

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

TAMARA PALUDO

**APLICAÇÃO DE POLIFENOIS NA DENTINA HUMANA: ESTUDO IN VITRO DA
MORFOLOGIA INTERFACIAL E DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO**

Porto Alegre

2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM DENTÍSTICA RESTAURADORA

**APLICAÇÃO DE POLIFENÓIS NA DENTINA HUMANA: ESTUDO *IN VITRO* DA
MORFOLOGIA INTERFACIAL E DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO**

Tamara Paludo

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, curso de Pós-graduação em Odontologia, área de concentração em Dentística Restauradora, pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra Ana Maria Spohr

Porto Alegre 2018

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM DENTÍSTICA RESTAURADORA

**APLICAÇÃO DE POLIFENÓIS NA DENTINA HUMANA: ESTUDO *IN VITRO* DA
MORFOLOGIA INTERFACIAL E DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO**

Tamara Paludo

Orientadora: Profa. Dra Ana Maria Spohr

Porto Alegre 2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, gratidão pela oportunidade.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC/RS), por ter sido minha “segunda casa” durante a graduação, mestrado e doutorado. A todos os professores, em especial aos professores da Faculdade de Odontologia, a quem devo tudo que aprendi e evolui como profissional, meu eterno carinho e gratidão.

*À minha orientadora **Profa. Dra Ana Maria Spohr**, por me guiar com tanta paciência, transmitindo conhecimentos, facilitando ações e ideias, muito além de uma excelente docente, és um ser humano admirável.*

*Ao **Prof. Dr. Alexandre Bahlis**, Diretor da Faculdade de Odontologia da PUC/RS Instituição pela qual tenho um carinho especial.*

*À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, **Profa. Dra. Maria Martha Campos**, por todo seu empenho e dedicação a pesquisa.*

*A minha colega de pós-graduação, a quem tive o prazer de trabalhar junto nesta jornada, **Maurem Marcondes**, obrigada por todo conhecimento transmitido, por me apresentar pessoas e locais em benefício desta pesquisa, por encarar este trabalho comigo da melhor forma possível.*

Ao Prof. Dr. André Arigony Souto da Faculdade de Química da PUCRS por todo auxílio prestado nesta pesquisa.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálise (CEMM) da PUCRS. Em especial ao Gustavo e Leandro pela paciência e constante ajuda na realização das imagens de Microscopia de Força Atômica.

Ao Instituto de Toxicologia e Farmacologia (Intox) da PUC/RS pela disponibilidade em receber e prontamente ajudar.

*A minha colega e grande amiga **Fernanda B. Manfroí**, presente que doutorado me deu. Uma pessoa maravilhosa que tive a felicidade de conhecer desde o primeiro dia de aula. Pela constante troca de conhecimento, pelo carinho recíproco e pela amizade que segue.*

*Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia em que tive o prazer de conhecer e conviver **Vanía Sánchez, Carolina Ritter Bromberg, Cílea Slomp, Duziene D. Pereira, Heloísa Pressí, Ivana A. Souza, Cláudia M. Modena, Daniele M. Costa, Heloísa Costa, Débora Stona, Mariá Bellan, Laura S. Nunes, Lígia M. N. Pibernat, Lisiane Fracasso, Leonardo De Cesero** pela troca de experiências e pela amizade que fica.*

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia da PUC/RS, em especial o Antônio e a Neusa, por estarem sempre dispostos a ajudar e pelos momentos de descontração. Aos funcionários da secretaria da graduação e pós-graduação pela simpatia e agilidade e a todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida e ao incentivo financeiro a pesquisa.

Agradecimento especial

A minha família, em especial aos meus queridos pais Armíndo e Clari Luíza e ao meu amado esposo, Maurício Zanotelli, vocês são meu maior e melhor incentivo.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

“A mente que se abre para uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	08
 ARTIGO 1: Efeito de um condicionador ácido estabilizador de colágeno na adesão ao esmalte e à dentina	
Resumo	10
Abstract.....	11
Introdução	12
Materiais e Métodos	14
Resultados.....	19
Discussão	23
Conclusão	29
Referências	30
 ARTIGO 2: Effect of phosphoric acid with polyphenols on dentin collagen: Atomic force microscopy study	
Abstract.....	35
Introduction.....	36
Materials and Methods.....	37
Results.....	39
Discussion.....	40
References.....	45
 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	 52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO A- Aprovação do projeto de pesquisa CEP (Plataforma Brasil)	54
ANEXO B- Termo de consentimento livre e esclarecido.	56

INTRODUÇÃO GERAL

As modificações biológicas da dentina dependem de uma ação biomimética realizada por substâncias bioativas que aprimoram e reforçam as características bioquímicas e biomecânicas da dentina. A biomodificação dentinária ocorre por ação de substâncias químicas sintéticas e naturais que interagem de forma distinta com o tecido dentário, promovem grandes perspectivas em tratamentos dentários preventivos, reparadores e/ou regenerativos (Bedran-Russo *et al.*, 2014).

O extrato de semente de uva (GSE) atua como um agente de reticulação do colágeno que melhora as propriedades mecânicas da camada híbrida. Essa biomodificação traz perspectivas positivas nas propriedades de união entre dentina-resina (Santos *et al.*, 2011^a). Além disso, o GSE tem um potente poder de biomodificação do colágeno dentinário, sendo um promissor material aliado à prática clínica restauradora (Phansalkar *et al.*, 2015). Os biomodificadores do tipo GSE e glutaraldeído podem melhorar as propriedades mecânicas como a resistência e a estabilidade da interface de união dentina-resina, melhorando a durabilidade em longo prazo (Santos *et al.*, 2011^b).

O GSE é um produto natural e de baixa citotoxicidade favorecendo o uso clínico (Santos *et al.*, 2011^b). Contém grande quantidade de proantocianidinas que são polifenóis que apresentam biocompatibilidade, bioatividade no tecido dentário, sendo um recurso natural e renovável (Bedran-Russo *et al.* 2014). A biomodificação causada pela proantocianidina na dentina desmineralizada provoca a diminuição da ação proteolítica na matriz de colágeno, proporcionando maior resistência à interface de união contra a degradação por enzimas (Liu *et al.*, 2014).

Em relação aos sistemas adesivos atuais, as principais preocupações relacionam-se com a interface dentina-resina, devido à degeneração da camada híbrida, associada à sorção de água, à hidrólise da resina e à ruptura das ligações de colágeno (Breschi *et al.*, 2008). A durabilidade das restaurações dentárias está relacionada a dois fatores relevantes ligados à degradação da união dentina-resina em longo prazo. Um dos fatores é a decomposição lenta pela água residual contida nas fórmulas atuais dos adesivos. O outro é ativação de metaloproteinases, próprias do hospedeiro, que degradam as fibras colágenas (Liu *et al.*, 2011). Reticuladores do tipo proantocianidinas são de baixa toxicidade e reduzem, em curto prazo, a permeabilidade da interface de ligação. Essa diminuição da permeabilidade é dependente do material, das interações do agente de reticulação com o colágeno e o sistema adesivo (Aydin *et al.*, 2016).

Diante dessas afirmativas, foi desenvolvido o projeto nomeado “Aplicação de polifenóis na dentina humana: Estudo *in vitro* da morfologia interfacial e da resistência de união” registrado no CEP-PUCRS (CAAE: 47845315.5.0000.5336), sendo desenvolvidos dois artigos científicos que serão apresentados a seguir.

ARTIGO 1: Efeito de um condicionador ácido estabilizador de colágeno na adesão ao esmalte e à dentina

&

ARTIGO 2: Effect of phosphoric acid with polyphenols on dentin collagen: Atomic force microscopy study

ARTIGO 1

Efeito de um condicionador ácido estabilizador de colágeno na adesão ao esmalte e à dentina

Effect of a collagen stabilizing acid conditioner on adhesion to enamel and dentin

Resumo

O objetivo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido fosfórico com extrato de semente de uva (GSE) no padrão de condicionamento ácido em esmalte, na resistência de união imediata ao esmalte e após 12 meses de armazenamento em dentina. Três diferentes formulações de ácido fosfórico com GSE foram obtidas: GSE5 - 5% de ácido fosfórico + 20% de etanol + 2% de GSE; GSE10 - 10% de ácido fosfórico + 20% de etanol + 2% de GSE; GSE20 - 20% de ácido fosfórico + 20% de etanol + 2% de GSE; GC (controle) - ácido fosfórico 37%. As superfícies do esmalte e da dentina de dentes terceiros molares, extraídos por razões terapêuticas, foram condicionadas com ácido fosfórico 37% por 15 s e com os ácidos modificados por 30 s, seguido de lavagem e aplicação do sistema adesivo Adper Scotchbond Multiuso (convencional de três passos) e da construção de um bloco em resina composta. Em esmalte, o padrão de condicionamento foi avaliado em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a resistência de união foi avaliada pelo ensaio de tração convencional. Em dentina, a resistência de união à microtração ($R_{\mu T}$) foi avaliada após 24 h e 12 meses de armazenamento. As imagens em MEV evidenciaram que o GSE5 causou um condicionamento mais superficial do esmalte. De acordo com ANOVA de 2 fatores e Tukey, a resistência de união ao esmalte não diferiu estatisticamente entre GC (49,00 MPa), GSE5 (42,78 MPa), GSE10 (51,55 MPa) e GSE20 (36,18 MPa) ($p > 0,05$). De acordo com ANOVA de duas vias e Tukey, a interação tratamento x tempo de armazenamento foi significativa ($p = 0,0001$). No tempo de armazenamento de 24 h, GC (28,43 MPa) obteve a maior $R_{\mu T}$, não diferindo estatisticamente do grupo GSE20 (24,11 MPa), sendo ambos estatisticamente superiores aos demais ($p < 0,05$). O grupo GSE10 (17,53 MPa) e o GSE5 (16,75 MPa) não diferiram estatisticamente entre si. No tempo de armazenamento de 12 meses, não houve diferença estatística na $R_{\mu T}$ entre o GC (17,71 MPa), GSE5 (20,97 MPa), GSE10 (17,59 MPa) e GSE20 (18,52 MPa). Apenas GSE5 e GSE10 não tiveram redução significativa da $R_{\mu T}$ após 12 meses de armazenamento. Concluiu-se que o GSE5 causou um condicionamento mais superficial do esmalte em relação às concentrações de 37%, 20% e 10%. No entanto, não houve diferença estatística nos valores de resistência à tração imediata ao esmalte entre as quatro concentrações. GSE5 e GSE10 promoveram a estabilidade da resistência de união à dentina após 12 meses de armazenamento.

Palavras-chave: esmalte dentário, dentina, extrato de semente de uva, colágeno, camada híbrida.

Abstract

The aim was to evaluate the effect of different concentrations of phosphoric acid with grape seed extract (GSE) on the enamel acid etching, on the immediate bond strength to enamel, and on the bond strength to dentin after 12 months storage. Three different phosphoric acid formulations with GSE were obtained: GSE5 - 5% phosphoric acid + 20% ethanol + 2% GSE; GSE10 - 10% phosphoric acid + 20% ethanol + 2% GSE; GSE20 - 20% phosphoric acid + 20% ethanol + 2% GSE; GC (control) - 37% phosphoric acid. The enamel and dentin surfaces of third molars, extracted for therapeutic reasons, were etched with 37% phosphoric acid for 15 s, and with the modified acids for 30 s. The acid was rinsed, followed by application of Adper Scotchbond Multipurpose adhesive system, and a block of composite resin was built. In enamel, the etching pattern was evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and the bond strength was evaluated by conventional tensile test. In dentin, the microtensile bond strength (μ TBS) was evaluated after 24 h and 1 year of storage. SEM images showed that GSE5 caused a more superficial enamel etching. According to ANOVA and Tukey's test, enamel bond strength did not differ significantly between GC (49.00 MPa), GSE5 (42.78 MPa), GSE10 (51.55 MPa) and GSE 20 (36.18 MPa) ($p > 0.05$). According to two-way ANOVA and Tukey's test, the interaction of factors (treatment x storage time) was significant ($p = 0.0001$). At the 24 h of storage, GC (28.43 MPa) obtained the highest μ TBS, and did not differ significantly from GSE20 (24.11 MPa). GC and GSE20 were significantly higher to the others ($p < 0.05$). The GSE10 (17.53 MPa) and GSE5 (16.75 MPa) did not differ significantly from each other. At the 12 months of storage, there was no significant difference in μ TBS between GC (17.71 MPa), GSE5 (20.97 MPa), GSE10 (17.59 MPa) and GSE20 (18.52 MPa). Only GSE5 and GSE10 did not significantly decrease μ TBS after 12 months of storage. It was concluded that GSE5 caused a more superficial enamel etching pattern in relation to the acid concentrations at 37%, 20% and 10%. However, there was no significant difference in the bond strength to enamel among the four concentrations. GSE5 and GSE10 promoted stability of the bond strength to dentin after 12 months of storage.

Key words: dental enamel, dentin, grape seed extract, collagen, dentin-bonding agents.

INTRODUÇÃO

Enzimas colagenolíticas endógenas da dentina, como as metaloproteinases (MMPs) e catepsinas cisteína, são responsáveis pela degradação em longo prazo da matriz de colágeno da camada híbrida.¹ Esse efeito deletério compromete a durabilidade clínica de restaurações adesivas, pois a integridade da matriz de colágeno é necessária para a conservação da união entre a dentina e o material restaurador. Assim sendo, a inibição das proteases endógenas dentinárias parece ser importante para conter a degradação enzimática da camada híbrida e, nesse sentido, diversos produtos vêm sendo avaliados, como clorexidina, EDTA, inibidores sintéticos de MMPs (glutaraldeído, riboflavina – vitamina B12), amônia quaternária e outras substâncias, visando prevenir a hidrólise do colágeno.²

Os polifenóis, do tipo proantocianidinas (PA), são compostos naturais extraídos de plantas que possuem baixa citotoxicidade, são biocompatíveis e são bons indutores de ligação cruzada no colágeno,^{3,4} sendo uma alternativa clínica promissora para melhoria e durabilidade da interface de união entre dentina e sistemas adesivos. Estes compostos de PA extraídos a partir do extrato da semente de uva (GSE) demonstraram aumentar significativamente a resistência da dentina à digestão por colagenase.^{4,5} As PA são excelentes agentes de reticulação favorecendo o “cross-linking” do colágeno e proporcionando estabilidade biológica em curto tempo de tratamento, sendo uma alternativa clínica promissora para melhoria e durabilidade dos sistemas adesivos atuais.^{6,7} Estudos comprovaram a presença de PA no colágeno dentinário tratado previamente a restaurações adesivas^{6,7,8} e a inativação de mais de 90% das MMP 2, 8 e 9, e por volta de 75 % da cisteína catepsina B e K dentinárias, demonstrando ser estatisticamente superior à inibição das proteases endógenas quando comparada à clorexidina.⁹

O pré-tratamento da dentina desmineralizada com PA aumentou a resistência de união de adesivos de condicionamento ácido total tanto para dentina saudável¹⁰ quanto para dentina cariada.¹¹ Além disso, as propriedades nanomecânicas de módulo de elasticidade e nanodureza da interface de união também foram melhoradas.^{12,13} Contudo, alguns estudos têm demonstrado que a inclusão de PA em adesivos dentais pode afetar negativamente o grau de polimerização do adesivo.^{6,14,15}

O trabalho pioneiro de Liu et al.¹⁶ que adicionou extrato de semente de uva (GSE) ao ácido fosfórico, mostrou efeito positivo para baixas concentrações de ácido fósforo (5%, 10% e 20%). Os autores observaram presença de PA na dentina tratada com esses ácidos modificados e aumento da resistência do colágeno dentinário à digestão por colagenase quando comparado com o uso do ácido fosfórico 37% sem PA. Pelo fato das concentrações testadas por Liu et al.¹⁶ serem inferiores a 37%, torna-se importante também avaliar o efeito destas soluções sobre o esmalte dentário, uma vez que os procedimentos restauradores envolvem o tratamento do esmalte e da dentina simultaneamente quando empregada a técnica do condicionamento ácido total.

Assim, tendo em vista a importância da melhoria da estabilidade da interface de união com os sistemas adesivos atuais e, sabendo que não existem pesquisas na literatura pesquisada até o momento sobre avaliação de restaurações adesivas em esmalte e dentina com o uso destas formulações ácidas modificadas com GSE,¹⁶ o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso destes ácidos modificados nas seguintes variáveis: a) no padrão de condicionamento ácido em esmalte; b) na resistência de união imediata ao esmalte; c) na resistência de união à dentina após 12 meses de armazenamento. Este estudo avaliou as seguintes hipóteses nulas: 1) o padrão de condicionamento ácido em esmalte é diferente dos grupos teste e controle; 2) não há

diferença na resistência de união ao esmalte entre os grupos avaliados; 3) não há diferença na resistência de união à dentina entre os grupos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trinta e seis dentes molares humanos hígidos, extraídos por indicação terapêutica, foram obtidos de pacientes, com idade entre 17 e 30 anos, da Faculdade de Odontologia da PUCRS mediante termo de doação de dentes após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (CAAE 47845315.5.0000.5336). Os dentes foram limpos com cureta periodontal e desinfetados em solução de cloramina a 0,5 % por 24 h. Após este período, foram lavados em água corrente e armazenados em um frasco fechado contendo água destilada a 4°C, trocada semanalmente, por um período de até dois meses.

Após o período de armazenamento, as raízes dos dentes foram incluídas individualmente em resina acrílica ativada quimicamente, Jet (Clássico Ind., São Paulo, SP, Brasil), com o auxílio de uma matriz de teflon de forma cilíndrica. Foi realizada a remoção do esmalte da superfície oclusal, vestibular e lingual com um disco diamantado de dupla face (Extec Corp., Londres, Inglaterra) em máquina de corte (Labcut 1010 – Extec Corp., Londres, Inglaterra) em rotação 500 rpm e constante refrigeração. As superfícies oclusais de esmalte foram descartadas e as superfícies vestibulares e linguais foram preservadas para posterior metodologia de resistência de união à tração ao esmalte.

Três diferentes formulações de ácido fosfórico modificado com extrato de semente de uva (GSE) (MegaNatural Gold, Madera, CA, EUA) contendo mais de 90%

Proantocianidina (PA) foram feitas de acordo com o estudo de Liu et al.,¹⁶ sendo obtidos os seguintes grupos:

Grupo controle: ácido fosfórico 37% (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil)

Grupo GSE 5: 5% de ácido fosfórico + 20% de etanol + 2% de GSE

Grupo GSE10: 10% de ácido fosfórico + 20% de etanol + 2% de GSE

Grupo GSE 20: 20% de ácido fosfórico + 20% de etanol + 2% de GSE

O pH dos ácidos modificados foi medido em um peagômetro W3B pH Meter (Bel Engineering, Monza, Itália).

Análise do esmalte em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As porções de 1,5 mm das faces vestibular e lingual de esmalte foram planificadas com lixa de carbetto de silício de granulação 800 por 10 s em politriz. Os ácidos foram aplicados na superfície do esmalte da seguinte forma: Grupo controle: condicionamento do esmalte com ácido fosfórico a 37% por 15 s, lavagem por 30 s com água, remoção do excesso de água e secagem com jato de ar. Grupos GSE5, GSE10, GSE20: Condicionamento das superfícies do esmalte por 30 s com as respectivas soluções com aplicador descartável sob fricção, lavagem durante 30 s com água e remoção do excesso de água e secagem com jato de ar.

Os espécimes (n=2) foram posicionadas nos *stubs* de forma aleatória e colocadas em dissecador por 48 h, sendo então metalizados (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) e visualizados em MEV-FEG (JSM 6060 LV, JEOL, Tóquio, Japão) em aumento de 5.000 vezes.

Resistência de união à tração ao esmalte

A face vestibular e lingual obtidas dos dentes terceiros molares humanos inclusos, com espessura de aproximadamente 1,5 mm, foram incluídas em resina acrílica quimicamente ativada. Sessenta fatias de dentes foram aleatoriamente distribuídas nos quatro grupos (n=15). Cada fatia foi condicionada com seu respectivo ácido, seguido da aplicação do adesivo (bond) do Adper Scotchbond Multiuso (3M/ESPE, St.Paul, MN, EUA). Uma matriz com um orifício central em forma de cone invertido (base com 3 mm de diâmetro e topo com 4,0 mm de diâmetro e altura de 4,0 mm) foi posicionada sobre a área de adesão para a construção de um cone de resina composta. Foram colocados dois incrementos de 2 mm de resina composta Charisma, cor A3 (Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha), cada um polimerizado com aparelho de LED Radi II (potência de 1200 mW/cm²) por 40s cada. Após 24 h de armazenamento em água destilada a 37° C em estufa, as amostras foram submetidas ao teste de resistência de união à tração em máquina de ensaio universal EMIC DL-2000 (São José dos Pinhais, PR, Brasil) com célula de carga de 500 N e velocidade de 0,5 mm/min.

As falhas foram classificadas em adesiva, coesiva em esmalte, coesiva em resina composta, mista I (adesiva + coesiva no adesivo), mista II (adesiva + coesiva na resina composta). As falhas foram visualizadas em lupa estereoscópica (Olympus Corp., Tóquio, Japão) com aumento de 20 vezes.

Resistência de união à microtração à dentina

A superfície dentinária oclusal exposta de 20 dentes foi planificada e polida com lixas de carbetto de silício de granulações 400, 600, 1200 e 1500 por 30 s em cada

granulação em politriz DPU-10 (Panambra, São Paulo, SP, Brasil), sob refrigeração. Os dentes foram divididos aleatoriamente entre os quatro grupos (n=5). Os ácidos foram aplicados na superfície da dentina, seguido da aplicação do sistema adesivo Adper Scotchbond Multiuso. No grupo controle, foi realizado o condicionamento da dentina com ácido fosfórico a 37% por 15 s, lavagem por 30 s com água, remoção do excesso de água com papel absorvente. O *primer* foi aplicado, seguido de leve jato de ar por 5 s. O adesivo foi aplicado, seguido de fotoativação por 10 s com o aparelho Radium Cal (SDI, Bayswater, Vic, Austrália) potência de 1200 mW/cm². Nos grupos GSE5, GSE10, GSE20, os ácidos foram aplicados na dentina por 30 s com aplicador descartável sob fricção, lavados durante 30 s com água, sendo removido o excesso de água com papel absorvente. O adesivo Adper Scotchbond Multiuso foi aplicado como descrito para o grupo controle. Na sequência, foram aplicados dois incrementos de 2 mm de resina composta Charisma, cor A3 (Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha), sendo cada incremento fotoativado por 40 s. Após procedimento restaurador, as amostras foram armazenadas por 24 h em água destilada a 37°C em estufa. Após esse período, os dentes foram submetidos a cortes seriados numa velocidade de 500 rpm, utilizando um disco diamantado dupla face sob irrigação constante de água destilada. Foram realizados cortes perpendiculares na interface adesiva nos sentidos vestibulo-lingual e mesio-distal. A área de união foi em torno de 0,9 mm², aferido com paquímetro digital. Dessa forma, foram obtidos corpos de prova em forma de palitos, constituídos de dentina, interface de união e resina composta.

De cada dente, foram obtidos cerca de oito palitos da região central do dente. Metade foi submetido imediatamente ao ensaio de microtração. A outra metade foi armazenado em água destilada a 37°C por 12 meses, sendo submetido ao ensaio de microtração após o período de armazenamento. A água era trocada semanalmente.

Os espécimes selecionados foram fixados pelas suas extremidades, separadamente, em um aparato específico para teste de microtração, por meio de uma cola de cianoacrilato e um acelerador de cura, de modo que a área de adesão ficasse perpendicular ao longo do eixo da força de tração. Os corpos de prova foram submetidos ao teste de microtração em máquina de ensaio universal EMIC-DL 2000 (Emic, São José dos Pinhais, PR, Brasil), operada por computador com *software* MTest 100, com velocidade de 0,5 mm/min, utilizando célula de carga de 50 N até ocorrer a fratura. Os valores de microtração foram obtidos em MPa, sendo a força em N dividida pela área em mm².

Para análise das falhas, as duas porções fraturadas foram removidas do aparato de microtração e nomeadas para fins de identificação. As extremidades dentinárias dos espécimes foram fixadas em dispositivos de fixação amostral com auxílio de uma cola de cianoacrilato, a fim de que a interface adesiva permanecesse voltada para cima. Os espécimes foram mantidos em dessecador com sílica gel e vácuo por duas semanas. Depois desse período, os espécimes foram metalizados e observados em MEV. O tipo de falha foi classificado em quatro tipos: a) interfacial: adesiva e coesiva no adesivo; b) coesiva em dentina (ruptura deste substrato); c) coesiva em resina (ruptura na resina composta); d) mista I (interfacial+ coesiva na dentina); e) mista II (interfacial + coesiva em resina composta).

Para a análise das falhas, foi posicionada uma grade (quatro linhas por quatro colunas) com o auxílio do programa *Power Point* sobre cada imagem obtida em MEV. As imagens digitais da dentina foram posicionadas de modo que cada quadrado possibilitasse determinar o material predominante remanescente (adesivo, resina composta ou dentina).

Análise estatística

Os valores de resistência à tração ao esmalte foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey. Os valores de resistência à microtração à dentina foram submetidos à ANOVA de dois fatores (tratamento de superfície x tempo de armazenamento) e teste de Tukey. O nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS

Os valores do pH dos ácidos modificados foi de 1,08 para o GSE20, 1,25 para o GSE10 e 1,38 para o GSE5.

Análise do esmalte em MEV

As imagens em MEV evidenciaram que o GSE5 causou um condicionamento mais superficial do esmalte, não havendo a exposição dos prismas do esmalte de forma tão evidente como o controle. No GSE10 e GSE20 houve exposição semelhante dos prismas de esmalte. Das quatro soluções, o ácido fosfórico a 37% (controle) causou maior desmineralização (Figura 1).

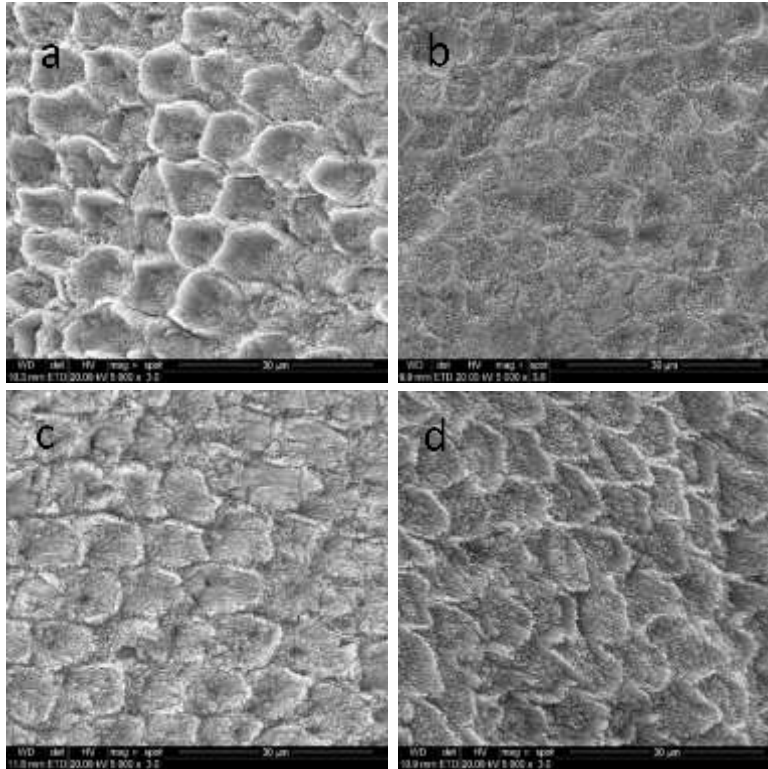


Figura 1: Imagens em MEV (5.000x) da superfície de esmalte condicionada com as diferentes soluções ácidas: a) ácido fosfórico a 37% (controle); b) GSE5; c) GSE10; d) GSE20. O GSE5 causou desmineralização mais superficial do esmalte.

Resistência de união ao esmalte

Não houve diferença estatística na resistência de união entre o grupo controle (49,00 MPa), GSE20 (36,18 MPa), GSE10 (51,55 MPa) e GSE5 (42,78 MPa) ($p > 0,05$) (Tabela 1). Em nenhum grupo houve falha coesiva em esmalte. Para o grupo controle e GSE20 houve predominância de falhas mistas. No GSE5 e GSE10 houve maior variação dos tipos de falha.

Tabela1: Médias da resistência à tração (MPa) em esmalte, desvios-padrão e tipos de falhas nos grupos.

Grupo	Resistência à tração (MPa) e desvio-padrão	n	Tipos de falhas				
			Adesiva	Coesiva em Esmalte	Coesiva em Resina	Mista (adesiva + coesiva em adesivo)	Mista (adesiva + coesiva em resina)
Controle	49,00 ^A (17,92)	15	0	0	5	2	8
GSE20	36,18 ^A (15,14)	13	0	0	4	5	4
GSE10	51,55 ^A (27,93)	11	4	0	4	0	3
GSE5	42,78 ^A (18,76)	10	4	0	3	1	2

Médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Resistência de união à microtração à dentina

De acordo com ANOVA de dois fatores, a condição tratamento de superfície foi significativa ($p=0,007$), a condição tempo de armazenamento foi significativa ($p=0,013$), e a interação foi significativa ($p=0,0001$).

No tempo de armazenamento de 24 h, o grupo controle (28,43 MPa) obteve o maior valor de resistência à microtração, não diferindo estatisticamente do grupo GSE20 (24,11 MPa), sendo ambos os grupos estatisticamente superiores aos demais ($p < 0,05$). O grupo GSE10 (17,53 MPa) e o grupo GSE5 (16,75 MPa) não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). No tempo de armazenamento de 12 meses, não houve diferença estatística na resistência à microtração entre o grupo controle (17,71 MPa), grupo GSE5 (20,97 MPa), grupo GSE10 (17,59 MPa) e grupo GSE20 (18,52 MPa).

Após 12 meses de armazenamento, houve redução significativa da resistência à microtração para o grupo controle e grupo GSE20. Nos outros dois grupos não houve redução significativa da resistência à microtração (Tabela 2).

Tabela 2: Médias de resistência à microtração (MPa) à dentina e desvios-padrão dos diferentes grupos.

Grupo/Tempo de armazenamento	Resistência à microtração (MPa) em 24 h e desvio-padrão	Resistência à microtração (MPa) em 12 meses e desvio-padrão
Controle	28,43 ^{Aa} (\pm 14,39)	17,71 ^{Ab} (\pm 8,58)
GSE5	16,75 ^{Bb} (\pm 7,44)	20,97 ^{Aa} (\pm 7,81)
GSE10	17,53 ^{Ba} (\pm 6,55)	17,59 ^{Aa} (\pm 8,04)
GSE20	24,11 ^{Aa} (\pm 8,08)	18,52 ^{Ab} (\pm 6,33)

Letras maiúsculas distintas nas colunas e letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A análise das falhas revelou prevalência de falha interfacial para todos os grupos nos tempo de 24 h e 12 meses de armazenamento. No entanto, houve uma redução da falha interfacial em todos os grupos após 12 meses de armazenamento, principalmente no grupo GSE 20 (Tabela 3).

Tabela 3: Porcentagem de falhas após ensaio de microtração.

Grupos	Interfacial (%)	Coesiva em dentina (%)	Coesiva em resina (%)	Mista (%)
Controle				
24h	88,7	6,8	0,4	3,9
12 meses	76,8	7,6	0,9	14,7
GSE 5				
24h	93,7	2,5	1,2	2,5
12 meses	85,9	0,4	8,6	5,1
GSE 10				
24h	86,7	3,5	5,4	4,2
12 meses	85,4	2,6	2,6	9,4
GSE 20				
24h	88,4	0,0	9,6	1,8
12 meses	68,3	21,0	0,0	10,7

DISCUSSÃO

As diferentes concentrações de ácidos modificados com GSE foram utilizadas neste estudo para analisar o seu potencial efeito como agente condicionante de tecido dentário, tanto do esmalte como da dentina, assim como potencial de inibir a degradação da interface de união com a dentina ao longo do tempo.

As imagens em MEV evidenciaram o condicionamento do esmalte pelas soluções ácidas, sendo observado o padrão de desmineralização do tipo I, em que há remoção preferencial do centro dos prismas, com relativa preservação da periferia.¹⁷ O condicionamento com o GSE5 causou um padrão de desmineralização mais raso em relação às outras concentrações, sendo aceita a primeira hipótese. Este achado corrobora com outros estudos que mostraram que menores porcentagens do ácido fosfórico causaram menor perda de esmalte¹⁸ e menor desmineralização em profundidade,¹⁹ o que favorece a não evidência, de forma tão pronunciada, dos

prismas do esmalte. O GSE10 e GSE20 desmineralizaram o esmalte de forma semelhante, e o ácido fosfórico a 37% desmineralizou em maior profundidade. Este achado microscópico corrobora com os valores de pH obtidos para cada solução, sendo o pH do GSE5 o maior (1,38) e, portanto, com menor capacidade de desmineralização.

Apesar das diferenças microscópicas da superfície do esmalte condicionado com as quatro concentrações de ácido fosfórico, não houve diferença estatística nos valores médios de resistência à tração ao esmalte, sendo também aceita a segunda hipótese. Este achado corrobora com o estudo de Haas et al.²⁰ que compararam o ácido fosfórico a 35% e o ácido fosfórico a 10% modificado com 2% de GSE por meio do teste de microcisalhamento em esmalte, e também não encontraram diferença estatística. Shinchí et al.²¹ também obtiveram valores semelhantes para a resistência à tração em esmalte quando testaram diferentes concentrações de ácido fosfórico (65% a 3%). Erickson et al.²² afirmaram que a infiltração da resina diminui com a decrescente concentração do ácido fosfórico, o que pode gerar uma resistência de união menor entre a resina e o esmalte. Concentrações mais altas de ácido fosfórico permitem a infiltração de resina entre os cristais, dentro dos prismas e conseqüente penetração mais profunda nos espaços inter-prismáticos, favorecendo a ocorrência de uniões mais fortes entre resina e esmalte. Porém, também não encontraram diferença estatística na resistência de união entre as concentrações do ácido fosfórico em um intervalo de 40% a 2,5%.

Ao relacionar o padrão de condicionamento ácido com os tipos de falha obtidos após o ensaio de tração, observa-se que o GSE5 e GSE10 apresentaram mais falhas adesivas, possivelmente em função do padrão de condicionamento ácido que promoveu uma menor dissolução da superfície do esmalte. No estudo de Shinchí et

al.,²¹ a profundidade dos *tags* de resina diminuíram significativamente de tamanho conforme foram reduzidas as concentrações do ácido fosfórico, com exceção da concentração de 65% (houve formação de *tags* de 22 μm para concentração de 35% de H_3PO_4 , 12 μm para concentração de 20%, 9 μm para concentração de 5, 10 e 65%, e 5 μm para concentração de 3%). Possivelmente *tags* menos profundos formados pelo GSE5 e GSE10 podem justificar as falhas adesivas observadas nestes grupos, uma vez que apresentam a concentração de 5% e 10% de H_3PO_4 , respectivamente. Contudo, obteve-se um condicionamento efetivo do esmalte para as três concentrações de ácido fosfórico com 2% de GSE, o que está de acordo com outros estudos que também avaliaram diferentes concentrações ácidas.^{21,22} Desta forma, as quatro soluções seriam efetivas sobre o esmalte no período de avaliação de 24 h.

No presente estudo, não foi avaliada a resistência de união ao esmalte após armazenamento, pois outros estudos revelaram que a união ao esmalte não se deteriora com o tempo como ocorre com a dentina.^{20,23,24}

Sobre o substrato dentinário, a maior resistência à microtração imediata (24 h) foi obtida com o grupo controle e o GSE20, sendo que o GSE10 e GSE5 obtiveram menor resistência à microtração. O ácido fosfórico a 37%, utilizado no grupo controle, apresenta pH próximo a 1,0²⁵ e a sua aplicação na dentina, pelo tempo de 15 s, causa a remoção da camada de *smear layer*, *smear plugs* e a abertura dos túbulos dentinários, além da desmineralização da dentina intertubular e peritubular a uma profundidade que pode variar em cerca de 5 μm com o tempo de condicionamento de 15 s.²⁶ No presente estudo, o pH do GSE20 foi de 1,08, do GSE10 foi de 1,25, e do GSE5 foi de 1,38. O estudo de Liu et al.¹⁶ verificou a profundidade de desmineralização da dentina com as mesmas soluções empregadas no presente

estudo pelo tempo de 30 s, sendo obtidas as profundidades de 3,8 μm para o GSE5, 5,0 μm para o GSE10, e 6,6 μm para o GSE20. Portanto, o menor pH do GSE20, em relação ao GSE10 e GSE5, causou maior profundidade de desmineralização da dentina, promovendo maior espessura da camada híbrida. Apesar de ser aceito que a resistência de união e a durabilidade dependem da qualidade da camada híbrida do que da espessura ou morfologia da camada híbrida e dos *tags* de resina,²⁷ supõe-se que uma espessura de camada híbrida mais espessa tenha contribuído para os maiores valores de resistência de união imediatos para o grupo GSE20, sendo comparável com o grupo controle em que foi aplicado o ácido fosfórico a 37%.

Após 12 meses de armazenamento, o grupo controle e o GSE20 tiveram redução significativa da resistência à microtração, enquanto que os grupos GSE10 e GSE5 mantiveram os valores de resistência à microtração à dentina. Este resultado corrobora com o estudo de Haas et al.²⁰ que também verificaram maior valor de resistência à microtração à dentina para o grupo tratado com ácido fosfórico a 10% modificado com 2% de GSE em comparação com o ácido fosfórico a 35% após seis meses de armazenamento em água.

Segundo Liu et al.¹⁶ o GSE é composto principalmente de monômeros de (epi) catequina e oligômeros, que são intrinsecamente mais hidrofóbicos e menos móveis (em função do seu elevado peso molecular) do que o pequeno e hidrófilo ácido fosfórico. Assim, o GSE difunde-se mais lentamente do que o ácido fosfórico dentro do espaço intratubular, que é preenchido com água. Dessa forma, ao utilizar o ácido fosfórico em maior concentração (GSE20), o condicionamento da dentina foi mais rápido do que a capacidade da PA contida no GSE de interagir com toda a camada de fibrilas colágenas desmineralizadas. Assim, as fibrilas mais próximas da base da dentina não interagiram com a PA como as fibrilas colágenas do topo da camada de

dentina desmineralizada.¹⁶ A camada de fibrilas colágenas da base da dentina tende a não ser totalmente envolvida pelos monômeros adesivos, o que favorece a degradação hidrolítica e a degradação enzimática,²⁸ o que justificaria a redução da média de resistência de união após 12 meses de armazenamento. Do contrário, o GSE10 e GSE5, pelo fato de empregar uma concentração ácida menor, causaram uma desmineralização em menor profundidade, não tão rápida como o GSE20, possibilitando maior interação da PA contida no GSE com as fibrilas de colágeno no nível da base da camada híbrida que tendem não ficarem envoltas pelos monômeros adesivos. Portanto, vários fatores podem explicar a estabilidade dos valores de resistência à microtração no GSE5 e GSE10: a) a PA alterou as propriedades mecânicas do colágeno dentinário, aumentando o módulo de elasticidade e a rigidez das fibrilas de colágeno,^{5,10} tornando-o mais resistente à degradação por parte das enzimas catalíticas;²⁹ b) a PA favoreceu a inibição da ação das MMPs da dentina que são ativadas frente ao baixo pH dos ácidos;⁹ c) a capacidade dessas soluções químicas de modificarem o ângulo de contato das fibras colágenas expostas, facilitando a volatilização do solvente após o uso dos sistemas adesivos, resultando numa dentina menos hidrófila e contribuindo para melhor estabilidade da interface dentina–resina.³⁰ A soma destes fatores, funcionando de forma sinérgica, pode ter favorecido a estabilidade da união na interface adesiva ao longo do período de 12 meses de armazenamento, assegurando o propósito do uso do ácido fosfórico com GSE como agente estabilizador de colágeno em longo prazo.

A análise dos tipos de falha correspondeu à observação em MEV dos corpos de prova (palitos) submetidos ao ensaio de microtração. Esta observação permite analisar se a metodologia empregada está fornecendo valores de resistência de união correspondente à interface adesivo-dentina, que é justamente a união que se deseja

estudar. Em segundo lugar, também permite determinar qual a região mais fraca e susceptível às falhas.³¹ No presente estudo, houve predominância de falhas do tipo interfacial, ou seja, adesiva com o substrato dentinário e coesiva no adesivo. Este padrão de falha foi predominante na avaliação em 24 h, assim como após 12 meses de armazenamento, não havendo uma mudança no padrão de falha. Desta forma, a interface de interesse (adesivo-dentina) foi mensurada em praticamente todos os corpos-de-prova.

As soluções ácidas foram aplicadas pelo tempo de 30 s, ao invés do tempo padrão de 15 s. O tratamento da dentina com PA na porcentagem de 2% em peso ou superior pelo tempo de 30 s foi suficiente para tornar o colágeno da dentina desmineralizada protegido da degradação.⁷ Portanto, o tempo de 30 s foi utilizado em estudo subsequente em que as soluções ácidas com GSE, utilizadas no presente estudo, foram preparadas e aplicadas sobre a dentina.¹⁶ No entanto, estudos futuros devem avaliar, em curto e longo tempo de armazenamento, a resistência de união empregando o tempo de condicionamento de 15 s para verificar se os resultados são semelhantes com o tempo de aplicação de 30 s.

CONCLUSÃO

- GSE5 causou condicionamento mais superficial do esmalte em relação ao GSE 10, GSE20 e ácido fosfórico a 37%. No entanto, não houve diferença estatística nos valores de resistência à tração imediata ao esmalte entre as concentrações.

- GSE5 e GSE10 promoveram a estabilidade da resistência de união à dentina após 12 meses de armazenamento.

REFERÊNCIAS

1. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater.* 2013;29:116-35.
2. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho M, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. *Dent Mater.* 2013; 29:999-1011.
3. Joshi SS, Kuszynski CA, Bagchi D. The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. *Curr Pharm Biotechnol.* 2001;2:187-200.
4. Liu Y, Bai X, Li S, Liu Y, Keightley A, Wang Y. Molecular weight and galloylation affect grape seed extract constituents' ability to cross-link dentin collagen in clinically relevant time. *Dent Mater.* 2015;31:814-21.
5. Castellan CS, Pereira PN, Grande RH, Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent Mater.* 2010;26:968-73.
6. Liu Y, Wang Y. Effect of proanthocyanidins and photo-initiators on photopolymerization of a dental adhesive. *J Dent.* 2013;41:71-9.
7. Liu Y, Wang Y. Proanthocyanidins' efficacy in stabilizing dentin collagen against enzymatic degradation: MALDI-TOF and FTIR analyses. *J Dent.* 2013; 41:535-542.

8. Srinivasulu S, Vidhya S, Sujatha M, Mahalaxmi S. Shear bond strength of composite to deep dentin after treatment with two different collagen cross-linking agents at varying time intervals. *Oper Dent.* 2012;37:485-91.
9. Epasinghe DJ, Yiu CK, Burrow MF, Hiraishi N, Tay FR. The inhibitory effect of proanthocyanidin on soluble and collagen-bound proteases. *J Dent.* 2013;41:832-9.
10. Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;80:268-72.
11. Macedo GV, Yamauchi M, Bedran-Russo AK. Effects of chemical cross-linkers on caries-affected dentin bonding. *J Dent Res.* 2009;88:1096-100.
12. Santos PH, Karol S, Bedran-Russo AK. Nanomechanical properties of biochemically modified dentin bonded interfaces. *J Oral Rehabil.* 2011;38:541-6.
13. Santos PH, Karol S, Bedran-Russo AK. Long-term nano-mechanical properties of biomodified dentin-resin interface components. *J Biomech.* 2011;44:1691-4.
14. Green B, Yao X, Ganguly A, Xu C, Dusevich V, Walker MP, Wang Y. Grape seed proanthocyanidins increase collagen biodegradation resistance in the dentin/adhesive interface when included in an adhesive. *J Dent.* 2010;38:908-15.
15. Hechler B, Yao X, Wang Y. Proanthocyanidins alter adhesive/dentin bonding strengths when included in a bonding system. *Am J Dent.* 2012;25:276-80.

16. Liu Y, Dusevich V, Wang Y. Addition of grape seed extract renders phosphoric acid a collagen-stabilizing etchant. *J Dent Res.* 2014;93:821-7.
17. Silverstone LM, Saxton CA, Dogon IL, Fejerskov O. Variation in the pattern of acid etching of human dental enamel examined by scanning electron microscopy. *Caries Res.* 1975;9:373-87.
18. Uno S, Finger WJ. Effect of acid etchant composition and etch duration on enamel loss and resin composite bonding. *Am J Dent.* 1995;8:165-9.
19. Legler LR, Retief DH, Bradley EL. Effects of phosphoric acid concentration and etch duration on enamel depth of etch: an in vitro study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1990;98:154-60.
20. Hass V, Luque-Martinez I, Muñoz MA, Reyes MF, Abuna G, Sinhoreti MA, Liu AY, Loguercio AD, Wang Y, Reis A. The effect of proanthocyanidin containing 10% phosphoric acid on bonding properties and MMP inhibition. *Dent Mater.* 2016;32:468-75.
21. Shinchi MJ, Soma K, Nakabayashi N. The effect of phosphoric acid concentration on resin tag length and bond strength of a photo-cured resin to acid-etched enamel. *Dent Mater.* 2000;16:324-9.
22. Erickson RL, Barkmeier WW, Latta MA. The role of etching in bonding to enamel: a comparison of self-etching and etch-and-rinse adhesive systems. *Dent Mater.* 2009; 25:1459-67.

23. De Munck J, Van Meerbeek B, Satoshi I, Vargas M, Yoshida Y, Armstrong S, Lambrechts P, Vanherle G. Microtensile bond strengths of one- and two-step self-etch adhesives to bur-cut enamel and dentin. *Am J Dent.* 2003; 16:414-20.
24. Loguercio AD, Moura SK, Pelizzaro A, Dal-Bianco K, Patzlaff RT, Grande RH, Reis A. Durability of enamel bonding using two-step self-etch systems on ground and unground enamel. *Oper Dent.* 2008; 33:79-88.
25. Kimmes NS, Barkmeier WW, Erickson RL, Latta MA. Adhesive bond strengths to enamel and dentin using recommended and extended treatment times. *Oper Dent.* 2010; 35:112-9.
26. Sarr M, Kane AW, Vreven J, Mine A, Van Landuyt KL, Peumans M, Lambrechts P, Van Meerbeek B, De Munck J. Microtensile bond strength and interfacial characterization of 11 contemporary adhesives bonded to bur-cut dentin. *Oper Dent.* 2010; 35:94-104.
27. Burrow MF, Takakura H, Nakajima M, Inai N, Tagami J, Takatsu T. The influence of age and depth of dentin on bonding. *Dent Mater.* 1994; 10:241-6.
28. Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J Esthet Restor Dent.* 2013 Aug;25:219-41.
29. Schaffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee KA, Cadenaro M, Turco G, Breschi L, Mazzoni A, Costa CA, Pashley DH. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. *Dent Mater.* 2014; 30:227-33.

30. Leme AA, Vidal CMP, Hassan LS, Bedran-Russo AK. Potential role of surface wettability in the long-term stability of dentin bonds after surface biomodification. *J Biomech.* 2015;48:2067-71.

31. Armstrong SR, Keller JC, Boyer DB. Mode of failure in the dentin-adhesive resin composite bonded joint as determined by strength-based (TBS) and fracture based (CNSB) mechanical testing. *Dent Mater.* 2001;17:201-10.

ARTIGO 2

Effect of phosphoric acid with polyphenols on dentin collagen: Atomic force microscopy study.

Efeito de ácidos modificados com polifenóis sobre o colágeno dentinário: Estudo de Microscopia de Força Atômica

Abstract

Objective: The aim was of this study to evaluate the effect of different concentrations of phosphoric acid with grape seed extract (GSE) on the structure of the collagen fibrils of dentin. **Materials and methods:** Samples (0.3 mm thickness and 8 mm diameter) of the middle third of the coronal dentin of sound human molars were obtained. Half of the dentin of each tooth was etched with phosphoric acid (5%, 10%, or 20%) for 30 s, and the other half was etched with its corresponding phosphoric acid with 2% GSE for 30 s. The dentin of each sample was observed using an Atomic Force Microscope (AFM). **Results:** AFM images showed that phosphoric acid at concentrations of 5%, 10% and 20% demineralized the dentin and exposed the collagen fibrils and their pattern of periodicity. Phosphoric acid at each concentration with 2% GSE changed the collagen fibril periodicity, and the collagen fibrils formed globular structures. This change was more significant in dentin treated with 5% phosphoric acid and less significant with 20% phosphoric acid. **Conclusions:** The use of 5% phosphoric acid with 2% GSE produced denser collagenous globular structures. This conformational change in the collagen can make it more mechanically and enzymatically resistant.

Key Words: microscopy atomic force, cross-linking reagents, collagen, polyphenols, grape seed extract.

Introduction

To achieve a durable and stable bond in a hybrid tissue such as dentin, the adhesive monomers must be able to fully infiltrate, encapsulate and stabilize the collagen fibrils that are exposed by acidic etching to form a homogeneous hybrid layer [1,2]. However, the stability of this bond is affected by factors, including inadequate filling of the collagen fibrils by the adhesive monomers, as well as by hydrolytic and enzymatic processes, that occur over time [3,4]. Recent studies indicate that bond durability is improved by the inhibition of endogenous collagenolytic activity [4-8] and the addition of cross-linking agents such as glutaraldehyde and derivatives of natural extracts rich in proanthocyanidins [9-11], which may contribute to the integrity of the hybrid layer. These exogenous cross-linking agents have been suggested to maintain, restore and enhance tissue function as well as produce a collagen with a support structure that is resistant to mechanical and enzymatic effects [10,12].

Grape seed extract (GSE), which is rich in proanthocyanidins, is an efficient collagen cross-linker [9,11-13], has low toxicity [14], inhibits MMP-2, MMP-9 and MMP-8 [15] and binds to collagen in a short treatment time [11,16]. The addition of 2% GSE to each concentration of phosphoric acid produced dentin collagen resistant to collagenase degradation and transformed the acidic conditioners into collagen stabilizers. This effect occurred preferably in phosphoric acid concentrations less than 20%. This finding was observed by transmission (TEM) and scanning electronic microscopy (SEM) [17].

TEM offers the highest possible resolution for the study of interactions between biomaterials and dental tissue [18]. MEV offers excellent detailing of surfaces [19]. However, atomic force microscopy (AFM), unlike the previous techniques, has the advantage of processing the images in hydrated samples at room temperature without

requiring high or low vacuum conditions. Thus, it is possible to treat a sample and verify in real time the changes that occur at the nanometric level. AFM has emerged as an essential tool in almost all research that requires the characterization of surfaces and interfaces of materials at a nanometer-scale [20,21]. To the best of our knowledge, there is no AFM study evaluating the effect of GSE incorporated in phosphoric acid on dentin collagen structure. GSE, according to the manufacturer (Mega Natural Gold GSE, Polyphenolics, Madera, CA, USA), has more than 90% proanthocyanidins, which are polyphenols. The nature of a cross-linking agent is influenced by the composition and its chemical structure [22]. The molecular weight of the polyphenols present in GSE has a determining effect on their interaction with type I collagen [23]. However, this important molecular weight data for the polyphenols (proanthocyanidins) present in GSE are not known [24].

The aims of the study were the following: a) to evaluate, by AFM, the effect of different concentrations of phosphoric acid with GSE on the structure of the collagen fibrils of dentin; b) to determine, by GPC chromatography, the molecular weights of the GSE polyphenols. This study was conducted under the following hypotheses: a) the different acid concentrations with GSE have the same effect on the structure of collagen fibrils; b) there are polyphenols with different molecular weights in GSE.

Materials and Methods

Atomic force microscopy (AFM)

Three sound human molars, extracted for therapeutic reasons, were selected from patients aged between 17 and 30 years. Patients signed the informed consent form approved by the Ethics Committee (CAAE 47845315.5.0000.5336). The teeth were

cleaned and disinfected in 0.02% sodium azide solution for 24 h and then washed under running water and stored in distilled water at 4°C for up to 1 month. After the storage period, the roots were mounted in self-cured acrylic resin, and the occlusal enamel surface was removed with a diamond disc mounted in a low-speed laboratory cutting machine (Labcut 1010, Extec Corp., London, UK) under cooling in water. A sample of the middle third of the coronal dentin of each tooth, with uniform thickness (~3 mm) and diameter (~8 mm), was sectioned perpendicular to the long axis of the tooth. The dentin surfaces were finished with 600-, 1200- and 1500-grit silicon carbide abrasive paper in a polishing machine (Panambra, São Paulo, SP, Brazil) under water for 2 min at each grit and then polished with 0.5- and 0.3- μ m grit alumina paste on a felt disk for 5 min at each grit in the polishing machine. Afterwards, the samples were ultrasonically cleaned with deionized water for 10 min and stored at 4°C in deionized water before use.

The phosphoric acid formulations with different percentage concentrations, without and with GSE (MegaNatural Gold, Madera, CA, USA) were prepared based on previous study [17] (Table 1). Half of the dentin of each tooth was etched with phosphoric acid, and the other half was etched with its corresponding phosphoric acid with GSE.

Acid etching was applied and remained on the dentin for 30 s [17]; the sample was then rinsed with deionized water for 30 s. The excess water was removed with absorbent paper. The specimens were observed by AFM (Dimension Icon, Burker, Camarillo, CA, USA), in Peak Force Tapping mode. A TAP 150A probe (Burker, Camarillo, CA, USA) was used, and the scan resolution was 256 x 256 pixels per image with a drive amplitude of 100 mV. The images of the dentin surfaces etched with the different acid concentrations were obtained at room temperature and in non-aqueous

medium. Images of 10 μm x 10 μm were used to locate the areas of intertubular dentin, where 3 μm x 3 μm images were taken; from these images, 1 μm x 1 μm images were obtained.

HPLC gel permeation chromatography

HPLC–GPC analysis was performed using a system equipped with an isocratic HPLC pump (Waters 1515, Milford, Ma, USA) and a refractive index detector (Waters 2414, Milford, Ma, USA). A solution of 0.025 g GSE and 5000 μl Tetrahydrofuran was mixed for 30 min in an ultrasonic cleaner. The solution was filtered in Acrodisc PSF syringe filters (Gelman Pall, Port Washington, NY, USA), and GPC analyses were performed with a flow rate of 1 ml/min, a column temperature of 40 °C, an injection volume of 200 μl and a run-time of 45 min. Molecular weight analysis was performed using Breeze software (Waters, Milford, MA, USA). This procedure provided information on several different MW (molecular weight) parameters, i.e., M_n (number-average molecular mass), M_p (peak molecular weight), and M_w (weight-average molecular mass). This procedure was done in duplicate.

Results

Figure 1 shows the two-dimensional (2D) images of the dentin surface etched with phosphoric acid at 5% (AC5), 10% (AC10) and 20% (AC20), and the dentin surface etched with phosphoric acids with 2% GSE at 5% (GSE5), 10% (GSE10) and 20% (GSE20). AC5, AC10 and AC20 caused demineralization of dentin and produced observable periodicity (gap zones and overlap zones) of the collagen fibrils (white arrow). The AC5 image shows areas referring to the mineral portion (black arrow). The AC10 and AC20 images do not show the presence of mineral portions as in AC5. AC20

caused deeper demineralization, which is verified by the color difference of the height scale (lighter colors - higher areas; darker colors - lower areas). GSE5 caused a change in collagen fibril periodicity, and the collagen fibrils formed globular structures (white arrow) in which the original periodicity pattern is no longer visualized. These globular structures are also visualized in GSE10 and GSE20 (white arrow). However, this change is less significant in the dentin treated with GSE20 because the collagen fibrils are not as bulky and agglomerated as the collagen fibrils of GSE5 and GSE10. Comparing GSE5 and GSE10, the globular structures are more evident in GSE5.

Figure 2 shows three-dimensional (3D) images. Comparing AC5 and GSE5, it is observed that the periodicity of collagen fibrils is greatly altered for GSE5, forming globular structures. The change in collagen fibrils between AC10 and GSE10 is significant, but not as greatly expressed as AC5 and GSE5. For AC20 and GSE20, this change in collagen fibrils shows much less expression and does not show the globular structures found in the GSE10, especially in GSE5.

According to HPLC–GPC analysis, the following molecular weights were found: 2595, 1564, 923, 139 and 496.

Discussion

AFM was used in this study due to its ability to characterize the fibrillar structure of dentin collagen [21,25-28]. This methodology has the advantage of generating images without additional treatment of the samples, which can stay hydrated at room temperature [21,25]. In addition, the images generated with AFM tapping mode can be an effective tool to obtain a better understanding of the relationship between structure

and the properties of biological tissues and biomaterials in both the micro- and nanoscale [28].

Fibrillar macromolecules of dentin collagen are easily recognized by their axial periodicity of 67 nm, which can be observed by AFM [25,27], and electronic microscopy [29,30]. This periodicity of 67 nm, which corresponds to a D-period, results from the alternating spaces between the ends of the successive collagen molecules (gap-zones), while the areas where several molecules overlap represent the overlap zones.

The endogenous intra- and intermolecular cross-linking is the basis for the stability, tensile strength and viscoelasticity of collagen fibrils [31]. The aim of dentin biomodification studies is to use the biomimetic therapy to mechanically reinforce the network of dentin collagen exposed by acid etching and control the biodegradation of extracellular matrix components [15,31-34]. In the AFM images of the present study, the periodicity of the dentin collagen is visualized after treatment with the different concentrations of phosphoric acid, whereas treatment with the phosphoric acid concentrations and the addition of GSE resulted in a change in this pattern which corresponded to the formation of globular structures. Thus, AFM images revealed the effect of proanthocyanidins on the collagen structure at the level of microfibrils. Even in a short treatment time (30 s) with extensive rinsing (30 s), the interaction of proanthocyanidins with collagen was observed for all concentrations of phosphoric acid with GSE. These findings corroborate studies that verified the interaction of proanthocyanidins with collagen [16,35,36].

It is interesting to note that the changes of the collagen with GSE5 and GSE10 are more intense than with GSE20, rejecting the first hypothesis. In the AFM images, it is observed that the collagen fibrils aggregate, forming much larger globular structures with GSE5 and GSE10 than with GSE20. This is an important finding

because it shows that the structural changes that occur in the collagen fibrils, as a function of the presence of GSE, are dependent on the percentage of the phosphoric acid. Liu, Dusevich and Wang [16] observed, by MEV, resistance to the digestion of collagen when dentin was treated with 5% and 10% phosphoric acid containing GSE. However, there was partial degradation of the collagen in the group in which 20% phosphoric acid with GSE was applied. The authors emphasized that the penetration of these phosphoric acids with GSE into the dentin is not synchronized. GSE, which is more hydrophobic, diffuses more slowly into the intratubular space than phosphoric acid, which is more hydrophilic. Thus, GSE20 etches the dentin tissue so quickly that the proanthocyanidins do not completely reach all the collagen exposed by the demineralization, leaving the collagen fibrils unprotected and more susceptible to enzymatic degradation [16].

Conformational or morphological alterations in dentin collagen resulting from treatment with proanthocyanidins were also studied by Vidal et al. [36]. Covalent bonds are induced by proanthocyanidins in type I collagen in demineralized dentin, promoting strong collagen-collagen interactions [36]. Proanthocyanidins are secondary metabolites obtained from plants, and they are formed by monomeric structures of catechins, which may be linked by an additional ether (C-O) bond or one or more C-C bonds to form oligomers and polymers [36]. Thus, GSE, which is a mixture of different oligomeric structures of proanthocyanidins, showed a similar increase in collagen-collagen interaction forces for both molecules and collagen fibrils, supporting the hypothesis that cross-linking with collagen occurs at different hierarchical levels. Larger oligomeric forms of proanthocyanidins are responsible for intra-molecular cross-links that provide the biostability of the collagen molecule, and inter-molecular

and inter-microfibrillar cross-links enhance mechanical properties, in addition to fibril biostability [23].

The HPLC–GPC technique can be used to determine molecular weights of underivatized polyphenols and tannins [24]. In the present study, HPLC–GPC verified the presence of five different molecular weights in GSE (2595, 1564, 923, 139 and 496), accepting the second hypothesis of the study. This finding evidences the presence of different oligomeric forms of proanthocyanidins. Thus, the conformational change of the collagen caused by the phosphoric acids with GSE may be due to cross-links, both at the level of collagen molecules due to the presence of lower molecular weight proanthocyanidins, and at the level of collagen fibrils due to the presence of higher molecular weight proanthocyanidins [23].

Ideally, the hybrid layer is expected to be compact and homogenous, i.e., the collagen fibrils are completely impregnated by the adhesive monomers. However, Bertassoni et al. [3] present arguments that support the thesis that the complete impregnation of collagen by resinous monomers is insufficient because of the physical limitations imposed by the intermolecular distance within the type I collagen fibrils. Moreover, these intermolecular spaces are intrinsically occupied by water molecules that are strongly bound to the collagen molecules. The authors emphasize that the impregnation and recoating of collagen fibrils with hydrolyzable monomers would favor the formation of an interface that is inherently susceptible to hydrolytic degradation in nanoscale. Although the treatment of collagen with exogenous cross-linkers, such as proanthocyanidins, does not appear to alter the intermolecular spaces, there is certainly a conformational change that can make the collagen more mechanically and enzymatically resistant, thus being advantageous to adhesive restorative treatments [10].

Proanthocyanidins exhibit a free radical scavenging effect that can inhibit polymerization of the resin. However, the addition of GSE in an experimental adhesive did not produce an adverse effect on the bond strength to dentin when the concentration of GSE incorporated into the adhesive was less than or equal to 2% [37]. The study of Hass et al. [34] found similar results of immediate bond strength to dentin etched with 35% phosphoric acid and 10% phosphoric acid with 2% GSE, proving the non-interference of proanthocyanidins in adhesive polymerization at these concentrations. After six months of storage in water, the bond strength decreased by half for the group without GSE, and there was a metalloproteinase decrease in the hybrid layer for the group with GSE. Therefore, the mechanical and enzymatic protection achieved by the use of these cross-linkers seems to be feasible, and the polymerization of the adhesive is not impaired when GSE is added to the acid etchant in specific percentages.

The results of the current study demonstrate that phosphoric acids with GSE caused a change in collagen fibrils periodicity and formed globular structures. The use of 5% phosphoric acid with 2% GSE produced denser collagenous globular structures, which can make the collagen fibrils more mechanically and enzymatically resistant. GSE has multiple polyphenols (proanthocyanidins) with different molecular weights.

Acknowledgments

The authors thank the Central Laboratory of Microscopy and Microanalysis of PUCRS for the images of Atomic Force Microscopy, and CAPES (Coordination of the Improvement of Higher Education Personnel) for the financial support (88881.062198/2014-01).

Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest.

References

- [1] Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, et al. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater.* 2008; 24: 90-101.
- [2] Pashley DH, Tay FR, Breschi L, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 2011; 27: 1-16.
- [3] Bertassoni LE, Orgel JP, Antipova O, et al. The dentin organic matrix - limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta Biomater.* 2012; 8:2419-33.
- [4] Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res.* 2011; 90:953-68.
- [5] Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007;86:529-33.
- [6] Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;90:373-80.
- [7] De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, et al. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive–dentin interfaces. *J Dent.* 2009;88:1101-6.
- [8] Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J Esthet Restor Dent.* 2013;25:219-41.

- [9] Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, et al. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;80:268-72.
- [10] Bedran-Russo AK, Castellan CS, Shinohara MS, et al. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. *Acta Biomater.* 2011;7:1735-41.
- [11] Liu Y, Wang Y. Proanthocyanidins' efficacy in stabilizing dentin collagen against enzymatic degradation: MALDI-TOF and FTIR analyses. *J Dent.* 2013;41:535-42.
- [12] Liu R, Fang M, Xiao Y, et al. The effect of transient proanthocyanidins preconditioning on the cross-linking and mechanical properties of demineralized dentin. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22:2403-11.
- [13] Castellan CS, Pereira PN, Grande RH, et al. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent Mater.* 2010;26:968-73.
- [14] Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, et al. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem Toxicol.* 2002;40:599-607.
- [15] Epasinghe DJ, Yiu CK, Burrow MF, et al. The inhibitory effect of proanthocyanidin on soluble and collagen-bound proteases. *J Dent.* 2013;41:832-9.
- [16] Liu Y, Dusevich V, Wang Y. Proanthocyanidins rapidly stabilize the demineralized dentin layer. *J Dent Res.* 2013;92:746-52.
- [17] Liu Y, Dusevich V, Wang Y. Addition of grape seed extract renders phosphoric acid a collagen-stabilizing etchant. *J Dent Res.* 2014; 93:821-7.

- [18] Masover WH. New and unconventional approaches for advancing resolution in biological transmission electron microscopy by improving macromolecular specimen preparation and preservation. *Micron*. 2011;42:141-51.
- [19] Breschi L, Gobbi P, Falconi M, et al. Evaluation of the F2000 bonding procedure: a high resolution SEM study. *J Dent*. 2001;29:499-507.
- [20] Jandt KD. Force measurements with the atomic force microscope: technique, interpretation and applications. *Surf Sci*. 2001;49:303-32.
- [21] Fawzy AS, Farghaly AM. Probing nano-scale adhesion force between AFM and acid demineralized intertubular dentin: Moist versus dry dentin. *J Dent*. 2009;37:963-9.
- [22] Vidal CM, Aguiar TR, Phansalkar R, et al. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta Biomater*. 2014;10:3288-94.
- [23] Vidal CM, Leme AA, Aguiar TR, et al. Mimicking the hierarchical functions of dentin collagen cross-links with plant derived phenols and phenolic acids. *Langmuir*. 2014;30:14887-93.
- [24] Stringano E, Gea A, Salminen JP, et al. Simple solution for a complex problem: proanthocyanidins, galloyl glucoses and ellagitannins fit on a single calibration curve in high performance-gel permeation chromatography. *J Chromatogr A*. 2011;43:7804-12.
- [25] Habelitz S, Balooch M, Marshall SJ, et al. In situ atomic force microscopy of partially demineralized human dentin collagen fibrils. *J Struct Biol*. 2002;138:227-36.

- [26] Fawzy AS. Variations in collagen fibrils network structure and surface dehydration of acid demineralized intertubular dentin: effect of dentin depth and air-exposure time. *Dent Mater.* 2010;26:35-43.
- [27] Bertassoni LE, Habelitz S, Pugach M, et al. Evaluation of surface structural and mechanical changes following remineralization of dentin Scanning. 2010;32:312-9.
- [28] Bertassoni LE, Marshall GW, Swain MV. Mechanical heterogeneity of dentin at different length scales as determined by AFM phase contrast. *Micron.* 2012;43: 1364-71.
- [29] Breschi L, Gobbi P, Lopes M, et al. Immunocytochemical analysis of dentin: a double-labeling technique. *J Biomed Mater Res A.* 2003;67:11-7.
- [30] Nalla RK, Porter AE, Daraio C, et al., Ultrastructural examination of dentin using focused ion-beam crosssectioning and transmission electron microscopy. *Micron.* 2005;36:672-80.
- [31] Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, et al. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical application. *Dent Mater.* 2014; 30:62-76.
- [32] Zheng X, Pan H, Wang Z, et al. Real-time enzymatic degradation of human dentin collagen fibrils exposed to exogenous collagenase: an AFM study in situ. *J Microsc.* 2011;24:162-70.
- [33] Phansalkar RS, Nam JW, Chen SN, et al. A galloylated dimeric proanthocyanidin from grape seed exhibits dentin biomodification potential. *Fitoterapia.* 2015;101:169-78.

- [34] Hass V, Luque-Martinez I, Muñoz MA, et al. The effect of proanthocyanidin-containing 10% phosphoric acid on bonding properties and MMP inhibition. *Dent Mater.* 2016;32:468-75.
- [35] He L, Mu C, Shi J, et al. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. *Int J Biol Macromol.* 2011;48:354-9.
- [36] Vidal CM, Zhu W, Manohar S, et al. Collagen-collagen interactions mediated by plant-derived proanthocyanidins: A spectroscopic and atomic force microscopy study. *Acta Biomater.* 2016;41:110-8.
- [37] Epasinghe DJ, Yiu CK, Burrow MF, et al. Effect of proanthocyanidin incorporation into dental adhesive resin on resin-dentine bond strength. *J Dent.* 2012;40:173-80.

Table 1: Formulation of the phosphoric acids with and without GSE.

Tooth	Group	Formulation
1	AC20	20% phosphoric acid + 20% ethanol
1	GSE20	20% phosphoric acid + 20% ethanol + 2% GSE
2	AC10	10% phosphoric acid + 20% ethanol
2	GSE10	10% phosphoric acid + 20% ethanol + 2% GSE
3	AC5	5% phosphoric acid + 20% ethanol
3	GSE5	5% phosphoric acid + 20% ethanol + 2% GSE

AC: Phosphoric acid

GSE: Grape seed extract

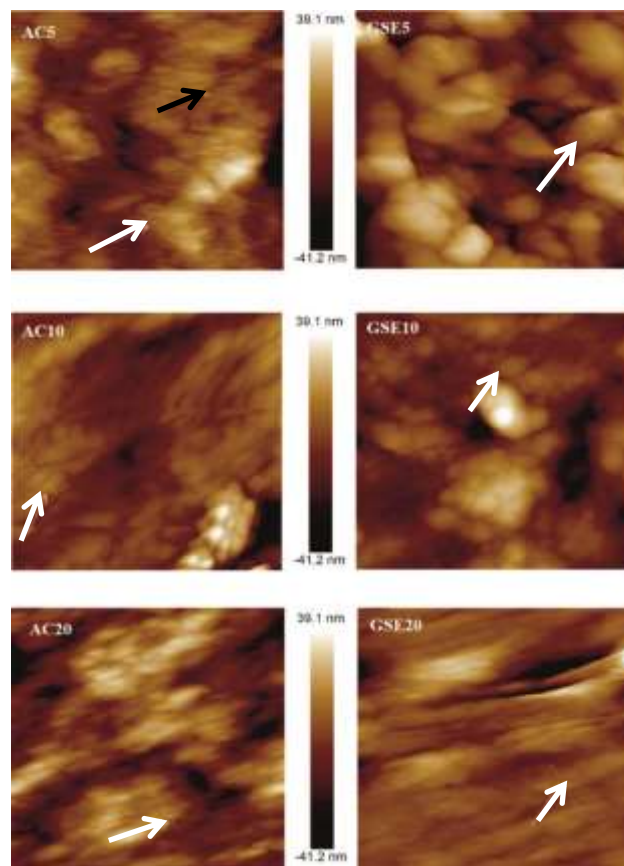


Fig. 1- Two-dimensional (2D) images using AFM of the dentin surfaces etched with 5% phosphoric acid (AC5), 10% phosphoric acid (AC10), 20% phosphoric acid (AC20), 5% phosphoric acid + 2% GSE (GSE5), 10% phosphoric acid + 2% GSE (GSE10), 20% phosphoric acid + 2% GSE (GSE20). AC5, AC10, and AC20 images: periodicity of the collagen fibrils (white arrows) and mineral portion (black arrow). GSE5, GSE10, and GSE20 images: collagen fibrils formed globular structures (white arrows), which are more evident in GSE5.

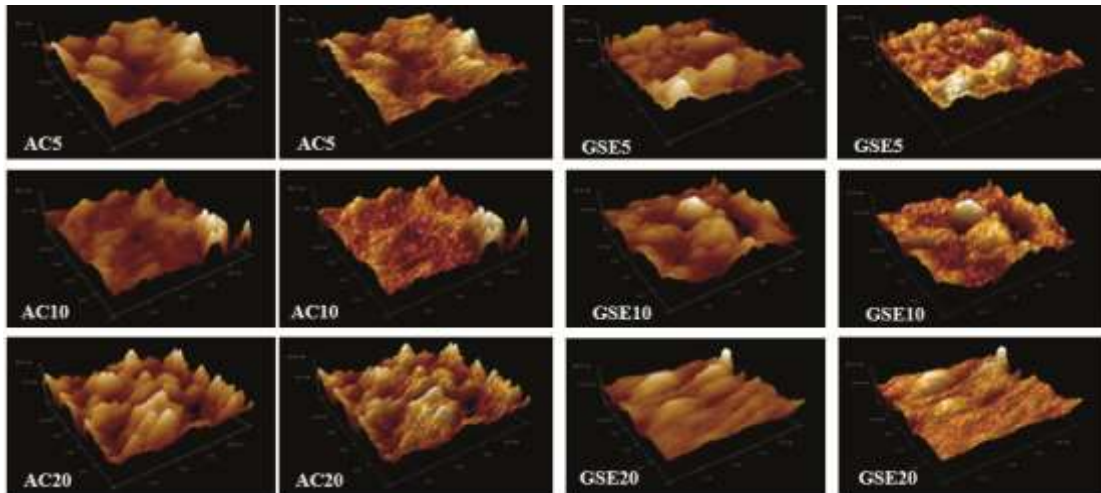


Fig 2 - Three-dimensional (3D) images using AFM of the dentin surfaces etched with 5% phosphoric acid (AC5), 10% phosphoric acid (AC10), 20% phosphoric acid (AC20), 5% phosphoric acid + 2% GSE (GSE5), 10% phosphoric acid + 2% GSE (GSE10), 20% phosphoric acid + 2% GSE (GSE20). There are two visualizations of the same image (height – left image; mixed – right image). Globular structures are more evident with GSE5.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da presente pesquisa e de outros trabalhos publicados, pode-se constatar que o extrato de semente de uva (GSE), rico em proantocianidina, é uma substância promissora para o desenvolvimento de biomateriais dentários, visando a durabilidade de restaurações adesivas, principalmente quando se trata da união dentina-resina.

O GSE, ao ser incorporado no ácido fosfórico, causou alterações na estrutura do colágeno dentinário, formando estruturas globulares. Este achado evidencia o efeito das proantocianidinas no colágeno ao nível microfibrilar pelo efeito de reticulação. Esta reticulação do colágeno pode favorecer a menor degradação do colágeno, seja pelo efeito enzimático ou hidrolítico, favorecendo a manutenção da interface adesiva. No presente estudo, esta estabilidade da interface adesiva pode ser observada quando GSE foi incorporado ao ácido fosfórico nas concentrações de 5% e 10%, pois não houve redução dos valores de resistência de união à dentina após 12 meses de armazenamento em água.

Outros estudos são necessários para ter-se maior comprovação do uso do GSE nos procedimentos de restaurações adesivas: a) incorporação do GSE no ácido fosfórico na forma de gel, que é a consistência utilizada clinicamente, e verificar se tem a mesma eficácia como agente de reticulação do colágeno; b) períodos maiores de armazenamento; c) estudos clínicos longitudinais.

REFERÊNCIAS (Introdução geral)

Aydin B; Hassan LS, Viana G, Bedran-Russo AK.. Assessing Collagen and Micro-permeability at the Proanthocyanidin-treated Resin-Dentin Interface. *J Adhes Dent.* 2016;18(6):529-534.

Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, Aguiar TR, Vidal CM, Napotilano JG, Nam JW, Leme AA. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater.* 2014; 30(1):62-76.

Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater.* 2008;24:90–101.

Liu Y, Dusevich V, Wang Y. Addition of grape seed extract renders phosphoric acid a collagen-stabilizing etchant. *J Dent Res.* 2014;93:821-7.

Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, Pashley DH, Tay FR. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res.* 2011; 90(8):953-68.

Phansalkar, RS. ; Nam, JW ; Chen, S-N ; Mcalpine, JB. ; Napolitano, JG. ; Leme, Ar ; Vidal, CM.P. ; Aguiar, T ; Bedran-Russo, AK. ; Pauli, GF. A galloylated dimeric proanthocyanidin from grape seed exhibits dentin biomodification potential. *Fitoterapia.* 2015; 101:169-78.

Santos PH, Karol S, Bedran-Russo AK. Nanomechanical properties of biochemically modified dentin bonded interfaces. *J Oral Rehabil.* 2011;38:541-6 (a).

Santos PH, Karol S, Bedran-Russo AK. Long-term nano-mechanical properties of biomodified dentin-resin interface components. *J Biomech.* 2011;44:1691-4 (b).

ANEXO A- Aprovação do projeto de pesquisa CEP

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Aplicação de polifenóis na dentina humana: Estudo in vitro da morfologia interfacial e da resistência de união

Pesquisador: Ana Maria Spohr

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 47845315.5.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.186.325

Data da Relatoria: 04/09/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de Projeto de Pesquisa subjacente em Projeto de Tese apresentado como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Dentística Restauradora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, de lavra da doutoranda Tamara Paludo sendo pesquisadora responsável a Profa. Dra. Ana Maria Spohr. Referido Projeto de Pesquisa conta com recursos oriundos do Edital MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs número 09/2014.

Objetivo da Pesquisa:

O Projeto tem por objetivo, segundo relata, avaliar a influência da aplicação de polifenóis (Proantocianidina e Resveratrol) sobre as seguintes variáveis dependentes: - resistência de união à dentina humana, por meio da metodologia de microtração; - análise da interface de união, por meio de microscopia eletrônica; - atividade/inibição enzimática na técnica adesiva, por meio de zimografia in situ; e, - análise do grau de conversão por espectroscopia em micro-Raman. Para a investigação, o Projeto utilizará terceiros molares humanos inclusos ou semi-inclusos, com dimensões semelhantes e extraídos por indicação terapêutica, de um total de 102 indivíduos,

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@puhrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 1.186.325

doados previamente a assinatura do respectivo TCLE. O descarte ao final da pesquisa obedecerá aos procedimentos da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos, pois serão utilizados dentes terceiros molares humanos extraídos por indicação terapêutica e doados para a pesquisa mediante prévio e bem esclarecido termo de doação, por via de TCLE. Os benefícios dependem da verificação - pelo objeto de pesquisa - se do uso de substâncias com potencial de reduzir a degradação dos sistemas adesivos serão obtidas restaurações adesivas com maior longevidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Investigação de estilo no âmbito da ciência e em sede de pesquisa para obtenção de resultados em Tese de Doutorado. A proposta revela alto significado para a área de concentração a que se destina e, segundo informações obtidas por este parecerista na WEB revela, também, alto conteúdo inovador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão anexados os todos os documentos obrigatórios, sendo que de seu exame, inclusive do TCLE, resulta a confirmação da adequação dos mesmos.

Recomendações:

S. m. j., não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

S. m. j., não há pendências ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 14 de Agosto de 2015

Assinado por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

ANEXO B- Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS

Pretendemos realizar uma pesquisa que tem o objetivo “Avaliar a influência da aplicação da proantocianidina (uma substância natural extraída da semente da uva) na resistência de união de materiais restauradores sobre a dentina humana”. Para isto, precisamos de dentes humanos extraídos para o desenvolvimento do estudo.

Como esta pesquisa será realizada em dentes extraídos por indicação terapêutica, não existem riscos a sua saúde. No decorrer da pesquisa e na publicação dos resultados sua identidade será mantida em sigilo absoluto através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

O prazo máximo de armazenamento deste material biológico será de 10 anos. Caso queira, o sujeito da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico, valendo a desistência a partir da data dessa formalização.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Instituição Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul-PUCRS, podendo ser publicados posteriormente. Os dentes utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador e após a conclusão da pesquisa serão descartados conforme as normas de descarte de materiais biológicos da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

Ressaltamos também que a não concordância em doar os dentes para este estudo não implica em qualquer modificação no tratamento estabelecido.

Caso tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, ou aos seus resultados, poderá entrar em contato com os pesquisadores: Profa. Dra. Ana Maria Spoh (51 3320-3500 Ramais 4307 ou 3538); Doutoranda Tamara Paludo (51 92416479) ou entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (CEP-PUCRS) pelo telefone (51) 3320.3345.

Eu,, CPF nº, autorizo a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do(s) meu(s) dente(s), extraídos por indicação terapêutica, conforme consta em meu prontuário clínico, para a pesquisa “APLICAÇÃO DA PROANTOCIANIDINA NA DENTINA HUMANA: ESTUDO *IN VITRO* DA MORFOLOGIA INTERFACIAL E DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO”.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, e concordo em doar meus dentes, conforme os dados acima.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____

Assinatura do doador

Assinatura do Pesquisador Responsável

Testemunha



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br