEITOSA, V.P.; SANTIAGO, S.L. Evaluation of Novel Plant-Derived Monomers-Based Pretreatment on Bonding to Sound and Caries-Affected Dentin. **Oper Dent**. Seattle. v. 47, n. 1, p. e12-e21. Jan. 2022.

LOGUERCIO, A.D.; MALAQUIAS, P.; SANTOS, F.P.; HASS, V.; STANISLAWCZUK, R.; LIMA, S.N.L.; BANDECA, M.C.; REIS, A. Acid Etching with Modified Phosphoric Acid to Increase the Longevity of the Bonded Interface. **J Adhes Dent**. New Malden. v. 8, p. 195-201. Jun. 2017.

LI, X.; FENG, Y.; LIU, J.; FENG, X.; ZHOU, K.; TANG, X. Epigallocatechin-3-gallate inhibits IGF-I-stimulated lung cancer angiogenesis through downregulation of HIF-1 α and VEGF expression. **J Nutrigenet Nutrigenomics**. v. 6, n. 3, p. 169-178. Ago. 2013.

MENDES, T.A.D.; PASCOAL, S.C.D.; LEMOS, M.V.S.; SANTIAGO, S.L.; MENDONÇA, J.S. Ácido tânico como agente biomodificador de dentina. **J. Health Biol. Sci**. Fortaleza. v. 7, n. 2, p. 182-186. Jun. 2019.

MOREIRA, M.A.; SOUZA, N.O.; SOUSA, R.S.; FREITAS, D.Q.; LEMOS, M.V.; DE PAULA, D.M.; MAIA, F.J.N.; LOMONACO, D.; MAZZETTO, S.E.; FEITOSA, V.P. Efficacy of new natural biomodification agents from Anacardiaceae extracts on dentin collagen cross-linking. **Dent Mater**. Copenhagen. v. 33, n. 10, p. 1103-1109.

PASHLEY, D.H.; TAY, F.R.; BRESCHI, L.; TJÄDERHANE, L.; CARVALHO, R.M.; CARRILHO, M.; TEZVERGIL-MUTLUAY, A. State of the art etch-and-rinse adhesives. **Dent Mater**. Copenhagen. v. 27, n. 1, p. 1-16. Jan. 2011.

SCHEFFEL, D.L.S.; SACONO, N.T.; RIBEIRO, A.P.D.; SOARES, D.G.; BASSO, F.G.; PASHLEY, D.; COSTA, C.A.S.; HEBLING, J. Immediate human pulp response to ethanol-wet bonding technique. **J Dent**. Guildford v. 43, n. 5, p. 537-545. Mai. 2015.

SPENCER, P.; YE, Q.; PARK, J.; TOPP, E.M.; MISRA, A.; MARANGOS, O.; WANG, Y.; BOHATY, B.S.; SINGH, V.; SENE, F.; ESLICK, J.; CAMARDA, K.; KATZ J.L. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. **Ann Biomed Eng**. Utah. v. 28, n. 6, p. 1989-2003. Fev. 2010.

SOUSA, A.B.S.; VIDAL, C.M.P.; LEME-KRAUS, A.A.; PIRES-DE-SOUZA, F.C.P.; BEDRAN-RUSSO, A.K. Experimental primers containing synthetic and natural compounds reduce enzymatic activity at the dentin–adhesive interface under cyclic loading. **Dent Mater**. Copenhagen. v. 32, n. 10, p. 1248-1255. Out. 2016.

SUN, Q.; HEILMANN, J.; KONIG, B. Natural phenolic metabolites with anti-angiogenic properties - a review from the chemical point of view. **Beilstein J Org Chem**. Washington. v. 11, p. 249-264. Fev. 2015.

TAY, F.R.; PASHLEY, D.H. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. **J Dent Res**. Washington. v. 88, n. 8, p. 719-724. Ago. 2009.

VAN-MEERBEEK, B.; YOSHIHARA, K.; LANDUYT, K.V.; YOSHIDA, Y.; PEUMANS, M. From Buonocore's Pioneering Acid-Etch Technique to Self-Adhering Restoratives. A Status Perspective of Rapidly Advancing Dental Adhesive Technology. **J Adhes Dent**. Washington. v. 22, n. 1, p. 7-34. 2020.

VIDAL, C.M.P.; AGUIAR, T.R.; PHANSALKAR, R.; MCALPINE, J.B.; NAPOLITANO, J.G.; CHEN, S.N.; ARAÚJO, L.S.N.; PAULI, G.F.; BEDRAN-RUSSO, A.K. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. **Acta Biomater**. Oxford. v. 10, n. 7, p. 3288-3294. Jul. 2014.

XIAO, H.T.; LIN, C.Y.; HO, D.H.H.; PENG, J.; CHEN, Y.; TSANG, S.W.; WONG, M.; ZHANG, X.J.; ZHANG, M.; BIAN, Z.X. Inhibitory Effect of the Gallotannin Corilagin on Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Ulcerative Colitis. **J Nat Prod**. Cincinnati. v. 76, n. 11, p. 2120-2125. Nov. 2013.

ZHENG, P.; CHEN, H. Evaluate the effect of different mmps inhibitors on adhesive physical properties of dental adhesives, bond strength and mmp substarte activity. **Sci Rep.** Maebashi. v. 7, n. 1, p. 1-11. Jul. 2017.

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: POTENCIAL BIOMODIFICADOR DE COLÁGENO DENTINÁRIO DE DIFERENTES POLIFENÓIS

Pesquisador: TALITA ARRAIS DANIEL MENDES

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 42343921.6.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Odontológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.651.833

Apresentação do Projeto:

Os agentes biomodificadores tem sido amplamente estudados na perspectiva de melhorar a união de materiais resinosos à superfície dentária. Assim sendo diversos polifenóis tem se tornado potenciais agentes biomodificadores, sendo as moléculas que apresentam grupamentos galoil em sua composição podem ter um maior potencial de reatividade com o colágeno dentário otimizando tal união. Portando o objetivo do estudo é avaliar o potencial biomodificador de alguns polifenóis contendo grupamento galoil. Trata-se de um estudo laboratorial in vitro. A unidade amostral será dente. Um total de 288 dentes doados de clínica particular serão selecionados para confecção de barras de dentina com 1,7 X 0,5 X 6 mm de dimensão, sendo gerada por dente, aproximadamente um total de 3 barras por dente. Em seguida, os espécimes serão desmineralizados completamente em solução de ácido fosfórico a 10% durante o período de 5 horas, em

temperatura ambiente sob agitação. Todos os agentes de biomodificação serão diluídos em água deionizada na concentração pertinente a cada grupo. Os fatores de estudo sob investigação serão o uso de diferentes agentes de biomodificação em sete níveis: (1) Epigallocatequina-3-galato (EGCG); (2) Teaflavina-3,3-Digalato (TD); (3) 1,2,6 – Trigaloil glucose (TG); (4) Ácido 1,3,4,5 - O – Galoiquinico (AG); (5) Ácido Tânico (AT); (6) Proantocianidinas (PAC) , (7) 3-OGaloilquecertina, (8)

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

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 4.651.833

Propilgalato, além do uso de (9) água destilada (controle negativo). As concentrações das mesmas serão definidas após realização de estudo piloto. As variáveis dependentes do estudo serão o módulo de elasticidade, avaliada quantitativamente através do teste de flexão de 3 pontos (n=15). Além dos testes de alteração de massa (n=15), taxa de biodegradação (n=15), medidas em balança analítica de precisão, grau de conversão in situ (n=3), por meio de um espectrometro micro-Raman, resistência de união (n=10), em um teste de microtração realizado por uma máquina de ensaios mecânicos universais. As análises qualitativas serão: teste de Nanoinfiltração (n=3), analisado por microscopia eletrônica de varredura e Micropermeabilidade (n=6), realizada com auxílio de um microscópio confocal a laser.

Objetivo da Pesquisa:

-Objetivo Primário:

- Avaliar o potencial biomodificador de colágeno dentinário de diferentes polifenóis, naturais e semisintéticos, contendo grupamentos galoil em sua molécula.

- Objetivo Secundário:

- Analisar a capacidade biomodificadora de diferentes ésteres galoilados naturais e sua influência nas propriedades mecânicas do colágeno em união à dentina;
- Observar o potencial biomodificador de polifenóis galoilados semi-sintéticos nas propriedades mecânicas do colágeno e no procedimento restaurador adesivo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Riscos:

Mínimos. Por tratar-se de um estudo laboratorial in vitro, pode oferecer riscos aos pesquisadores, como os ergonômicos relacionados ao ambiente de trabalho; bem como contaminação no manuseio do material biológico.

Além destes, a utilização de dentes humanos pode proporcionar constrangimento ao paciente, porém, o doador será esclarecido acerca da utilização do seu material biológico para fins acadêmicos, sendo obtidos por meio de um termo de doação de dentes.

-Benefícios:

O provável desenvolvimento de uma nova técnica de procedimento adesivo que poderá prorrogar a longevidades das restaurações em resina composta.

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

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 4.651.833

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa laboratorial in vitro. A unidade amostral será dente, dentes extraídos sem cárie (3molares). As variáveis dependentes do estudo serão: módulo de elasticidade, avaliada quantitativamente através do teste de flexão de 3 pontos. Além dos testes de alteração de massa, taxa de biodegradação, medidas em balança analítica de precisão, grau de conversão in situ, por meio de um espectrometro micro-Raman, resistência de união, em um teste de microtração realizado por uma máquina de ensaios mecânicos universais. As análises qualitativas serão: teste de Nanoinfiltração, analisado por microscopia eletrônica de varredura e Micropermeabilidade, realizada com auxílio de um microscópio confocal a laser. A pesquisa é laboratorial, contudo utilizará material biológico humano.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Projeto
- Orçamento: Financiamento próprio
- Cronograma: Vigência da presente pesquisa até dezembro de 2021.
- Declaração dos Pesquisadores
- Declaração de Infraestrutura
- Termo de fiel depositário: Programa de Pós-graduação apresenta banco de dentes, no qual os dentes serão cedidos para pesquisa.
- Termo de dispensa de TCLE

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após ajustes, recomenda-se aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Enviar o relatório final ao concluir a pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1688232.pdf	18/03/2021 11:19:33		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensatcle.pdf	18/03/2021 11:19:10	TALITA ARRAIS DANIEL MENDES	Aceito
Outros	calculoamostral.pdf	18/03/2021 11:18:23	TALITA ARRAIS DANIEL MENDES	Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 4.651.833

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	brochura.pdf	17/03/2021 19:08:05	TALITA ARRAIS DANIEL MENDES	Aceito
Outros	doacaododentes.pdf	17/03/2021 19:06:29	TALITA ARRAIS DANIEL MENDES	Aceito
Outros	cartapend.pdf	01/03/2021 11:09:45	TALITA ARRAIS DANIEL MENDES	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	carta.pdf	22/01/2021 15:30:19	TALITA ARRAIS DANIEL MENDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAODOSPESQUISADORES. pdf	15/01/2021 14:35:27	TALITA ARRAIS DANIEL MENDES	Aceito
Outros	AUTORIZACAODOlocal.pdf	15/01/2021 14:34:52	TALITA ARRAIS DANIEL MENDES	Aceito
Outros	fieldeposita.pdf	13/01/2021 14:54:54	TALITA ARRAIS DANIEL MENDES	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	13/01/2021 14:54:26	TALITA ARRAIS DANIEL MENDES	Aceito
Declaração de concordância	cartadeauto.pdf	13/01/2021 14:52:33	TALITA ARRAIS DANIEL MENDES	Aceito
Cronograma	CRONONOVO.pdf	13/01/2021 14:52:15	TALITA ARRAIS DANIEL MENDES	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	13/01/2021 14:51:26	TALITA ARRAIS DANIEL MENDES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 15 de Abril de 2021

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

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

CEP: 60.430-275

E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO B – NORMAS DAS REVISTAS A SEREM SUBMETIDAS

Brazilian Oral Research: <https://www.scielo.br/journal/bor/about/#instructions>

Brazilian Dental Journal: <https://www.scielo.br/journal/bdj/about/#instructions>

International Journal of Adhesion and Adhesives:
<https://www.elsevier.com/journals/international-journal-of-adhesion-and-adhesives/0143-7496/guide-for-authors>