CARINA STRANO CASTELLAN

Estudo da matriz orgânica dentinária modificada por agentes naturais ricos em proantocianidina e seu uso para aumentar a efetividade de restaurações adesivas

São Paulo

2010

CARINA STRANO CASTELLAN

Estudo da matriz orgânica dentinária modificada por agentes naturais ricos em proantocianidina e seu uso para aumentar a efetividade de restaurações adesivas

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Materiais Dentários

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Nóbrega Rodrigues Pereira

Co-Orientadora: Ana Karina Bedran-Russo

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Castellan, Carina Strano
Estudo da matriz orgânica dentinária modificada por agentes naturais ricos em proantocianidina e seu uso para aumentar a efetividade de restaurações adesivas / Carina Strano Castellan; co-orientadora Ana Karina Bedran-Russo; orientadora Patricia Nóbrega Rodrigues Pereira. -- São Paulo, 2010.
110p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Materiais Dentários. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Dentina – Colágeno – Ligação Cruzada. 2. Materiais Dentários. I. Bedran-Russo, Ana Karina; Pereira, Patrícia Nóbrega Rodrigues. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Castellan CS. Estudo da matriz orgânica dentinária modificada por agentes naturais ricos em proantocianidina e seu uso para aumentar a efetividade de restaurações adesivas.Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2010

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura:

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura:

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura:

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura:

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura:

DEDICATÓRIA

Hoje, e apenas hoje, não usarei de minhas palavras para dedicar este trabalho, e dois são os motivos: o primeiro passa pela minha completa incapacidade de expressar tão grande amor e gratidão e o segundo se faz pela escassez de palavras após meses produzindo a abundância de texto que se segue.

Dedico este trabalho para:

Marcos, meu amor

Car vois-tu, chaque jour, je t'aime davantage,
Aujourd'hui plus qu'hier et bien moins que demain.

L'éternelle chanson (1889)
Rosemonde Gerard Rostang

Saverio e Fátima, meus pais e Guilly-Pula, meu brother

I carry your heart with me (I carry it in my heart),
I am never without it (anywhere I go you go, my dear; and whatever is
done by only me is your doing, my darling),
I carry your heart (I carry it in my heart).

I carry your heart with me (1952)
E. E. Cummings

Amo vocês e sempre os levo em meu coração

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta no mar de bênçãos que recebo!

A minha querida vó Inês por ser a minha preferida. Te amo vó!

A família Strano e a Castellan. Carrego todos vocês em meu coração.

À "Ayalada" (Luiz, Victória, Mamá, Yaio e Yaia), que me apoiam sempre e pelo carinho sempre dispensado. Obrigada por tudo o que fazem por mim.

A todos os meus amigos que não posso agradecer nominalmente aqui, vocês são essenciais para mim.

A minha orientadora professora Patrícia Pereira por ter aceito me orientar sem me conhecer, por ter aberto todas as portas, pela ajuda e inúmeros ensinamentos ao longo de três anos e por sempre entender a minha ausência de e-mails. Muito obrigada pela oportunidade!

A amiga e co-orientadora professora Ana Karina Bedran-Russo. Muito obrigada pelo ensinamento ininterrupto! Agradeço também o ano mágico e de muito trabalho que tive na maravilhosa cidade de Chicago, e o carinho que sua família me recebeu. Você é muito especial para mim. Muito obrigada por tudo.

A Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Ao programa de pós-graduação do departamento de Materiais Dentários.

A todos os professores do departamento de Materiais, pelo convívio e ajuda nestes últimos anos. Pelos amigos que aqui fiz e sei que estarão sempre comigo.

A Rosinha, Eli e Antonio. Vocês é que fazem andar o departamento. Muito obrigada pelo carinho que cada um de vocês dispensou a mim e pela grande amizade.

Aos amigos Bárbara Pick e Vinicius Rosa, pela verdadeira alegria de ter conhecido vocês e pela amizade que é sempre motivo de saudades!

A TODOS os meus amigos da pós, inclusive aqueles que já saíram (Fê Sadek, Fernandinha, etc..) pelas risadas freqüentes, e pelo suporte que sempre me ofereceram. Eu desejo o que há de melhor para cada um de vocês.

A Capes pelo auxílio financeiro.

A SDO pela correção deste trabalho.

RESUMO

Castellan CS. Estudo da matriz orgânica dentinária modificada por agentes naturais ricos em proantocianidina e seu uso para aumentar a efetividade de restaurações adesivas [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

O objetivo deste trabalho foi elucidar a interação entre a proantocianidina (PA), um agente natural e não tóxico de ligação cruzada, e o colágeno dentinário tipo I. A hipótese proposta é que o modelamento de uma dentina desmineralizada mais resistente e com melhores propriedades propiciará um substrato mais estável e íntegro para restaurações adesivas. Para isto, o estudo foi dividido em 4 fases: 1) Validação da PA como agente exógeno de ligação cruzada, testando matrizes de dentina desmineralizadas tratadas com extratos a base de PA em teste micro-flexural para análise do módulo de elasticidade (ME), variando o tempo de exposição (10, 30, 60, 120, 240 min), o tipo de extrato usado (semente de uva-GSE, semente de cacau-CSE, oxicoco-CRE, canela-CNE e açaí-ACE) e a longevidade (imediato, 3, 6 e 12 meses); 2) Estudar parâmetros relacionados às soluções de PA, como solubilidade (água, etanol e acetona), fonte (GSE e CSE) e concentração (0,65%, 3,25%, 6,5%, 15% e 30%), através da mensuração do ME pelo teste micro-flexural de matrizes de dentina desmineralizada; 3) Caracterização da dentina tratada com PA (GSE e CSE), sorção de água, calorimetria e degradação enzimática; 4) Analisar a resistência de união entre a dentina tratada com PA (GSE/CSE) e sistemas de adesivos comerciais (Adapter Single Bond Plus e One Step Plus), variando a concentração (6,5% e 30%), tempo de exposição (1, 10 e 60 min) e longevidade (imediato, 3, 6 e 12 meses). Foram realizadas análises de variâncias e teste de contraste de médias, quando necessário, para todos os ensaios. Os resultados de ME foram influenciados pelo tratamento com PA, dependendo do tipo de extrato usado, exibindo os melhores resultados para o maior tempo de exposição (240 min) para os extratos GSE e CSE. Embora os resultados imediatos com os extratos CRE e CNE não tenham aumentado, estes se mantiveram constantes apos 1 ano de armazenamento, o que não aconteceu para o ACE e os grupos controles. A solubilidade das soluções é influenciada diretamente pelo modo de extração e

manufaturação dos extratos, sendo que GSE é solúvel em água destilada e CSE em acetona-água. A efetividade do GSE mostrou ser concentração-dependente, exibindo o maior ME para a concentração de 30%. A dentina tratada com agentes a base de PA foi mais resistente contra a colagenase, obteve uma menor sorção de água e um aumento significativo na temperatura de desnaturação quando comparada ao grupo controle. O GSE foi capaz de aumentar a resistência de união (RU) imediata para ambos os sistemas adesivos, mantendo-se constante para o Adapter Single Bond Plus ao longo do tempo. Para o One Step Plus todos os grupos mostraram diminuição da RU após 1 ano, independente do tempo de exposição. Quando a dentina foi tratada por 1 minuto, os valores de RU para o grupo 30% de GSE foram maiores do que os demais e mantiveram-se constante pelo período de armazenamento. O efeito dos agentes ricos em PA mostrou ser concentração e tempo dependente, porém uma dentina mais resistente e estável ao longo do tempo é possível de ser obtida, levando-se em conta a estrutura química, conteúdo de PA, solubilidade e outros fatores inerentes ao extrato

Palavras-chave: Dentina. Colágeno. Ligação cruzada. Proantocianidina.

ABSTRACT

Castellan CS. Study of the dentin organic matrix modified by proanthocyanidin rich agents and their use to increase short and long-term bond strength [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

The aim of this study was to elucidate the interaction between proanthocyanidin based extracts (PA), a natural and non-toxic cross-linker, and type I dentin collagen. The hypothesis is that if a stronger and more stable collagen layer is chemically engineered, the resultant hybrid layer will be stronger and less prone to degradation. So, this research was divided into four phases: 1) PA validation as an exogenous cross-linking agent, testing the elastic modulus (E) of demineralized dentin treated with various PA based extracts (grape seed-GSE, cocoa seed-CSE, cranberry-CRE, cinnamon-CNE, and açai berry-ACE), exposure times (10, 30, 60, 120, 240 min), and long term effectiveness (immediate, 3, 6 and 12 months); 2) Evaluation of different parameters related to PA solutions, like solubility (water, ethanol and acetone), manufacturer (GSE and CSE) and concentration (0.65%, 3.25% 6.5%, 15% and 30%), E was also obtained by micro-flexural strength measurements of demineralized dentin matrix, 3) Characterization of PA treated dentin (GSE and CSE): water sorption, calorimetry and enzymatic degradation and 4) Analyze the bond strength (μBS) of PA treated dentin (GSE / CSE) with commercial adhesives systems (Adapter Single Bond Plus-SB and One Step Plus-OS), varying concentration (6.5% and 30%), exposure time (1, 10 and 60 min) and long-term effectiveness (immediate, 3, 6 and 12 months). Data were statistically analyzed at a 95% confidence interval. GSE and CSE extracts showed a time-dependant effect and were able to improve and stabilize the E of the organic matrix. CRE and CNE extracts were able to maintain the E of collagen matrices constant after 12 months artifical saliva storage. ACE and controls groups showed no effect over dentin organic matrix, did not prevent degradation and consequently reduced the mechanical properties. Herbal extraction process and other pharmacognostic parameters have an important influence on extract solubility as well as constitution, therefore GSE is better dissolved in water and CSE in acetone-water. GSE effect on demineralized dentin is concentration-dependant, with highest E values at 30% GSE

concentration. Dentin treated with PA-based agents was more resistant against enzymatic degradation, less susceptible to water sorption and showed a higher denaturation temperature. As compared to the controls, GSE stabilized the dentin-resin bond strength values over a period of one year for both adhesives, however better results were achieved with SB. CSE showed less predictable results depending on the adhesive system used. One minute treatment with 30% GSE was capable of increasing short-term μBS and stabilizing it for at least 6 months. Increased mechanical properties and stability of dentin matrix can be achieved by the use of PA-rich collagen cross-linkers regarding inherent characteristics of the natural compounds as chemical structure, solubility and PA content.

Keywords: Dentin. Collagen. Cross-linking. Proanthocyanidin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 REVISÃO DE LITERATURA 16

2.1 Dentina 16

2.1.1 Biossíntese 16

2.1.2 Composição dentinária 17

2.2 Matriz Orgânica 18

2.2.1 Colágeno 18

2.2.2 Estrutura do colágeno tipo I 18

2.2.3 Biossíntese do colágeno tipo I 19

2.2.4 Função do colágeno tipo I 24

2.3 Ligações cruzadas nativas e induzidas do colágeno 25

2.4 Agentes naturais de ligações cruzadas 27

2.4.1 Composição das PA 28

2.4.2 Atividades biológicas das PA 30

2.4.3 Parâmetros para utilização da PA como agente de ligação cruzada 32

2.5 Características biomecânicas da matriz dentinária 33

2.5.1 Módulo de elasticidade 33

2.5.2 Sorção de água 34

2.5.3 Estabilidade Térmica 35

2.5.4 Degradação enzimática 37

2.6 Dentina como substrato adesivo 38

2.6.1 Degradação ao longo do tempo 39

2.6.2 Opções para aumentar a longevidade e RU 41

2.6.3 Agentes de ligação cruzadas ricos em PA e longevidade adesiva... 42

3 PROPOSIÇÃO 43

4 MATERIAL E MÉTODOS 44

4.1 Efetividade de diferentes extratos naturais a base de PA como agentes de ligação cruzada com o colágeno dentinário. 44

4.2 Estudo dos parâmetros das soluções a base de PA: Solubilidade, procedência e/ou fabricante, tempo de aplicação e concentração dos extratos escolhidos.....48

4.3 Caracterização da dentina desmineralizada tratada com extratos a base de PA. 50

4.4 Resistência de união entre dentina tratada com extratos a base de PA e compósitos dentais.....54

5 RESULTADOS 57

5.1 Efetividade de diferentes extratos naturais a base de PA como agentes de ligações cruzadas com o colágeno dentinário 57

5.2 Estudos dos parâmetros das soluções a base de PA: Solubilidade, procedência e/ou fabricante, tempo de aplicação e concentração dos extratos escolhidos......62

5.3 Caracterização da dentina desmineralizada tratada com extratos a base de PA 67

5.4 Resistência de união entre dentina tratada com extratos base de PA e compósitos dentais......71

6 DISCUSSÃO 80

6.1 Efetividade de diferentes extratos naturais a base de PA como agentes de ligações cruzadas com o colágeno dentinário. 80

6.2 Estudos dos parâmetros das soluções a base de PA: Solubilidade, procedência e/ou fabricante, tempo de aplicação e concentração dos extratos escolhidos......83

6.3 Caracterização da dentina desmineralizada tratada com extratos a base de PA. 87

6.4 Resistência de união entre dentina tratada com extratos base de PA e compósitos dentais......90

6.5 Considerações Finais 93

7 CONCLUSÕES 95

REFERÊNCIAS 96

ANEXO 110

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos tecidos conectivos, como tendões, pele, vasos sanguineos, ossos e dentina, são constituídos principalmente por colágeno tipo I. O colágeno é a proteína mais abundante em vertebrados e é sintetizado pelas células do tecido conjuntivo sendo secretado para o espaço extracelular para fazer parte de uma complexa rede de macromoléculas.

Cada molécula de colágeno é constituída de três cadeias polipeptídicas (uma tripla-hélice) enrolada em torno da outra e orientadas para a direita com cerca de mil resíduos de aminoácidos cada uma [1]. As ligações cruzadas, principalmente pontes de hidrogênio, formadas entre as cadeias polipeptídicas individuais (entre o NH da glicina de uma cadeia e a C=O da prolina ou de outro aminoácido de outra cadeia) constitui o módulo estrutural básico do colágeno [1]. A maior insolubilização do colágeno, o aumento da resistência das fibrilas e também a estabilização destas moleculas, podem ser conseguidos com ligações cruzadas exógenas intra e inter-moleculares, ou seja dentro da mesma fibrila ou entre fibrilas adjacentes [2]. Somando-se a estas existem as ligações cruzadas inter-microfibrilares, caso a distância de duas microfibrilas (1,3-1,7 nm) seja menor que o comprimento do agente indutor [3].

O colágeno é normalmente utilizado como um importante biomaterial para aplicações clinicas como: próteses, tecidos artificiais, usos cosméticos, recuperação de queimaduras, e feridas. Em todas estas aplicações, um colágeno estável é exigido, e as moléculas usadas para a estabilização devem também ser biocompatíveis, para que este possa desempenhar as obrigações inerentes [4]. A estabilização do colágeno em tecidos ou biomateriais é destacada na literatura contemporânea [5-8].

Colágeno tipo I é o principal constituinte da matriz dentinária, e as fibrilas colágenas da dentina do manto e intertubular ocupam a maior parte do espaço preenchido pela matriz extracelular dentinária. Na ocorrência da desmineralização, a rede de fibrilas colágenas e proteínas não-colagenosas preservam a forma e dimensões da dentina [9]. Entretanto as moléculas que formam a rede de colágeno representam apenas 35% em peso, enquanto a fase mineral pode constituir 65% da dentina seca [10], sendo que os cristais de hidroxiapatita tem uma densidade

quase 3 vezes maior que a do colágeno, ocupando menos de 50% do volume médio dentinário [10].

O restabelecimento da forma e função dental, devido a perda de estrutura por processos cariosos ou traumas pode ser conseguido através de restaurações adesivas diretas ou indiretas. Para isso a rede de colágeno tridimensional desmineralizada torna-se o substrato para a aplicação tópica de *primers* ou resinas adesivas, que fluindo para os espaços interfibrilares envolvem as fibrilas com monômeros resinosos, que são polimerizados subseqüentemente, promovendo assim uma retenção mecânica para os compositos dentinários [9].

Como a adesão é criada pela impregnação do substrato dentinário desmineralizado por misturas de monômeros resinosos, a estabilidade da interface adesiva depende na criação de uma camada híbrida compacta e homogênea [11]. A longevidade clinica da camada hibrida envolve tanto fatores químicos e físicos. Forças provenientes da mastigação oclusal, e a repetitiva expansão e contração devido a mudanças na temperatura intra-oral são fatores físicos que podem afetar a estabilidade da interface [12]. Já fatores químicos como agentes ácidos no fluído dentinário, saliva, comidas, bebidas e produtos bacterianos são capazes de desafiar a interface entre dente e compósito resultando em vários padrões de degradação e disorganização das fibrilas de colágeno desprotegido, eluição dos monômeros resinosos e degradação dos componentes resinosos [12]. Tanto a incompleta infiltração e encapsulamento das fibrilas colágenas pelos monômeros resinosos no momento da restauração como a própria degradação da camada de resinosa protetora inerente ao tempo e fatores influentes podem causar a exposição destas fibrilas e conseqüente disorganização. Uma rede de fibrilas de colágeno mais resistente, insolúvel e estável são, portanto, fatores importantes também para mais esta função do colágeno [13, 14].

Proantocianidinas (PA) são distribuídas nas gimnospermas e angiospermas [15]. São consideradas como uma das classes mais importantes do metabolismo secundário no reino vegetal. PA fazem parte da categoria conhecida como taninos condensáveis, uma das duas principais categorias dos taninos vegetais, e são produtos naturais polifenólicos compostos por subunidades de flavan-3-ol, unidas através de ligações C4-C8 (ou C6) [16]. Recentemente, as PA tem recebido uma atenção considerável em campos como a nutrição, saúde e medicina devido suas atividades fisiológicas, baixo custo e facilidade de obtenção. Dentre estas

atividades pode-se citar: capacidade anti-oxidante, efeito anti-microbiano, propriedades anti-inflamatorias, doenças cardiovasculares, atividade anti-alergica e inibidora de atividades enzimáticas como a fosfolipase A2, ciclooxigenase e lipooxigenase e seus receptores [4]. Maffei e colaboradores [17] (1994) demonstraram que as PA podem inibir significantemente também a atividade proteolítica das enzimas como colagenases e elastases. Embora tenham uma atividade inibitória para a maioria das enzimas, PA são capazes de facilitar a hidroxilação da prolina através da enzima hidroxilase [17]. Este processo é imprescindível para a síntese de colágeno.

PA são conhecidos por precipitar prontamente as proteínas ricas em prolina, assim como o colágeno, através de ligações de hidrogênio, indicando a adstringência de muitas comidas e bebidas [16]. Foi comprovado que este tipo de ligação tem um importante papel na estabilização do complexo entre PA e proteína. As PA possuem inúmeras fontes naturais, como semente de uva, caule de *Pinus Radiata,* semente de cacau, canela, oxicoco, maçã dentre outras [15]. A utilização destes compostos provenientes da semente de uva na dentina foi capaz de aumentar o módulo de elasticidade da dentina desmineralizada [18, 19], melhorar o substrato dentinário adesivo expressado pelo aumento na resistência de união entre dentina íntegra [20, 21] ou afetada pela cárie [22] e compósitos e ajudar na remineralização de lesões artificiais de cárie nas raízes dentais [23]. A baixa citotoxidade destes compostos já foi comprovada [16].

Métodos analítos como o módulo de elasticidade da dentina desmineralizada tornam-se de interesse pois a rede de colágeno desmineralizada é parte integrante da interface adesiva em procedimentos dentais que requerem condicionamento ácido, e já foi sugerido que teria correlação com o ensaio de resistência de união [21]. Bio-ensaios como sorção de água, estabilidade térmica e degradação enzimática da malha orgânica são comuns na avaliação das propriedades da matriz de colágeno [4, 5, 7]. Com auxílio destes métodos na busca de um melhor entendimento do efeito dos agentes de ligações cruzadas a base de PA com o colágeno dentinário, este estudo propôs estudar diferentes fontes de PA, parâmetros das soluções ativas, caracterizar a dentina tratada e por fim analisar a contribuição deste processo na adesão longitudinal com compósitos resinosos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para o melhor entendimento da interação entre proantocianidina (PA) e o colágeno, faz-se necessária a abordagem de tópicos como: biossíntese da dentina e colágeno, tipos de ligações cruzadas presentes no colágeno dentinário e por fim a estrutura da PA, composição e os possíveis mecanismos de interação com o colágeno. Embora alguns assuntos já tenham sido abundantemente descritos na literatura, a re-abordagem será feita no intuito de trazer a mais fácil compreensão do tema. A dentina: sua origem, composição e ligações cruzadas serão tópicos abordados a seguir.

2.1 Dentina

2.1.1 Biossíntese

A microestrutura dentinária e suas propriedades são os principais determinantes de quase todas as operações da odontologia restauradora [11]. Embora seja de suma importância, existem disponíveis apenas limitadas relações entre estrutura e respectiva propriedade deste complexo compósito biológico hidratado [24]. Além da escassez de informações desta relação, a dentina é modificada por processos fisiológicos, envelhecimento e também patologias, criando diferentes formas de dentina. Atualmente, sabe-se que a organização da matriz dentinária está diretamente relacionada ao processo de formação da dentina [10].

A síntese de dentina começa com a formação da dentina do manto, que é a primeira camada de dentina formada [10]. Neste momento inicia-se a secreção dos principais constituintes da matriz orgânica, sendo as fibrilas colágenas os elementos mais numerosos [25]. Simultaneamente com a secreção das primeiras fibrilas, aparecem as vesículas da matriz, que brotam dos odontoblastos, situam-

se entre as fibrilas colágenas, e no determinado momento participarão do processo de mineralização [26].

Os ameloblastos recém-diferenciados emitem contatos com os também curtos processos dos odontoblastos, inclusive com a vesícula da matriz. Uma vez formada uma fina camada de matriz orgânica, começa a deposição mineral em seu interior [24]. A formação da dentina do manto termina quando os odontoblastos alcançam sua completa diferenciação e polimerização [26]. A partir deste momento, enquanto se deslocam centripetamente, os odontoblastos continuam depositando as moléculas da matriz orgânica, sendo que as fibrilas colágenas continuam sendo o elemento mais numeroso [25]. Porém, as fibrilas agora formadas apresentam diâmetro médio de 50nm e dispõe-se, quase na totalidade, orientadas em torno do longo eixo dos túbulos dentinários [26]. Como a formação ocorre por aposição centrípeta, a dentina do manto é externamente adjacente a uma nova camada não mineralizada, chamada de pré-dentina, a qual, por sua vez, constituirá, quando mineralizada, a primeira camada de dentina circumpulpar, esta por sua vez também adjacente a outra camada recém-formada de pré-dentina [26]. A dentina circumpulpar constitui a maior parte da espessura total da dentina, e é constituída de dentina peritubular e intertubular [27].

2.1.2 Composição dentinária

Sua composição, quando analisada pelo volume dos constituintes, revela uma abundância de 50% de mineral, 20% de água e 30% de matéria orgânica [24]. Em um dente desmineralizado, a rede de fibrilas colágenas preserva a forma e tamanho da dentina original. Entretanto, as moléculas que formam a rede de fibrilas colágenas representam apenas 35% em peso, enquanto a parte mineral pode constituir cerca de 65% da dentina seca. Os cristais de cálcio de hidroxiapatita possuem uma densidade 3 vezes maior que o colágeno, sendo que a dentina peritubular é a mais mineralizada [10].

A parte inorgânica dentinária constitui-se de cristais em forma de agulha, menores do que no esmalte, e sais como hidroxiapatita, carbonatos, fosfato de cálcio, sulfato, flúor, cobre, zinco e ferro [24]. Como outros tecidos que sofrem

mineralização, a matriz orgânica da dentina tem dois componentes principais: o fibrilar, constituído pelas fibrilas colágenas e a substância fundamental interfibrilar. O colágeno representa 90% da matriz orgânica, os 10% restantes são constituídos pelas chamadas proteínas não-colágenas [25].

Como a parte orgânica é de essencial importância para este estudo será, então, melhor detalhada a seguir.

2.2 Matriz Orgânica

2.2.1 Colágeno

O colágeno é uma proteína essencial nos vertebrados e corresponde a aproximadamente 25% de toda proteína no corpo humano, por conseguinte, a 6% do peso corporal [28]. Está presente na maioria dos tecidos (ossos, cartilagens, pele, veias, órgãos, entre outros), conferindo-lhes integridade funcional e estrutura [1]. Como resultante do processo biossintético, são formados 19 tipos diferentes de cadeias alfa (α) que, por associação na forma de trímeros, dão origem a pelo menos 27 tipos de colágenos [29]; entre eles, o colágeno tipo I é o mais abundante no corpo humano. Do total da matéria orgânica na dentina, mais de 90% é formado por colágeno do tipo I e 3% do tipo V, cuja função não é conhecida [30]. Estes tipos distintos de colágenos mostram uma variedade e complexidade marcantes em sua estrutura (por exemplo: comprimento e número de domínios colagênicos e não-colagênicos), funções biológicas e distribuição nos tecidos.

2.2.2 Estrutura do colágeno tipo I

O colágeno tipo I é formado por 3 cadeias α, sendo 2 cadeias α^1 e 1 cadeia $\alpha^{2,}$ que se enrolam entre si para formar uma estrutura chamada tripla hélice [31]. Nas duas extremidades dessa região helicoidal há uma região não helicoidal, de

pequeno comprimento, designadas peptídeos C-terminal (carboxi-terminal; -COOH) e N-terminal (amino-terminal; $-NH_2$). Cada cadeia α é formada por uma seqüência de aminoácidos que apresentam uma glicina (Gly) a cada terceiro resíduo da cadeia, caracterizando no colágeno uma estrutura de triplete repetitivo na forma Gly-X-Y, onde X e Y podem ser Prolina (Pro), Hidroxiprolina (Hyp) ou outro aminoácido, os quais podem ter naturezas ácidas, básicas e hidrofóbicas [32]. Gly esta situada exclusivamente no centro da tripla hélice devido ao seu menor tamanho, em um local muito restrito [1]. Apesar destes tripletes repetitivos, e uma grande quantidade de Gly e Pro no colágeno, ambas as cadeias α^1 e α^2 não tem uma única seqüência de aminoácidos, com muito poucas e curtas áreas homólogas. Yamauchi [1] (2002) relatou que esta estrutura terciária é estabilizada primariamente por ligações de hidrogênio entre cadeias polipeptídicas adjacentes, ou seja, pelo NH da glicina de uma cadeia ligando-se com o C=O da prolina ou de outro aminoácido de outra cadeia.

As cadeias α^1 e α^2 apresentam 1056 e 1035 resíduos de aminoácidos, respectivamente, ao passo que o telopeptídeo C-terminal apresenta 26 e o N-terminal, 16 resíduos de aminoácidos [31].

O colágeno é sintetizado na forma de pró-colageno e, quando no meio extracelular, perde parte de sua estrutura protética, dando origem a estruturas fibrilares [31], conforme visto a seguir.

2.2.3 Biossíntese do colágeno tipo I

O processo de biossíntese inclui quatro grandes passos descritos a seguir (Figura 2.1) [1]:

1.Transcrição gênica e processamento do RNA mensageiro.

2.Transporte do RNA mensageiro para o lúmem do retículo endoplasmático onde ocorre a tradução do RNAm em cadeias α de protocolágeno, algumas modificações pós-transducional, associação das três cadeias e dobramento do pró-colágeno em tripla-hélice.

3. Transporte para o complexo de Golgi, secreção para a matriz extracelular e processamento com subseqüente clivagem dos terminais N e C para formação da molécula de tropocolágeno.

4. Moléculas de colágeno se acomodam para formação das fibrilas e se estabilizam através de modificações e ligações cruzadas covalentes intra e inter moleculares.

A sub-unidade de cadeias peptídicas formada nos polissomos do retículo endoplasmático é chamado protocolágeno. A hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina ocorre depois de sua liberação dos ribossomos e requer enzimas específicas como a prolina e a lisina hidroxilase. O pró-colágeno em tripla-hélice é formado intra-celularmente, partindo do C-terminal em direção ao N-terminal. Esta proteína tem um peso molecular mais alto que o tropocolágeno, e não forma fibras. Após secreção da proteína pela célula, pequenos grupos peptídicos são removidos das regiões de N e C-terminal por peptidases específicas, resultando em tropocolágeno. Estes peptídeos dos terminais N e C clivados atuam como reguladores da síntese de colágeno, por um processo inibitório de *feedback* [1]. O tropocolágeno recém sintetizado não possui ligações cruzadas intra-moleculares, e as três cadeias α são individualmente separadas pela desnaturação. É a subunidade básica molecular do colágeno, com uma peso molecular de 300000 nm, comprimento de 2800 A° e uma largura de 15 A° [33]. Quando maduro possui ligações cruzadas intra-moleculares para produzir cadeias β e γ. Colágeno sem ligações cruzadas entre cadeias é conhecido como α colágeno, quando apenas duas cadeias são covalentemente ligadas é o β colágeno e quando todas as três cadeias estão ligadas é o γ colágeno [1].

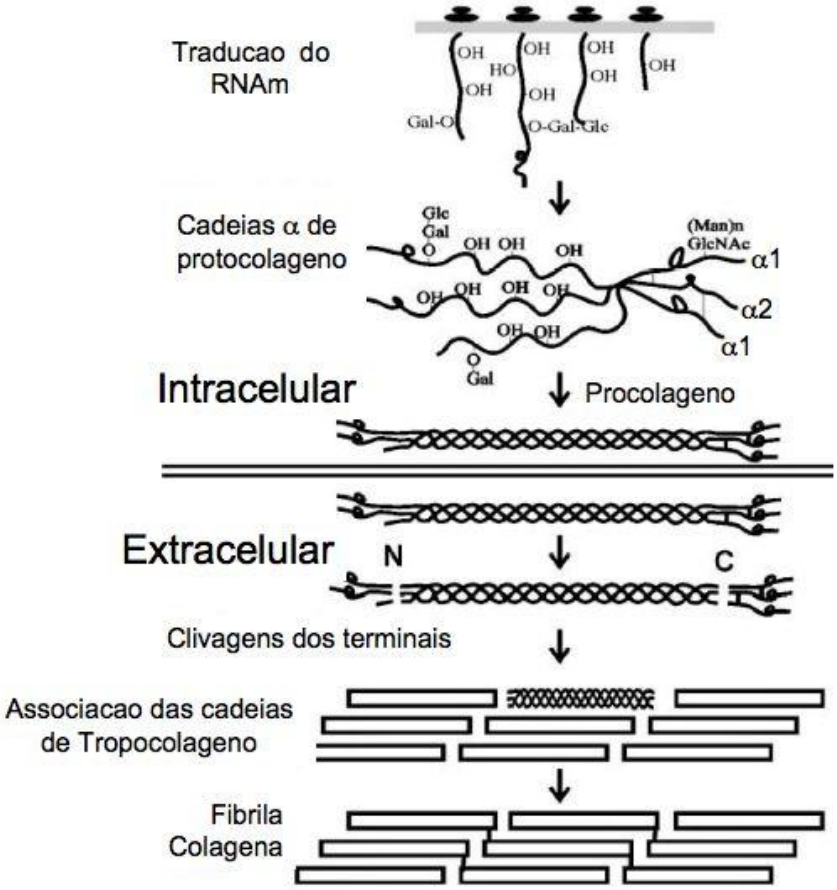


Figura 2.1 – Os quatro grande passos da biossíntese das fibrilas colágenas. Transcrição gênica e processamento do RNA mensageiro. Transporte do RNA mensageiro para o lúmem do retículo endoplasmático onde ocorre a tradução do RNAm em cadeias α de protocolágeno, algumas modificações pós-transducional, associação das três cadeias e dobramento do pró-colágeno em tripla-hélice. Transporte para o complexo de Golgi, secreção para a matriz extracelular e processamento com subseqüente clivagem dos terminais N e C para formação da molécula de tropocolágeno. Moléculas de colágeno se acomodam para formação das fibrilas e se estabilizam através de modificações e ligações cruzadas covalentes intra e inter moleculares. A imagem foi cedida pelo professor Mark Hill do Cell Biology Laboratory School of Medical Sciences, Faculty of Medicine. Concentimento obtido para o uso da imagem

Este mecanismo de síntese do colágeno é muito útil, pois permite que o colágeno solúvel seja secretado pela célula e subsequentemente modificado em diversos tipos de tecidos conjuntivos. Aparentemente, peptidases específicas são responsáveis por modificar o pró-colágeno em tropocolágeno. Colágenos provenientes de diversos tecidos diferem na estrutura. Estas modificações, sem dúvida, estão relacionadas à função biológica final que será exercida. Colágeno presente em diversas membranas e cartilagens biológicas, por exemplo, consiste em colágeno ligado covalentemente por glicoproteinas. Colágeno da membrana

basal glomerular renal e em alguns tipos de cartilagens consistem de (α^1)3 (3 cadeias α^1), enquanto a maioria do colágeno da pele, tendões, ossos e dentina consiste de (α^1)2 e $\alpha^{2\ 1}$.

Após impregnação com sais de metais pesados seguidos da observação das fibrilas de colágeno pela Microscopia eletrônica de Transmissão (MET), são observadas zonas claras que são caracterizadas como *Overlap* e tem 310 A°, e zonas escuras, que são chamadas de *Gap*, e tem menor densidade de aminoácidos e seu comprimento é de 360 A° [33]. Com a coloração positiva da MET, observa-se que as bandas claras e escuras são caracterizadas também por sua subperiodicidade que, em função da técnica empregada, reflete a regularidade e a periodicidade da distribuição dos aminoácidos ácidos e básicos presentes na estrutura fibrilar. Dessa forma, a região do *overlap*, abrange os sub-produtos c_1, b_2, b_1 e a_4. Enquanto a região do *gap* inclui os sub-produtos: a_3, a_2, a_1, e_2, e_1, d, c_3, c_2. [31], levando-nos a compreender a formação de clusters de aminoácidos ácidos e básicos ao longo do período D. O conjunto *gap-overlap* é o período D da estrutura fibrilar do colágeno tipo I e está ilustrado na figura 2.2 [31].

Assim, o modelo fibrilar quarto alterado [31] define o tropocolágeno, unidade estrutural da molécula de colágeno que se organiza em número de cinco, de forma escalonada e alternada de ¼ de seu comprimento (67 nm), formando a microfibrila [34]. Esse modelo, quando comparado com a MET, mostra que essas moléculas de tropocolágeno não estão distribuídas aleatoriamente na estrutura fibrilar e a sua agregação espontânea na fibrila é produzida pela interação de grupos ácidos e básicos presentes na mesma molécula ou em moléculas adjacentes.

Essas microfibrilas de colágeno irão se agregar lateral e longitudinalmente por um processo chamado fibrilogêneses [34] e formarão as fibrilas de colágeno, as quais são mantidas por ligações cruzadas inter-moleculares (ou inter-fibrilares) e intra-moleculares (ou intra-fibrilares) e também por interações eletrostáticas ou iônicas que lhes conferem a estabilidade [35].

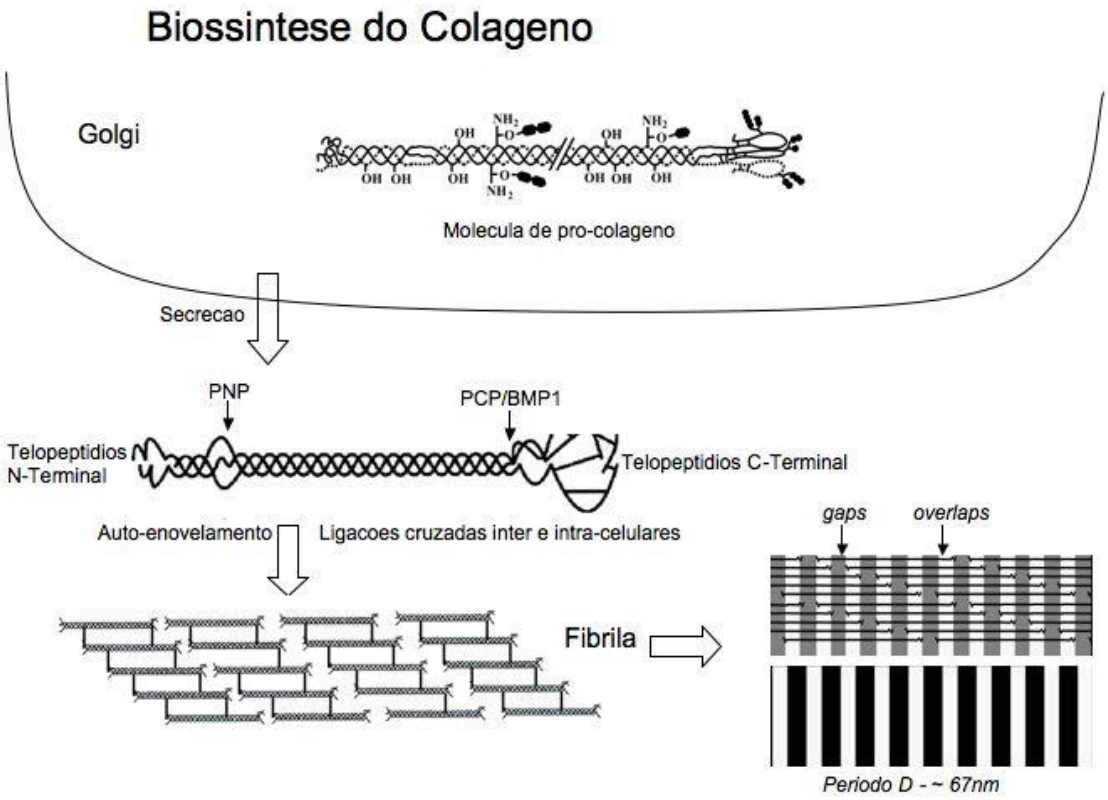


Figura 2.2 – Ilustração esquemática da biossíntese do colágeno tipo I. Os eventos intra-celular, que acontecem a cima da membrana celular, incluem modificações translacionais extensas, associação das cadeias α e enovelamento em uma molécula tripla-hélice. Os eventos extra-celular, abaixo da mebrana celular, envolvem a remoção dos terminais N e C, auto-aglomeração das moleculas de colágeno em fibrilas. As moléculas de colágeno são posicionadas em paralelo e são escalonadas longitudinalmente com respeito umas às outras, por distancias axiais múltiplas e repetidas, D (~ 67nm). Este tipo de empacotamento cria regiões de alta e baixa densidade, por exemplo *overlaps* e *gaps* respectivamente, mostrando a característica de bandas do colágeno visto em nível ultra-estrutural. Figura obtida de Fig 3- collagen biochemistry: an overview (2002) [1]. Concentimento obtido para o uso da imagem

A matriz dentinária contém também um número de proteínas em adição ao colágeno tipo I, chamadas de não-colágenas, dentre elas estão: fosfoforinas, fosfoproteínas, sialoproteínas, sialoproteínas dentinárias (DSPs), proteínas morfogenéticas dentinárias (DMPs), Gla-proteínas, proteoglicanas, glicoproteinas ácidas e proteínas séricas [10]. De acordo com Veis [10] (1996) estas proteínas são sintetizadas de maneira parecida ao colágeno pelos odontoblastos, em sua maioria são ácidas e fosforiladas. Muitas aparecem também nos tecidos ósseos, e

poucas são consideradas especificas da dentina. Suas funções ainda não foram completamente elucidadas, porém as mais comuns seriam manutenção estrutural ou regulatória na matriz extracelular, assim como fatores de crescimento ou citocinas [10].

2.2.4 Função do colágeno tipo I

Embora o colágeno seja uma proteína estruturalmente simples, tem funções bastante variadas, desde mecânica até como reguladora da atividade celular. Nos tecidos moles, atribuí-se ao colágeno a importante função mecânica de manter a forma dentro dos limites que permitem o funcionamento normal do organismo ou tecido sob a ação de qualquer força que a tente modificá-la [36]. Ele fornece resistência e integridade estrutural a diversos tecidos e órgãos, sendo encontrado nas víceras e nas intimidades delas, na derme, nos tendões, na cartilagem, na córnea, no humor vítreo, nos vasos sanguíneos, na membrana basal, nos ligamentos, entre outros [37].

Na biossíntese dentinária, as propriedades físicas e químicas do colágeno são especialmente adaptadas para a ligação das proteínas da matriz e também serve como um esqueleto para a deposição mineral [10]. A deposição mineral, de acordo com Marshall et al. [11] (1997), pode ocupar dois sítios na trama de colágeno: intrafibrilar (dentro das zonas periodicamente espaçadas de *gap* na fibrila) e extrafibrilar (no interstício entre as fibrilas). A proporção de cada sítio é incerta, mas acredita-se que entre 70-75% do mineral esteja no espaço extrafibrilar [38]. A característica de plasticidade da dentina funcional, de menor módulo de elasticidade quando comparada ao esmalte, e dada também pelo seu componente orgânico [24]. Com relação à odontologia adesiva, a integridade das fibrilas colágenas expostas pelo condicionamento ácido desempenha um papel importante no mecanismo de adesão, sofrendo um embebedamento dos monômeros adesivos, compondo assim a camada hibrida [12].

2.3 Ligações cruzadas nativas e induzidas do colágeno

Fibrilas maduras de colágeno, como encontradas naturalmente, são formadas por ligações cruzadas covalentes que convertem seus elementos monoméricos (tropocolágeno) em uma rede de ligações cruzadas [1]. Estas ligações nativas são em sua maioria inter-moleculares e são cruciais para a produção de matrizes de tecido conjuntivo com resistência à tração e viscoelasticidade. Este tipo de ligação cruzada do colágeno tem um papel importante durante o desenvolvimento do recém sintetizado colágeno até a fase da puberdade em humanos [39]. Sendo assim, o próprio envelhecimento também mostra como característica um progressivo processo de enrijecimento de quase todos os tecidos ricos em matrizes extracelulares e proteínas de longa-vida. Yamauchi [1] (2002) descreve inúmeros tipos de ligações cruzadas presentes nas fibrilas colágenas, dentre as mais importantes estão as ligações de aldimina que parecem ser instáveis, outras são produtos estáveis entre alisina e hidroxialisina, que aparecem em altas concentrações nos tipos de colágenos mais insolúveis.

Essas ligações cruzadas estáveis que podem ser observadas no tropocolágeno e ocorrem a partir da lisina (Lys) em duas fases [40]:

1. O grupo ε-amino da lisina ou da hidroxilisina é oxidado pela lisil-oxidase para formar alisina um aminoácido contendo grupo aldeído.
2. O grupo aldeído da alisina reage com o grupo ε-amino de outro resíduo de lisina de um filamento adjacente para produzir uma ligação cruzada estável. Alternativamente dois resíduos de alisina reagem por condensação aldolica para formar outra ligação cruzada.

As ligações cruzadas nativas do colágeno podem ser quebradas e a molécula desnaturada através do aquecimento em soluções ácidas de 38 a 40 °C, ou por reagentes como o tiocianato de potássio (KSCN) que destrói estas ligações. Polipeptídios do colágeno desnaturado assumem uma configuração aleatória, sendo este material a gelatina [40].

A indução de ligações cruzadas no colágeno solúvel, reestruturando e estabilizando o material, são aspectos importantes para o uso de colágeno como biomaterial. A indução de ligações cruzadas pode ser feita através de métodos químicos e físicos [41]. Cada método induz essas ligações por uma determinada via,

que não serão abordadas neste estudo. Os físicos incluem uma simples secagem, envelhecimento, aquecimento ou irradiação com raios ultravioleta ou gama [42]. A irradiação tem dois grande efeitos no colágeno: indução de ligações cruzadas aleatórias e quebra das moléculas de pró-colágeno.

Entre os reagentes químicos sintéticos capazes de induzir a formação de ligações cruzadas estão os aldeídos, carbodiamidas e acido crômico [5]. O grupo aldeído é extremamente reagente com proteínas [43]. O mais simples dos aldeídos – formaldeído, já foi utilizado como agente de ligações cruzadas, porém seus efeitos colaterais tornam estes produtos tóxicos. A carbodiamida, como exemplo o EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide), é capaz de juntar amino-ácidos em peptídios. Este mecanismo de ligação cruzada do colágeno envolve a ativação dos grupos ácidos da carboxila dos resíduos glutâmicos e aspárticos do EDC [13]. Jás os agentes naturais, como base na PA, possuem uma toxicidade reduzida e seus métodos de indução de ligações cruzadas serão descritos mais adiante.

Geralmente é considerada uma hierarquia organizacional na estrtutura colagênica em níveis sucessíveis. Três cadeias polipeptídicas, formando uma macromolécula em tripla hélice, sendo que cinco delas se enovelam para formar uma micro-fibrila. As micro-fibrilas se juntam em fibrilas e estas formam a fibra colágena. Distâncias entre as cadeias de polipeptidios nas hélices, hélices individuais na micro-fibrila e entre micro-fibrilas adjacentes são 0,1-0,2 nm (mínimo), 0,15-0,18 nm e 1,3-1,7 nm respectivamente [3]. A distância entre grupos de ε-aminas em diferentes cadeias em uma mesma molécula podem tranquilamente ser maior do que entre dois resíduos de moléculas vizinhas. A distância entre fibrilas e fibras é de no mínimo uma ordem de magnitude maior do que essas entre micro-fibrilas [3]. Isto significa que o nível de formação da ligação cruzada é dependente do tamanho da molécula indutora. Os mais comuns são entre as cadeias de tripla-hélice, entre micro-fibrilas e na propria micro-fibrila.[5]

É difícil enfatizar demasiadamente a importância biológica das ligações cruzadas tanto intra- como inter-moleculares. A ausência ou alteração das ligações inter-moleculares podem causar diversas doenças do tecido conjuntivo [44]. Já a indução de ligações de ambos os tipos com agentes específicos pode aumentar as propriedades mecânicas destas fibrilas facilitando algumas de suas funções já existentes e diversificando outras aplicações como biomaterial.

2.4 Agentes naturais de ligações cruzadas

A fixação de tecidos biológicos, como colágeno, ou mesmo a melhoria de suas propriedades físicas e biológicas, pode aumentar a resistência e durabilidade destes substratos [2]. Vários agentes capazes de induzir ligações cruzadas, como formaldeído [45], glutaraldeído [18], compostos epóxicos e carbodiamida [46], tem sido usados, mas todos tem inconvenientes, como a toxicidade, dificuldade de controle da taxa e velocidade de ligação cruzada, e instabilidades [16]. Achar um agente indutor de ligação cruzada para o colágeno que possua baixa citotoxicidade, e que forme produtos biocompatíveis e desejáveis, traria benefícios tanto para campos como a engenharia de tecido como a odontologia adesiva.

Compostos de proantocianidina (PA) parecem bons candidatos para preencher estes requisitos. Eles são metabólitos naturais provenientes de plantas, largamente encontrado em frutas, vegetais, nozes, sementes, flores e caules [47]. PAs são bioflavonóides constituintes de um grupo específico de compostos polifenólicos e provem de uma categoria conhecidas como taninos condensados, uma das duas principais categorias de taninos de plantas [16]. Os compostos fenólicos proveniente das plantas podem ser subdivididos nas seguintes classes: acidos fenólicos, flavanona, flavona e flavonois, antocianidina e proantocianidina (Figura 2.3). Todos estes componentes fenólicos possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxilas[48]. PAs são conhecidas por diversos nomes, dentre os mais comuns estão OPC (proantocianidinas oligoméricas) e leucocianidinas [15].

Além da baixa citoroxicidade citada anteriormente outras vantagens inerentes a este tipo de agente indutor de ligação cruzada seria seu baixo custo e fácil obtenção, uma vez que são extraídos de sementes ou frutas encontradas abundantemente na natureza e já inseridas em programas de desenvolvimento sustentável.

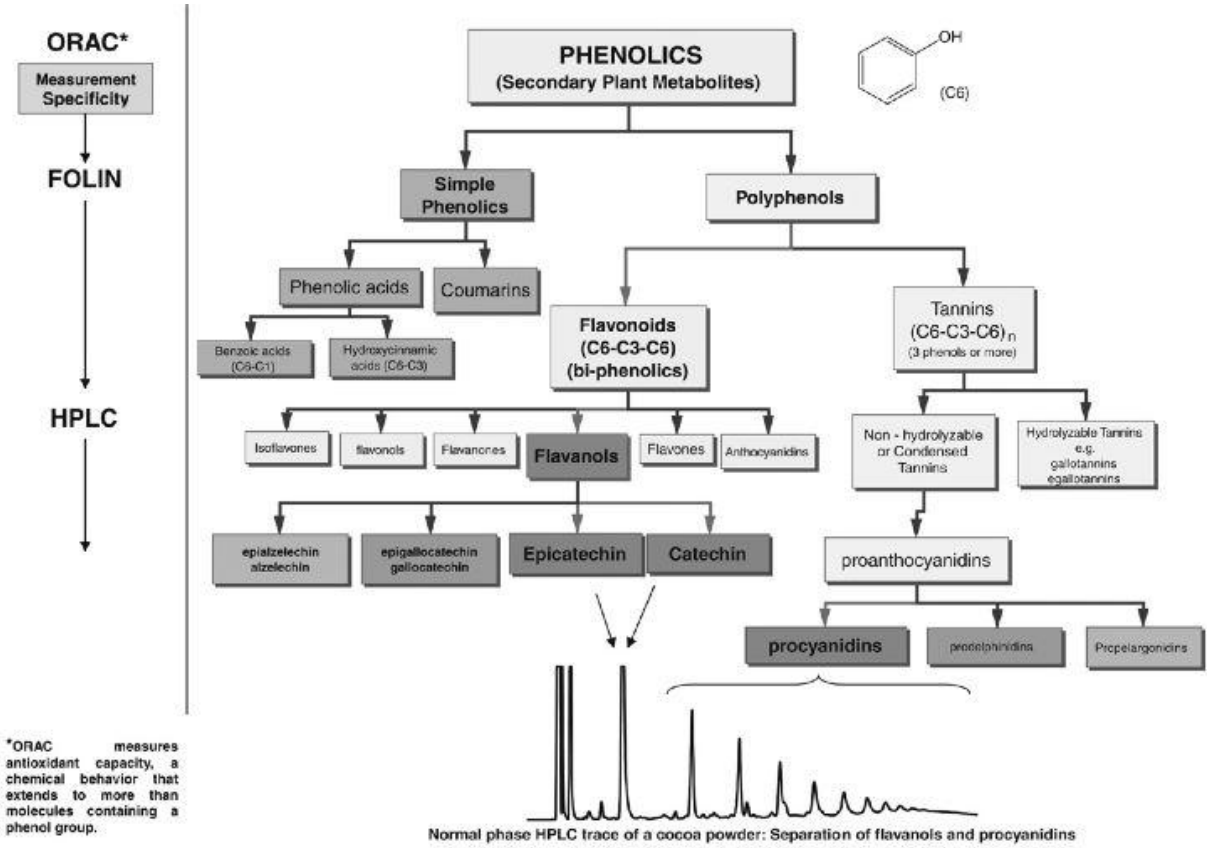


Figura 2.3 – Fluxograma mostrando a esquema de classificação dos polifenóis, de acordo com o numero de unidades fenólicas e hierarquia dos monômeros e polímeros dos flavonoides comuns. A especificidade dos métodos analíticos comuns de mensuração é fornecido (lado esquerdo). Um HPLC de pó de cacau demonstrando a separação de flavonois e procianidina é exemplificado. Obtido da Figure 1 – Analysis of Flavonols in food: What methods are required to enable meaningful health recommendations? [49] Concentimento obtido para o uso da imagem

2.4.1 Composição das PA

PAs são produtos naturais polifenólicos composto por subunidades de flavan-3-ol unidas principalmente por ligações C4-C8 (ou C6). Estes dois tipos de uniões são chamados de tipo B, quando uma ligação éter adicional é formada, normalmente entre C2 e C7, são chamadas de tipo A. Esta subclasse possui dois hidrogênios a menos que o tipo B [15]. Ligações do tipo A são encontradas no cacau, por exemplo. As ligações tipos A e B estão exemplificadas na figura 2.4.

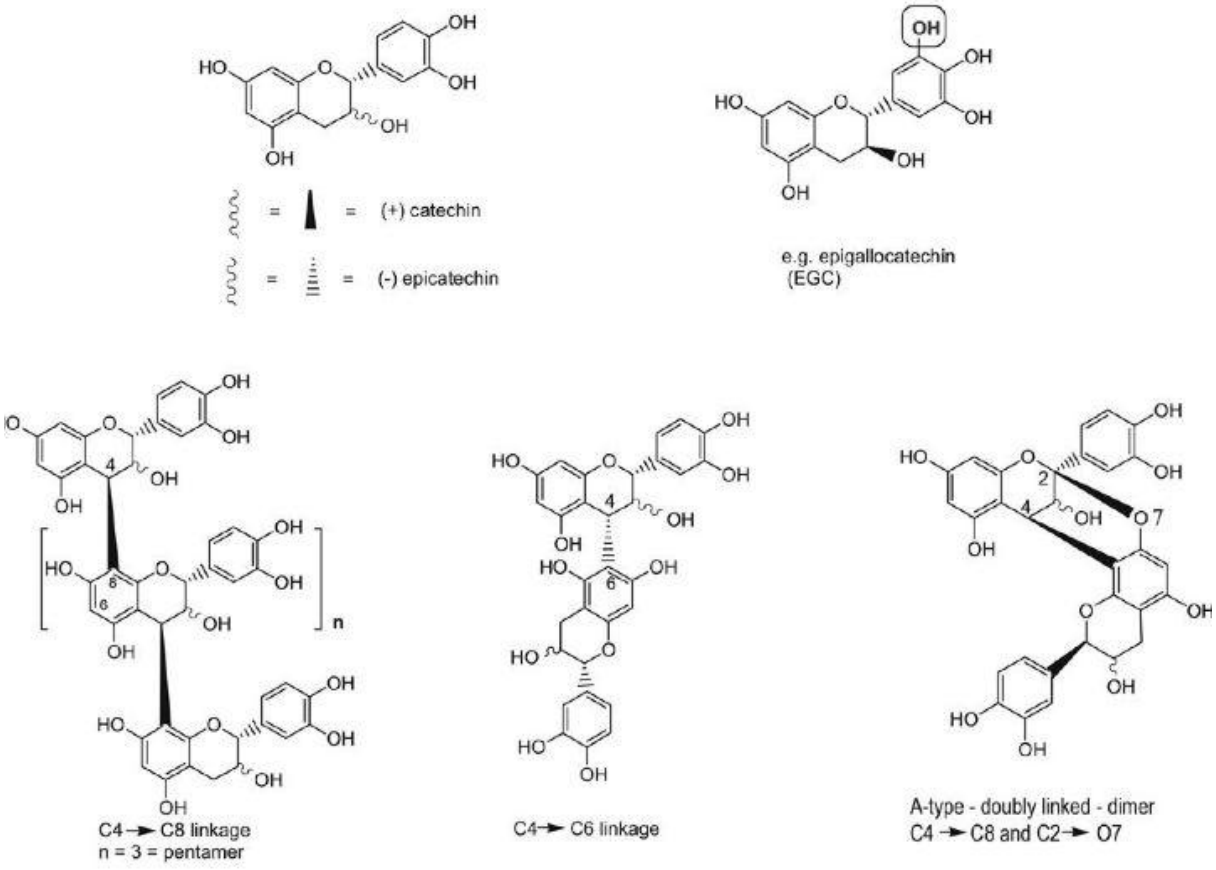


Figura 2.4 – Exemplos de características estruturais comuns em procianidinas. Monômeros, pentâmeros, e dois dímeros são mostrados. Diferença de ligação entre os díemros Tipo A e Tipo B. Epigalocatequina é um exemplo de variação estrutural de flavanols: grupo adicional de hidroxila em destaque na caixa. Adaptado da Figure 3 – Analysis of Flavonols in food: What methods are required to enable meaningful health recommendations? [49]. Concentimento obtido para o uso da imagem

Existe uma variedade de classes diferentes de PA dependendo dos padrões de substituições da flavan-3-ol, sua sub-unidade monomérica. Estas sub-unidades também podem carregar substitutos como o glicosil ou acil. O ácido gálico também pode estar presente. PAs podem ter uma alta diversidade estrutural, dependendo das unidades monoméricas presentes, sendo a catequina e a epicatequina as mais comuns. Em relação a estereoquímica da ligação entre C2-C3, pode existir a configuração *cis* ou *trans* [50]. A complexidade destes compostos é dada pela variação monomérica, tipos diferentes de ligações inter-flavonoides, e aos vários comprimentos de cadeia, conhecido como grau de

polimerização (DP) [15]. Cadeias de maior massa molecular são normalmente de tamanho moderado (>3000 Da), entretanto polímeros de altíssima massa molecular (20000 – 150000 kDa) também já foram descritos. O termo oligomérico normalmente refere aos dímeros até heptâmeros (n = 2~5), enquanto cadeias maiores são referidas como polímeros (n = 6~∞) [15].

2.4.2 Atividades biológicas das PA

Estes compostos são largamente usados como antioxidantes naturais, varredores de radicais livres, impedindo ou reduzindo a ação destas moléculas [51]. Podem também aumentar a síntese de colágeno e acelerar a conversão de colágeno solúvel em insolúvel durante seu desenvolvimento [52]. Em culturas de fibroblastos provenientes da pele de pacientes portadores de Ehlers-Danlos tipo V, uma doença hereditária na qual ocorre a formação de fibrilas colágenas com resistência diminuída, a excessividade da solubilidade do colágeno pôde ser corrigida pela adição de PA sintética ao meio de cultura [53]. Estes bioflavonóides mostraram em estudos com animais, uma inibição do catabolismo do colágeno solúvel [54], estimulando proliferação de fibroblastos normais da pele, e aumentando a síntese de matriz extracelular, incluindo colágeno e fibronectina [55].

Quatro mecanismos de interação entre PA e proteínas já foram postulados, dentre eles interações covalentes [56], interações iônicas [57], pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Han e colaboradores [16] (2003) mostraram que as interações entre PA e colágeno podem ser perturbadas por detergentes ou solventes enfraquecedores de pontes de hidrogênio [16], relatando que esta complexa interação envolve pontes de hidrogênio entre a carbonila da amida protéica com a hidroxila fenólica [58]. A prolina presente abundantemente no colágeno favorece, e, aumenta a especificidade da interação com a PA. Prolina é um imino acido com um oxigênio do grupo carbonila adjacente a um nitrogênio do grupo amina secundário, e pode ser um bom aceitador de pontes de hidrogênio [58].

A estabilidade da estrutura do colágeno mostrou ser reduzida quando ocorre o rompimento das pontes de hidrogênio N-H do esqueleto de alanina (ou

glicina) com o grupo carbonila da prolina adjacente da cadeia vizinha [40]. Este tipo de ligação seria favorecida pela estrutura helicoidal do colágeno, que seria capaz de proporcionar um melhor acesso ao esqueleto de peptídeo. As pontes de hidrogênio não só estabilizam a estrutura terciária como, são responsáveis por modificações de propriedades diversas do tecido fixado como aumento da temperatura de desnaturação [5].

A relativa grande estabilidade destas ligações cruzadas quando comparadas com outros polifenóis (como os taninos) sugerem especificidade à estrutura, que além de induzir pontes de hidrogênios, pode criar bolsos hidrofóbicos [16]. Estas interações hidrofóbicas ocorrem ainda na formação da estrutura terciária do colágeno, sendo descritas como forças não-covalentes de extrema importância para a estabilidade de uma estrutura enovelada. Neste estágio do desenvolvimento do colágeno as interações são resultantes da tendência das cadeias laterais hidrofóbicas – presentes em aminoácidos como alanina, isoleucina, valina - de serem atraídas umas pelas outras para agruparem-se em áreas específicas e definidas para minimizar seus contatos com a água. Quando circundados por moléculas de água, os grupos hidrofóbicos são induzidos a juntarem-se para ocupar o menor volume possível [40]. No caso da interação proteína/proantocianidina, estes bolsos hidrofóbicos são relatados como resultantes da tendência de empilhamento dos anéis aromáticos das PA contra os anéis de pirrolidona dos resíduos de prolina das proteínas ou peptídeos [16].

A citotoxicidade crônica é sempre a principal preocupação na concepção de materiais biomédicos utilizados *in vivo*. PAs são largamente utilizadas como suplemento alimentar, e sua ausência de toxicidade já foi extensivamente demonstrada [59]. Um ensaio de citotoxidade usando culturas de fibroblastos revelou que as PAs sao 120 vezes menos citotóxicas que o glutaraldeído (GD), utilizado normalmente como agente de ligação cruzada. O GD, mesmo após lavagem, continua sendo citotóxico, inibindo a síntese de colágeno, e aumentando a calcificação distrófica [60].

Outros efeitos benéficos relatados na utilização da PA são: atividades antibacterianas [61], antivirais, anti-cancerigenas [62], anti-inflamatórias [63] e anti-alergênica [59]. Além destes efeitos a PA mostrou atividade inibitória contra algumas enzimas, como fosfolipase A2, ciclooxigenase, lipooxigenase e receptores [64]. Embora tenha este efeito inibitório na maioria das enzimas, foi relatado em

estudos laboratoriais uma atividade benéfica em relação a enzima prolina hidroxilase, responsável pela hidroxilação da prolina que é essencial conforme visto anteriormente para a síntese do colágeno[63].

2.4.3 Parâmetros para utilização da PA como agente de ligação cruzada

Quanto ao efeito do pH sabe-se que a absorção de complexos entre PA-proteína é dependente do pH, com maior precipitação ocorrendo próximo ao ponto isoelétrico da proteína [65]. A faixa ótima para ligações entre PA e proteína pode normalmente ser observada em seu ambiente nativo, pois o colágeno possui mais grupos polares com capacidade de ligação com a água. Em seu ambiente nativo, o colágeno possui um conteúdo de água de 70 a 80% em peso [66]. O pH 7,4 pode ser considerado dentro da faixa ótima de atuação e também próximo ao pH das condições corporais.

Ku et al. [4] (2007) estudaram a dependência do tempo e concentração de PA proveniente do tronco de *Pinus radiata*, e encontraram que um maior tempo de contato aumentava a absorção de PA pelo colágeno [4]. Esta absorção era maior nos primeiros estágios e diminuía gradualmente até o equilíbrio, independente da concentração de PA nas soluções usadas no estudo. O período de equilíbrio é considerado o período onde houve a máxima absorção de PA na superfície das fibrilas colágenas, e a partir deste momento a absorção torna-se constante. No estudo supra-citado o período de equilíbrio se deu a partir de 285 min para a maioria das concentrações utilizadas. A fase inicial de maior absorção pode ser compreendida pelo número de sítios disponíveis para a ligação [67]. A absorção mostrou ser dependente da concentração de bioflavonóides nas soluções também. Quanto maior a concentração de PA na solução usada maior a absorção pelo colágeno, provavelmente devido a presença de mais sítios disponíveis para ligação [68].

Em relação a temperatura ideal para a ligação entre PA e colágeno, foi encontrada que a faixa entre 37 e 50°C é a que traz maiores benefícios. Abaixo de 25°C devido a baixa energia de movimentação molecular, a absorção foi prejudicada. A menor absorção acima de 50°C pode ser atribuída a deformação de

segunda ordem da estrutura macromolecular do colágeno, de tripla hélice para um espiral aleatório. Esta deformação pode ser causada por perdas de pontes de hidrogênio na hidroxila da prolina [4].

Portanto, a concentração (6,5%), pH (7,4) e temperatura (ambiente) das soluções indutoras de ligações cruzadas foram baseados na literatura prévia [4, 16, 18].

2.5 Características biomecânicas da matriz dentinária

2.5.1 Módulo de elasticidade

A mensuração do módulo de elasticidade (ME) da matriz extracelular refere-se a propriedade mecânica não apenas do colágeno, mas da malha colágena que inclui também proteínas não-colágenas. Sasaki e Odajima [69] (1996) relataram que o módulo de elasticidade do colágeno foi entre 2,9-9 GPa para tendões de Aquiles [69]. Ao contrário do tendão, as fibrilas colágenas da dentina estão dispostas aleatoriamente. Quando se aplica uma força na matriz de dentina desmineralizada a carga não é distribuída homogeneamente, mas é preferencialmente suportada pelas fibrilas orientadas na direção da força [70]. Por isso, não é surpresa que as propriedades de carga-deslocamento da dentina desmineralizada sejam diferentes dos tendões. A matriz orgânica da dentina ocupa apenas um total de 30-48% em volume da dentina [71, 72]. Zhang et al. [73] (1998) relatam que os valores de módulo de elasticidade mensurados poderiam ser duas a três vezes maiores se o estresse fosse dividido pela real área transversal das fibrilas colágenas [73]. A mensuração do ME no estudo de Zhang e colaboradores foi realizada através de dois métodos: o primeiro um ensaio destrutivo que mensurava a relação entre carga e deslocamento até a fratura do espécime, já o segundo, um ensaio não destrutivo com 10-12% de deslocamento [73]. Os autores relataram que embora muito utilizado, o ensaio destrutivo mostrava falta de consistencia dos resultados devido ao grande desvio-padrão e alta variabilidade promovida por este ensaio.

Atualmente o método de flexão em três pontos para a análise do ME com 3% de deslocamento da matriz orgânica da dentina desmineralizada é largamente utilizado pois é um método que por não ser destrutivo oferece a possibilidade de se usar o próprio corpo-de-prova como controle de seus resultados aumentando a capacidade e força estatística. Além de permitir análises múltiplas no mesmo corpo-de-prova [9]. Vale ressaltar que estudos que utilizaram esta metodologia constataram que 3% de deslocamento não produz nenhum tipo de deformação permanente nos espécimes, e portanto, completa recuperação elástica [18].

Maciel et al. [9] (1996) compararam em seu estudo o módulo de elasticidade por três pontos com o de cantilever para espécimes de dentina desmineralizada tratados com diferentes solventes [9]. Os autores encontraram resultados semelhantes para ambos os testes, quando o deslocamento mínimo é aplicado no teste convencional de três pontos (cantilever 6,3 + 2,8 MPa, três pontos 7,7+2,7 MPa em água).

O módulo de elasticidade da dentina desmineralizada não sofre alteração dependendo do método usado para a desmineralização. Carrilho e colaboradores [74] (2009) mostraram que os valores, em ensaio de flexão por três pontos não destrutivo, de módulo de elasticidade da dentina variaram de 4 a 6 MPa, e foram estatisticamente semelhantes quando desmineralizada em 10% acido fosfórico por 12 horas ou 0,5 mol/L EDTA por 6 dias [74].

2.5.2 Sorção de água

Dentre as propriedades físicas da matriz orgânica da dentina desmineralizada a sorção de água possui grande relação com a estabilidade térmica e degradação enzimática, descritas a seguir. Este não é um teste de muita popularidade para a matriz dentinária, muito embora a movimentação da água na camada hibrida leve a degradação de seus componentes [75].

O ataque hidrolítico à camada hibrida pode resultar em desintegração e desaparecimento de fibrilas colágenas desprovidas de recobrimento mineral ou resinoso [76]. Foi recentemente descrito que fibrilas de colágeno desnudas que estavam presentes na camada híbrida se tornavam menos sucetíveis à coloração

após envelhecimento, sugerindo que alguma forma de degradação hidrolítica ocorre dentro da camada híbrida em longos períodos [77].

A presença de água na matriz extra-celular também está diretamente relacionada com a atividade das metaloproteinases (MMPs). Esta família de enzimas zinco-dependente serão discutidas a seguir, porém vale ressaltar nesta etapa, que sua ativação é definida pela liberação do sítio ativo de zinco para se ligar a uma molécula de água e então atacar as ligações peptídicas do substrato protéico [78].

O aumento do número de ligações cruzadas em uma matriz de colágeno pode diminuir a absorção de água e consequentemente influenciar processos como a hidrólise [7, 79]. A rede formada pelas ligações cruzadas exógenas seria mais densa o que dificultaria a absorção de água pela matriz. Charulatha e Rajaram [7] (2003) estudaram a influência de vários agentes sintéticos de ligações cruzadas (glutaraldeído, dimetil 3,3′-dithiobispropionimidato, dimetil suberimidato) em membranas a base de colágeno tipo I. Todos os agentes provocaram uma diminuição estatística da absorção de água em relação ao grupo controle, diminuindo a sorção de água. A razão de sorção (*swelling ratio*) do grupo experimental tratado com glutaraldeído foi quase três vezes menor do que a razão do grupo controle que não obteve tratamento [7].

2.5.3 Estabilidade Térmica

Ultimamente, o aumento do interesse na estabilidade térmica da dentina vem crescendo [80]. Na endodontia a dentina radicular é exposta a temperaturas de até 300°C durante a compactação vertical da guta-percha termoplástica em uma obturação radicular. Isto pode ser quente o suficiente para desnaturar total ou parcialmente a matriz dentinária mineralizada adjacente [81]. Na odontologia restauradora adesiva o uso de acido fosfórico a 37% demineraliza uma camada superficial de 5-10 μm de dentina[73]. Presumivelmente, a perda de cristalitos de apatita faria a matriz dentinária mais suscetível à desnaturação térmica.

Armstrong et al. [80] (2008) estudaram a temperatura de desnaturação (Td) da matriz dentinária mineralizada e desmineralizada, saturadas ou não com água. A Td da dentina desmineralizada saturada com água foi de 65.6 °C. Quando a

água foi removida, a Td subiu para 176.1 °C. Este valor não foi estatisticamente diferente da dentina hidratada mineralizada (170.4 °C). Os autores afirmam que esta maior resistência/estabilidade térmica seria devido as ligações cruzadas covalentes entre os peptídeos do colágeno [80].

A estabilidade térmica de moléculas de colágeno representa a resistência ao "desdobramento" das cadeias de colágeno como resultado ao aquecimento. Acredita-se que aconteça primeiramente a separação da tripla hélice em hélices individuais, devido ao rompimento entre as ligações de hidrogênio das cadeias polipeptídicas [82, 83]. As hélices separadas desdobram-se em frações aleatórias devido ao rompimento das ligações covalentes dentro da própria hélice [84]. Em estudos prévios da temperatura de desnaturação em tendões de cauda de rato e peles de bezerros também foi encontrada uma maior temperatura quando os tecidos estavam desidratados [85]. O(s) mecanismo(s) responsáveis por este efeito não são completamente entendidos. A perda de água parece colapsar a matriz fibrilar do colágeno deixando-a em um estado mais denso, e também, ocorrem impedimentos maiores a vibrações moleculares em temperaturas mais altas [86].

Danilov et al. [5] (2008) relataram que a utilização de gliceraldeído, um agente de ligação sintético, em espécimes de colágeno tipo I provenientes da esclera de coelho aumentou a estabilidade térmica dos espécimes (Td= 80°C) em relação ao grupo não tratado (Td= 68°C), assim como a resistência proteolítica e características biomecânicas [5]. Miles e Ghelashvili propuseram que a Td mais alta do colágeno insolúvel em relação ao colágeno mais solúvel era devido a influência de estabilização das moléculas adjacentes [86]. Os autores sugerem que esta estabilização aumentava proporcionalmente a perda de água, diminuindo a distância das fibrilas colágenas. Outra interpretação seria a possibilidade dos peptídeos das fibrilas colágenas colapsadas de formarem novas e intrínsecas associações por ligações fracas como ligações entre hidrogênio, em adição às ligações cruzadas covalentes, que conforme visto, são essenciais para a manutenção da estabilidade da tripla hélice. Estas novas ligações de hidrogênio enrijecem e fortificam a matriz de colágeno, deixando-a mais estável em temperadores elevadas. Quando re-hidratadas estas matrizes perdem rapidamente a rigidez, indicando que o processo é reversível devido a força de caráter mais fraca, não covalentes [80].

Outro estudo relata o efeito de ligações cruzadas promovidas por diversos

aldeídos na estabilidade térmica do colágeno tipo I. Os autores acharam valores para colágeno nativo (Td 65±1°C), e para colágeno tratado com formaldeído (Td 89±1°C), glutaraldeído (Td 86±1°C), crotanaldeído (Td 79±1°C) e glioxal (Td 83±1°C) [87].

2.5.4 Degradação enzimática

A maior parte do colágeno nativo é insolúvel, e apenas 2-3% pode ser solubilizado em soluções de ácidos diluídos. O colágeno insolúvel, ou pelo menos grande parte dele, pode ser solubilizado por enzimas proteolíticas [2].

O colágeno é resistente a maioria das enzimas exceto às colagenases [88]. Estas são classes de metaloproteinases da matriz (MMPs), que estão disponíveis em diferentes fontes, sendo seu modo de ação dependente da sua proveniência. Colagenases são classes de enzimas capazes de clivar as ligações peptídicas dentro da estrutura da tripla-hélice do colágeno em condições fisiológicas de pH e temperatura [89]. Enquanto a colagenase bacteriana proveniente de *Clostridium histolyticum* cliva o colágeno em múltiplos sítios, ou seja, diversos fragmentos de peptídeos, a colagenase dos mamíferos separa em apenas dois fragmentos ¼ e ¾ [90]. Colagenase bacteriana tem especificidade para a região Pro-X-Gly-Pro-Y, separando entre o aminoácido X e a Gly [91].

As MMPs intrínsecas ao organismo são endopeptidases [92] dependentes de zinco e cálcio, e ficam presas na matriz dentinária mineralizada durante o desenvolvimento do dente [93]. A liberação e conseqüente ativação destas enzimas durante procedimentos adesivos na dentina, são possivelmente responsáveis pelo afinamento e desaparecimento do colágeno desprotegido da camada hibrida em estudos de envelhecimento *in vitro* [77]. A evidência de atividade colagenolítica/gelatinolítica na matriz colágena da dentina desmineralizada parcialmente são provas indiretas da existência das MMPs na dentina humana, sendo que a MMP-2 e a MMP-9 já foram detectadas através de zimografias e ensaios de *western-blots* [94]. Especula-se que elas são sintetizadas e liberadas em demanda como parte do complexo mecanismo biológico [95]. Este processo

sincroniza a degradação do colágeno com a sua biossíntese, no controle do crescimento, morfogênese e reparos.

Vários estudos tem sido feitos para entender a atividade das colagenases no colágeno. Recentemente, microscópio de forca atômica (MFA) tem sido utilizado para observar diretamente a degradação das fibrilas colágeno tipo I por este tipo de enzima [87]. O aumento do número de ligações cruzada na molécula de colágeno é capaz de aumentar a sua resistência à degradação por colagenase. Fathima et al. [87] (2004) relatam que este processo de ligação cruzada é o principal objetivo do curtimento, que é o processo que converte pele de animais em estado natural em couro. Tradicionalmente, os aldeídos, como glutaraldeído e formaldeído, tem sido utilizados na indústria de couro para estabilizar a pele contra degradação.

A literatura atual mostra um recorrente aumento da resistência à degradação de espécimes de colágeno tipo I, contra a ação das colagenases, quando tratados com agentes de ligações cruzadas, sendo eles sintéticos ou naturais. Bedran-Russo et al. [14] (2009) analisaram o efeito do acido tânico (TA) como agente de ligação cruzada do colágeno dentinário. Os autores mensuraram a degradação enzimática pelo teste de resistência coesiva da matriz dentinária (UTS) tratada com diferentes concentrações de TA. Após 24 horas na solução de colagenase (CO) o grupo controle (não tratado) encontrou-se completamente digerido. Já os grupos tratados com TA encontraram valores estatisticamente similares aos espécimes deixados apenas na solução tampão (ST) pelo mesmo período de tempo (TA 20% CO=16,93±5,79, ST=15,64±3,61; 10%TA CO=14,87±4,87, ST=14,26±4,65; 1%TA CO=13,87±4,26, ST=10,85±4,36) [14].

2.6 Dentina como substrato adesivo

Apesar de melhoras consideráveis nos sistemas adesivos nos últimos anos, a interface adesiva continua sendo o elo fraco em uma restauração adesiva. Se a interface dentinária adesiva é exposta ao meio oral, descoloração marginal, uma falta de adaptação marginal e conseqüente perda da restauração são resultados normalmente encontrados [96, 97]. Apesar dos trabalhos que analisam a resistência

de união imediata ou de curtos períodos apresentarem altos valores[98], a durabilidade e estabilidade das interfaces de dentina, com alguns sistemas adesivos, continuam questionáveis [99]. De Munck et al. [99] (2005) afirmaram que a resistência adesiva imediata pouco se relaciona com a longevidade destas restaurações, uma vez que degradação através da camada de dentina da interface ocorre rapidamente (cerca de 6 meses) [99].

2.6.1 Degradação ao longo do tempo

Conforme já citado a adesão é criada pela impregnação do substrato dentinário por misturas monoméricas resinosas, a estabilidade da interface apóia-se na criação de uma camada híbrida compacta e homogenia. Para os adesivos que necessitam do condicionamento prévio com acido fosfórico, o adesivo deve infiltrar completamente a camada de dentina desmineralizada [100]. Carrilho et al. (2005) avaliaram a durabilidade de restaurações feitas com um sistema adesivo a base de água e etanol (Single-bond) e outro a base de acetona (One-Step), quando armazenadas em água e óleo por 1 ano. Os autores relataram uma redução estatisticamente significante para ambos os sistemas adesivos quando armazenados por longos períodos em água [101]. Os mesmos sistemas adesivos foram utilizados por Loguercio e colaboradores [102] (2005). Os autores analisaram a resistência de união entre a dentina e compósito, na forma de palitos para microtração e a coroa não cortada restaurada, imediatamente (IM) e após seis meses (6M) de armazenagem em água. Independente da forma dos espécimes armazenados, a resistência de união diminui para ambos os adesivos após 6 meses (Single Bond: IM-37,8±4,9, 6M-19,2±7,3; One Step: IM-39,9±5,4, 6M-14,6±7,6) [102].

A longevidade clinica das interfaces adesivas parece envolver tanto aspectos químicos e físicos. Fatores físicos seriam forças mastigatórias oclusais, e as repetitivas tensões de expansões e contrações devido as variações de temperatura na cavidade oral [99, 103]. Já os químicos são agentes quimicamente ácidos no fluído dentinário, saliva, comida, bebida e produtos bacterianos, que também desafiam a interface resultando em: diversos padrões de degradação da

fibrilas colágenas sem proteção [104], eluição de monômeros [105], e degradação dos componentes resinosos [99]. Como a camada híbrida é resultante da mistura de matriz orgânica, cristais de hidroxiapatita residual, monômeros resinosos e solventes, o envelhecimento pode afetar cada componente separadamente ou a combinação de todos.

A matriz orgânica dentinária representa cerca uma parte significante do tecido dentinário hígido [72] então, o entendimento do arranjo tridimensional é necessário para o esclarecimento dos mecanismos de adesão e, também, da interação das fibrilas colágenas com os monômeros adesivos. Já foi discutido anteriormente o arranjo das fibrilas de colágeno (medindo cada uma cerca de 50-70 nm de diâmetro) interagindo com as proteínas não-colágenas (na ordem de 20-40 nm em diâmetro), produzindo a periodicidade de 67 nm de fibrilas colágenas maduras desmineralizadas, tipicamente vista nas microscopias de transmissão e varredura. Esta imagem tão característica de fibrilas colágenas não é encontrada em trabalhos de longevidade de restaurações adesivas, isto porque, a desorganização das fibrilas e a completa degradação delas é o achado mais freqüente [106].

Hashimoto et al. descreveram dois padrões de comportamento da camada hibrida, em restaurações com adesivos de três passos com condicionamento acido prévio, após 1 ano de armazenagem em água. Tanto a desorganização das fibrilas colágenas como a degradação hidrolítica da resina nos espaços interfibrilares da camada hibrida foram capazes de enfraquecer a resistência de união [107]. A hidrólise da resina é um processo químico que é capaz de romper as ligações covalentes entre os polímeros, pela adição de água às ligações de ésteres, resultando na perda da massa de resina [108]. A degradação resinosa está diretamente relacionada a sorção de água tanto das resinas, adesivos e rede de matriz orgânica [109]. Estudos tem mostrado evidências morfológicas da eluição resinosa e/ou degradação hidrolítica da matriz colágena após armazenamento de longa duração [12, 110]. Especificamente, a degradação das fibrilas, detectável tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, sugere que estas estejam expostas na camada híbrida [104, 106].

Estas fibrilas desprotegidas podem se tornar suscetíveis a degradação também enzimática, conforme citado anteriormente [111]. Estudos recentes revelaram a contribuição das MMPs provenientes do organismo na digestão das

matrizes de colágeno na patogêneses da cárie dentinária e doenças periodontais, com potenciais implicações para a resistência de união [93, 112]. Pashley et al. [113] (2004) reportaram que dentina condicionada com acido fosfórico pode ser degradada ao longo do tempo por enzimas proteolíticas derivadas da dentina, na ausência de total de bactérias e em condições assépticas [113]. Neste estudo, matrizes de colágeno parcialmente desmineralizadas, obtidas da dentina humana, foram armazenadas em saliva artificial e um outro grupo armazenado em saliva artificial com adição de inibidores de enzimas proteolíticas ou em óleo puro. As matrizes de dentina foram quase completamente destruídas, mas isto não ocorreu quando incubadas com inibidores ou óleo, e ainda o estudo mostrou uma diferença estatística na espessura e na condição da rede de colágeno quando comparados ao grupo controle.

O objetivo final dos procedimentos adesivos é a completa infiltração, e o encapsulamento das fibrilas colágenas pela resina é recomendável em ordem de protegê-las contra degradação [106]. É sabido que este encapsulamento varia de acordo com o tipo do sistema adesivo utilizado, por exemplo auto-condicionante versus o condicionamento ácido [12]. Para estes últimos, a diminuição do gradiente de difusão monomérica na dentina condicionada resulta em zonas de incompleta infiltração na base da camada hibrida e na dentina desmineralizada condicionada que contém fibrilas colágeno desprotegidas [114]. Uma das razões para a discrepância entre a profundidade da dentina desmineralizada pelo condicionamento é a infiltração dos monômeros do adesivo, e também a insolubilidade do BIS-GMA na dentina saturada pela água [115].

2.6.2 Opções para aumentar a longevidade e RU

Como a resistência de união está intimamente correlacionada com a qualidade da camada híbrida [99], provavelmente mais do que a espessura ou morfologia desta, diferentes abordagens clinicas foram propostas para aumentar a penetração monomérica, diminuindo a taxa de sorção de água e também a degradação do colágeno.

O uso da camadas adicionais de resinas hidrofóbicas [116], aplicações de múltiplas camadas [117], maior evaporação de solventes [118], troca da saturação dentinária de água para etanol [119], maior tempo de polimerização [105], utilização de inibidores de MMP [120], o uso de corrente elétricas para aumentar a impregnação monomérica [118], são métodos que já mostraram aumentar a adesão entre compósitos e dentina.

O aumento da propriedade mecânica do substrato dentinário desmineralizado com agentes indutores de ligações cruzadas já foi abordado na literatura [14, 20]. Al-Ammar et al. [20] (2009) restauraram dentes tratados (após o condicionamento ácido) com diferentes agentes de ligações cruzadas como glutaraldeído (GD), extrato de semente de uva (GSE) e genipin (GE). Os autores relataram um aumento da resistência de união para GSE e GD, para ambos os adesivos Single Bond-SB (GSE=71,06±14,59; GD=68,96±3,91) e One Step-OS (GSE=71,4±10,08; GD=65,46±8,06), quando comparados com o grupo controle (SB=33,78±6,79; OS=44,13±8,54) [20]. Em outro estudo, Bedran-Russo et al. [14] (2009) analisaram a resistência de união da dentina tratada em soluções de acido tânico, conhecido por promover ligações cruzadas com o colágeno, com diferentes pH (2,8 e 7,2). Os sistemas adesivos usados foram os mesmos que descritos para o ultimo estudo (SB e OS), e os resultados mostraram que independente do pH, o acido tânico foi capaz de aumentar significativamente a resistência de união da dentina quando comparado com o controle [14].

2.6.3 Agentes de ligação cruzadas ricos em PA e longevidade adesiva

Embasado nas informações descritas anteriormente sobre a interação dos compostos naturais ricos em proantocianidina e proteínas ricas em prolina, como o colágeno, este trabalho tem como racional verificar diversos agentes ricos em PA e seus parametros de utilização, como agentes indutores de ligações cruzadas capazes não só de fortalecer, reestruturar e estabilizar a rede de fibrilas como também melhorar a sua atribuição como substrato para restaurações adesivas principalmente de longa duração.

3 PROPOSIÇÃO

O trabalho foi dividido em quatro estudos dependentes, mas com proposições e hipóteses próprias:

I. Validar extratos comerciais, ricos em PA, de fontes distintas como agentes de ligação cruzada do colágeno tipo I dentinário, variando o tempo de armazenamento.

Hipótese nula: Não haverá diferença no módulo de elasticidade da matriz orgânica dentinária, independente do período de exposição ou armazenamento, tratada com diferentes fontes de biomodificadores ricos em PA em relação aos grupos controles .

II. Estudar parâmetros das soluções a base de PA como: procedência, tempo de aplicação, solubilidade e concentração.

Hipótese nula: Os agentes de ligação cruzada a base de PA não afetarão as propriedades elásticas da dentina desmineralizada quando comparados aos grupos não tratados, independente do tipo de solvente usado, concentração, tempo de aplicação ou procedência.

III. Caracterizar a dentina desmineralizada tratada com agentes de ligação cruzada ricos em PA.

Hipótese nula: O uso de agentes de ligações cruzadas a base de PA não modificará as propriedades da matriz orgânica dentinária.

IV. Analisar a resistência de união imediata e após armazenamento, entre dentina tratada com PA e compósitos.

Hipótese nula: A resistência de união, imediata ou após armazenamento. entre a dentina tratada com agentes a base de PA será similar a aquela da dentina não tratada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os dentes utilizados neste estudos, molares hígidos, tiveram concordância do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Illinois em Chicago (processo # 2009 – 0198) e do Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP (protocolo 12/08) (Anexo A).

4.1 Efetividade de diferentes extratos naturais a base de PA como agentes de ligação cruzada com o colágeno dentinário

Método: Módulo de elasticidade

Extratos: Semente de Uva, Cacau, Oxicoco, Canela, Açaí

Solventes: Água destilada, etanol

Concentrações: 6,5%

Armazenamento: Imediato, 3, 6 e 12 meses

Dezesseis molares humanos foram utilizados para a análise do módulo de elasticidade. Os dentes foram limpos de debris e, suas superfícies oclusais removidas com auxílio de um disco de diamante em alta-rotação (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), expondo dentina coronária, sob a junção amelodentinária (JAD). A porção radicular foi cortada 1 mm abaixo da junção esmalte cemento (JEC) e descartada. Já a porção coronária foi cortada em fatias de 0,5 mm (± 0,1) na direção mesio-distal, por meio de disco de diamante (180 rpm) acoplado a máquina de corte Isomet (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), sob constante refrigeração. As fatias foram posteriormente desgastadas com uma broca cilíndrica em alta rotação (n. 557D, Brasseler, Savannah, GA), até se atingir uma dimensão retangular final de 0,5 mm de espessura X 1,7 mm de altura X 7 mm de comprimento. Uma marca foi feita em uma superfície para permitir que as mensurações repetidas fossem realizadas na mesma superfície.

Os corpos-de-prova (cp) foram imersos em solução a 10% de ácido fosfórico (LabChem, Pittsburgh, PA) por 5 horas, radiografados (Ektaspeed Plus- Eastman

Kodak Company; GE 1000-General Eletrical Company Milwaukee, Wisconsin, EUA; 65 kVp, 10 mA, tempo de exposição de 0,4 s) para verificar a completa desmineralização tecidual. Estes, então, foram lavados abundantemente com água destilada por 10 minutos para remover qualquer resíduo de ácido. Os grupos experimentais foram 5 (n=10), conforme demonstrado na tabela 4.1.

Dois grupos controles foram realizados para comparação dos resultados, um utilizando água destilada (DW) e outro na proporção de 50/50 água e etanol (ETW). Foram realizadas os mesmos procedimentos para os grupos controles e para os grupos experimentais.

O pH levemente ácido de algumas soluções foram ajustados para 7,4 utilizando NaOH. Após o ajuste do pH, as soluções foram filtradas através de filtro de papel n°6 (Whatman, Londres, Inglaterra). Os espécimes foram testados primeiramente sem nenhum tratamento (*baseline*) e depois imersos em suas respectivas soluções por tempos de 10, 30, 60, 120 e 240 minutos. O método de flexão por três pontos foi escolhido para o cálculo do módulo de elasticidade, as vantagens deste método estão relacionadas com a não destruição dos cp, permitindo a realização de outros testes em tempos diferentes e também não há necessidade de fixar os espécimes de tamanhos reduzidos. As etapas experimentais estão ilustradas na figura 4.1.

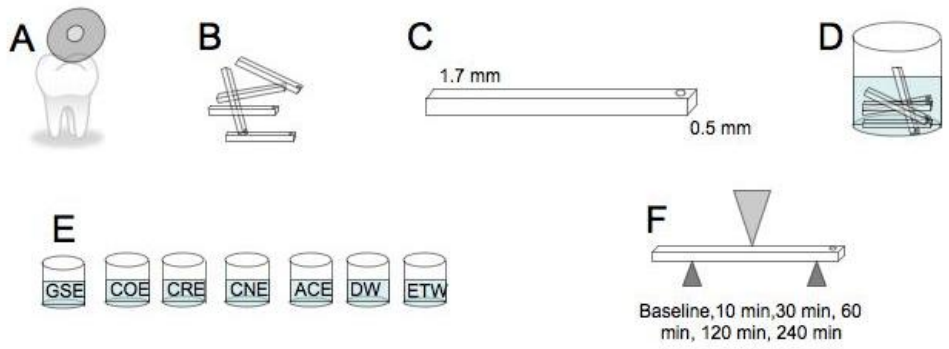


Figura 4.1 – Etapas experimentais. A – Corte das coroas dos molares íntegros. B – palitos retangulares de dentina. C - dimensão dos palitos. D – desmineralização com ácido fosfórico. E - imersão nas soluções por tempos distintos. F- ensaio microflexural

Tabela 4.1 - Relação entre os grupos experimentais, as respectivas composições das soluções utilizadas, fabricantes, conteúdo de PA, sistema de solvente e método de extração utilizado

Grupos	Características dos extratos				
	Composição (p/v)	Fabricante	Sistema de solvente	Conteúdo de PA *	Método de extração *
GSE	6,5% extrato de semente de uva	Vitis vinifera, Mega-Natural extrato de semente de uva dourado, Lote 13682503-01, Polyphenolics Madera, CA, EUA	Água destilada	95%	Água quente
CSE	6,5% extrato de semente de cacau	Theobroma cacao, Polyphenol, Lote CMIE-7LJJKF-Foratero, Barry Callebaut, Lebbeke-Wieze, Bélgica	Etanol-água (50/50)	45%	30% acetona – água
CRE	6,5% extrato de oxicoco	*Vaccinium macrocarpon*,NutriCran 90S 90% pó de oxicoco, Lote 080118 , Degas Botanical Synergies, Carver, MA, EUA	Água destilada	Maximo 0,95%	Água e *spray dried*
CNE	6,5% extrato de canela	Cinnamomun cassia, extrato de caule em pó de canela, C-0154130, Draco Natural Products, San Jose, CA, EUA	Água destilada	Maximo 8%	Extração em água com controle de temperatura , *spray dried*
ACE	6,5% extrato de açaí	Euterpe oleraceae, extrato de açaí, Lote ACAXX02/0407S Santosflora Comercio de Ervas, SP, Brasil	Água destilada	Maximo 1%	*Spray Dryer*

*Informação do fabricante.

GSE- extrato de semente de uva; CSE- extrato de cacau; CRE- extrato de oxicoco; CNE- extrato de canela; ACE- extrato de açaí

Os espécimes foram testados em compressão, imersos em água destilada, utilizando uma maquina de ensaios EZ Graph (Shimadzu, Kyoto, Japao) com uma célula de carga de 50 gramas e velocidade de 0,5 mm/min (Figura 4.2). As curvas de carga-deslocamento foram substituídas por curvas de tensão-deformação que serviram de base para o cálculo do módulo de elasticidade, utilizando-se a seguinte formula [121]:

$$D = \varepsilon L^2/6T$$

onde, D é o deslocamento expresso em milímetros, ε é a tensão, L a distância entre suportes e T a espessura do cp. Então, o módulo de elasticidade (E) foi calculado em MPa com a fórmula [121]:

$$E = PL^3/4DbT$$

sendo, P a carga máxima, L a distância entre suportes, D o deslocamento, b é a largura e T a espessura do cp.

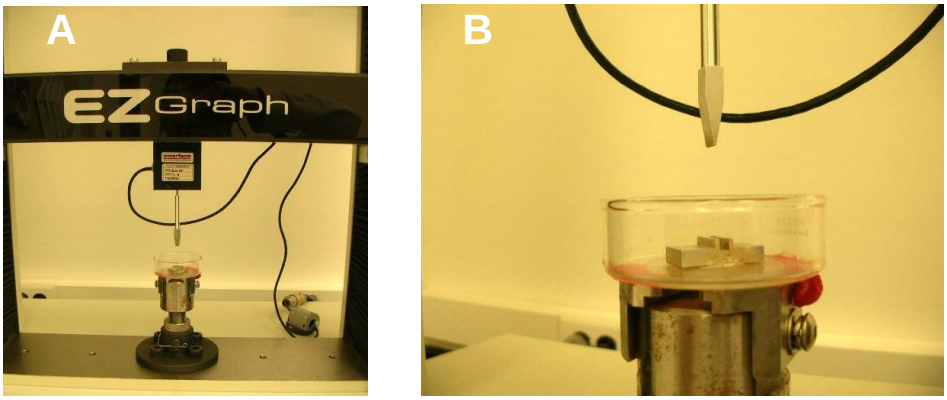


Figura 4.2 - A: dispositivo para o ensaio de flexão em três pontos posicionado na máquina de teste universal; B: dispositivo sem água em maior aumento

Após as mensurações imediatas, os espécimes foram armazenados em saliva artificial, a 37°C por até 12 meses. A saliva artificial foi manipulada contendo os seguintes químicos: 1,5 mM de Cálcio, 0,9 mM de Fosfato em uma solução tampão de TRIS 0,1M em um pH de 7,0 [122]. Trocas do meio de armazenamento foram

feitas a cada 15 dias. Mensurações de módulo de elasticidade foram feitas em 3, 6 e 12 meses e os resultados expressos em MPa.

Os dados foram coletados e analisados estatisticamente usando duas ANOVA para medidas repetidas de dois fatores (tipo de tratamento e tempo de exposição ao tratamento; tipo de tratamento e longevidade), e teste Tukey quando necessário (α= 0,05).

4.2 Estudo dos parâmetros das soluções a base de PA: Solubilidade, procedência e/ou fabricante, tempo de aplicação e concentração dos extratos escolhidos

Método: Modulo de elasticidade e Parâmetro de Solubilidade de Hansen

Extratos: Semente de Uva e Cacau

Fabricante dos extratos: Semente de uva – Polyphenolics (EUA), Sanrisil (Br); Cacau - Barry Callebaut (Be)

Solventes: Água destilada, etanol e acetona

Concentrações: 0,65%, 3,25%, 6,5%, 15% e 30%

Solubilidade e Procedência

Para esta parte do trabalho apenas os dois extratos que mostraram melhores resultados na ultima parte foram escolhidos: a semente de uva e o cacau. Para verificar se a procedência, ou seja, se os parâmetros de fabricação influenciavam de maneira significativa os extratos comerciais de semente de uva, escolhemos dois fabricantes de locais diferentes: Polyphenolics *(*GSEP-*Vitis vinifera*, extrato de semente de uva dourado, Lote 13682503-01, Madera, CA, EUA) e Sanrisil (GSES-*Vitis vinifera*, extrato seco de semente de uva, Lote 84277, São Paulo, Brasil). O extrato de cacau utilizado foi o mesmo que na Parte 4.1 (CSE-Barry Callebaut).

Vários solventes (etanol-água, acetona-água e água destilada) foram utilizados para o preparo das soluções de PA. Todos os produtos químicos (etil álcool anidrous, ≥99,5% e acetona, ≥99,9%, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados sem mais nenhuma purificação.

Trinta molares humanos foram utilizados. A metodologia utilizada foi a mesma descrita anteriormente para a mensuração do módulo de elasticidade. Para o estudo do comportamento dos extratos em diferentes sistemas de solventes, os grupos experimentais foram 9 (n=10):

1. 6,5% (p/v) GSEP em soluções.
2. 6,5% (p/v) GSES em soluções.
3. 6,5% (p/v) CSE em soluções.

Extratos foram dissolvidos nas seguintes soluções:

A. 100% água destilada (água destilada, DW).

B. Solução de etanol-água (50:50, ET).

C. Solução de acetona-água (30:70, AC).

Solventes puros e suas misturas foram utilizados como controle negativo.

Os ensaios foram realizados nos tempos: base, 10, 30, 60, 120, 240 minutos, em água destilada, exatamente como descrito na Parte 4.1. Os dados coletados foram analisados estatisticamente através de uma ANOVA de dois fatores (sistema de solvente e tipo de tratamento) para cada período de tempo usando o programa SPSS e teste Tukey (α= 0,05).

Parâmetro de Solubilidade de Hansen (HSP)

A utilização da Teoria dos Parâmetros de Solubilidade de Hansen permite a determinação do solvente ou sistema de solvente mais adequado para um determinado soluto, por meio de cálculos termodinâmicos. Essa teoria é baseada fundamentalmente em três forças:

- δD: força de dispersão de London,

-δP: força de atração/repulsão devido à polaridade das moléculas,

-δH: força da ligação de hidrogênio,

A aproximação pela soma das três forças supra-descritas seria a densidade de energia coesiva (δt) [123]. Os parâmetros de solubilidade para os solventes foram calculados de acordo com seus volumes molares e também suas concentrações quando em misturas. A solubilidade mútua entre um soluto *i* e um solvente *j* foi calculada, quando não encontrada na literatura, pelo seguinte parâmetro [123]:

$$(\Delta\delta_{i,j})^2 = [4(\delta^i_d - \delta^j_d)^2 + (\delta^i_p - \delta^j_p)^2 + (\delta^i_h - \delta^j_h)^2]^2$$

Concentração e tempo de aplicação

Para a realização desta etapa do estudo apenas o extrato de semente de uva de melhor resultado no último estudo (Polyphenolics-*Vitis vinifera*, extrato de semente de uva dourado, Lote 13682503-01, Madera, CA, EUA) dissolvido no solvente que proporcionou os melhores resultados (água destilada) foram utilizados.

A metodologia utilizada foi a mesma descrita anteriormente para o calculo do módulo de elasticidade. Para o estudo do comportamento do extrato em diferentes concentrações, os grupos foram (n=10): 0,65%, 3,25%, 6,5%, 15% e 30% (p/v) de extrato de semente de uva (GSE).

Foi elaborada uma curva de dose X resposta para este extrato em relação ao seu potencial como agente de ligação cruzada com o colágeno. Os dados coletados foram analisados estatisticamente através de uma ANOVA de medidas repetidas e teste Tukey (α=0,05).

4.3 Caracterização da dentina desmineralizada tratada com extratos a base de PA

Método: Sorção, calorimetria, degradação enzimática e microscopia eletrônica de varredura

Extratos: Semente de Uva (Polyphenolics-GSE) e Cacau (Barry Callebaut-CSE)

Solventes: Água destilada e acetona

Concentrações: 6,5%

Sorção

Para esta parte do trabalho apenas dois extratos e dois solventes foram analisados. Os extratos utilizados foram semente de uva (GSE) e cacau (CSE), nos respectivos solventes, água destilada e acetona-água (30:70).

Os procedimentos até o tratamento dos espécimes pelos extratos a base de PA são iguais aos descritos para o método de mensuração do módulo de elasticidade. Os espécimes desmineralizados, provenientes de 6 molares hígidos,

com as mesmas dimensões (0,5 x 1,7 x 7,0 mm), foram tratados por 1 hora nas soluções, que foram feitas da mesma maneira descritas anteriormente. Os grupos estudados foram (n=10): 6,5% GSE em água destilada, 6,5% CSE em acetona, e grupos controles de água destilada e acetona-água (30/70).

Apos o tratamento, os espécimes foram lavados abundantemente com água destilada e equilibrado durante 12 horas em solução de soro fisiológico. A solução teve seu pH ajustado em 7,4 e foi mantida em temperatura ambiente durante todo o processo. Os espécimes foram então, removidos e rapidamente o excesso de umidade foi retirado com auxilio de um filtro de papel e pesados imediatamente.

Os cp foram então colocados em um grande volume de água deionizada para remoção de sais e seco com leve jato de ar até adquirir peso constante. A sorção (*Q*) foi calculada como a razão entre o peso do espécime úmido e o peso do espécime seco [7].

Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS general linear model seguidos de teste Tukey com intervalo de confiança de 95%.

Calorimetria

Três molares hígidos foram utilizados para esta fase do trabalho. Estes foram limpos de debris e, suas superfícies oclusais removidas com auxílio de um disco de diamante em alta-rotação (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), expondo dentina coronária, sob JAD. A porção radicular foi cortada 1 mm abaixo da JEC descartada. Já a porção coronária foi cortada em fatias de 0,2mm (± 0,1) na direção mesio-distal, por meio de disco de diamante (180 rpm) acoplado a máquina de corte Isomet (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), sob constante refrigeração. As fatias foram posteriormente desgastadas com uma broca cilíndrica em alta rotação (n. 557D, Brasseler, Savannah, GA), até se atingir uma dimensão retangular final de 0,2 mm de espessura X 2 mm de altura X 2 mm de comprimento.

Os espécimes foram desmineralizados conforme descrito anteriormente e tratados com um dos seguintes grupos (n=5):

1. água destilada;
2. 6,5% de GSE em água destilada;
3. 6,5% de CSE em acetona-água.

A estabilidade térmica foi acessada após 1 hora de tratamento. Os espécimes foram selados em panelas de alumínio para alta pressão (PerkinElmer, Il, EUA), pesados e colocados em um *scanning calorimeter* como mostrado na figura 4.3 (DSC, Pyrus 1, PerkinElmer, Il, EUA). Para cada ensaio, os espécimes foram aquecidos de 25 a 130ºC em uma velocidade de 5ºC por minuto. Apos o resfriamento subseqüente, os espécimes eram novamente aquecidos para confirmar a desnaturação, sendo este um processo irreversível [80].

O DSC foi calibrado com o metal índio antes de ser utilizados a uma temperatura de 165ºC e uma velocidade de 10ºC por minuto. Os dados colhidos dos grupos experimentais e controles foram analisados utilizando a analise de variância de um fator do programa SPSS (general linear model) seguida de teste Tukey com intervalo de confiança de 95%.

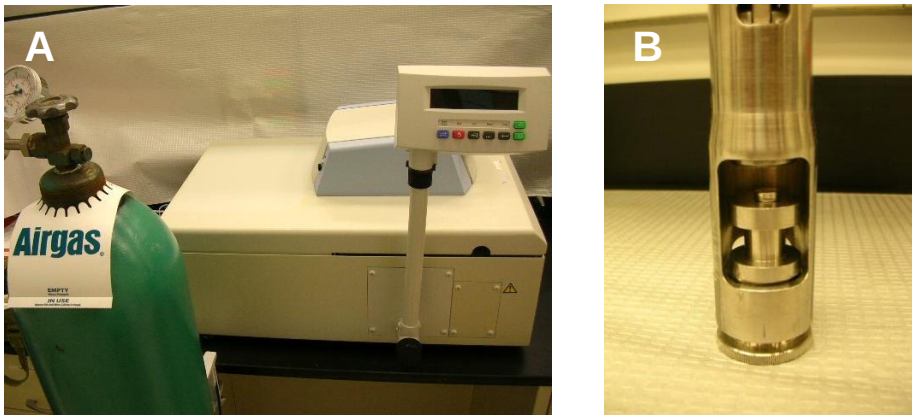


Figura 4.3 - A: máquina para o ensaio de calorimetria; B: dispositivo responsável pelo selamento das panelas utilizadas no ensaio

Degradação Enzimática

Onze molares humanos foram utilizados nesta etapa. Estes foram limpos de debris e, suas superfícies oclusais removidas com auxílio de um disco de diamante em alta-rotação (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), expondo dentina coronária, sob a JAD. A porção radicular foi cortada 1 mm abaixo da junção JEC e descartada. Já a porção coronária foi cortada em fatias de 0,5mm (± 0,1) na direção mesio-distal, por meio de disco de diamante (180 rpm) acoplado a máquina de corte Isomet (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), sob constante refrigeração. As fatias foram posteriormente desgastadas até um formato final de ampulheta, com uma broca

cilíndrica em alta rotação (n. 557D, Brasseler, Savannah, GA). A área final do pescoço foi de 0,5 ± 0,1 x 0,5 ± 0.1 mm.

Após a desmineralização em 10% de acido fosfórico por 5 horas, os espécimes foram lavados abundantemente e divididos aleatoriamente em três tratamentos (n=12): 6,5% de GSE em água destilada; 6,5% CSE em acetona-água, e um grupo controle em água destilada.

Os espécimes foram tratados por 1 hora e depois foram sujeitos ou não ao desafio enzimático por 24 horas. A solução responsável pela degradação enzimática foi produzida usando colagenase bacteriana (100 µg/ml) em 0,2M de uma solução tampão de bicarbonato de amônia (pH= 7,5). Os espécimes que não foram expostos a esta solução ficaram por 24 horas apenas na solução tampão, sem a colagenase.

Para a avaliação do desafio enzimático foi realizado o ensaio de resistência coesiva à microtração. Os cp foram colados com cianocrilato (Loctite Superbond, Henkel, Avon, OH, EUA) em garra específica, e o conjunto foi levado em máquina para ensaios universal (Bisco, Schaumburg, IL, EUA), sendo então submetido ao ensaio de tração à velocidade de 1 mm/min. As médias e os desvios padrões foram expressos em MPa. A análise estatística foi realizada no programa SPSS seguida de teste Tukey com intervalo de confiança de 95%.

Análise ultra-estrutural da superfície

Para este parte do estudo 3 molares hígidos tiveram suas superfícies oclusais removidas com auxílio de lixas de papel # 180, 320 e 600 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) sob constante refrigeração, para se obter uma superfície padronizada de dentina coronária média. Foi então cortada um fatia de 1,5 (±0,1) mm de cada dente com auxilio de um disco diamantado (180 rpm) acoplado a máquina de corte Isomet (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), sob constante refrigeração. Cada fatia foi então cortada com uma broca cilíndrica em alta rotação (n. 557D, Brasseler, Savannah, GA) em 3-4 espécimes de dimensão final de 1,5 mm de espessura X 2,0±0,1 mm de altura X 2,0±0,1 mm de comprimento. Uma marca foi feita em uma superfície oposta para permitir que o condicionamento ácido fosse realizado na superfície com *smear layer*. O condicionamento ácido foi realizado por 15 s seguido de enxágüe abundante e tratamento de 10 min com: 6,5% GSE (DW),

6,5% CSE (ET/DW) e controle em água destilada (DW). Os espécimes foram então levados ao banho de ultrassom por 1 min. Os passos de desidratação foram os seguintes: 25% ET/DW por 20 min, 50% ET/DW por 20 min, 75% ET/DW por 30 min, 95% ET/DW por 45 min, 2 X 100% ET/DW por 1 hora. Os espécimes foram imersos em hexametildisilano (HMDS) por 20 min, e cobertos por segmentos de ouro para ser observado em microscopia eletrônica de varredura MEV (Philips Electronics N.V., Balzers, Liechtenstein).

4.4 Resistência de união entre dentina tratada com extratos a base de PA e compósitos dentais

Método: Resistência de união

Extratos: Semente de Uva e Cacau

Tempo de Tratamento: 1, 10 e 60 minutos

Solventes: Água destilada, acetona e etanol

Concentrações: 6,5% e 30%

Armazenamento: Imediato, 3, 6 e 12 meses

Análise da resistência de união do colágeno tratado

Para analisar a resistência de união, por ensaio de microtração, foram utilizados 80 molares humanos. As superfícies oclusais foram removidas conforme descrito anteriormente, expondo a dentina coronária sob a JAD. As superfícies dentinárias foram então desgastadas com lixa de papel #600, sob refrigeração, para obtenção *smear layer* padronizada.

Os sistemas adesivos empregados foram Adapter Single Bond Plus (3M ESPE Dental Products, St Paul, MN, EUA) e One Step Plus (Bisco, Schaumburg, IL, EUA), sendo que suas aplicações foram realizadas de acordo com os fabricantes. Logo após o condicionamento ácido, os dentes foram divididos em quatro grupos (n=5):

1. 6,5% GSE em água destilada;
2. 6,5% CSE em acetona-água;
3. 6,5% CSE em etanol-água;

4. controle água destilada.

Nesta etapa foram analisados dois diferentes tempo de tratamentos 10 e 60 min. Apos o tratamento, os dentes foram então abundantemente enxaguados com água destilada e deionizada, para remover quaisquer remanescentes das substâncias, e imersos em banho no ultra-som, por 30 segundos. As superfícies tratadas foram parcialmente secas dando, então, continuidade aos procedimentos adesivos respectivos de cada grupo.

A resina composta Filtek Supreme (3M ESPE Dental Products, St Paul, MN, EUA) foi aplicada de forma incremental para construir um bloco (5X5X5mm); cada camada será fotoativada por 20 segundos a 650 mW/cm^2. Cada conjunto (dente e bloco de resina) foi posteriormente colocado na máquina de corte, onde foram seccionados os cp em forma de paralelogramo com dimensões de 0,81 mm^2.

Os cp foram colados com auxílio de cola de cianocrilato (Loctite Superbond, Henkel, Avon, OH, EUA) em garras e tracionados a uma velocidade de 1 mm/min em máquina de ensaios universal (Bisco, Schaumburg, IL, EUA) conforme visto na figura 4.4. A resistência de união (MPa) foi calculada mediante a divisão da carga no momento da fratura pela área do corpo-de-prova. As dimensões de espessura e largura de cada espécime foram medidas com paquímetro digital de precisão (Starrett-727-6/150, Itu, SP, Brasil).

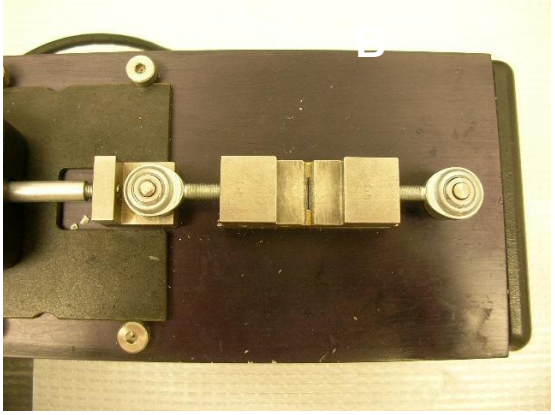


Figura 4.4 – Dispositivo no qual eram colados os espécimes de microtração já posicionado na máquina de ensaios

Os palitos foram testados imediatamente e após 3, 6 e 12 meses, para análise da degradação da resistência de união. Após as mensurações imediatas, os espécimes foram armazenados em saliva artificial a 37°C. A saliva artificial foi

manipulada da mesma maneira que na Parte 4.1 do estudo. Trocas do meio de armazenamento foram feitas de 15 em 15 dias. Os resultados calculados foram apresentados em MPa e duas ANOVAS (uma para cada sistema adesivo) de três fatores (tratamento, tempo de aplicação e armazenamento) foram realizadas no programa SPSS seguidas de testes de contraste como Tukey ou Games-Howell dependendo da normalidade e homocedasticidade da amostra, com intervalo de confiança de 95%. O desempenho dos adesivos comerciais não foi comparado entre eles.

Analisar a resistência de união do colágeno tratado em diferentes concentrações

Para esta fase do estudo foram utilizados 30 molares hígidos. Após a limpeza dos debris e a secção da parte oclusal conforme descrito anteriormente, as superfícies dentinárias foram então desgastadas com lixa de papel #600, sob refrigeração, para obtenção *smear layer* padronizada.

Os materiais utilizados foram os mesmo que para a etapa descrita anteriormente, porem os grupos experimentais estudados foram (n=5):

1. 6,5% GSE em água destilada;
2. 30% GSE em água destilada;
3. controle (água destilada).

Os tratamentos foram realizados por 1 minuto. Os dentes foram, então lavados abundantemente, sofrendo as aplicações dos sistemas adesivos (Adapter Single Bond Plus e One Step Plus) de acordo com as informações dos fabricantes. Com as superfícies parcialmente secas foram realizados incrementos de resina composta da mesma forma como descrito anteriormente. Os cps foram obtidos da mesma maneira assim como o tracionamento e obtenção das médias em MPa, imediatamente e após 6 meses de armazenamento em saliva artificial a 37°C. A saliva artificial foi manipulada da mesma maneira que na Parte 4.1 do estudo. Trocas do meio de armazenamento foram feitas de 15 em 15 dias.

Os resultados expressos em MPa foram analisados estatisticamente por uma ANOVA de 2 fatores (tipo de tratamento e tempo de armazenagem) para cada adesivo e teste Tukey com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

5.1 Efetividade de diferentes extratos naturais a base de PA como agentes de ligações cruzadas com o colágeno dentinário

O efeito dos diferentes agentes de ligações cruzadas na dentina desmineralizada e os tempo de tratamento estão exposto na figura 5.1.

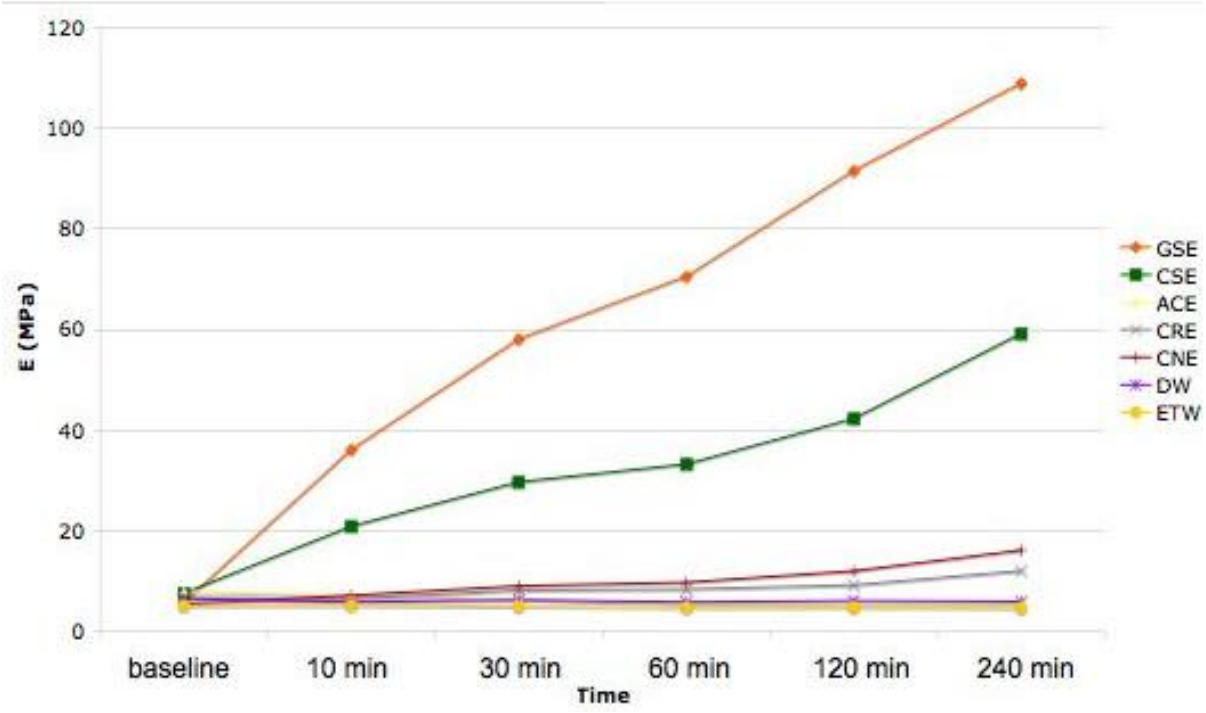


Figura 5.1 - Influência do tratamento com agentes de ligação cruzada no módulo de elasticidade da dentina desmineralizada (MPa) em diferentes tempo de tratamento (min). GSE- extrato de semente de uva; CSE- extrato de cacau; ACE- extrato de açaí; CRE- extrato de oxicoco; CNE- extrato de canela; DW- água destilada; ETW- etanol-água

Ambos os fatores (tempo exposição ao tratamento X tipo de tratamento, $p<0,001$ para ambos) e sua interação mostraram diferença estatística significante ($p<0,001$). A descrição numérica, com médias e desvio-padrão, e estatística está apresentada na tabela 5.1.

As médias de cada tipo de tratamento feito nesta fase do estudo, seus desvio-padrão e diferença estatística estão mostrados na tabela 5.2. GSE e CSE

foram capazes de aumentar o módulo de elasticidade (ME) das matrizes dentinárias ($p<0.001$). Os outros extratos a base de PA não influenciaram as propriedades mecânicas imediatas da dentina.

Tabela 5.1 - Modulo de elasticidade (MPa-desvio-padrão) da dentina desmineralizada tratada com diferentes agentes de ligação cruzada em períodos acumulativos de tratamento

Módulo de Elasticidade (MPa)						
Extratos	Tempo de exposição					
	Baseline	10 min	30 min	60 min	120 min	240 min
GSE	5,8 (2,0) $^{A\ a}$	36,1 (9,7) $^{A\ a,b}$	58,1 (21,7) ^{Ab,c}	70,5 (32,9) ^{Ab,c}	91,6 (52,1) ^{Ac,d}	109,0 (56,1) $^{A\ d}$
CSE	7,6 (1,5) $^{A\ a}$	20,9 (5,2) $^{B\ a,b}$	29,7 (10,4) ^{Bb,c}	33,2 (13,1) ^{Bb,c}	42,3 (16,3) $^{B\ c,d}$	59,2 (24,9) $^{B\ d}$
ACE	8,0 (2,3) $^{A\ a}$	7,4 (2,3) $^{C\ a}$	6,5 (2,3) $^{C\ a}$	5,5 (2,0) $^{C\ a}$	5,4 (2,2) $^{C\ a}$	5,4 (2,2) $^{C\ a}$
CRE	6,6 (3,1) $^{A\ a}$	6,5 (3,6) $^{C\ a}$	8,2 (4,9) $^{C\ a}$	8,4 (4,1) $^{C\ a}$	9,2 (5,4) $^{C\ a}$	12,1 (6,8) $^{C\ a}$
CNE	5,4 (2,1) $^{A\ a}$	7,2 (3,2) $^{C\ a,b}$	9,0 (4,1) $^{C\ a,b}$	9,8 (3,6) $^{C\ a,b}$	12,0 (4,3) $^{C\ b,c}$	16,2 (6,3) $^{C\ c}$
DW	6,7 (1,7) $^{A\ a}$	5,8 (1,6) $^{C\ a}$	6,3 (1,4) $^{C\ a}$	5,8 (1,2) $^{C\ a}$	6,1 (1,6) $^{C\ a}$	5,9 (1,4) $^{C\ a}$
ETW	5,1 (1,6) $^{A\ a}$	5,2 (1,7) $^{C\ a}$	5,0 (1,5) $^{C\ a}$	4,8 (1,6) $^{C\ a}$	4,8 (1,4) $^{C\ a}$	4,7 (1,3) $^{C\ a}$

Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística entre linhas e letras minúsculas diferentes entre colunas. GSE- extrato de semente de uva; CSE- extrato de cacau; ACE- extrato de açaí; CRE- extrato de oxicoco; CNE- extrato de canela; DW- água destilada; ETW- etanol-água.

Tabela 5.2 - Modulo de elasticidade (MPa-desvio-padrão) da dentina desmineralizada tratada com diferentes agentes de ligação e grupos controles

Extrato	Módulo de elasticidade (MPa)						
	GSE	CSE	ACE	CRE	CNE	DW	ETW
Médias	61,9 [A]	32,2 [B]	6,4 [C]	8,5 [C]	9,9 [C]	6,1 [C]	4,9 [C]
DP	48,3	21,2	2,4	4,9	5,3	1,4	1,5

Letras diferentes mostram diferenças estatísticas significantes. GSE- extrato de semente de uva; CSE- extrato de cacau; ACE- extrato de açaí; CRE- extrato de oxicoco; CNE- extrato de canela; DW- água destilada; ETW- etanol-água.

Os resultados, quanto a longevidade, estão expostos na figura 5.2. Diferenças estatística significantes foram encontradas para ambos os fatores (tempo de armazenamento e tipo de tratamento) ($p<0,001$) e sua interação ($p<0,001$). A dentina tratada com GSE foi mais afetada pelos longos períodos de armazenagem ($p<0,001$) do que o CSE ($p=0,120$), então após 3 meses não foi encontrada diferença estatística entre os dois tratamentos, mas ambos continuaram a apresentar um modulo de elasticidade maior do que os outros tratamentos, em todos os tempos ($p<0,001$). Todos os outros grupos (ACE, CRE, CNE, DW and ETW) não foram diferentes estatisticamente em todos os períodos de armazenamento avaliados. Os resultados de ME nos diferentes períodos de armazenagem estão ilustrados na figura 5.3. GSE (Figura 5.3 A) mostrou uma diminuição nos valores após 3 meses de armazenagem e contínuou diminuindo os valores, porém sem diferença estatística ($p<0,001$). CSE ($p=0,120$), CRE ($p=0,946$) e CNE ($p=0,130$) foram capazes de estabilizar os valores de ME durante o período de 12 meses (Figuras 5.3 B, D and E). Além da inabilidade do ACE de aumentar o ME da dentina desmineralizada independente do tempo exposição ao tratamento ($p=0,370$), ele não estabilizou os valores durante o período de armazenagem ($p=0,003$) (Figura 5.3 C), como o CRE (Figura 5.3 D). O armazenamento em saliva artificial foi capaz de diminuir o ME para ambos os

grupos controles (DW and ETW, p<0,001 para ambos), como mostra as figuras 5.3 F e G.

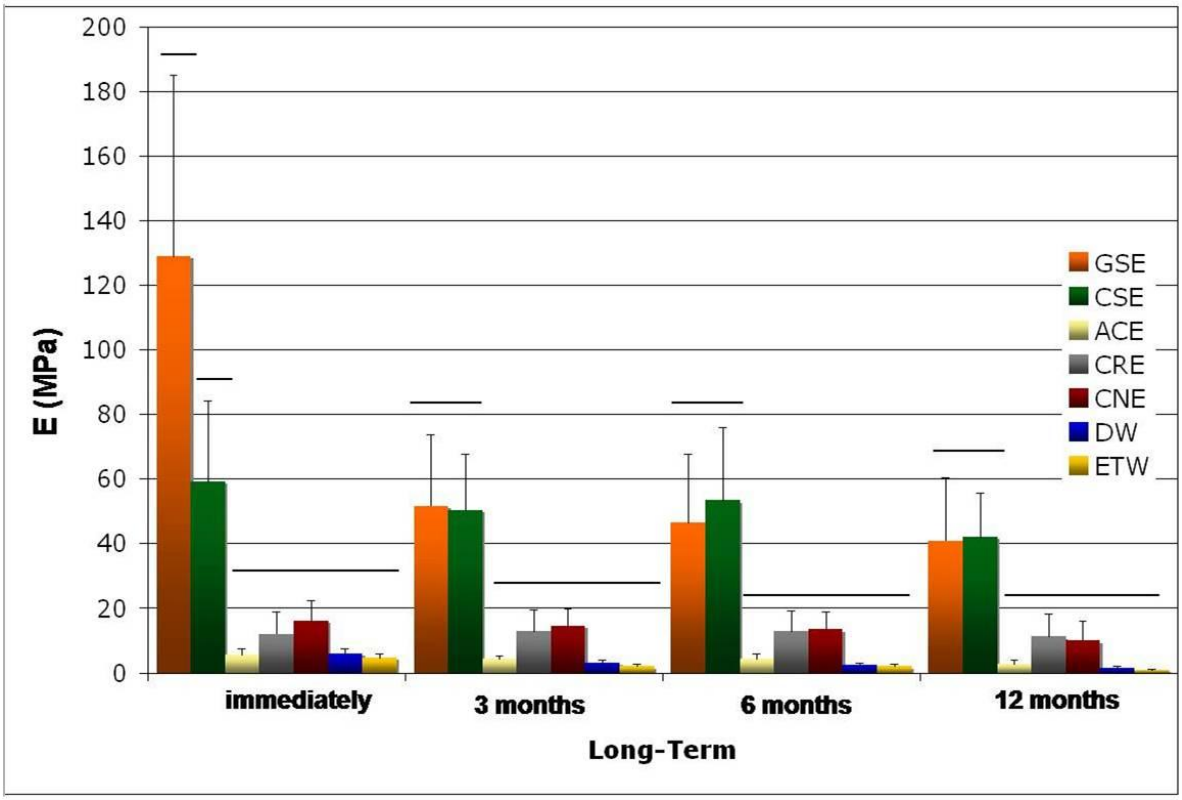


Figura 5.2 - Módulo de elasticidade (MPa) da dentina desmineralizada apos aplicação dos agentes de ligação cruzada e armazenamento em saliva artificial por 3, 6 e 12 meses. Semelhanças estatísticas estão mostradas pelas linhas horizontais. GSE- extrato de semente de uva; CSE- extrato de cacau; ACE- extrato de açaí; CRE- extrato de oxicoco; CNE- extrato de canela; DW- água destilada; ETW- etanol-água

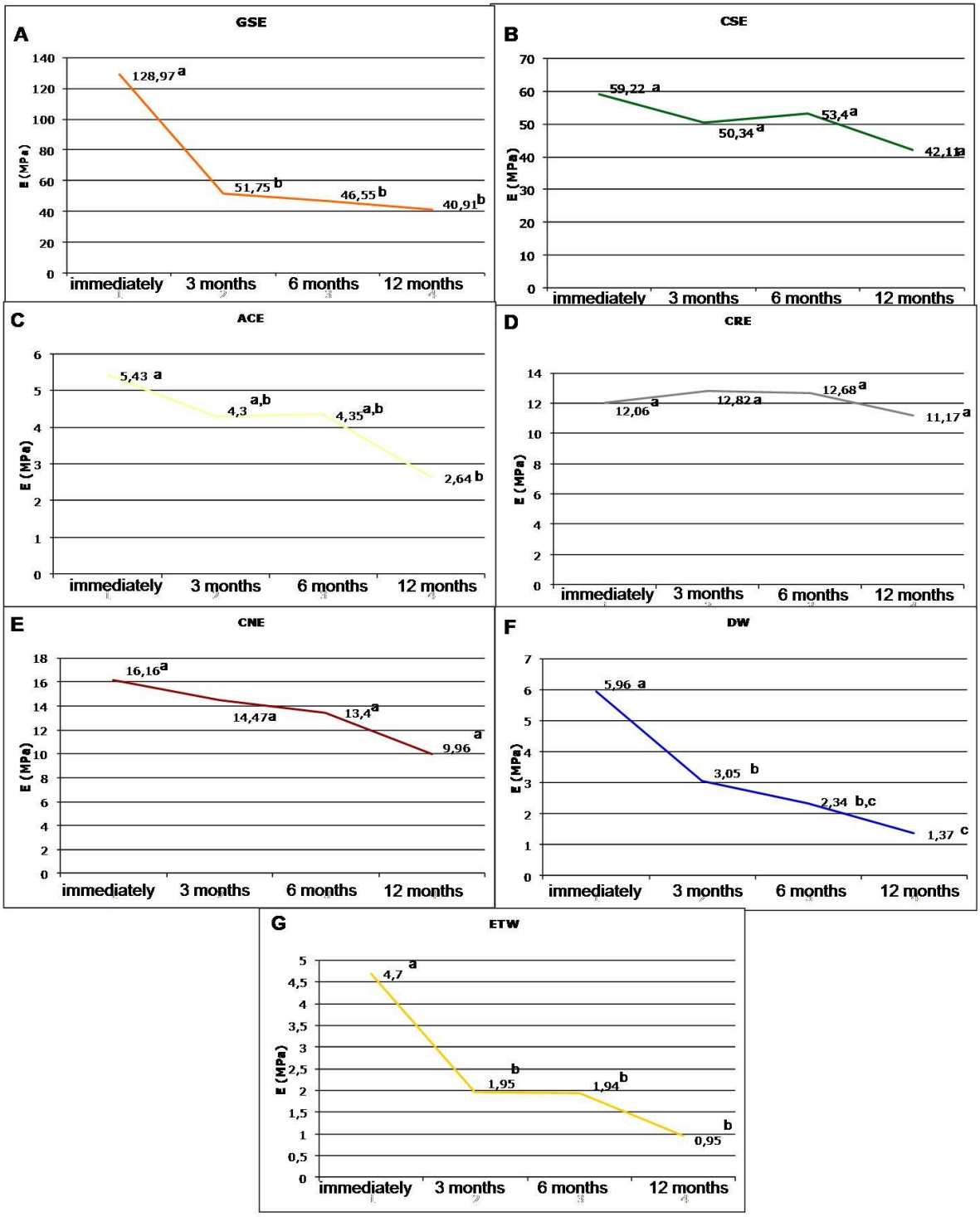

A
GSE
E (MPa)
128,97 a
51,75 b
46,55 b
40,91 b
immediately
3 months
6 months
12 months
B
CSE
E (MPa)
59,22 a
50,34 a
53,4 a
42,11 a
immediately
3 months
6 months
12 months
C
ACE
E (MPa)
5,43 a
4,3 a,b
4,35 a,b
2,64 b
immediately
3 months
6 months
12 months
D
CRE
E (MPa)
12,06 a
12,82 a
12,68 a
11,17 a
immediately
3 months
6 months
12 months
E
CNE
E (MPa)
16,16 a
14,47 a
13,4 a
9,96 a
immediately
3 months
6 months
12 months
F
DW
E (MPa)
5,96 a
3,05 b
2,34 b,c
1,37 c
immediately
3 months
6 months
12 months
G
ETW
E (MPa)
4,7 a
1,95 b
1,94 b
0,95 b
immediately
3 months
6 months
12 months

Figura 5.3 - Módulo de elasticidade (MPa) da dentina tratada com diferentes agentes de ligações cruzadas por longos períodos de armazenagem. A- Módulo de elasticidade da dentina desmineralizada tratada com GSE (extrato de semente de uva) armazenado por diferentes períodos de tempo. B - Módulo de elasticidade da dentina desmineralizada tratada com CSE (extrato de cacau) armazenado por diferentes períodos de tempo. C - Módulo de elasticidade da dentina desmineralizada tratada com ACE (extrato de açaí) armazenado por diferentes períodos de tempo. D - Módulo de elasticidade da dentina desmineralizada tratada com CRE (extrato de oxicoco) armazenado por diferentes períodos de tempo. E - Módulo de elasticidade da dentina desmineralizada tratada com CNE (extrato de canela) armazenado por diferentes períodos de tempo. F - Módulo de elasticidade da dentina desmineralizada tratada com DW (água destilada) armazenado por diferentes períodos de tempo. G - Módulo de elasticidade da dentina desmineralizada tratada com ETW (etanol-água armazenado por diferentes períodos de tempo. NOTA escalas diferentes em cada gráfico

5.2 Estudos dos parâmetros das soluções a base de PA: Solubilidade, procedência e/ou fabricante, tempo de aplicação e concentração dos extratos escolhidos

Solubilidade

A tabela 5.3 mostra as médias e desvio-padrão para todos os grupos estudados nesta etapa. Tabela 5.4 apresenta os *p-values* para todos os fatores e interações desta parte do estudo.

A interação entre tratamento e solvente foi significante para todos os tempos estudados (para todos os tempos $p<0,05$), exceto para a avaliação de 10 minutos ($p = 0,062$). Exceto pelo baseline ($p = 0,497$), todos os períodos de tempo tratados com os extratos a base de PA aumentaram o módulo de elasticidade da matriz dentinária ($p<0,001$). Variações de solventes não afetaram a propriedade estudada para os espécimes nos períodos acumulativos de tratamento: 10 (t_{10}), 120 (t_{120}), e 240(t_{240}), min, ($t_{10} = 0,207$; $t_{120} = 0,106$; $t_{240} = 0,346$).

A figura 5.4 expõe o comportamento dos solventes nos grupos experimentais e controles. CSE teve um comportamento mais homogêneo quando comparado aos outros grupos, estabelecendo uma relação mais próxima com o sistema de etanol-água. Geralmente, os dois grupos tratados com GSE mostraram efeitos mais fortes quando dissolvidos em água destilada, enquanto para o sistema de solvente com acetona-água, um maior ME em comparação ao grupo dissolvido em água foi visto apenas nos 60 min de tratamento.

Tabela 5.3 - Módulo de elasticidade [médias (desvio-padrão)] da dentina desmineralizada após os diferentes tratamentos, solventes e tempo de exposição

Módulo de Elasticidade (MPa)							
Tratamento	Solvente	Tempo de Exposição					
		Baseline	10 min	30 min	60 min	120 min	240 min
GSEP	DW	6,6 (2,6)	39,6 (18,0)	61,2 (27,3)	73,7 (37,0)	92,9 (50,2)	109,9 (53,2)
	ET	6,7 (2,6)	26,7 (11,4)	31,0 (22,8)	39,3 (14,4)	56,9 (21,2)	72,1 (25,1)
	AC	6,2 (2,4)	33,6 (15,5)	57,2 (25,2)	77,8 (26,6)	77,7 (29,1)	79,3 (29,8)
GSES	DW	6,7 (1,5)	17,9 (5,7)	27,3 (13,8)	32,7 (18,7)	46,0 (26,3)	54,7 (33,8)
	ET	5,9 (1,8)	12,3 (4,8)	15,5 (6,0)	20,0 (8,2)	24,5 (10,7)	33,5 (14,0)
	AC	8,0 (1,9)	18,8 (3,1)	25,6 (6,6)	37,4 (8,3)	37,8 (8,7)	51,5 (13,2)
CSE	DW	6,7 (2,2)	21,8 (12,9)	28,3 (17,4)	34,3 (21,7)	39,9 (23,0)	53,5 (28,5)
	ET	8,7 (3,2)	25,8 (12,7)	33,9 (15,5)	43,7 (27,3)	55,8 (36,1)	80,0 (54,4)
	AC	6,3 (3,1)	18,8 (9,1)	24,2 (11,5)	33,5 (17,1)	46,2 (17,3)	58,4 (25,8)
Controle	DW	7,0 (1,9)	5,9 (1,5)	6,2 (1,3)	6,0 (1,2)	6,2 (1,4)	6,2 (1,5)
	ET	5,7 (2,0)	5,8 (2,0)	5,4 (1,8)	5,2 (1,8)	5,2 (1,6)	5,0 (1,5)
	AC	6,8 (2,1)	6,9 (2,0)	7,2 (2,3)	7,2 (2,3)	6,8 (1,9)	6,9 (1,7)

DW- água destilada; ET- 50% solução de água e etanol; AC- 30% solução de acetona e água

Tabela 5.4 - ANOVA de dois fatores entre os fatores e interações (*p-value*)

Análise estatística (*p-values*)						
Fatores	Baseline	10 min	30 min	60 min	120 min	240 min
Tratamento	0,497	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
Solvente	0,989	0,207	0,005*	0,009*	0,106	0,346
Tratamento X Solvente	0,033*	0,062	0,000*	0,001*	0,021*	0,013*

*diferença estatística significante ≤ 0,05.

HSP foram calculados para compostos comuns contidos em extratos ricos em PA (Tabela 5.5). O melhor solvente foi o sistema de acetona e água (30:70), que mostrou os mais baixos valores de $\Delta\delta_{i,j}$, seguido do sistema de etanol e água (50:50). Água destilada pura mostrou os maiores valores de $\Delta\delta_{i,j}$, indicando uma falta de afinidade entre soluto e solvente.

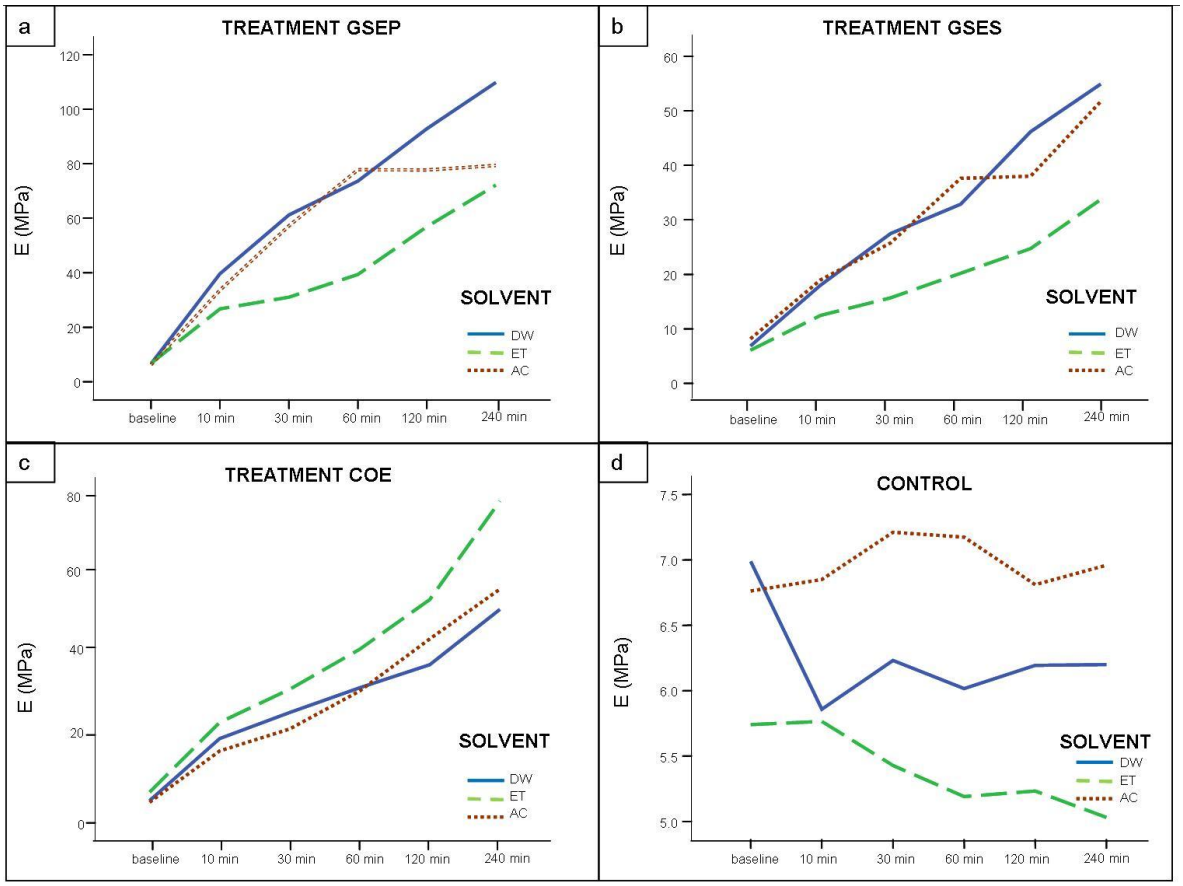


Figura 5.4 – A -Gráfico de modulo de elasticidade (MPa) da dentina desmineralizada tratada com extrato de semente de uva (Poliphenolics) apos diversos tempos de tratamento; DW - água destilada; ET- etanol-água; AC- acetona-água. B – Gráfico de modulo de elasticidade (MPa) da dentina desmineralizada tratada com extrato de semente de uva (Sanrisil) apos diversos tempos de tratamento; DW-água destilada; ET-etanol-água; AC- acetona-água. C – Gráfico de modulo de elasticidade (MPa) da dentina desmineralizada tratada com extrato de cacau, apos diversos tempos de tratamento. DW-água destilada; ET-etanol-água; AC- acetona-água. D – Gráfico do modulo de elasticidade (MPa) da dentina desmineralizada sem tratamento, após diversos tempos de tratamento. DW-água destilada; ET-etanol-água; AC- acetona-água. NOTA escalas diferentes em cada gráfico

Tabela 5.5 - Parâmetros de Solubilidade de Hansen. Os valores de V*m*, δ_d, δ_p, δ_h e δ_t para os compostos fenólicos foram descritos por Savova et al. (2007) [124]. $\Delta\delta_{i,j}$ foi calculado de acordo com Hansen Solubility Parameters: a user's handbook [123]

Parâmetros de Solubilidade de Hansen								
Compostos	V*m* Cm^3 mol^{-1}	δ_d $MPa^{1/2}$	δ_p $Mpa^{1/2}$	δ_h $MPa^{1/2}$	δ_t $MPa^{1/2}$	$\Delta\delta_{i,j}$ H_2O	$\Delta\delta_{i,j}$ 50% etanol/ água	$\Delta\delta_{i,j}$ 30% acetona/ 70% água
Catequina	266	13,7	4,5	19,7	24,4	27,8	16,5	15,9
ECG	385	13,8	3,8	19,7	24,4	28,3	17,1	16,2
EGC	273	13,6	4,7	21,2	25,6	26,5	15,4	14,8
EGCG	392	13,8	4,0	20,8	25,3	27,4	16,3	15,4
Dímeros	518	13,4	3,3	19,9	24,2	28,5	17,3	16,7

EGC-epigalocatequina; ECG- epicatequina galato e EGCG-epigalocatequina galato. δ^2_d- força de dispersão de London; δ^2_p- força de atração/repulsão devido à polaridade das moléculas; δ^2_h- força da ligação de hidrogênio.

Concentração e tempo de aplicação

A figura 5.5 mostra os resultados de módulo de elasticidade da dentina desmineralizada após tratamento com diferentes concentrações de soluções a base de extrato de semente de uva em tempos cumulativos. Este gráfico é comumente conhecido como gráfico dose X resposta. Houve uma diferença estatisticamente significante para a interação dos fatores ($p<0,001$), tempo de tratamento ($p<0,001$) e concentrações ($p<0,001$). O resultado mostrou ser proporcional, ou seja, com o aumento da concentração das soluções houve um aumento do ME avaliado, nos diferentes períodos de avaliação. O uso de uma solução de 30% de GSE resultou em um aumento de quatro vezes no módulo, quando comparado com a menor concentração usada. Outra característica deste gráfico encontrada para os valores de maior concentração, acima de 6,5%, é a bimodalidade. Sendo que os primeiros 10 min são os que sofrem o maior aumento do ME, seguidos por um aumento mais gradual até os 60 min.

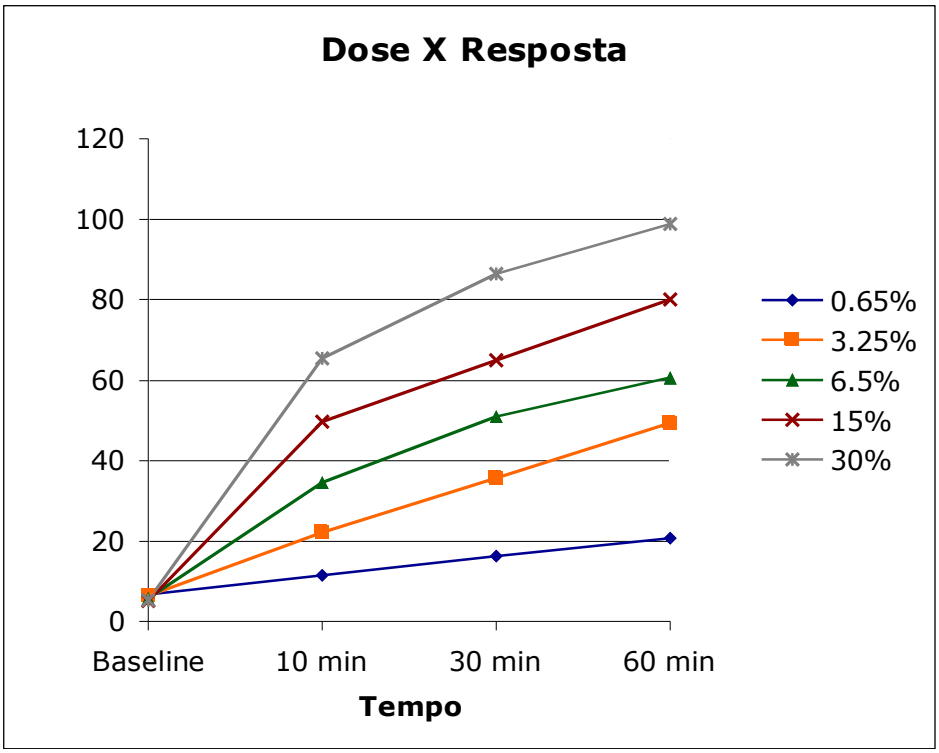


Figura 5.5 – Modulo de elasticidade (MPa) da dentina desmineralizada apos tratamento com diferentes concentrações de extrato de semente de uva e diversos tempos de tratamento

5.3 Caracterização da dentina desmineralizada tratada com extratos a base de PA

Sorção

A figura 5.6 apresenta os resultados do estudo da sorção. Diferentes tratamentos afetaram significativamente esta propriedade da dentina ($p<0,001$). O uso de agentes de ligações cruzadas reduziram a razão de sorção quando comparados aos grupos controles. Uma comparação de todos os grupos estudados mostrou que o CSE causa ganho mínimo de peso quando embebido por água, seguido pelos tratamento a base de GSE. Levando-se em consideração apenas os grupos controles, o tratamento com acetona mostrou valores estatisticamente menores em comparação ao grupo de água destilada.

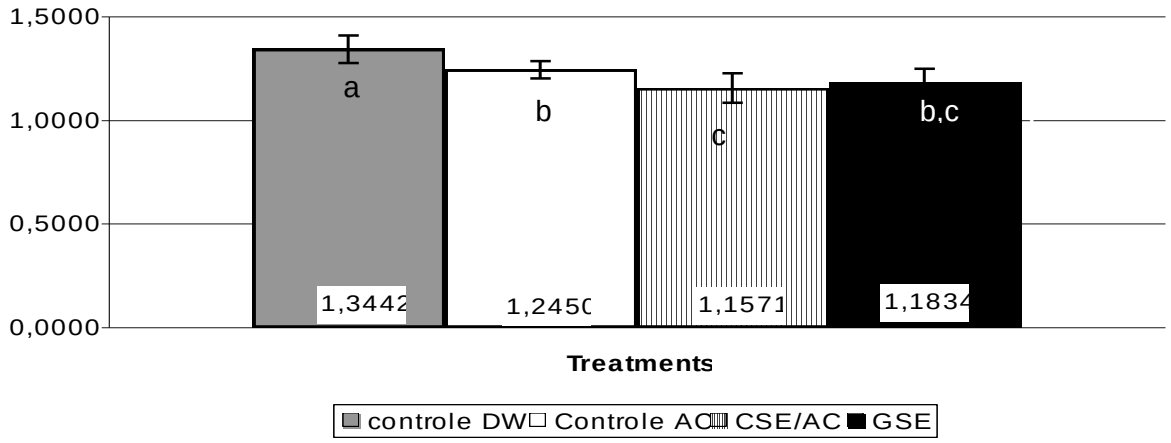


Figura 5.6 – Razão de sorção da dentina desmineralizada seguida de diferentes tratamentos. DW- água destilada, AC- acetona, CSE/AC- extrato de semente de cacau solubilizado em água e acetona (70:30), GSE- extrato de semente de uva. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

Calorimetria

A figura 5.7 apresenta os resultados do ensaio de calorimetria. Diferentes tratamentos afetaram significativamente a temperatura de desnaturação do colágeno ($p<0,001$). O uso de agentes de ligações cruzadas aumentou a temperatura necessária para que ocorresse a perda da estrutura tridimensional do colágeno quando comparados ao grupo controle (água destilada).

O fenômeno de múltiplos picos foi detectado para os espécimes tratados com agentes naturais de ligação cruzada. Para ambos os extratos, foram encontrados para o mesmo espécimes uma série de picos e o valor utilizado foi a média de todos os picos menores, conforme visto na tabela 5.6.

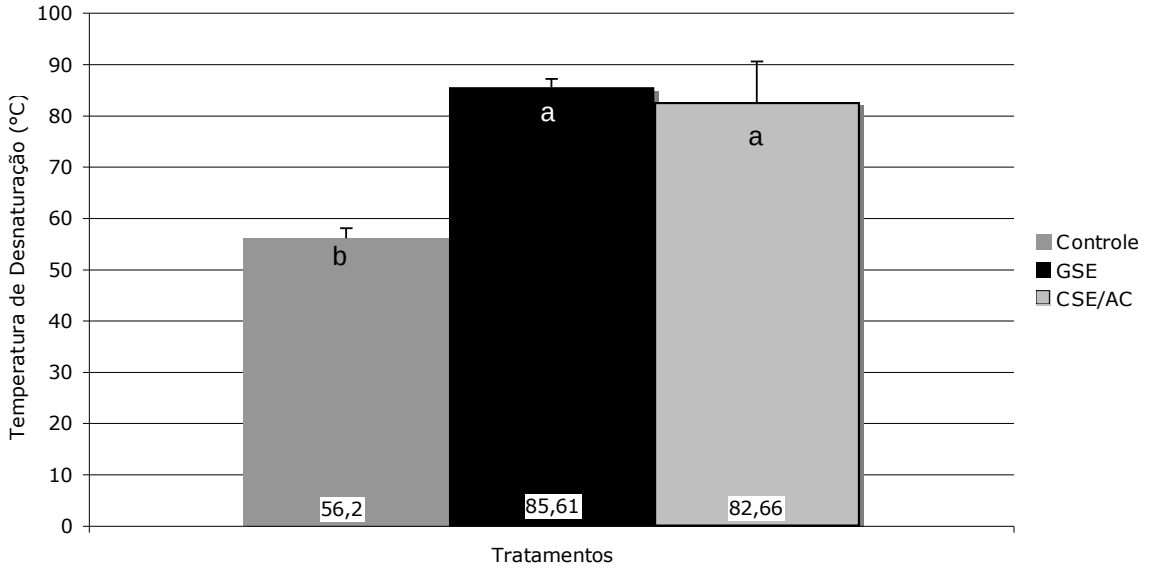


Figura 5.7 - Resultados do ensaio de calorimetria da dentina desmineralizada seguida dos tratamentos. CSE/AC- extrato de semente de cacau solubilizado em água e acetona (70:30), GSE- extrato de semente de uva. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

Tabela 5.6 – Múltiplos picos encontrados no ensaio de calorimetria para a dentina tratada com extrato de semente de uva (GSE) e extrato de semente de cacau (CSE) e a média calculada para cada espécime

Calorimetria			
Agentes	Espécime	Picos (°C)	Média de TD (°C)
GSE	1	64,5; 84,68; 103,15	84,1
	2	66,98; 79,39; 85,93; 89,79; 99,46	84,4
	3	68,9; 85,84; 89,94; 101,95	86,8
	4	67,86; 83,17; 98,14; 99,77	87,2
CSE	1	61,25; 66,78; 81,37;	69,7
	2	69,78; 79,74; 89,34; 97,78; 98,76	87,1
	3	82,17; 94,76	88,5
	4	75,77; 78,93; 86,9; 96,87	84,8

Degradação enzimática

O ensaio de degradação enzimática *in vitro* revelou que os espécimes de colágeno expostos a colagenase bacteriana foram encontrados completamente digeridos apos 24 horas (Tabela 5.7). Os valores de UTS aumentaram significativamente após tratamento com ambos os agentes de ligações cruzadas ($p<0,001$). Cp tratados com GSE e CSE foram altamente resistentes a digestão com colagenase e os valores de UTS não foram significativamente afetados pela exposição a colagenase ($p=0,198$/GSE; $p=0,109$/CSE).

Tabela 5.7 - Resistência enzimática *in vitro* da matriz dentinária para tratamentos dentinários. Medias de resistência coesiva da dentina [MPa] e desvio-padrão estão expostos

Degradação Enzimática		
Tratamento	Tampão	Tampão com colagenase
GSE	19,5 (6,1)[a]	18,17 (4,5) [a]
CSE	16,3 (2,6) [b]	17,15 (4,3) [b]
Controle	11,5 (5,3) [c*]	0,0 [c*]

Letras diferentes indicam diferença estatística significante ($p<0,05$) entre tratamentos dentinários.
Asterisco (*) indicam diferença estatística ($p<0,05$) entre a digestão a colagenase.
GSE- extrato de semente de uva; CSE- extrato de cacau.

Análise ultra-estrutural da superfície

As imagens de MEV estão presentes na figura 5.8. A magnificação foi mantida constante para todas as imagens.

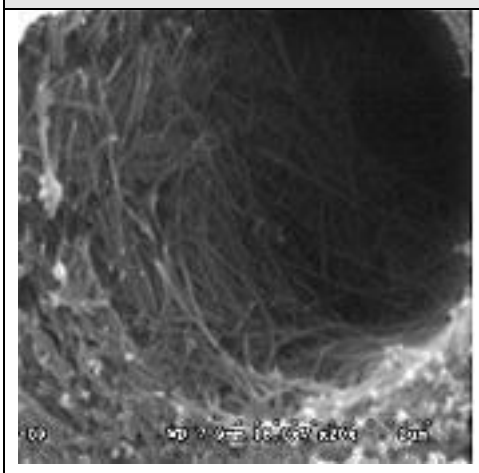
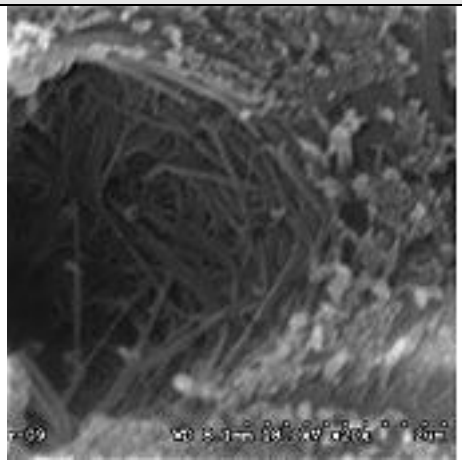
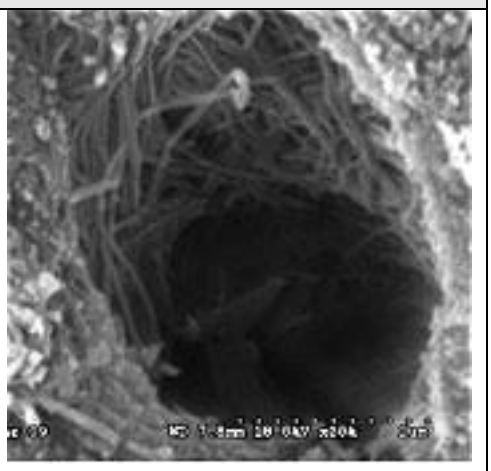
Imagens de MEV		
Controle	**GSE**	**CSE/ET**
		

Figura 5.8 – MEV imagens para diferentes tratamentos de dentina. GSE-extrato de semente de uva; CSE/ET –extrato de cacau em etanol-água e grupo controle em água destilada

5.4 Resistência de união entre dentina tratada com extratos base de PA e compósitos dentais

A médias e desvio-padrão para o ensaio de resistência de união (RU) dos tratamento em diferentes tempo de aplicação e armazenamento para os dois sistemas adesivos comerciais estão expostos nas tabelas 5.8 e 5.9.

Para ambos os sistemas adesivos a interação tripla não foi significativa (SB p=0,621; OS p=0,990). Quando analisados os dados do Adpter Single Bond Plus as interações entre tratamento e armazenamento foi significativa (p=0,030), mas as outras interações não se mostraram diferentes estatisticamente (tratamento e tempo de aplicação p=0,878 e tempo de aplicação e de armagenamento p=0,812). Todos os tratamentos individualmente não mostraram diferenças estatísticas ao longo do tempo de armazenamento. Mostrando que após 12 meses os valores continuam similares ao imediatos para cada tratamento.

Tabela 5.8 - Resultado da resistência de união (μBS-MPa) e desvio-padrão para diferentes tratamentos, tempo de aplicação e armazenamento quando utilizado o sistema adesivo adper single bond Plus (SB)

Variáveis	μBS (MPa) – SB				P
	Tempo de Armazenamento				
	24 horas	3 meses	6 meses	12 meses	
GSE					
10 min	65,9 (12,4) Aab	64,2 (16,7) Aab	64,2 (16,2) Aab	57,2 (15,3) Aab	0,185
60 min	71,3 (18,1) Aab	68,2 (16,2) Aa	63,1 (22,4) Aab	60,0 (20,2) Aa	0,100
CSE/ET					
10 min	56,9 (14,4) Abc	55,9 (14,1) Aabc	52,9 (11,5) Abc	54,0 (17,1) Aab	0,753
60 min	47,4 (13,9) Ac	50,1 (11,1) Ac	47,4 (14,2) Ac	45,3 (15,7) Aab	0,686
CSE/AC					
10 min	49,9 (11,9) Ac	51,8 (16,8) Abc	50,0 (14,0) Ac	48,2 (19,5) Aab	0,890
60 min	51,2 (9,7) Ac	52,5 (19,4) Aabc	49,8 (12,2) Ac	44,2 (17,5) Ab	0,236
Control					
10 min	54,5 (20,0) Abc	52,7 (16,3) Abc	49,2 (13,9) Ac	51,7 (19,4) Aab	0,759
60 min	57,9 (23,7) Abc	55,9 (23,0) Aabc	52,0 (17,6) Ac	48,9 (20,5) Aab	0,468
P	0,000	0,001	0,000	0,026	

*Diferentes letras minúsculas e maiúsculas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) dentro de cada linha e coluna, respectivamente. GSE- extrato de semente de uva; CSE- extrato de cacau; ET- etanol; AC- Acetona.

Tabela 5.9 - Resultado da resistência de união (μBS-MPa) e desvio-padrão para diferentes tratamentos, tempo de aplicação e armazenamento quando utilizado o sistema adesivo One Step Plus (OS)

Variáveis	μBS (MPa) – OS				P
	Tempo de Armazenamento				
	24 horas	3 meses	6 meses	12 meses	
GSE					
10 min	60,9 (8,8) ^{Aab}	53,6 (12,4) ^{Bab}	50,4 (10,1) ^{BCa}	42,6 (7,5) ^{Ca}	0,000
60 min	62,9 (9,3) ^{Aa}	54,8 (7,8) ^{Bab}	49,8 (6,7) ^{Ba}	42,9 (5,1) ^{Ca}	0,000
CSE/ET					
10 min	60,3 (12,9) ^{Aab}	55,2 (11,2) ^{Aab}	47,0 (8,3) ^{Ba}	44,6 (11,0) ^{Ba}	0,000
60 min	54,9 (11,4) ^{Aab}	57,3 (13,8) ^{Aa}	46,2 (8,6) ^{Ba}	43,3 (7,8) ^{Ba}	0,000
CSE/AC					
10 min	54,4 (11,0) ^{Aab}	55,8 (9,7) ^{Aab}	48,9 (16,5) ^{ABab}	41,3 (6,8) ^{Ba}	0,000
60 min	55,6 (15,9) ^{Aab}	52,3 (11,2) ^{Aab}	47,2 (14,0) ^{ABab}	38,4 (13,3) ^{Ba}	0,000
Control					
10 min	50,4 (18,2) ^{Ab}	49,7 (9,4) ^{Aab}	39,1 (12,7) ^{ABb}	36,8 (10,4) ^{Ba}	0,000
60 min	55,4 (12,1) ^{Aab}	46,0 (11,9) ^{Bb}	38,2 (6,0) ^{Cb}	39,9 (12,5) ^{BCa}	0,000
P	0,013	0,010	0,000	0,094	

*Diferentes letras minúsculas e maiúsculas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) dentro de cada linha e coluna, respectivamente. GSE- extrato de semente de uva; CSE- extrato de cacau; ET- etanol; AC- Acetona.

Para o adesivo Adpter Single Bond Plus, em cada período de armazenamento analisado os valores foram influenciados pelo tipo de tratamento realizado. A análise imediata mostrou que o GSE nos dois tempos de aplicação exibem os maiores valores de resistência de união, seguidos pelos dois grupos controles, que são similares ao grupo tratado com CSE/ET 10 min. Os grupos CSE/ET 60 min, e os dois tempo de aplicação do grupo CSE/AC mostraram ser estatisticamente diferentes dos outros, exibindo os menores resultados. Após três meses de armazenamento, os grupos se comportaram de maneira semelhante, com GSE 60 min mostrando os maiores valores de resistência de união. Aos seis meses de tempo de armazenagem, os grupos controles mostraram resultados estatisticamente menores que os grupos GSE, mas não apresentaram diferenças em relação aos outros tratamentos. Com 1 ano de armazenagem o GSE 60 min mostrou valores de RU estatisticamente maiores que todos os demais grupos, sendo que o grupo CSE/AC 60 min mostrou os menores valores.

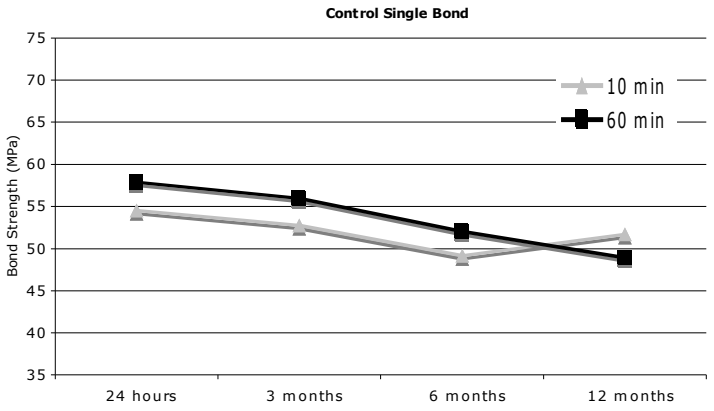
Em relação ao sistema adesivo One Step Plus a interação entre tempo de aplicação e tipo de tratamento foi estatisticamente significante (p=0,010), enquanto as duas outras interações não mostraram diferenças estatísticas (tratamento e tempo de armazenamento p=0,910 e tempo de armazenamento e de aplicação p=0,690). Ao contrário do outro sistema adesivo citado anteriormente, tanto os grupos experimentais como os controles exibiram queda dos valores de resistência de união após 1 ano. Em relação aos valores encontrados imediatamente GSE 60 min mostrou os maiores valores seguidos pelos grupos GSE 10 min e CSE/ET 10 min. Os menores valores de RU foram encontrados no grupos controle 10 min que mostrou ser inferior estatisticamente aos outros grupos. Aos 3 meses CSE/AC 10 min mostrou os maiores valores estatisticamente diferente dos valores do grupo controle 60 min, que apresentou os menores resultados. Após 6 meses de armazenamento os grupos controles mostraram valores menores do que os grupos experimentais de GSE e CSE/ET, sendo estatisticamente semelhantes aos grupos de CSE/AC. Porém após 12 meses de armazenagem todos os grupos mostraram resultados semelhantes

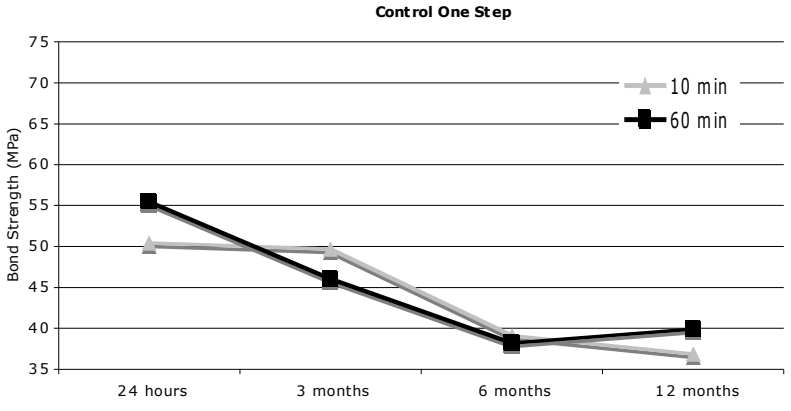
Quando a comparação é feita entre os dois tempos de aplicação para o adesivo Adpater Single Bond Plus nota-se que o único tratamento a mostrar

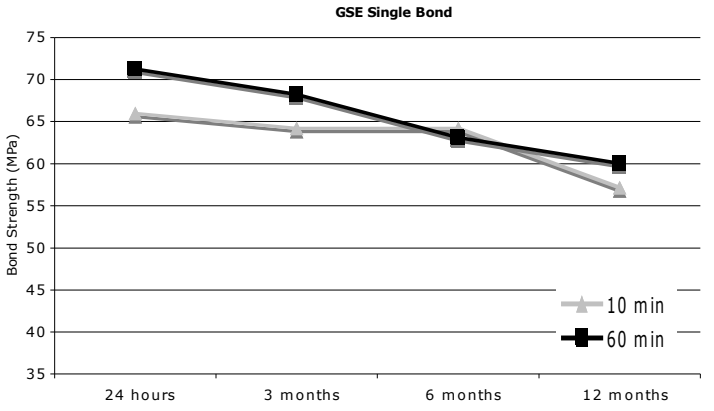
(Continua..)

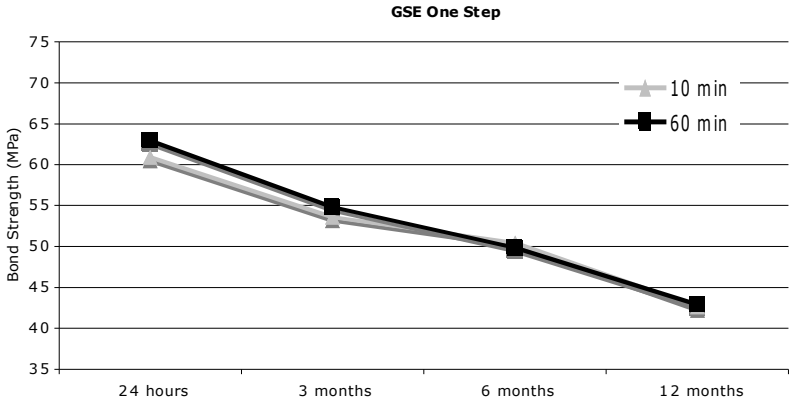
alguma variação é o CSE/ET (p<0,001). O GSE (p=0,017) mostrou resultados imediatos maiores do que os resultados após 1 ano de armazenagem (Figura 5.9).

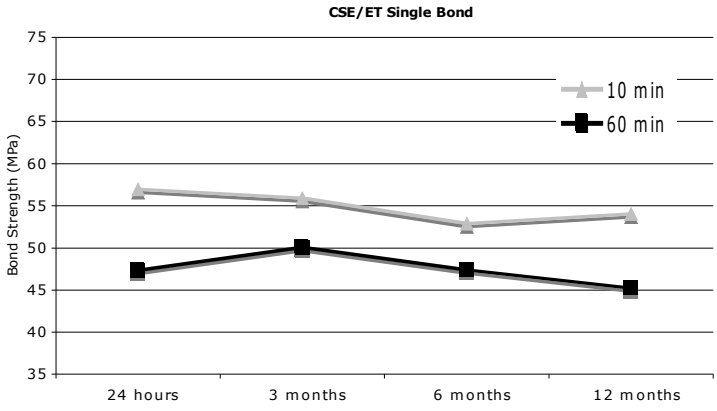
Já para o One Step Plus, os diversos tratamentos mostraram quedas nos valores de RU após armazenagem. No grupo controle os valores imediatos e de três meses foram maiores estatisticamente que os valores de 6 e 12 meses (p<0,001). Para o tratamento com GSE os valores imediatos foram maiores que os de 3 e 6 meses que se mostraram iguais, mas estatisticamente maiores que os valores de 12 meses (p<0,001). O grupo CSE/ET mostrou o mesmo comportamento que o grupo controle e o outro grupo CSE/AC revelou resultados maiores imediatamente que foram estatisticamente semelhantes a 3 meses mais diferente de 6 e 12 meses (p<0,001). Os resultados encontrados após 3 e 6 meses também foram semelhantes entre si, mas estatisticamente maiores do que 1 ano (Figura 5.9).

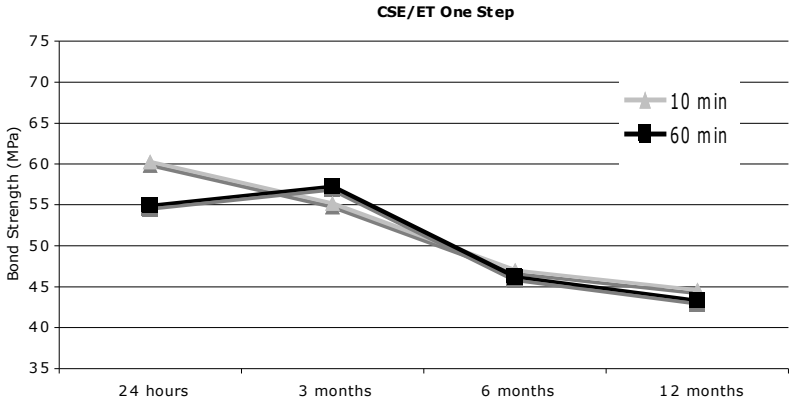












(Continuação...)

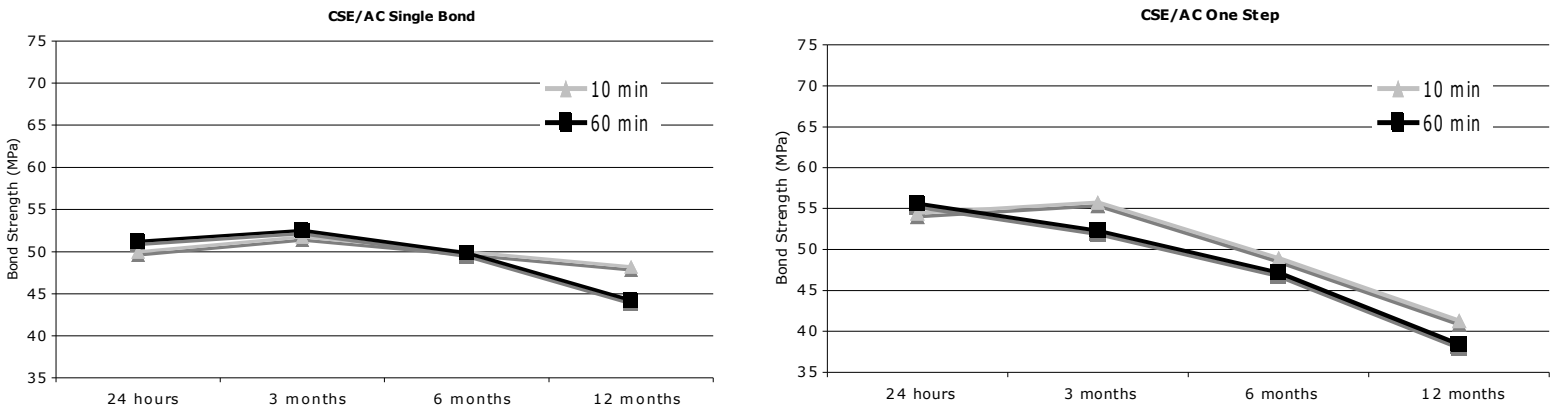


Figura 5.9 - Resistência de união (MPa) para os diversos tratamentos feitos em 10 min e 60 min testados em diversos tempos de armazenagem, para os adesivos Adpter Single Bond Plus e One Step Plus. GSE-Semente de uva; CSE-Semente de cacau; ET-Etanol; AC-Acetona. NOTA: escalas igauis em todos os gráficos

Analisar a resistência de união do colágeno tratado em diferentes concentrações

A resistência de união entre dentina-resina também foi significativamente afetada pela alteração das concentrações de GSE ($p<0,001$) assim como o tempo de armazenagem ($p<0,005$), porém as interações entre os fatores não foram estatisticamente significantes ($p=0,300$).

Uma maior concentração de GSE promoveu os valores mais altos de resistência de união entre dentina-resina e estabilidade depois de 6 meses em ambiente oral, conforme visto na tabela 5.10. As figuras 5.10 e 5.11 mostram o efeito da utilização de GSE em diferentes concentrações por apenas 1 minuto.

Tabela 5.10 - Resistência de união (μBS) entre dentina-resina [media (desvio-padrão)] após tratamentos com diferentes concentracoes de GSE, adesivos e tempos de armazenamento

μBS (MPa)			
Tratamento	Adesivos	Tempo de Armazenamento	
		24 horas	6 meses
Controle	OS	42,6 (6,9)$^{AB\ a}$	41,8 (6,5)$^{A\ a}$
	SB	41,0 (11,6)$^{B\ a}$	38,5 (11,1)$^{A\ a}$
6,5% GSE	OS	45,4 (3,5)$^{AB\ a}$	47,1 (10,3)$^{A\ a}$
	SB	48,7 (8,2)$^{AB\ a}$	39,0 (12,7)$^{A\ b}$
30% GSE	OS	50,1 (3,2)$^{AB\ a}$	46,6 (8,4)$^{A\ a}$
	SB	58,0 (3,5)$^{A\ a}$	54,0 (9,5)$^{A\ a}$

*Diferentes letras minúsculas e maiúsculas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) dentro de cada linha e coluna, respectivamente.
OS- One Step Plus; SB- Adapter Single Bond Plus; GSE- Extrato de semente de uva.

Os valores imediatos foram significantemente maiores para o grupo de 30%, quando comparado ao grupo controle (Figura 5.10). Apos 6 meses de armazenamento em saliva artificial, os valores mantiveram-se contantes para todos, exceto para o grupo de 6,5% GSE com o adesivo Single Bond. Os valores de 6 meses quando compardos entre si, foram similares, porém uma tendência de maiores resultados numéricos para 30% pode ser observada (Figura 5.11).

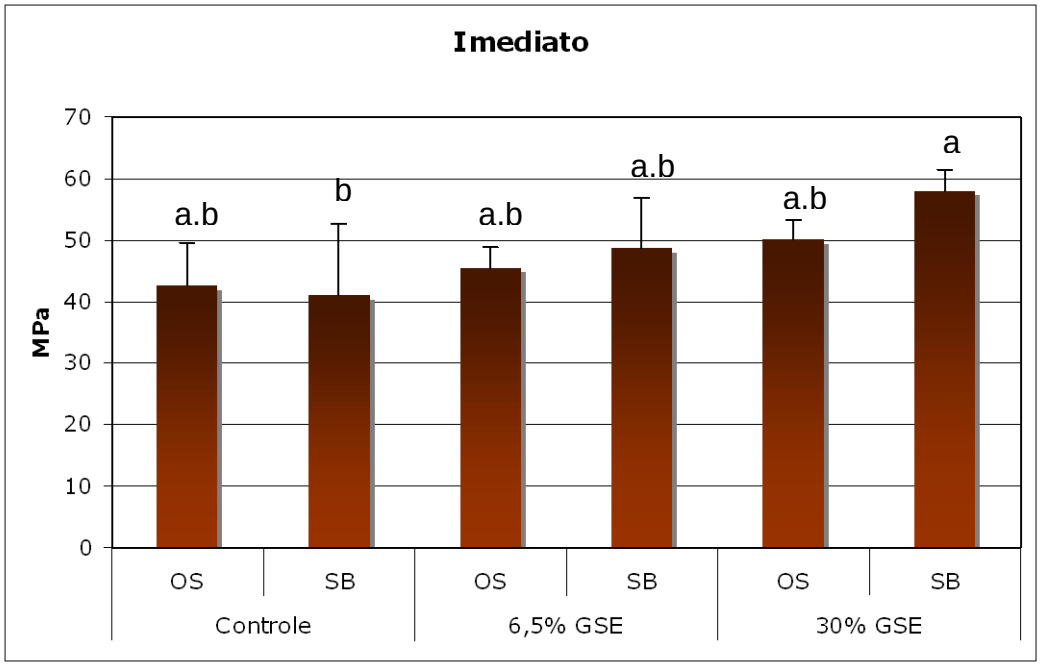


Figura 5.10 - Resistência de união (MPa) para os diversos tratamentos feitos em 1 min testados imediatamente para os adesivos One Step (OS) e Single Bond (SB). GSE-Semente de uva. Diferentes letras representam diferença estatística

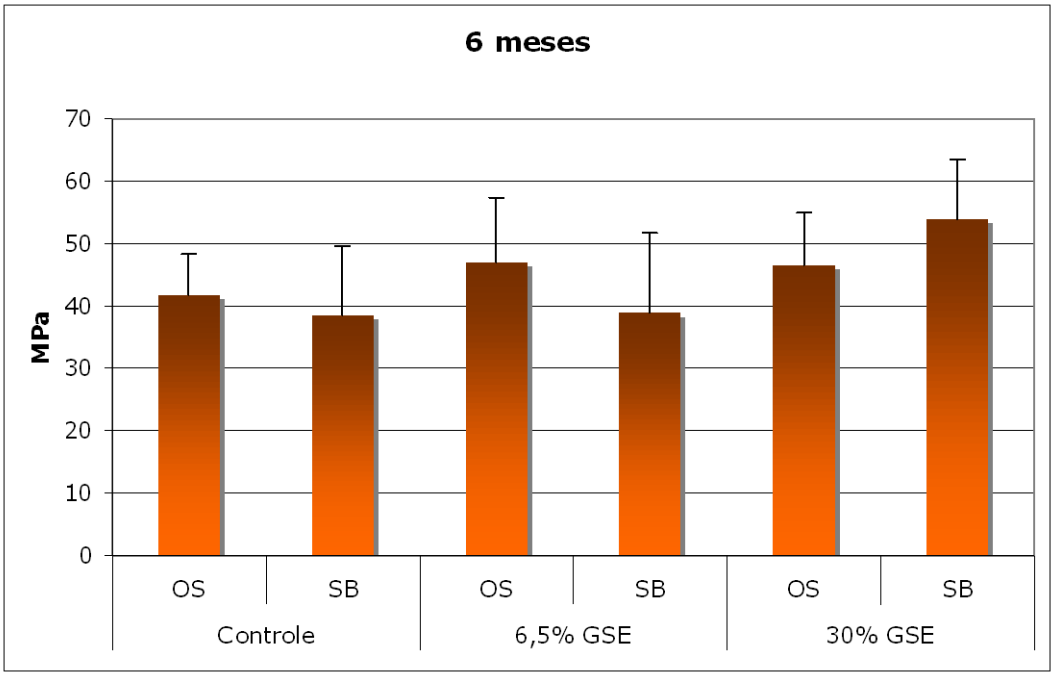


Figura 5.11 - Resistência de união (MPa) para os diversos tratamentos feitos em 1 min testados apos 6 meses de armazenamento para os adesivos One Step (OS) e Single Bond (SB). GSE-Semente de uva

6 DISCUSSÃO

A discussão segue a mesma divisão de tópicos dos capítulos de Materiais e Métodos e Resultados, para melhor entendimento e coerência de idéias.

6.1 Efetividade de diferentes extratos naturais a base de PA como agentes de ligações cruzadas com o colágeno dentinário

O estudo presente confirmou a habilidade notória de alguns agentes a base de PA de aumentar o módulo de elasticidade da matriz dentinária. Seus efeitos foram constantes e duradouros, demonstrados pelo aumento de quarenta vezes do módulo de elasticidade causado pelo GSE após 12 meses de armazenamento quando comparado aos grupos controles. Entretanto a hipotese nula de que não haveria diferença no módulo de elasticidade da matriz orgânica dentinária, independente do período de exposição ou armazenamento, tratada com diferentes fontes de biomodificadores ricos em PA em relação aos grupos controles deve ser parcialmente aceita, pois os agentes tiveram efeitos distintos e se comportaram diferentemente durante o armazenamento. O resultado de longo prazo dos agentes GSE e CSE na dentina desmineralizada, provavelmente se dá através da indução de ligações cruzadas no colágeno.

A resistência das fibrilas de colágeno dependem da formação endógena e exógena de ligações cruzadas [125]. O primeiro tipo acontece entre os telopeptídeos e os domínios helicoidais adjacentes das moléculas de colágeno tipo I. Este tipo de colágeno possui ao menos quatro sítios de ligações cruzadas: um em cada telopeptídeo (terminal-COOH e terminal NH_2) e outros dois sítios nos domínios da tripla hélice, resíduos 87 e 930 [126]. A interação do PA e colágeno resulta na indução de ligações cruzadas primariamente por pontes de hidrogênio entre a carbonila da amina proteica e a hidroxila fenólica [57] e também ligações covalentes, ionicas e agrupamentos hidrofóbicos.

A estabilidade relativamente grande dessas ligações cruzadas em comparação com outros polifenóis (tais como os taninos) sugere a especificidade

da estrutura [58], que apesar de incentivar a ligação de hidrogênio também podem criar bolsões hidrofóbicos [16]. Esses micro ambientes em virtude da diminuição da constante dielétrica, aumentam a estabilidade das pontes de hidrogênio. As ligações de hidrogênio, que não são estabilizadas por ligações hidrofóbicas adjacentes podem ser dissociados pelo tratamento com tampão aquoso [16], como saliva artificial, ao longo do tempo. Isso poderia explicar a diminuição dos valores do GSE após 3 meses e, também, a sua estabilização posterior. Álcools, por outro lado, pela diminuição da constante dielétrica do meio, também estimulam as interações entre PA e colágeno [16]. O uso de etanol-água pelo CSE como sistema solvente resultou em uma menor diminuição nos valores de rigidez ao longo do tempo de armazenagem, quando comparados ao GSE.

PA pertence a uma categoria conhecida como taninos condensados, estruturas altamente hidroxiladas capazes de formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas [127]. Já foi demonstrado que PA foram capazes de aumentar a síntese de colágeno e acelerar a conversão de colágeno solúvel em colágeno insolúvel durante o desenvolvimento [128]. Sementes de uva e de cacau, açaí, canela e oxicoco são fontes de PA descritos na literatura com vários efeitos benéficos para a saúde humana [129]. Infelizmente, a interação entre os três últimos extratos com o colágeno da dentina desmineralizada foi muito fraca. Os efeitos de curto e longo prazo foram despercebidos para o açaí e muito baixos para o oxicoco e para a canela, isso poderia ser explicado pelas diferenças química estruturais e/ou conteúdo PA. Devido à sua complexidade, as PAs proveniente de fontes distintas, tornam-se difíceis de analisar, o que constitui um desafio fitoquímico [48]. Os taninos da semente de uva são constituídos por uma mistura muito complexa de oligômeros e polímeros [130]. Cacau e canela, por outro lado, apresentam uma composição relativamente simples com oligômeros de baixo peso molecular [130]. Açaí tem um índice muito elevado de fenólicos, principalmente de ácidos fenólicos, catequinas e oligômeros de procianidina [131]. É razoável prever que variações da estrutura química, padrões de estereoquímica e composição total afetam as características gerais desses produtos naturais e, portanto, sua capacidade de interagir com o colágeno tipo I.

A concentração PA em cada extrato é outra explicação razoável para os diferentes valores de rigidez. Os maiores valores de GSE e CSE podem ser explicada pelo seu elevado conteúdo de PA (95% e 45%, respectivamente).

Variáveis como condição da matéria prima e processo de manufaturação tem efeitos profundos sobre a composição e o conteúdo de PA resultante de cada extrato. Por exemplo, a oxicoco fresca, semelhantemente às sementes de uva e cacau, contêm maior quantidade de fenóis totais, seguidos de outras frutas comuns, incluindo mirtilos, maçãs, uvas vermelhas e morango. Mas, ela possui apenas duas classes principais de compostos fenólicos identificados e apenas 56% é proantocianidina [44]. O extrato comercial de oxicoco utilizado neste estudo continha menos de 1% de PA, o que poderia explicar seu efeito suave. O efeito mais brando do extrato de canela, ou o efeito inexistente de extrato de açaí, também poderiam ser explicados pelo seus conteúdos de PA, apenas 8% e 1% na melhor das hipóteses, respectivamente. Os resultados diferentes quando comparados os extratos CRE e do ACE, ambos com quase a mesma quantidade de PA, pode ser devido à suas, já mencionadas, diferenças químicas estruturais.

Além das ligações de hidrogênio, entre PA e fibrilas de colágeno, que não estão estabilizadas e podem ser dissociadas pelo armazenamento em saliva, as metaloproteinases de matriz (MMPs) são outra possibilidade para a diminuição dos valores de rigidez ao longo do tempo tanto para os grupos tratados como para os grupos controle. MMPs são uma família de enzimas proteolíticas dependentes de zinco que são capazes de degradar a matriz orgânica da dentina após desmineralização, o que poderia explicar os valores mais baixos de ambos os grupos controle após o armazenamento de longo prazo [113]. Enzimas com atividade gelatinolítica (MMP-2 e MMP-20) estão presentes na matriz dentinária intacta [132] e na dentina cariada [133]. Alguns destes agentes naturais de ligações cruzadas, especialmente GSE e CRE, foram relatados como inibidores da atividade de MMPs [134, 135] e também reduzem os sítio de clivagem proteolítica na molécula de colágeno, escondendo ou modificando a estrutura devido ao dobramento de proteínas [136]. Estudos futuros deverão esclarecer o efeito de certos agentes de PA na atividade da dentina e também nas MMPs endógenas e exógenas.

Há uma crescente necessidade, na medicina e em outras áreas da saúde, por biomateriais que são versáteis e compatíveis com os tecidos humanos, sendo o colágeno um dos mais importantes exemplos. Desta forma a introdução de ligações cruzadas, reestruturação e estabilização do colágeno é um aspecto essencial para o uso de colágeno como biomaterial [2]. Alguns agentes de ligações cruzadas naturais foram capazes de aumentar e/ou estabilizar o módulo de

elasticidade de espécimes de dentina desmineralizada, dentre eles GSE, CSE, CRE e CNE. Entretetanto para melhor explorar outras caraterísticas inerentes a interação entre PA e colágeno apenas os extratos que apresentaram os melhores resultados (GSE e CSE) continuaram a fazer parte deste estudo.

6.2 Estudos dos parâmetros das soluções a base de PA: Solubilidade, procedência e/ou fabricante, tempo de aplicação e concentração dos extratos escolhidos

A força inerente do colágeno tipo I é derivada, conforme visto, da formação extracelular de ligações cruzadas covalentes. Light e Bayle [137] (1979) propuseram que uma maior estabilidade deste colágeno maduro seria devido a presença de ligações cruzadas multivalentes, formando um sistema tanto lateral como transversal de ligações cruzadas nas fibrilas [130].

Após o tratamento com extratos a base de PA, um aumento significativo e consistente foi encontrado no módulo de elasticidade da matriz dentinária, independente do tipo de solvente e tempo de exposição para todos os extratos usados (Tabela 5.3). Portanto, a hipótese nula deste estudo foi rejeitada. Embora todas as soluções mostraram um aumento nos valores de rigidez quando comparados ao grupo controle, os sistemas de solventes se comportaram diferentemente para cada extrato, e ainda diferentes concentrações também promoveram alterações na efetividade das soluções indutoras de ligações cruzadas. Ambos os extratos de semente de uva promoveram maior solubilidade em água destilada pura, já o tratamento com extrato de semente de cacau resultou em valores maiores quando uma solução de etanol e água foi utilizada, seguida da solução de acetona e água.

PA são constituintes fenólicos com estrutura química baseada em monômeros de flavan-3-ol. Sua condensação em dímeros, trímeros e oligômeros maiores leva a compostos de PA oligoméricos (também conhecidos como Proantocianidina Oligoméricas- OPCs). Variados tipos de ligações podem ser feitas entre os monômeros (por exemplo: <4-8> ou <4-6>, entre outras simples e duplas ligações C-C), sendo que o esqueleto de flavona pode aceitar inúmeros padrões de substituições estereoquímicas (por exemplo: catequina vs.

epicatequina, galocatequina vs. epigalocatequina). Como resultado, PA são produtos naturais tipicamente complexos para análise e a padronização de resultados torna-se um desafio [138]. É razoável predizer que a variação de estrutura química e composição global afeta características como solubilidade destes produtos naturais. Os compostos naturais conhecidos, contidos no extrato de semente de uva, apresentam apenas variações mínimas de seus parâmetros de solubilidade e consequentemente os valores de densidade de energia coesiva (δt) são intimamente relacionados. Os valores apresentados na tabela 5.5, de acordo com o modelo HSP, classificam a mistura fenólica como uma fração polar e mostram que a mistura água e acetona é o melhor solvente para a extração de PA monomérica, oligomérica e polimérica contida nos extratos de semente de uva. Baseado no HSP, a água pura não dissolve os polímeros de alto peso molecular deste extrato. Entretanto há limitações para a predição da solubilidade das OPCs em misturas aquosas utilizando métodos analíticos. Conforme o etanol e acetona são adicionados à água destilada pura, a entropia da mistura aumenta e a estrutura da mistura de solventes se torna menos ordenada, favorecendo a interação do soluto com a mistura de solventes [124]. Enquanto os polifenóis presentes no cacau são similares à semente de uva, os taninos presentes no ultimo consistem de misturas complexas de oligômeros e polímeros [124]. A relativa simplicidade presente na composição de PA do extrato de cacau pode explicar suas propriedades químicas e físicas, reatividade e sua solubilidade. Até o término deste estudo, os autores não encontraram na literatura os parâmetros de solubilidade dos polifenóis do extrato de cacau.

A principal distinção entre os diferentes extratos de plantas ricos em PA que estão disponíveis no mercado hoje é o processo de extração, o que representa um dos parâmetros farmacognósticos chave. O fornecedor da matéria prima e a manufaturação tem efeitos profundos sobre a composição, potência e conteúdo de PA final no extrato. O extrato de semente de uva proveniente da Mega-Natural contém aproximadamente 95% de PA e sua extração é feita com água quente. GSE da Sanrisil contém aproximadamente 13% de PA e é extraído em 20% de etanol e 80% de água. Extrato de semente de cacau foi obtido por extração com acetona e água, e contém cerca de 45% de PA (todas as informações foram fornecidas pelo fabricante; análises independente estão sendo feitas). A solubilidade superior deste último extrato em solventes menos polares como etanol

e acetona foi confirmada neste estudo. Isso mostra que, o processo de extração dos extratos comerciais parece influenciar na solubilidade dos extratos mais do que os parâmetros de solubilidade dos constituintes polifenólicos isolados estabelecidos.

Moléculas de colágeno tipo I são apresentados em tripla hélice (cerca de 280 nm de comprimento), sendo uma estrutura escalonada com uma periodicidade de aproximadamente 67 nm. Ligações de hidrogênio intra e inter-cadeia são apresentadas como fundamentais na formação da estrutura das moléculas de colágeno [124]. A remoção de água está associada com a desidratação química, como por exemplo a substituição com diferentes solventes polares, metanol, acetona e etanol, provocando retração do colágeno na matriz de dentina desmineralizada, e pode levar a um maior módulo de elasticidade e resistência à tração (UTS) [124]. Tal enrijecimento e fortalecimento do colágeno da dentina tem sido atribuído ao aumento dos níveis de ligações inter peptídeo de hidrogênio entre fibrilas de colágeno adjacentes, isto porque a estrutura do colágeno foi interrompida pela substituição da água por moléculas de solvente menos polares. A quantidade de retração e o aumento do ME e UTS são inversamente proporcional à capacidade de ligação de hidrogênio do solvente, representado no HSP pelo δH [124]. Com o seu valor δH relativamente maior, a água pode plastificar os colágeno quebrando as ligações inter peptídeo de hidrogênio, levando a um menor módulo e força [124]. O grupo controle tratado com água destilada mostrou apenas pequenas alterações na rigidez. Estudos prévios encontrados na literatura, relatam amostras de dentina desmineralizada expostas à desidratação por solventes polares no momento da realização do ensaio [9]. No presente estudo, todas as medidas foram realizadas em água, conhecida por reverter o aumento de rigidez da matriz orgânica causada por solventes polares livres de água [9], isto pode explicar o porquê dos baixos valores de ME para os grupos que utilizaram sistemas de solventes menos polares, como etanol ou acentona. Outra particularidade deste estudo é que todos os sistemas de solventes foram à base de água. Nenhum solvente livre de água foi utilizado puro, o que difere de estudos publicados anteriormente [9].

Parâmetros de solubilidade de Hansen (HSP) são apresentados na literatura para produtos derivados de plantas [124]. No presente estudo, o método de extração das OPC usado pelo fabricante teve maior influência sobre a solubilidade

do que os parâmetros de solubilidade. Extratos ricos em PA podem ser constituído por centenas de substâncias ativas naturais conhecidas e, talvez, por milhares de desconhecidas, como a quercetina, miricetina, ácido ferúlico, ácido caféico e / ou ácido cumárico. Portanto, o objetivo dos esforços é o de caracterizar todo o espectro de compostos polifenólicos contidos na semente de uva e de cacau além dos seus produtos, a fim de estabelecer uma correlação entre o conteúdo fitoquímico e propriedades bioativas de enrijecimento do colágeno tipo I.

Em relação aos outros parâmetros estudados, concentração e tempo de aplicação, nossos resultados mostram coerência com outros estudos prévios. Os agentes de ligação cruzadas à base de PA já foram relatados como sendo tempo e concentração dependentes [4]. Em relação ao tempo de tratamento ou exposição, a absorçãoda de PA pelas firbilas colágenas produz gráficos bimodais, ou seja, maior nos primeiros estágios, diminuindo gradualmente até o equílibrio que foi encontrado após 285 minutos em um estudo de Ku et al. [4] (2007). Este mesmo comportamento foi encontrado neste estudo (conforme visto na Figura 5.5). As concentrações acima de 6,5% exibiram curvas bimodais, com maior inclinação nos primeiros períodos de incubação devido ao maior número de sítios disponíveis e uma tendência a estabilidade após um período mais longo de contato, tornando-se quase que constante. Para as menores concentrações, a relação entre tempo e módulo de elasticidade foi praticamente proporcional, aumentando-se o tempo de aplicação, houve uma aumento proporcional da rigidez. Quando analisadas as diferentes concentrações, notou-se um aumento de quase 5 vezes comparando-se a maior e a menor concentração. A concentração de 30% de GSE (máxima recomendada pelo fabricante) mostrou resultados maiores e mais rápidos em relaçoes às demais concentrações, sugerindo a possibilidade de um menor tempo de pré-tratamento com este tipo de solução, buscando sempre a realidade clínica.

Ao elaborar um biomaterial, dependendo da aplicação específica, as propriedades de matrizes de colágeno podem ser adaptadas pela indução de ligações cruzadas. Os dados obtidos no presente estudo fundamentam a escolha de um agente natural para este fim. Os resultados levam a uma compreensão preliminar do efeito de ambos os extratos naturais e respectivos solventes como agentes de ligação cruzada capazes de modificar as propriedades do colágeno, e são potencialmente importantes na concepção de uma matriz dentinária forte que se torna um substrato menos propenso à degradação.

6.3 Caracterização da dentina desmineralizada tratada com extratos a base de PA

Existem desafios contínuos associados à resistência adesiva na odontologia, como a pobre infiltração da dentina desmineralizada por monômeros resinoso que proporciona uma camada híbrida menos homogênea [12]. Foi proposto para este estudo que uma camada de colágeno, quimicamente elaborada, mais forte e estável poderá resultar em uma camada híbrida menos suscetível à degradação. No presente estudo, agentes naturais ricos em PA foram examinados para avaliar seu potencial como agente biomimético para melhorar as propriedades mecânicas da dentina desmineralizada, e de acordo com nossos resultados, a hipótese nula foi rejeitada.

O aumento, dependente do tempo, das propriedades mecânicas da dentina desmineralizada tratada com PA já foi confirmado no primeiro e segundo estudos e também em trabalhos publicados na literatura [18, 139]. Diferentes mecanismos de interação dos agentes ricos em PA e as proteínas estão envolvidos no notável aumento na rigidez da dentina desmineralizada quando comparados ao grupo controle. Curiosamente, o extrato-fonte de PA teve um efeito estatisticamente significativo sobre os valores de rigidez. Os ensaios de calorimetria e degradação enzimática não foram altamente sensíveis para detectar uma diferença entre os diferentes extratos, mas o ensaio de sorção detectou uma menor razão de sorção para o extrato de cacau. Os taninos de semente de uva são constituídos por uma mistura complexa de oligômeros e polímeros compostos de catequina flavan-3-ols monomérica, epicatequina e seus galatos [130]. Enquanto o cacau é composto principalmente de unidades de epicatequina e seus oligômeros [140]. Esta simplicidade na composição de procianidina do cacau torna possível detectar os oligômeros de maior grau de polimerização por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa (HPLC / MS) [140, 141]. A composição muito mais complexa do procianidinas da semente da uva revela numerosas diastereoisômeros e com o aumento do peso molecular, o número de isômeros torna-se tão grande que a separação e detecção de isômeros individuais tornam-se desafiadoras por HPLC/MS[140]. A estrutura química das sementes de uva e cacau determina, conforme já citado, suas propriedades físicas e reatividade, bem

como a sua interatividade com o colágeno[142]. Sendo que diferentes taninos mostram variações em relação à interação com a proteína [65], é importante não só analisar o GSE, que já se provou eficiente, mas outros extratos ricos em PA, como o cacau.

O mecanismo de ligação cruzada entre PA e colágeno, pode ser conforme já dito, pela formação primária de pontes de hidrogênio entre a carbonila de amina de proteína e a hidroxila fenólica [143]. A relativa estabilidade destas ligações cruzadas em comparação com outros tipos de polifenóis sugere que apenas algumas moléculas de PA, interagem com a proteína do colágeno [16]. Já foi discutido anteriormente a diferença de composicão e conteúdo de PA dos dois extratos, porém para o ensaio de degradação enzimática ambos os agentes apresentaram alta resistência à tração que não foram afetadas pela digestão da colagenase.

A resistência à degradação enzimática é uma propriedade crucial de uma matriz dentinária tratada por PA, uma vez que indica um aumento da estabilidade e, possivelmente, um mecanismo de proteção para longos período de tempo. O ácido tânico é um polifenol que também é capaz de diminuir as taxas de degradação enzimáticas provavelmente mascararando os sítios de clivagem ou diminuindo a atividade enzimática [143]. A indução de agentes de ligação cruzadas exógenos na matriz dentinária também leva a uma diminuição da razão de sorção[144, 145].

A rede formada pelas ligações cruzadas exógenas seria densa, e a absorção de água prejudicada pela matriz. Este fenômeno foi observado no presente estudo para o colágeno tratado. Diferença estatística significativa foi mostrada entre GSE e CSE quando comparados ao grupo controle. A baixa razão de sorção para os grupos tratados pode indicar que não só o "mascaramento" dos sítios de clivagem ou diminuição da atividade da colagenase podem afetar a degradação da dentina tratada. Uma rede mais densa da matriz colagenosa poderia causar uma redução na absorção de colagenase [144] e, por conseguinte, ajudar na resistência contra a degradação enzimática da matriz. Menores valores de sorção para os grupos controle tratados com acetona pode ser explicado pelo aumento da capacidade das fibrilas de colágeno saturadas de acetona de formar ligações inter peptídicas que também enrijece a matriz de colágeno, reduzindo o efeito plastificante da água [9]. Aparentemente, o equilíbrio durante a noite em soro

fisiológico não conseguiu eliminar o efeito de acetona na matriz dentinária.

A estabilidade térmica dos espécimes compostos por fibrilas colágenas representa a resistência ao “desdobramento” das cadeias de colágeno como resultado do aquecimento. Uma maior temperatura de desnaturação (Td) indica uma maior densidade de ligações cruzadas, e uma melhor bioestabilidade e durabilidade dos tecidos fixados. Isto é corroborado pela mudança da suscetibilidade dos tecidos colagenosos à degradação proteolítica [5]. Os espécimes tratados com extratos a base de PA mostraram uma maior resistência sendo que a temperatura média de desnaturação ocorreu acima de 80 °C em comparação ao grupo controle (~55°C). Uma das causas pode ser devido ao tratamento da dentina desmineralizada causando diminuição da saturação de água, conforme valores de sorção previamente descritos. Sabe-se que quando a água é removida, há um aumento da Td. A ausência de água pode aumentar a resistência/estabilidade térmica devido às ligações cruzadas covalentes entre os peptídeos do colágeno [80]. Outro fator relacionado seria o aumento de ligações cruzadas prévias pelo tratamento com PA . A Td mais alta do colágeno insolúvel em relação ao colágeno mais solúvel pode ser devido a influência de estabilização das moléculas adjacentes pela solução indutora de ligações cruzadas [86]. Esta estabilização pode também aumentar a perda de água, sendo que ambos os fatores influenciam no aumento da Td.

Inúmeros picos nos termogramas do DSC para os grupos experimentais indica ambigüidade na formação de várias frações de colágeno com propriedades diferentes, isto pode ser uma sinal de diferentes níveis de ligações cruzadas no espécime, ou diferentes tipos de ligações cruzadas, ou até diferentes formas de enovelamento da tripla-hélice [5]. Danilov et al. [5] (2008) garantem que os múltiplos picos não são artefatos de técnicas, mas sim, representam uma característica deste tipo de espécime. Este fenômeno, segundo os autores, pode ser creditado a distribuição heterogênea das ligações cruzadas, causada pela difusão mais devagar dos reagentes no tecidos ou nas fibrilas propriamente dita.

É bem aceito que a resistência de união e a durabilidade dependem da qualidade da camada híbrida, em vez da espessura ou morfologia da camada híbrida e *tags* de resina [146]. Recentemente foram expressas preocupações relativas ao envelhecimento da interface devido à degradação da camada híbrida, absorção de água, a hidrólise da resina e rompimento da rede de colágeno[12]. A

dentina desmineralizada tratada com agentes a base de PA diminuiu a degradação da colagenase, aumentou as propriedades mecânicas e diminuiu a absorção de água. A densa matriz de colágeno seria potencialmente menos suscetível à ruptura por deformação [147] ou fadiga cíclica [148] após a função intraoral prolongada.

6.4 Resistência de união entre dentina tratada com extratos base de PA e compósitos dentais

Como a adesão é criada pela impregnação do substrato dentinário por misturas monoméricas resinosas, a estabilidade da interface apóia-se na criação de uma camada híbrida compacta e homogênea. Foi especulado que uma matriz orgânica mais resistente seria um melhor substrato para restaurações adesivas de curta e longa duração. O uso de agentes naturais de ligação cruzada foi capaz de aumentar a RU e mantê-la constante após armazenamento por 12 meses, porém este efeito foi dependente do tipo e concentração do extrato, tempo de aplicação e adesivo utilizados. Então a hipótese nula deste estudo foi parcialmente aceita.

A resistência de união da dentina tratada por 1 hora com GSE e consequentemente restaurada com dois sistemas adesivos comerciais (Single Bond e One Step), já havia sido avaliada [150]. Tratamento com 6,5% GSE produziu os maiores valores de resistência adesiva, estatisticamente superior ao glutaraldeído e o grupo controle [20]. Os autores sugeriram que GSE tem capacidade muito mais interativa com o colágeno do que glutaraldeído. O presente estudo observou primeiramente os efeitos de agentes de ligações cruzadas após 10 e 60 minutos de tratamento, sendo que o ultimo não é clinicamente viável. Nos resultados imediatos, não houve diferença estatisticamente significativa para ambos os tempos de tratamento tanto para GSE e CSE, mas apenas GSE apresentou valores maiores de resistência adesiva quando comparados ao grupo não tratado (Tabelas 5.8 e 5.9). CSE já foi descrito como um potencial agente de ligação cruzada do colágeno, com um tempo de exposição maior [149] e isto pode ser devido à diversidade de composição estrutural, como já descrito, e conteúdo de PA dos extratos. O menor teor de PA (valores fornecidos pelos fabricantes) presentes no CSE (cerca de 45%) quando comparado com o GSE (pelo menos

95%), bem como o tamanho de suas moléculas mais comuns de proantocianidina oligomérica de menor grau de polimerização que são capazes de diminuir a razão de sorção de água. O nível de formção da ligação cruzada (entre cadeias, entre moléculas vizinhas, fibrilas, etc.) é dependente do tamanho da molécula indutora [3]. Conforme descrito o cacau apresenta moléculas de baixo grau de polimerização e consequentemente menor tamanho [130], o que poderia causar um colapsamento maior da rede de fibrilas colágenas. Uma maior contração pode levar a uma menor sorção de água, conforme mostrado no estudo anterior e consequentemente uma pobre infiltração de monômeros resinosos. Como as moléculas de GSE são descritas com maior grau de polimerização, poderia-se supor que induziriam ligações cruzadas em níveis maiores, causando um menor colapsamento da rede orgânica.

A solução de GSE interagiu melhor com o sistema adesivo SB do que os outros grupos. O mesmo não foi encontrado com o sistema OS, que mostrou valores interessantes de RU também quando CSE foi utilizado. Isto provavelmente se deve a melhor afinidade entre solventes encontrados nos adesivos e nas soluções, afinal tanto etanol quanto acetona são solventes polares miscíveis em água, mas etanol encontrado no SB é um solvente prótico contendo um H^+ dissociável assim como a água e a acetona encontrada no OS é um solvente aprótico que compartilha íons e possui um baixo parâmetro δH de solubilidade (7.0), sendo que o etanol (19.4) mostra valores mais próximos aos da água (42.3) [123, 150]. A análise longitudinal destes agentes mostrou que após 12 meses de armazenamento os resultados também foram dependentes do tipo de sistema adesivo utilizado. Para o Adapter Single Bond Plus (SB) os valores se mativeram constantes para todos os grupos testados, não havendo uma queda de RU após a armazenagem. Esta estabilidade não foi encontrada quando o sistema OS foi empregado, o qual mostrou valores inferiores de RU após armazenamento e com isso não houve uma diferença estatística entre os grupos experimantais e controles após 1 ano de armazenamento.

Uma possível explicação para a queda dos valores de RU na utilização do OS foi encontrada por Hashimoto [151] (2010), que mostrou em um recente estudo publicado, que a degradação ocorre para todos os integrantes da camada híbrida. E que embora o adesivo Single Bond seja mais hidrófilo do que o sistema baseado em acetona (One Step), o ensaio de nanoinfiltração mostrou uma concentração de

grãos de nitrato de prata apenas na camada de adesivo, mantendo a camada híbrida intacta. Já os especimes restaurados com One Step (OS) e armazenados pelo mesmo período mostraram na microscopia eletrônica de varredura ausência de resina nos espaços interfibrilares, caracterizados por micro-espaços dentro da camada híbrida[151].

Quando é considerado o tempo de aplicação das soluções indutoras de ligações cruzadas pode-se verificar que apenas para o adesivo SB e o extrato CSE dissolvido em etanol/água houve diferença significante. Para todos os outros extratos utilizados com este adesivo ou com OS, o período de tratamento não aumentou a RU, melhorando a acessibilidade clínica, uma vez que embora 10 minutos de tratamento já sofra inúmeras criticas, 60 minutos não é aceitável. O tempo de 60 min foi o período encontrada na literatura em traballhos correlacionados [20], já 10 min foi o tempo estipulado nos ensaios anteriores de módulo de elasticidade no qual os espécimes já mostravam aumento de propriedades.

A redução do tempo de pré-tratamento com soluções ricas em PA era inerente para uma maior reproducibilidade clínica. Como segunda parte deste estudo foi realizada a RU entre dentina tratada por 1 minuto com GSE apenas, em duas concentrações, e os mesmos sistemas adesivos (SB e OS). Os resultados imediatos mostraram maiores valores de RU quando 30% GSE foi utilizado comparando com o grupo controle para o SB. Reiterando mais uma vez a melhor interação deste extrato com este sistema adesivo. Após 6 meses de armazenamento os valores foram estatisticamente significante para todos os grupos.

Quando a solução de GSE foi aplicada por 10 ou 60 minutos, os resultados de 6 meses se mostraram maiores do que o grupo controle, para ambos os sistemas adesivos. Provavelmente o reduzido tempo de tratamento induziu ligações cruzadas distribuídas heterogeneamente, não havendo tempo suficiente para que uma superfície tratada homogeneamente fosse adquirida. As ligações de hidrogênio proporcionadas pelas ligações cruzadas que não são estabilizadas por ligações hidrofóbicas adjacentes podem ser dissociados pelo tratamento com tampão aquoso [16], como saliva artificial, ao longo do tempo. Isso poderia explicar a diminuição de todos os valores de GSE nesta parte do trabalho, independente do tempo de tratamento (Figuras 5.9 e 5.11). Provavelmente o tratamento de 1 minuto

seja capaz de induzir as ligações de hidrôgenio, caracterizado pelo aumento da RU imediata, mas não seja suficiente para estabilizar com ligações hidrofóbicas adjacentes. Outro fator relacionado seria a própria degradação resinosa causada pela hidrólise que é um processo químico capaz de quebrar as ligações covalentes entre polímeros pela adição de água às ligações de ésteres, causando a perda de massa resinosa [12]. Este processo é considerado a principal razão para a degredação resinosa na camada híbrida [108].

Uma camada de colágeno mais estável e menos sucetivel à degradação enzimatica pode ser conseguida pelo tratamento da dentina desmineralizada por agentes ricos em PA (estudos 1 e 3). Esta camada de colágeno tratado serviu como substrato adesivo neste estudo. Apenas o GSE mostrou uma real capacidade de induzir ligações cruzadas buscando desenvolver um substrato mais resistente e durável, sem diminuir a penetração resinosa, e consequentemente melhorar a RU. GSE foi capaz de manter valores de RU mais altos quando utilizado em conjunto com o SB, e também foi capaz de aumentar a RU imediata em apenas 1 minuto de tratamento, que se manteve estável por 6 meses.

6.5 Considerações Finais

Sabe-se que as fibrilas colágenas dentinárias auxiliam uma série de funções biológicas e reparativas desde a mineralização dos dentes até, no momento da restauração, a manutenção de uma rede tridimensional que servirá de substrato para a impregnação de monômeros resinosos. Uma vez desmineralizada a dentina, estas fibrilas são expostas ao ambiente oral que é nocivo e pode desnaturá-las ocorrendo a perda do alicerce de um possível reestabalecimento da forma e função dentária. Desta forma este estudo propôs, por intermédio de ligações cruzadas exógenas, aumentar a resistência à degradação da matriz orgânica desmineralizada, melhorando também algumas propriedades físicas, químicas e mecânicas.

De forma geral os extratos naturais de baixo custo, fácil obtenção e baixa citotoxicidade provenientes da proantocianidina são conhecidos pela alta afinidade às proteínas ricas em prolina, e capazes de ligações curzadas específicas e

estáveis. Soluções ricas em extratos de sementes de uva e cacau aumentaram o módulo de elasticidade de espécimes de matriz orgânica dentinária e os mantiveram estáveis por pelo menos 1 ano. Os sistemas de solventes utilizados nas soluções são específicos e estão relacionados com o manufaturamento de cada extrato, sendo assim o fabricante deve ser levado em consideração. Estas soluções ricas em proantocianidina mostraram ser tempo e concentração dependentes. A concentração máxima de 30% de extrato de semente de uva por 60 minutos promoveu os mais altos resultados de módulo de elasticidade da dentina desmineralizada.

Além do aumento da resitência mecânica quantificada pelo módulo de elasticidade, a dentina tratada com soluções indutora de ligações cruzadas ricas em proantocianidina proveniente de sementes de uva e cacau mostrou ser menos suscetível a sorção de água, mais resistentes a degradação térmica e também a enzimática quando comparadas a dentina não tratada. Em relação a resistência de união os maiores valores, e também os mais estáveis, foram encontrados quando a dentina foi tratada com extrato de semente de uva e o sistema adesivo comercial a base de etanol e água foi utilizado. Uma adesão melhor e mais estável mostrou ser dependente da combinação entre extrato e sistema adesivo. Melhorando a acessibilidade clínica um tempo de tratamento de 1 minuto com extrato de semente de uva na concentração máxima de 30% foi capaz de melhorar a adesão imediata e mantê-la estável por pelo menos 6 meses.

7 CONCLUSÕES

As conclusões encontradas por este estudo foram:

1. A integridade e estabilidade ao longo do tempo são pré-condições para o colágeno como biomaterial ou como substrato essencial para restaurações adesivas. Extratos ricos em PA são ferramentas importantes para o modelamento da matriz de colágeno através de ligações cruzadas, e seu efeito depende da estrutura química, conteúdo de PA e características fitoquímicas de cada extrato. A estabilização da matriz de colágeno por longos períodos de armazenagem foi obtida com o uso destes agentes.
2. A natureza e o método de extração dos agentes de ligações cruzadas a base de PA influenciam às propriedades elásticas da dentina desmineralizada. GSE e CSE foram efetivos aumentando a rigidez da matriz de dentina. Fatores como solubilidade, tempo de aplicação, concentração e procedência dos extratos são importantes para a efetividade de soluções capazes de realizar ligações cruzadas com o colágeno.
3. Os extratos estudados aumentaram a resistência à degradação por colagenase da matriz orgânica dentinária, diminuíram a sorção de água na rede de colágeno e aumentaram a temperatura necessária para que ocorra a desnaturação do colágeno dentinário, em comparação aos grupos não tratados.
4. Houve um aumento da resistência de união imediata após o uso de agentes de ligação cruzada com o GSE, independente do sistema adesivo utilizado. Adapter Single Bond Plus mostrou uma estabilidade ao longo do tempo para todos os grupos experimentais que o sistema adesivo One Step Plus não mostrou, ocorrendo a queda dos valores de RU para todos os grupos. GSE em uma concentração de 30%, por 1 minuto, mostrou um aumentos dos valores de RU e estabilidade apos 6 meses.

REFERÊNCIAS [1]

1 Yamauchi M. Collagen biochemistry: an overview. Advances in Tissue Banking World Scientific Publishing; 2002. p. 55.

2 Stenzel KH, Miyata T, Rubin AL. Collagen as a biomaterial. Annu Rev Biophys Bioeng. 1974;3(1):231-53.

3 Zeeman R, Dijkstra PJ, van Wachem PB, van Luyn MJ, Hendriks M, Cahalan PT, et al. Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. Biomaterials. 1999 May;20(10):921-31.

4 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 Apr;67(8):1618-27.

5 Danilov NA, Ignatieva NY, Iomdina EN, Semenova SA, Rudenskaya GN, Grokhovskaya TE, et al. Stabilization of scleral collagen by glycerol aldehyde cross-linking. Biochim Biophys Acta. 2008 May;1780(5):764-72.

6 Cornwell KG, Lei P, Andreadis ST, Pins GD. Crosslinking of discrete self-assembled collagen threads: Effects on mechanical strength and cell-matrix interactions. J Biomed Mater Res A. 2007 Feb;80(2):362-71.

7 Charulatha V, Rajaram A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. Biomaterials. 2003 Feb;24(5):759-67.

8 Bruel A, Ortoft G, Oxlund H. Inhibition of cross-links in collagen is associated with reduced stiffness of the aorta in young rats. Atherosclerosis. 1998 Sep;140(1):135-45.

9 Maciel KT, Carvalho RM, Ringle RD, Preston CD, Russell CM, Pashley DH. The effects of acetone, ethanol, HEMA, and air on the stiffness of human decalcified dentin matrix. J Dent Res. 1996 Nov;75(11):1851-8.

10 Veis A. Dentin. In: Comper WD, editor. Extracellular Matrix , Tissue Function. Amstredan: Harwood Academic Publishers; 1996. p. 35.

11 Marshall GW, Jr., Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. J Dent. 1997 Nov;25(6):441-58.

[1] De acordo com o Estilo Vancouver.

12 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 Jan;24(1):90-101.

13 Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010 Jul;94(1):250-5.

14 Bedran-Russo AK, Yoo KJ, Ema KC, Pashley DH. Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. J Dent Res. 2009 Sep;88(9):807-11.

15 Hummer W, Schreier P. Analysis of proanthocyanidins. Mol Nutr Food Res. 2008 Dec;52(12):1381-98.

16 Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. J Biomed Mater Res A. 2003 Apr 1;65(1):118-24.

17 Maffei FR, Carini M, Aldani G, Bombardelli E, Morazzoni P, Morelli R. Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of proanthocyanidin from Vitis Vinifera. Arzneimittelforschung. 1994;44:592-601.

18 Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008 Aug;86B(2):330-4.

19 Castellan CS, Pereira PN, Viana G, Chen SN, Pauli GF, Bedran-Russo AK. Solubility study of phytochemical cross-linking agents on dentin stiffness. J Dent. 2010 May; 38(5):431-6. Epub 2010 Feb 18.

20 Al-Ammar A, Drummond JL, Bedran-Russo AK. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009 Oct;91(1):419-24.

21 Castellan CS, Pereira PN, Grande RH, Bedran-Russo A. Mechanical caracterization of proantocyanidin-dentin matrix interaction. Dent Mater. 2010 Oct; 26(10):968-73. Epub 2010 July 21.

22 Macedo GV, Yamauchi M, Bedran-Russo AK. Effects of chemical cross-linkers on caries-affected dentin bonding. J Dent Res. 2009 Dec;88(12):1096-100.

23 Xie Q, Bedran-Russo AK, Wu CD. In vitro remineralization effects of grape seed extract on artificial root caries. J Dent. 2008 Nov;36(11):900-6.

24 Marshall GW, Jr. Dentin: microstructure and characterization. Quintessence Int. 1993 Sep;24(9):606-17.

25 Butler WT. Dentin extracellular matrix and dentinogenesis. Oper Dent. 1992;Suppl 5:18-23.

26 Arana EKV. Histologia e Embriologia oral : texto atlas correlações clínicas. 1a ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2001.

27 Pashley DH. Dentin: a dynamic substrate--a review. Scanning Microsc. 1989 Mar;3(1):161-74; discussion 74-6.

28 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts M, Watson J. Molecular biology of the cell. 3a ed. New York: Garland; 1994.

29 Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens modifying enzymes and their mutation in humans, flies and worms. Trends in Genetics. 2004;20(1):33-43.

30 Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(1):13-27.

31 Chapman JA, Tzaphlidou M, Meek KM, Kadler KE. The collagen fibril--a model system for studying the staining and fixation of a protein. Electron Microsc Rev. 1990;3(1):143-82.

32 Bailey AJ. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. Mech Ageing Dev. 2001 May 31;122(7):735-55.

33 Tenorio DM, Santos MF, Zorn TM. Distribution of biglycan and decorin in rat dental tissue. Braz J Med Biol Res. 2003 Aug;36(8):1061-5.

34 Weinstein SB, JA. Ortopedia de Turek: princípios e sua aplicação. 5a ed. São Paulo: Manole; 2000.

35 Bailey AJ, Paul RG, Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. Mech Ageing Dev. 1998 Dec 1;106(1-2):1-56.

36 Kaplan I, Ada S, Ozerkan F, Bora A, Ademoglu Y. Reconstruction of soft tissue and bone defects in lower extremity with free flaps. Microsurgery. 1998;18(3):176-81.

37 Notelovitz M. Osteoporose: prevencao, diagnostico e conduta. 3a ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas; 2001.

38 Kinney JH, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin. J Dent Res. 2003 Dec;82(12):957-61.

39 Monnier VM, Mustata GT, Biemel KL, Reihl O, Lederer MO, Zhenyu D, et al. Cross-linking of the extracellular matrix by the maillard reaction in aging and diabetes: an update on "a puzzle nearing resolution". Ann N Y Acad Sci. 2005 Jun;1043:533-44.

40 Mota V. Bioquimica. São Paulo: EDUCS; 2005.

41 Weadock K, Olson RM, Silver FH. Evaluation of collagen crosslinking techniques. Biomater Med Devices Artif Organs. 1983;11(4):293-318.

42 Fujimori E. Cross-linking of collagen CNBr peptides by ozone or UV light. FEBS Lett. 1988 Aug 1;235(1-2):98-102.

43 Sung HW, Hsu CS, Wang SP, Hsu HL. Degradation potential of biological tissues fixed with various fixatives: an in vitro study. J Biomed Mater Res. 1997 May;35(2):147-55.

44 McKay DL, Blumberg JB. Cranberries (Vaccinium macrocarpon) and cardiovascular disease risk factors. Nutr Rev. 2007 Nov;65(11):490-502.

45 Feeney RE, Blankenhorn G, Dixon HB. Carbonyl-amine reactions in protein chemistry. Adv Protein Chem. 1975;29:135-203.

46 Nimni ME, Cheung D, Strates B, Kodama M, Sheikh K. Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement. J Biomed Mater Res. 1987 Jun;21(6):741-71.

47 Joshi SS, Kuszynski CA, Bagchi D. The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. Curr Pharm Biotechnol. 2001 Jun;2(2):187-200.

48 Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. J Med Food. 2003 Winter;6(4):291-9.

49 Robbins RJ, Kwik-Uribe C, Hammerstone JF, Schmitz HH. Analysis of flavanols in foods: what methods are required to enable meaningful health recommendations? J Cardiovasc Pharmacol. 2006;47 Suppl 2:S110-8; discussion S9-21.

50 Haslam E. Polyphenols-vegetable tannins. In: Phillipson J, Ayres D, Baxter J, editors. Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited. Cambridge: Cambridge University Press; 1989. p. 1-89.

51 Bors W, Michel C, Stettmaier K. Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. Arch Biochem Biophys. 2000 Feb 15;374(2):347-55.

52 Rao CN, Rao VH, Steinmann B. Bioflavonoid-mediated stabilization of collagen in adjuvant-induced arthritis. Scand J Rheumatol. 1983;12(1):39-42.

53 Francis G, Donnelly PV, Di Ferrante N. Abnormally soluble collagen produced in fibroblasts cultures. Experientia. 1976 Jun 15;32(6):691-3.

54 Kuttan R, Donnelly PV, Di Ferrante N. Collagen treated with (+)-catechin becomes resistant to the action of mammalian collagenase. Experientia. 1981 Mar 15;37(3):221-3.

55 Kim SJ, Lim MH, Chun IK, Won YH. Effects of flavonoids of Ginkgo biloba on proliferation of human skin fibroblast. Skin Pharmacol. 1997;10(4):200-5.

56 Pierpoint WS. o-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides. Biochem J. 1969 May;112(5):609-16.

57 Hagerman AE, Klucher KM. Tannin-protein interactions. Prog Clin Biol Res. 1986;213:67-76.

58 Hagerman AE, Butler LG. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. J Biol Chem. 1981 May 10;256(9):4494-7.

59 Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Toxicology. 2000 Aug 7;148(2-3):187-97.

60 Cheung DT, Tong D, Perelman N, Ertl D, Nimni ME. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde. IV: In vitro and in vivo stability of a crosslinked collagen matrix. Connect Tissue Res. 1990;25(1):27-34.

61 Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999 Oct;12(4):564-82.

62 Ye X, Krohn RL, Liu W, Joshi SS, Kuszynski CA, McGinn TR, et al. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. Mol Cell Biochem. 1999 Jun;196(1-2):99-108.

63 Teixeira S. Bioflavonoids: proanthocyanidins and quercetin and their potential roles in treating musculoskeletal conditions. J Orthop Sports Phys Ther. 2002 Jul;32(7):357-63.

64 Wang BH, Foo LY, Polya GM. Differential inhibition of eukaryote protein kinases by condensed tannins. Phytochemistry. 1996 Sep;43(2):359-65.

65 Bennick A. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(2):184-96.

66 Reichert D, Pascui O, deAzevedo ER, Bonagamba TJ, Arnold K, Huster D. A solid-state NMR study of the fast and slow dynamics of collagen fibrils at varying hydration levels. Magn Reson Chem. 2004 Feb;42(2):276-84.

67 Sathishkumar M, Binupriya AR, Kavitha D, Yun SE. Kinetic and isothermal studies on liquid-phase adsorption of 2,4-dichlorophenol by palm pith carbon. Bioresour Technol. 2007 Mar;98(4):866-73.

68 Deepa KK, Sathishkumar M, Binupriya AR, Murugesan GS, Swaminathan K, Yun SE. Sorption of Cr(VI) from dilute solutions and wastewater by live and pretreated biomass of Aspergillus flavus. Chemosphere. 2006 Feb;62(5):833-40.

69 Sasaki N, Odajima S. Elongation mechanism of collagen fibrils and force-strain relations of tendon at each level of structural hierarchy. J Biomech. 1996 Sep;29(9):1131-6.

70 Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(1):13-29.

71 Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Russell CM, Pashley DH. Tensile properties of resin-infiltrated demineralized human dentin. J Dent Res. 1995 Apr;74(4):1093-102.

72 Kinney JH, Marshall GW, Jr., Marshall SJ. Three-dimensional mapping of mineral densities in carious dentin: theory and method. Scanning Microsc. 1994;8(2):197-204; discussion -5.

73 Zhang Y, Agee K, Nor J, Carvalho R, Sachar B, Russell C, et al. Effects of acid-etching on the tensile properties of demineralized dentin matrix. Dent Mater. 1998 Jun;14(3):222-8.

74 Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjaderhane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009 Jul;90(1):373-80.

75 Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. J Dent. 2002 Sep-Nov;30(7-8):371-82.

76 Amaral FL, Colucci V, Palma-Dibb RG, Corona SA. Assessment of in vitro methods used to promote adhesive interface degradation: a critical review. J Esthet Restor Dent. 2007;19(6):340-53; discussion 54.

77 De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. J Dent Res. 2003 Feb;82(2):136-40.

78 Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. J Dent Res. 2006 Jan;85(1):22-32.

79 Ciardelli G, Gentile P, Chiono V, Mattioli-Belmonte M, Vozzi G, Barbani N, et al. Enzymatically crosslinked porous composite matrices for bone tissue regeneration. J Biomed Mater Res A. Jan;92(1):137-51.

80 Armstrong SR, Jessop JL, Winn E, Tay FR, Pashley DH. Effects of polar solvents and adhesive resin on the denaturation temperatures of demineralised dentine matrices. J Dent. 2008 Jan;36(1):8-14.

81 Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Roveri N, Rubini K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. Biomaterials. 2002 Dec;23(24):4827-32.

82 Friess W, Lee G. Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices. Biomaterials. 1996 Dec;17(23):2289-94.

83 Rochdi A, Foucat L, Renou JP. Effect of thermal denaturation on water-collagen interactions: NMR relaxation and differential scanning calorimetry analysis. Biopolymers. 1999 Dec;50(7):690-6.

84 Ramachandran GN, Chandrasekharan R. Interchain hydrogen bonds via bound water molecules in the collagen triple helix. Biopolymers. 1968;6(11):1649-58.

85 Miles CA, Avery NC, Rodin VV, Bailey AJ. The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibres. J Mol Biol. 2005 Feb 18;346(2):551-6.

86 Miles CA, Ghelashvili M. Polymer-in-a-box mechanism for the thermal stabilization of collagen molecules in fibers. Biophys J. 1999 Jun;76(6):3243-52.

87 Fathima NN, Madhan B, Rao JR, Nair BU, Ramasami T. Interaction of aldehydes with collagen: effect on thermal, enzymatic and conformational stability. Int J Biol Macromol. 2004 Aug;34(4):241-7.

88 Seifter S, Takahashi S, Harper E. Further demonstration that cysteine reacts with the metal component of collagenase. Biochim Biophys Acta. 1970 Sep 29;214(3):559-61.

89 Matthew F. Paige ACLaMCG. Real-time enzymatic biodegradation of collagen fibrils monitored by atomic force microscopy. Int Biodeterioration & Biodegradation. 2002;50(1):1-10.

90 Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur J Cell Biol. 1997 Oct;74(2):111-22.

91 Watanabe K. Collagenolytic proteases from bacteria. Appl Microbiol Biotechnol. 2004 Feb;63(5):520-6.

92 Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003 May 2;92(8):827-39.

93 van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. Caries Res. 2003 Jan-Feb;37(1):58-65.

94 Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A, Jr., et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. J Biomed Mater Res A. 2009 Mar 1;88(3):697-703.

95 Jeffrey JJ, Gross J. Collagenase from rat uterus. Isolation and partial characterization. Biochemistry. 1970 Jan 20;9(2):268-73.

96 Mjor IA, Gordan VV. Failure, repair, refurbishing and longevity of restorations. Oper Dent. 2002 Sep-Oct;27(5):528-34.

97 Mjor IA, Shen C, Eliasson ST, Richter S. Placement and replacement of restorations in general dental practice in Iceland. Oper Dent. 2002 Mar-Apr;27(2):117-23.

98 Inoue S, Vargas MA, Abe Y, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, et al. Microtensile bond strength of eleven contemporary adhesives to dentin. J Adhes Dent. 2001 Fall;3(3):237-45.

99 De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. J Dent Res. 2005 Feb;84(2):118-32.

100 Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. J Biomed Mater Res. 1982 May;16(3):265-73.

101 Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Yiu C, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. Am J Dent. 2005 Dec;18(6):315-9.

102 Loguercio AD, Uceda-Gomez N, Carrilho MR, Reis A. Influence of specimen size and regional variation on long-term resin-dentin bond strength. Dent Mater. 2005 Mar;21(3):224-31.

103 Gale MS, Darvell BW. Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. J Dent. 1999 Feb;27(2):89-99.

104 Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. J Dent Res. 2000 Jun;79(6):1385-91.

105 Cadenaro M, Antoniolli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. Eur J Oral Sci. 2005 Dec;113(6):525-30.

106 Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. Biomaterials. 2003 Sep;24(21):3795-803.

107 Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y, et al. Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. J Biomed Mater Res. 2002;63(3):306-11.

108 Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? J Can Dent Assoc. 2003 Dec;69(11):726-31.

109 Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. Biomaterials. 2005 Nov;26(33):6449-59.

110 Tanaka J, Ishikawa K, Yatani H, Yamashita A, Suzuki K. Correlation of dentin bond durability with water absorption of bonding layer. Dent Mater J. 1999 Mar;18(1):11-8.

111 Yiu CK, Pashley EL, Hiraishi N, King NM, Goracci C, Ferrari M, et al. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. Biomaterials. 2005 Dec;26(34):6863-72.

112 Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho MI. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. Calcif Tissue Int. 1995 Jul;57(1):52-9.

113 Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. J Dent Res. 2004 Mar;83(3):216-21.

114 Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Horner JA, Matthews WG, Pashley DH. Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. Oper Dent. 1995 Jan-Feb;20(1):18-25.

115 Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. J Biomed Mater Res. 2002 Jan;59(1):46-55.

116 King NM, Tay FR, Pashley DH, Hashimoto M, Ito S, Brackett WW, et al. Conversion of one-step to two-step self-etch adhesives for improved efficacy and extended application. Am J Dent. 2005 Apr;18(2):126-34.

117 Pashley EL, Agee KA, Pashley DH, Tay FR. Effects of one versus two applications of an unfilled, all-in-one adhesive on dentine bonding. J Dent. 2002 Feb-Mar;30(2-3):83-90.

118 Van Landuyt KL, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, et al. Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. J Dent Res. 2005 Feb;84(2):183-8.

119 Sadek FT, Castellan CS, Braga RR, Mai S, Tjaderhane L, Pashley DH, et al. One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. Dent Mater. Apr;26(4):380-6.

120 Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. J Dent Res. 2007 Jan;86(1):90-4.

121 Nielsen LE. Mechanical properties of polymers and composites. New York: Dekker M; 1974.

122 Hara AT, Queiroz CS, Giannini M, Cury JA, Serra MC. Influence of the mineral content and morphological pattern of artificial root caries lesion on composite resin bond strength. Eur J Oral Sci. 2004 Feb;112(1):67-72.

123 Hansen CM. Hansen Solubility Parameters: A user's handbook. Boca Raton: CRC Press; 2000.

124 Savova MK, Stourza A, Seikova I. The use of group contribution method for predicting the solubility of seed polyphenols of vitis vinifera L., within a wide polarity range in solvent mixtures. J University of Chemi Technology and Metallurgy. 2007;42(3):295-300.

125 Goh KL, Meakin JR, Aspden RM, Hukins DW. Stress transfer in collagen fibrils reinforcing connective tissues: effects of collagen fibril slenderness and relative stiffness. J Theor Biol. 2007 Mar 21;245(2):305-11.

126 Takaluoma K, Lantto J, Myllyharju J. Lysyl hydroxylase 2 is a specific telopeptide hydroxylase, while all three isoenzymes hydroxylate collagenous sequences. Matrix Biol. 2007 Jun;26(5):396-403.

127 Cao N, Fu Y, He J. Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. Food Hydrocolloids. 2007;21(4):575-84.

128 Han B, Nimni ME. Transdermal delivery of amino acids and antioxidants enhance collagen synthesis: in vivo and in vitro studies. Connect Tissue Res. 2005;46(4-5):251-7.

129 Cos P, De Bruyne T, Hermans N, Apers S, Berghe DV, Vlietinck AJ. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. Curr Med Chem. 2004 May;11(10):1345-59.

130 Thompson RJ, Haslam, E. Plant proanthocyanidins, part I. Introduction: the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. J Chemi Soc. 1972;1:1387.

131 Prior RL, Lazarus SA, Cao G, Muccitelli H, Hammerstone JF. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (Vaccinium spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. J Agric Food Chem. 2001 Mar;49(3):1270-6.

132 Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. Arch Oral Biol. 2000 Sep;45(9):757-65.

133 Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. J Dent Res. 1998 Aug;77(8):1622-9.

134 Matchett MD, MacKinnon SL, Sweeney MI, Gottschall-Pass KT, Hurta RA. Inhibition of matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells by flavonoids from lowbush blueberry (Vaccinium angustifolium): possible roles for protein kinase C and mitogen-activated protein-kinase-mediated events. J Nutr Biochem. 2006 Feb;17(2):117-25.

135 Matchett MD, MacKinnon SL, Sweeney MI, Gottschall-Pass KT, Hurta RA. Blueberry flavonoids inhibit matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells. Biochem Cell Biol. 2005 Oct;83(5):637-43.

136 Jayakrishnan A, Jameela SR. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. Biomaterials. 1996 Mar;17(5):471-84.

137 Light ND, Bailey AJ. Changes in crosslinking during aging in bovine tendon collagen. FEBS Lett. 1979 Jan 1;97(1):183-8.

138 Lazarev YA, Grishkovsky BA, Khromova TB, Lazareva AV, Grechishko VS. Bound water in the collagen-like triple-helical structure. Biopolymers. 1992 Feb;32(2):189-95.

139 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 Jan;80(1):268-72.

140 Rigaud JE-B, Prieur C, Souquet JM, Cheynier V. Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds J Chromatogr A. 1993;654(2):255-60.

141 Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH. Identification of procyanidins in cocoa (Theobroma cacao) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. J Agric Food Chemi. 1999 Feb;47(2):490-6.

142 Nunez V, Gomes-Córdoves C, Bartolomé B, Hong Y, Mitchell A. Non-galloylated and galloylated proanthocyanidin oligomers in grape seeds from *Vitus Vinifera* l. cv. Graciano, Tempranillo and Carbenet Sauvignon. J Sci Food agriculture. 2006;86:915-20.

143 Isenburg JC, Simionescu DT, Vyavahare NR. Elastin stabilization in cardiovascular implants: improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid. Biomaterials. 2004 Jul;25(16):3293-302.

144 Nam K, Kimura T, Kishida A. Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels. Biomaterials. 2007 Jul;28(20):3153-62.

145 Pek YS, Spector M, Yannas IV, Gibson LJ. Degradation of a collagen-chondroitin-6-sulfate matrix by collagenase and by chondroitinase. Biomaterials. 2004 Feb;25(3):473-82.

146 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 Jul;10(4):241-6.

147 Wang XT, Ker RF, Alexander RM. Fatigue rupture of wallaby tail tendons. J Exp Biology. 1995 Mar;198(Pt 3):847-52.

148 Wang XT, Ker RF. Creep rupture of wallaby tail tendons. The Journal of experimental biology. 1995 Mar;198(Pt 3):831-45.

149 Gasser P, Lati E, Peno-Mazzarino L, Bouzoud D, Allegaert L, Bernaert H. Cocoa polyphenols and their influence on parameters involved in ex vivo skin restructuring. International journal of cosmetic science. 2008 Oct;30(5):339-45.

150 Lowery THR, K S. Mechanism and Theory in Organic Chemistry. 3rd ed. New York: Harper Collins Publishers; 1987.

151 Hashimoto M. A review--micromorphological evidence of degradation in resin-dentin bonds and potential preventional solutions. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010 Jan;92(1):268-80.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 12/08

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa: **"EFEITO DO USO DE BIOFLAVONÓIDES NA RESISTÊNCIA MECÂNICA DA DENTINA DESMINERALIZADA E NA RESISTÊNCIA DA UNIÃO DENTINA E SISTEMAS ADESIVOS"**, de responsabilidade da Pesquisadora: **CARINA STRANO CASTELLAN,** sob orientação da Professora Doutora **PATRÍCIA NÓBREGA RODRIGUES PEREIRA.**

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 04 de março de 2008

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-900
São Paulo – SP - Diretoria Telefax: (011) 3091- 0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7895
Impresso no S.D.O