**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

MARCELA MARTINI TAGLIANI

**Efeitos comparativos de diferentes géis à base de *Cranberry*
e Proantocianidina sobre a dentina submetida à erosão:
estudo *in vitro***

**BAURU
2015**

MARCELA MARTINI TAGLIANI

**Efeitos comparativos de diferentes géis à base de *Cranberry*
e Proantocianidina sobre a dentina submetida à erosão:
estudo *in vitro***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Saúde Coletiva.

Orientador: Prof. Dr. Heitor Marques Honório

Versão corrigida

**BAURU
2015**

T128e Tagliani, Marcela
Efeitos comparativos de diferentes géis à base de *Cranberry* e Proantocianidina sobre a dentina submetida à erosão: estudo *in vitro*. Marcela Martini Tagliani. – Bauru, 2015.
80p. : il.; 30cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Heitor Marques Honório

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Marcela Martini Tagliani

Data:

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese a **Stella e Vivian**, minhas filhas.

A **Paulo e Eliana**, meus pais.

"Se eu pudesse novamente viver a minha vida, na próxima trataria de cometer mais erros. Não tentaria ser tão perfeito, relaxaria mais, seria mais tolo do que tenho sido.

Na verdade, bem poucas coisas levaria a sério. Seria menos higiênico. Correria mais riscos, viajaria mais, contemplaria mais entardeceres, subiria mais montanhas, nadaria mais rios. Iria a mais lugares onde nunca fui, tomaria mais sorvetes e menos lentilha, teria mais problemas reais e menos problemas imaginários.

Eu fui uma dessas pessoas que viveu sensata e profundamente cada minuto de sua vida; claro que tive momentos de alegria. Mas se eu pudesse voltar a viver trataria somente de ter bons momentos.

Porque se não sabem, disso é feita a vida, só de momentos; não percam o agora. Eu era um daqueles que nunca ia a parte alguma sem um termômetro, uma bolsa de água quente, um guarda-chuva e um pára-quedas e, se voltasse a viver, viajaria mais leve.

Se eu pudesse voltar a viver, começaria a andar descalço no começo da primavera e continuaria assim até o fim do outono. Daria mais voltas na minha rua, contemplaria mais amanheceres e brincaria com mais crianças, se tivesse outra vez uma vida pela frente. Mas, já viram, tenho 85 anos e estou morrendo."

Autoria desconhecida

Filhas, façam suas vidas dignas de serem vividas. Façam o BEM ao próximo, AMEM sem parcimônia, sejam livres. Amo vocês infinitamente e além.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus queridos orientadores:

Prof. Dr. Heitor Marques Honório

Palavras são poucas para agradecer o grande professor, pesquisador, orientador, mestre e líder que o senhor foi para mim. Muito obrigada por me acolher, me ajudar tanto, por ser incrível em sabedoria e conhecimento. Um ser humano admirável, também! No tempo em que convivemos, só vi o senhor brilhar, muito além das paredes da Faculdade. O senhor vai muito, muito longe. Que sua jornada seja de paz e alegrias, dentro e fora da Universidade. Muito obrigada pelos ensinamentos, oportunidade, acolhimento e generosidade. O senhor tem toda minha admiração. Muito obrigada por ter me ajudado nessa trajetória, sem o senhor não seria possível. Ser sua (seu) orientada (o) é como um sonho para um pós-graduando.

“If you choose to use your status and influence to raise your voice on behalf of those who have no voice; if you choose to identify not only with the powerful, but with the powerless; if you retain the ability to imagine yourself into the lives of those who do not have your advantages, then it will not only be your proud families who celebrate your existence, but thousands and millions of people whose reality you have helped change. We do not need magic to change the world, we carry all the power we need inside ourselves already: we have the power to imagine better.”

excerpt from J.K. Rowling 2008 Harvard Commencement Speech

Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris

Professor Lauris, ter sido sua aluna e orientada foi uma grata surpresa que a vida me concedeu. Foi uma dádiva. O senhor é uma pessoa excepcional: seu jeito tranquilo de ser, sua forma de encontrar soluções, capacidade de conciliar a atividade docente com a diretoria do campus, a facilidade que tem em ajudar as pessoas... Tudo isso me impressionou. O senhor tem toda minha admiração. Grande professor, pesquisador e líder. Muito obrigada pela chance, por ter me aceitado. Muito obrigada pela oportunidade, por ter me direcionado. Muito obrigada por ter mostrado tanta luz, com bondade. Por ter acreditado. O senhor tem toda minha admiração. Muito obrigada por ter me ajudado nessa trajetória, sem o senhor não seria possível. Ser sua (seu) orientada (o) é como um sonho para um pós-graduando.

“I learned that people will forget what you said, people will forget what you did, but people will never forget how you made them feel.”

Maya Angelou

Ao Universo, a Deus

“A mente é implacável. O que você pensa, você realiza.”

Buda

Newton, meu amor

Obrigada por me apoiar e me amar de maneira tão doce.

Meu irmão, Luis Tagliani Neto

Depois de dez anos de formada, ainda é o melhor dentista que já conheci. Agradeço demais seu carinho, apoio e irmandade no maior sentido da palavra.

“L'amor che move il sole e l'altre stelle.”

Dante Alighieri

Cristiane Silva

Para minha irmã desta e de outras vidas, dedico essa oração:

“Deus, obrigado, pois sei que nunca irá me desamparar; mesmo nos momentos mais difíceis da minha vida, o Senhor sempre estará presente. Obrigado pelo amanhecer, ele me mostra que sempre posso recomeçar. Obrigado também pelo anoitecer, ele me faz lembrar que tudo nessa vida é passageiro e que nenhum momento da vida, seja bom ou ruim, durará para sempre.”

Chico Xavier

É uma honra e um orgulho ser julgada pela senhora, Prof. Dra. Cristiane Maria da Costa Silva, doutora em Saúde Coletiva. Muito obrigada.

Dr. Celso Charuri

“Existe um amor maior. Existe uma bondade maior. Existe um poder maior. A nossa mente está ligada com o Universo. Nós não somos uma parte isolada do Universo. Nós estamos juntos com todas as partes. Nós fazemos parte da mesma respiração - a grande respiração. A nossa pequena respiração pulmonar é apenas ilusória. O nosso movimento é apenas ilusório. O nosso real movimento é mental, espiritual. É até onde nós conseguimos ver do todo que nos cerca e do qual fazemos parte.”

Celso Charuri, excerto de palestra de 8 de Setembro de 1981.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

*“Quando era bem pequena, eu e minha família passeávamos de carro em frente à FOB quando disse: um dia estudarei aqui.
As palavras tem poder.”*

Ao diretor do campus Bauru, **Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris.**

À diretora da FOB/USP, **Prof. Dra. Maria Aparecida Machado.**

À comissão de pós-graduação da FOB/USP.

Aos **professores do departamento de Saúde Coletiva da FOB/USP**, em especial **Prof. Dr. Lauris, Prof. Dr. Heitor, Prof. Dra. Nilce, Prof. Dr. Eliel e Prof. Dra. Silvia.**

Ao querido **Prof. Dr. Roosevelt**, muito obrigada pela presença constante.

À **Prof. Dra. Daniela Rios**, muito obrigada por sua ajuda, atenção e ensinamentos.

À **Prof. Dra. Anuradha Prakki**, agradeço o fornecimento do extrato de *Cranberry*.

À **Prof. Dra. Astrid Vono**, uma inspiração.

Aos **funcionários do departamento de Saúde Coletiva e do laboratório de bioquímica**, em especial **Telma e Larissa.**

Aos **alunos do Laboratório de Bioquímica**, com os quais convivi durante o desenvolvimento da pesquisa.

À **Ana Amélia Silva Santos Thame** pela caprichosa contribuição na formatação da Tese.

Aos queridos **Patrícia Valentim, Luiza Valentim, Maria Arantes, Thalita Franco, Natália Mondelli, Patrícia Mendonça, Marcella Fasano, Ligia Quinete, Newton Ribeiro Filho, Amanda Beltramine, Karen Fernandes, Dr. Antônio Fernandes.**

Ao meu primeiro orientador, grande, super, genial **Prof. Dr. Adalberto Rosa** e ao **Prof. Dr. Márcio Beloti.**

Prof. Dra. Alma Catirse, inesquecível professora, maravilhosa pessoa, cujos profundos ensinamentos foram mais fortes que o tempo e a passagem pela Faculdade.

Zilá Soucheff, muito obrigada por ser tão especial.

A minhas professoras da residência no HRAC/USP, **Prof. Dra. Beatriz Costa** e **Profa. Dra. Marcia Gomide**, em especial, **Prof. Dra. Cleide Carrara**, grande pesquisadora, querida, competente, inesquecível, generosa, altruísta, excepcional orientadora. Muito obrigada pelo apoio no desenvolvimento de pesquisas.

Aos meus generosos **colegas de residência, mestrado e doutorado.**

RESUMO

Considerando que a Proantocianidina e outros componentes do *Cranberry* possam inibir as metaloproteinases da dentina quando esta é exposta a ação de agentes erosivos e tal fato pode minimizar o desgaste dentinário, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito protetor *in vitro* de géis à base de extrato de *Cranberry* e Proantocianidina em diferentes concentrações, aplicados sobre a dentina posteriormente submetida à erosão. Para tal, 150 espécimes de dentina bovina (4 x 4 mm) foram confeccionados e igualmente divididos em 10 grupos: G1- gel de clorexidina a 0,012%; G2- gel placebo; G3- gel a base de extrato de *Cranberry* a 0,05%; G4- gel a base de extrato de *Cranberry* a 1%; G5- gel a base de extrato de *Cranberry* a 5%; G6- gel a base de extrato de *Cranberry* a 10%; G7- gel a base de Proantocianidina 0,05%; G8- gel a base de Proantocianidina 1%, G9- gel a base de Proantocianidina 5%; G10- gel a base de Proantocianidina 10%. Os diferentes géis foram aplicados uma única vez sobre os espécimes antes do primeiro desafio erosivo durante 5 minutos. Em seguida, os espécimes foram submetidos a 3 ciclagens erosivas seguidas (imersão em bebida à base de Cola por 5 minutos seguido de imersão em saliva artificial por 3 horas) por dia, durante 5 dias. Após as 3 ciclagens erosivas diárias, os espécimes foram mantidos em saliva artificial por 15 horas. A perfilometria foi utilizada para quantificar o desgaste dentinário (μm). Os dados foram analisados pelo teste ANOVA seguido do teste de Fisher ($p < 0,05$). Os resultados (G1: $15,6 \pm 2,4^b$; G2: $23,1 \pm 1,4^e$; G3: $15,1 \pm 2,3^b$; G4: $20,4 \pm 1,9^{cd}$; G5: $19,0 \pm 2,1^{ac}$; G6: $18,7 \pm 1,4^a$; G7: $18,2 \pm 1,6^a$; G8: $21,1 \pm 1,2^d$; G9: $19,2 \pm 2,6^{ac}$; G10: $15,2 \pm 2,5^b$) mostraram que o gel de *Cranberry* a 0,05% (G3) e gel de Proantocianidina 10% (G10) apresentaram eficácia estatisticamente significativa na redução da erosão dentinária em comparação aos outros grupos analisados.

Palavras-chave: Erosão dentinária. *Cranberry*. Proantocianidina. Desgaste dentário.

ABSTRACT

***In vitro* effect of Cranberry and proanthocyanidin on dentin erosion**

Considering that Proanthocyanidin and other Cranberry's components might inhibit dentin metalloproteinases exposed to erosive agents and it can prevent dental wear, the aim of this *in vitro* study was to evaluate the effect of Cranberry and Proanthocyanidin gels used in different concentrations on dentin before an erosive challenge. For this purpose, 150 bovine root dentin blocks (4x4mm) were treated by different gels and randomly divided into 10 groups: G1- 0.012% Chlorhexidine Gel (positive control), G2- Placebo gel with no active principle (negative control), G3- 0.05% Cranberry gel, G4- 1% Cranberry gel, G5- 5% Cranberry gel, G6- 10% Cranberry gel, G7- 0.05% Proanthocyanidin gel, G8- 1% Proanthocyanidin gel, G9- 5% Proanthocyanidin gel and G10- 10% Proanthocyanidin gel. The gels were applied over specimens once before the first erosive challenge for 5 minutes. After that, the blocks were subjected to 3 sequential erosive cycles (cola drink for 5 minutes and artificial saliva for 3 hours, each) per day, during 5 days. After 3 daily erosive cycles, the blocks were maintained in artificial saliva for 15 h. Profilometry was used to quantify the dentin wear (μm). Data were analyzed by ANOVA and Fisher's test ($p < 0.05$). Results (G1: 15.6 ± 2.4^b ; G2: 23.1 ± 1.4^e ; G3: 15.1 ± 2.3^b ; G4: 20.4 ± 1.9^{cd} ; G5: 19.0 ± 2.1^{ac} ; G6: 18.7 ± 1.4^a ; G7: 18.2 ± 1.6^a ; G8: 21.1 ± 1.2^d ; G9: 19.2 ± 2.6^{ac} ; G10: 15.2 ± 2.5^b) showed that 0.05% Cranberry gel (G3) and 10% Proanthocyanidin gel (G10) presented similar results when compared to positive control group (G1), and these three groups showed statistically lowest wear when compared to all other evaluated groups. The results of this study suggest a significant efficacy of Cranberry and Proanthocyanidin gels in preventing wear of dentin subjected to dental erosion *in vitro*.

Keywords: Dentin erosion. Cranberry. Proanthocyanidin. Matrix metalloproteinases.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	EROSÃO, DENTINA, MMPs E SEUS INIBIDORES.....	21
2.2	ESTUDOS RELACIONADOS À <i>CRANBERRY</i>	28
3	PROPOSIÇÃO	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	37
4.2	PREPARO DOS ESPÉCIMES DE DENTINA.....	39
4.3	PLANIFICAÇÃO E POLIMENTO DOS ESPÉCIMES DE DENTINA.....	40
4.4	AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA SUPERFICIAL E SELEÇÃO DOS ESPÉCIMES DE DENTINA	41
4.5	PERFILOMETRIA INICIAL	43
4.6	PREPARAÇÃO DOS GÉIS	44
4.7	PROTEÇÃO DOS ESPÉCIMES.....	45
4.8	APLICAÇÃO DOS GÉIS.....	45
4.9	CICLAGEM EROSIVA	45
4.10	PERFILOMETRIA APÓS CICLAGEM EROSIVA	47
4.11	AVALIAÇÃO DOS PERFIS.....	47
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5	RESULTADOS	49
5.1	ANÁLISE DE DESGASTE	51
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE	73

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A observação do aumento da prevalência de pacientes com desgaste dentário ao redor do mundo tem chamado a atenção de pesquisadores e clínicos, principalmente ao longo das últimas décadas (GANSS, 2006; RIOS et al., 2007; GANSS; LUSSI; SCHLUETER, 2014), devido à estreita relação dessa alteração dentária com a qualidade de vida dos pacientes. Nesse contexto, pesquisas têm sido feitas objetivando trazer soluções preventivas e curativas a essa patologia (ZERO, 1996; RIOS et al., 2007; HONÓRIO et al., 2008; KATO et al., 2009; HONÓRIO et al., 2010a; KATO et al., 2010a; 2010b, 2012, 2014).

Por definição, o desgaste dentário é a perda micro e macroscópica da estrutura dental (ECCLES, 1979; ZERO, 1996; BARTLETT, 2006; HONÓRIO et al., 2008). Pode ser dividido em três categorias: erosão, atrição e abrasão (BARTLETT, 2006; GANSS, 2006). Essa divisão é aceita mundialmente. A atrição é definida como a perda superficial por conta de contatos dentários, por exemplo, no ranger de dentes. Já a abrasão é a perda superficial originada por forças mecânicas, por exemplo, a escovação dentária com força excessiva (IMFELD, 1996). A erosão, alvo do presente estudo, é a perda de estrutura dental causada por fatores químicos extrínsecos e/ou intrínsecos, geralmente associados a fatores inter-relacionados como composição salivar, frequência de consumo de produto ácido e pH do mesmo, comportamento do indivíduo, entre outros (IMFELD, 1996; ZERO, 1996; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; KATO et al., 2009).

Clinicamente, a erosão dental se manifesta com a diminuição do brilho do esmalte e alteração anatômica (ALMEIDA e SILVA et al., 2007). A coloração do dente também sofre alteração devido à perda do esmalte, resultando em dentes amarelados e perda de estética, causa primária de queixa clínica do paciente nos consultórios. Casos severos de erosão dentária podem estar acompanhados de exposição dentinária e essa condição clínica normalmente está associada à presença de dor e hipersensibilidade (O'SULLIVAN et al., 1998; RYTOMAA et al., 1998; RIOS et al., 2007), outros motivos os quais motivam o paciente em busca de solução profissional.

Na erosão, os fatores intrínsecos estão associados aos ácidos produzidos pelo próprio organismo, por exemplo, em vômitos relacionados à bulimia e anorexia, regurgitação frequente do suco gástrico, regurgitação subclínica devido à gastrite crônica associada ao alcoolismo, vômito crônico durante a gestação, xerostomia, doença do refluxo gastroesofágico (GANDARA; TRUELOVE, 1999; ALI et al., 2002; BARRON et al., 2003; BARBOSA et al., 2009; PREETHA et al., 2015). A xerostomia pode ser provocada por patologias sistêmicas, tais como a *diabetes mellitus* e a síndrome de Sjögren (GANDARA; TRUELOVE, 1999).

Já os fatores extrínsecos se relacionam aos ácidos de origem exógena, como hábitos dietéticos relacionados a bebidas e alimentos ácidos. Medicamentos de natureza ácida também podem provocar erosão se estiverem em contato direto com os dentes no momento da ingestão, como acontece, por exemplo, com pastilhas de vitamina C (GANDARA; TRUELOVE, 1999), aspirina, anfetaminas (GRIPPO; SIMRING; SCHREINER, 2004) e ecstasy/cocaína (KAPILA; KASHANI, 1997).

Outros fatores extrínsecos incluem a exposição ambiental a agentes ácidos (ZERO, 1996; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004), como, por exemplo, a exposição excessiva a gases ácidos presentes em ambientes industriais, tais quais indústrias de baterias e aerossóis, além de trabalho em mineradoras (GANDARA; TRUELOVE, 1999). Todos os fatores devem ser avaliados e considerados durante a anamnese inicial do paciente.

Estruturalmente, o componente mineral (inorgânico) da dentina é formado por cristais de hidroxiapatita substituíveis. Porém, comparativamente aos cristais do esmalte, são pobres em cálcio, fosfato e sódio e ricos em magnésio e carbonato (HICKS; FLAITZ; SILVERSTONE, 1985). Encontrados sobre e entre as fibrilas colágenas, os cristais da dentina são menores, permitindo uma maior área de superfície, que é mais susceptível ao ataque ácido (HICKS; FLAITZ; SILVERSTONE, 1985). Qualquer substância ácida com pH inferior ao crítico para o esmalte ou dentina pode dissolver os cristais de hidroxiapatita (BARRON et al., 2003; GRIPPO; SIMRING; SCHREINER, 2004).

A dieta favorável à erosão dentária inclui alimentos e bebidas com baixa concentração de íons cálcio e fosfato. Isso causa um desequilíbrio entre íons cálcio, fósforo e flúor em relação à hidroxiapatita e fluorapatita (BARBOSA et al., 2009), favorecendo a dissolução dos prismas de esmalte superficiais sem a formação de

uma nova superfície de fluoridroxiapatita, como ocorre no mecanismo de remineralização na cárie dentária (IMFELD, 1996; HONÓRIO et al., 2010a, 2010b).

A composição salivar possui papel determinante na instalação e progressão da erosão, pois, dentre outras funções, regula o equilíbrio do pH do meio para que ocorra troca de íons cálcio e fosfato (GANSS; LUSSI; SCHLUETER, 2014). A erosão ocorre mesmo sem a presença de bactérias cariogênicas. Entretanto, é fundamental a presença regular de substâncias ácidas em pH inferior àquele em que o flúor consegue ativar o processo de remineralização (GANDARA; TRUELOVE, 1999; KATO et al., 2010b; GANSS; LUSSI; SCHLUETER, 2014).

Ao contrário do esmalte, cuja matriz orgânica perfaz aproximadamente 0,5%, a dentina contém cerca de 20% de material orgânico e 12% de água, proporcionando um substrato melhor para a degradação de bactérias e proteinases hospedeiras (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006). Esse material orgânico da dentina (matriz orgânica) é composto 90% de fibrilas colágenas (tipo I) e os 10% restantes são fosfoproteínas da dentina, proteoglicanas e glicosaminoglicanas (HICKS; FLAITS; SILVERSTONE, 1985; PASHLEY et al., 2004).

Dentre outros componentes como fatores de crescimento e proteínas, o tecido dentinário orgânico também contém enzimas conhecidas como metaloproteinases da matriz (MMPs) (KATO et al., 2012). Na dentina, foi verificado que ocorrem principalmente os subtipos 2, 8 e 9 das MMPs (KATO et al., 2012, 2014). A MMP-8 pode ser considerada a collagenase humana mais importante na dentina, e as MMP-2 e MMP-9 têm a função de degradar o colágeno em lesões de cárie dentinária (KATO et al., 2010a, 2012). Quando há queda do pH, por exemplo, durante o metabolismo bacteriano (cárie) ou ingestão de bebidas ácidas, as MMPs tornam-se ativas. Além disso, já se constatou que indivíduos com alta concentração de MMPs salivares têm maior incidência de cárie (TJÄDERHANE et al., 1998). A degradação química da matriz dentinária ocorre especialmente pelas MMPs presentes na dentina e saliva, as quais podem ser ativadas em pH abaixo de 4.5 (SCHLUETER et al., 2010; SHELLIS; FEATHERSTONE; LUSSI, 2014; VIDAL et al., 2014).

Componentes celulares, as macromoléculas da matriz extracelular (ECM) são importantes para o equilíbrio celular adequado na remodelação, desenvolvimento e morfogênese teciduais ao longo da vida. Essa remodelação da

ECM pelas MMPs geralmente ocorre em um pH neutro. As células do tecido conjuntivo (ex. fibroblastos, osteoblastos e odontoblastos) sintetizam e secretam MMPs na ECM. Em condições normais, as MMPs são expressas apenas quando necessárias à remodelação. Porém, em patologias com significativa destruição tecidual, como artrite reumatoide, periodontite, câncer e fibrose, há uma expressão acentuada das MMPs (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006). Quimicamente, a matriz orgânica da dentina pode ser degradada por MMPs as quais mediam a quebra de praticamente todas as moléculas da ECM, incluindo colágeno nativo e desnaturado (KATO et al., 2010a, 2010b).

Ainda não há muitos estudos investigando o papel das MMPs na erosão dentária. Supõe-se que devam ocorrer mecanismos semelhantes aos que ocorrem na cárie dentária (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006). Neste sentido, a manutenção da matriz orgânica de colágeno da dentina erodida pode diminuir a intensidade de progressão de futuros desgastes erosivos e tal fato pode ser obtido por meio do uso de inibidores das MMPs (CARRILHO et al., 2007; KATO et al., 2010a, 2012). Sabe-se que a taxa de desmineralização da dentina erosiva diminui ao passo que aumenta a quantidade de colágeno degradável, pois a camada de matriz desmineralizada serve como uma barreira contra a difusão ácida, reduzindo a progressão da erosão (HARA et al., 2005).

A respeito das MMPs, a clorexidina tem sido amplamente testada e é sugerida como uma ferramenta útil na prevenção da degradação de fibrilas de colágeno infiltradas por MMPs nas camadas híbridas. Porém, seus efeitos colaterais, tais como, manchamento dos dentes, perda de paladar, entre outros, não permitem sua utilização por um longo período de tempo. Dessa forma, os pesquisadores buscam uma alternativa a esse produto. Os polifenóis do chá verde, especialmente epigallocatequina-3-galato, também foram testados na promoção da atividade inibitória contra MMPs distintas (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; CARRILHO et al., 2007; KATO et al., 2009, 2010a, 2010b). O sulfato ferroso também teve efeito preventivo como inibidor de protease contra a erosão dentinária (KATO et al., 2010b).

Outros estudos demonstram a interação das MMPs com os tecidos dentinários. Koli, Saxena e Ogbureke (2015) publicaram um artigo no qual afirmam que a MMP-20 é amplamente conhecida como específica do tecido dentário, com a

expressão limitada a tecidos duros. Ela também é necessária para a formação do esmalte. Além disso, a MMP 20 e MMP 2 processam a sialofosfoproteína (DSPP) da dentina em sialoproteína da dentina, fosfoproteína da dentina e glicoproteína da dentina, durante a formação do dente.

Pesquisas nas diversas áreas da medicina indicam benefícios relacionados aos polifenóis do suco de *Cranberry* (*Vaccinium macrocarpon*) ou extratos da fruta, inclusive como inibidor das MMPs (DÉZIEL et al., 2010; KONDO et al., 2011).

As *Cranberries*, *Blueberries* (mirtilos), maracujá, ginkgo, uvas, chá verde, chá preto entre outras plantas possuem moléculas de flavonoides. Flavonoides (ou bioflavonoides) é a designação dada a um grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis, moléculas encontradas em certas espécies vegetais (HARBORNE; MABRY; MABRY, 1975).

Dentre os flavonoides, destacam-se as Proantocianidinas (PACs) (TEEL, 1992). As PACs têm demonstrado serem inibidoras do estresse oxidativo celular e carcinogênese quimicamente induzida (HOCMAN, 1989). Além da varredura de radicais livres e atividade antioxidante, as PACs exibem atividades vasodilatadoras, anticarcinogênicas, antialérgicas, anti-inflamatórias, antibacterianas, cardioprotetivas, imunoestimulantes, antivirais e estrogênicas, bem como inibidoras da enzima fosfolipase A, cicloxygenase e lipoxigenase (SALAH et al., 1995; RICE-EVANS; MILLER, 1996; EYDELNANT; TUFENKJI, 2008; CASTELLAN et al., 2010; DÉZIEL et al., 2010; LOMBARDO BEDRAN; PALOMARI SPOLIDORIO; GRENIER, 2015).

Gupta, Bansal e Marwaha (2015) publicaram um estudo relacionado ao *Cranberry* e seus efeitos na cavidade oral. Nele, constatou-se que o extrato desta fruta foi altamente eficaz na redução de *S. mutans*, bactérias causadoras de cáries, através de enxagues frequentes em crianças.

Especificamente, as PACs do tipo A isoladas de *Cranberries* têm sido implicadas nas propriedades anti-aderentes do suco de *Cranberry* (HOWELL et al., 2005). Os efeitos das PACs do *Cranberry* não são específicos do substrato, pois agem tanto em tecidos biológicos (GUPTA et al., 2007) quanto em materiais não biológicos, como por exemplo em PVC (EYDELNANT; TUFENKJI, 2008).

Acredita-se que as PACs constituintes do extrato de *Cranberry* sejam a peça chave no mecanismo inibitório das MMPs.

Diante do exposto, este estudo *in vitro* visou testar um possível efeito inibitório das MMPs dentinárias. Para tal, géis de diferentes concentrações à base de extrato de *Cranberry* e Proantocianidina foram aplicados sobre a dentina previamente à ação de um agente erosivo ácido e o efeito inibitório avaliado considerando, como principal variável de resposta, o desgaste.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

O presente capítulo terá uma divisão em tópicos relacionados. Nele, diversos artigos publicados foram resumidos de maneira a permitir uma análise panorâmica do cenário atual destes tópicos, frente à literatura científica mundial.

2.1 EROSÃO, DENTINA, MMPs E SEUS INIBIDORES

No presente ano, Comar et al. (2015) avaliaram o efeito de vernizes fluoretados na progressão da erosão dentária *in vitro*. Compararam-se amostras com um verniz placebo, sem verniz, com verniz tratado com fluoreto de titânio (TIF₄) e com fluoreto de sódio (NaF), separadamente. As amostras foram submetidas a desafio erosivo e por fim calculou-se a quantidade de desgaste das amostras. No caso da dentina, a medição final foi realizada com ou sem a presença de matriz orgânica desmineralizada. Os resultados evidenciaram que vernizes de TIF₄ e NaF reduziram o desgaste de esmalte de forma significativa. As mesmas diferenças foram encontradas para a dentina, tanto na presença como na ausência de matriz orgânica. Os autores concluem que ambos vernizes de TIF₄ e NaF foram igualmente eficientes na redução da progressão da erosão *in vitro*.

O papel das metaloproteinases da matriz (MMPs) na erosão dentária e os efeitos protetores de inibidores de MMPs foram revisados por Buzalaf, Kato e Hannas (2012). Sabe-se que as MMPs estão presentes tanto na saliva quanto na dentina. Elas têm papel fundamental na progressão da erosão dentinária. A remoção enzimática da matriz orgânica pelas MMPs aumenta o processo de desmineralização, uma vez que a matriz orgânica desmineralizada se aparenta impedir a difusão acídica após um desafio erosivo. Estudos recentes *in vitro* e *in situ* apresentaram prospectos positivos no papel de inibidores de MMPs contra a erosão. Os inibidores testados foram chá verde, galato-epigallocatequina (EGCC), sulfato ferroso e clorexidina. Esta última destacou-se no papel protetivo. Inclusive observou-se que a proteção foi duradoura e pôde ser contínua por até 10 dias após severos desafios erosivos *in situ*. Esses achados são relevantes na busca de soluções terapêuticas para a prevenção e contra a progressão da erosão dentinária.

Outra pesquisa investigou se a redução da degradação da matriz orgânica desmineralizada (DOM), pelo tratamento com inibidores de proteases (PI), é efetiva contra a perda da matriz dentinária. Para isso, dentina bovina foi desmineralizada e tratada com ácido cítrico (pH 2,3) por 36 horas. Na sequência, os espécimes foram tratados com géis contendo galato-3-epigallocatequina (EGCG), clorexidina (CHX – 0,012%), FeSO_4 (1mM), NaF (1,23%) ou placebo (sem princípio ativo). Na sequência os espécimes foram armazenados em saliva artificial por 5 dias, com adição de colagenase (*Clostridium histolyticum*, 100 U/mL). A degradação do colágeno foi analisada pela concentração de hidroxiprolina (HYP) nas soluções incubadas e a perda da matriz dentinária foi avaliada por perfilometria. O tratamento com géis contendo EGCG, CHX e FeSO_4 levaram à diminuição significativa de concentrações de HYP na solução e perda de matriz dentinária quando comparados a outros tratamentos. Estes resultados sugerem fortemente que os efeitos preventivos das proteases testadas contra erosão dentinária são decorrentes de sua habilidade em reduzir a degradação da matriz orgânica desmineralizada (KATO et al., 2012).

Tao et al. (2015), analisaram o *status quo* da erosão dental em crianças de 3 a 6 anos de idade da província de Shangai, na China. Foram aplicados questionário e exame clínico nessa pesquisa, a qual demonstrou que, de um total de 1837 crianças escolhidas aleatoriamente, a erosão estava presente em 15,1% delas. A maior prevalência, de 17%, foi encontrada no grupo de 4 anos e a menor, de 12%, no grupo de 3 anos de idade. Eles não encontraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados. Porém, foi constatado que a ocorrência de erosão dental foi influenciada por hábitos de consumo de vinagre, café e chá, além do local de nascimento da criança, o nível educacional da mãe e regurgitação ($p < 0,05$). Eles sugerem o estabelecimento de um padrão unificado de diagnóstico para futuras investigações epidemiológicas.

Preetha et al. (2015) encontraram uma relação positiva entre doença de refluxo gastroesofágico e erosão dental. De 100 pacientes analisados, 11 apresentavam dentes erodidos. Notou-se uma relação inversa entre o pH salivar e a duração da doença, bem como seu grau de severidade. Pacientes com erosão também apresentaram alterações nas mucosas orais. Concluiu-se que quanto mais severa e de maior duração a doença de refluxo, mais potenciais são os danos aos

tecidos moles, estruturas dentais e pH salivar, enquanto a forma mais branda da doença não necessariamente causa esses efeitos colaterais.

Lussi e Carvalho (2015) publicaram um artigo enfatizando a necessidade de diferentes linhas de tratamento com fluoretos da doença cárie *versus* erosão. Elas alegam que os requerimentos na prevenção de cárie e erosão são diferentes, pois não há área coberta no processo erosivo como há em lesões cariosas subsuperficiais. Desta forma, o mecanismo protetor do fluoreto no processo erosivo é limitado à superfície ou perto da camada superficial do esmalte. Elas sugerem que outras substâncias possam aumentar a precipitação de fosfatos de cálcio na superfície do esmalte, protegendo-a de impactos adicionais ácidos. Além disso, sugerem que a combinação de fluoretos com agentes protetores, como metais polivalentes ou polímeros, tem prospectos ainda mais positivos.

Barbosa, Kato e Buzalaf (2011) estudaram o efeito da suplementação de refrigerantes com extrato de chá verde no potencial erosivo destes contra a dentina. Para tal, foram testados alguns refrigerantes brasileiros, Coca-Cola, Kuat Guaraná, Sprite e Coca-Cola light. Para cada bebida testada, os grupos foram divididos em dois: metade com suplementação de extrato de chá verde e a outra metade, sem (controle). Na sequência, os espécimes foram submetidos a ciclos de pH, alternando estados de des-remineralização em um dia. Para cada ciclo, amostras foram imersas em bebida pura ou suplementada com o extrato, e depois em saliva artificial. Para análise das superfícies, utilizou-se perfilometria. Os resultados demonstraram que Sprite levou à maior perda superficial de dentina, enquanto a Coca-Cola light, à menor. A suplementação com extrato de chá verde reduziu a perda superficial entre 15% a 40%, mas a diferença foi significativa apenas para o refrigerante Coca-Cola.

Hemingway et al. (2006), investigaram como a perda de esmalte dental devido a erosão e ao ciclo de erosão/abrasão depende da composição de refrescos e particularmente se a espessura da camada erosiva amolecida é uma função da composição da bebida. Para tal, eles escolheram seis entre as mais populares bebidas do Reino Unido: suco de maçã, suco de laranja, refresco à base de maçã, refresco à base de laranja, refresco à base de *Cranberry* e refresco à base de groselha, denominado *toothkind*, ou “não prejudicial aos dentes”. Amostras do grupo A (n=36) foram expostas às bebidas a 36°C por seis períodos consecutivos de 10 minutos. Amostras do grupo B (n=36) foram submetidas alternadamente à erosão e

escovação, por seis vezes. A perda de esmalte foi medida usando perfilometria óptica. Os resultados indicam que houve perda significativa de esmalte para todas as bebidas testadas. A erosão estava correlacionada ao pH e concentração de cálcio do meio. Para o grupo B, houve perda adicional de tecido devido à escovação, para todas as bebidas. Desta forma foi demonstrado que houve maior perda de esmalte quando houve erosão e subsequente abrasão, sendo que a composição do meio erosivo foi determinante da quantidade de tecido amolecido removido pela escovação.

Moezizadeh e Alimi (2014) publicaram um estudo em que compararam o efeito de enxaguatório com fluoreto de sódio 0,2% e pasta de fosfato de cálcio adicionada de fosfopeptídio de caseína amorfo (CPP-ACP) na prevenção de erosão dentinária. Para tal, superfícies de pré-molares hígidos foram polidas e pré-tratadas com mousse dental (contendo CPP-ACP – grupo A), enxaguante bucal de fluoreto de sódio a 0,2% (grupo B), sem tratamento (controle - grupo C). As amostras foram expostas a Coca-Cola por 4 vezes ao dia, por três dias, armazenadas em saliva artificial e avaliadas por perfilometria. Os resultados mostraram que a erosão nos grupos A e B foi menor do que no grupo controle, sendo que o grupo submetido à pré-tratamento com enxaguatório contendo fluoreto de sódio foi o mais efetivo na prevenção da erosão.

No mesmo ano, Darda et al. (2014) publicaram um estudo no qual avaliaram os efeitos do EDTA a 17% na remoção da *smear layer* e na erosão da estrutura dentinária após irrigação de 1 ou 10 minutos. Foram utilizados molares mandibulares humanos e os testes foram realizados nos canais mesiobucais dos mesmos. Após instrumentação, os canais foram submetidos à avaliação por microscopia eletrônica (SEM), depois à irrigação e novamente à SEM. Os autores concluem que um tempo superior a 1 minuto não deve ser utilizado nos tratamentos endodônticos e que a aplicação de 10 minutos de EDTA causou excessiva erosão dentinária peri e intertubular.

Zandim-Barcelos et al. (2015) avaliaram se a aplicação de um gel com alta concentração de fluoretos poderia aumentar a remineralização de espécimes com lesões dentinárias subsuperficiais, armazenadas em substitutos salivares. Para tal, utilizaram-se espécimes de dentina bovina desmineralizada, as quais foram armazenadas em água mineral (W), Glandosane (G – saliva artificial) ou saliva em

natura modificada (SN). Diferentes tratamentos foram realizados duas vezes ao dia: sem tratamento, enxaguatório Elmex *Sensitive* (E), gel *ProSchmelz* (Germany - P), dentifrício Duraphat (D) e combinações de ED, PD e EPD. As diferenças na perda mineral foram avaliadas através de microradiografia transversal após 2 e 5 semanas. Os resultados indicaram que a aplicação tópica de géis com elevadas concentrações de fluoreto reduziu a perda mineral induzida por G, mas resultou em erosão nas superfícies dos espécimes. O produto *ProSchmelz* não demonstrou efeitos benéficos em combinação com SN na remineralização das lesões de dentina subsuperficiais. Dentro das limitações do estudo *in vitro*, concluiu-se que a utilização de géis com alta concentração de fluoreto não promoveu efeitos adicionais na remineralização subsuperficial de lesões de dentina quando combinados com substitutos salivares ao serem comparados a produtos com baixa concentração de fluoreto.

Um estudo de Ozcan et al. (2015) testou se o tratamento da dentina desmineralizada com ácido poliacrílico (PAA) teria algum efeito ativador ou inibidor nas metaloproteinases da matriz de dentina (MMPs) ou catepsina K (CAT-K). Para tal, amostras de dentina foram completamente desmineralizadas com EDTA e depois mergulhadas em diferentes soluções a serem testadas: ácido fosfórico 37% (PA), PA + 2% de cloreto de benzalcônio (BAC), PA + 2% de gluconato de clorexidina (CHX), 10% PAA, PAA+BAC ou PAA+CHX por 20 segundos. O controle utilizado foram amostras sem tratamento. Todas as amostras foram incubadas em fluido corpóreo simulado (SBF) por uma semana e a perda de massa seca foi avaliada. Chegou-se à conclusão de que a dentina desmineralizada tratada com PAA a 10% ativou a CAT-K mais do que o PA a 37%, a CHX parece ser uma melhor inibidora de MMPs e CAT-K do que o BAC a 2%.

Francisconi-dos-Rios et al. (2015) avaliaram o efeito de soluções de clorexidina (CHX) na força de união da resina composta à dentina erodida por 6 meses, usando dentina normal como controle. Dentinas erodidas de terceiros molares extraídos foram submetidas à erosão por refrigerante à base de cola. Depois de tratados, aplicou-se *Adper Single Bond 2* nos espécimes e construiu-se blocos de resina Filtek Z350 sobre os corpos de prova. Os espécimes foram seccionados e testados imediatamente ou após 6 meses. A força de união dos espécimes erodidos sempre foi significativamente menor do que os de dentina não erodidos. A aplicação de soluções de clorexidina não teve efeito imediato, mas após

os 6 meses, a CHX a 2% preveniu a ruptura abrupta da união dentina/material a ambas dentinas, erodida ou não.

Ganss, Klimek e Schlueter (2014), investigaram o potencial experimental preventivo de erosão/abrasão de dentifrícios de fluoreto de sódio (NaF) e fluoreto de amida (AmF)/NaF/SnCl₂/quitosano, em comparação a placebo e gel de SnF₂, e o impacto da matriz desmineralizada nos efeitos do dentifrício. A fim de se produzir uma ordem comparável de perda tecidual, erosão foi realizada com ácido cítrico, sob um protocolo específico. A intervenção foi realizada por imersão das amostras em dentifrícios. Metade das amostras, adicionalmente, foi escovada por 15 s. Utilizou-se perfilometria para calcular a perda tecidual. Em relação ao placebo, os autores concluem que o NaF não teve efeitos significativos, a formulação de AmF/NaF/SnCl₂/quitosano significativamente reduziu a perda dentinária entre 20% a 25%, exceto quando aplicado sem escovação na presença de matriz orgânica. Os autores concluem que os efeitos das formulações foram similares tanto na presença quanto na ausência de matriz orgânica. Além disso, formulações contendo Sn(2+)/F(-) têm potencial de redução da erosão e abrasão mesmo na ausência de colágeno desmineralizado.

A capacidade do fluoreto (F) de prevenir a cárie dentária é bem conhecida, mas sua capacidade de inibir metaloproteinases da matriz (MMPs), as quais também ajudariam a prevenir cárie dentinária, ainda não havia sido investigada. Então Kato et al. (2014) propuseram um estudo o qual verificou a capacidade do flúor de inibir as gelatinases humanas salivares purificadas MMPs-2 e -9. Para tal, coletou-se saliva de dez indivíduos saudáveis. A saliva foi centrifugada e os sobrenadantes foram levados para zimografia. Então, fluoreto de sódio (50-275 ppm F) foi adicionado na incubação. A reversibilidade da inibição das metaloproteinases foi testada pela adição de ainda mais F. Os resultados indicaram que o F diminuiu as atividades de MMPs salivares em efeito dose-resposta. As gelatinases purificadas foram completamente inibidas por 200 ppm F e a MMP-9 salivar por 275 ppm de F. A inibição foi parcialmente irreversível de 250 a 1500 ppm de F, mas irreversível a 5000 ppm. Este foi o primeiro trabalho a investigar a capacidade do NaF em inibir completamente as MMPs.

Ghisi et al. (2015) avaliaram os efeitos do Sterilox, uma água superoxidada, hipoclorito de sódio a 2% e 5% e EDTA a 17%, sobre os componentes orgânicos e

inorgânicos da dentina. A solução química de hipoclorito de sódio a 5% teve um maior efeito no componente orgânico da dentina, em área e profundidade, do que a mesma substância a 2%. As soluções químicas de Hipoclorito a 5% + EDTA e de ambos hipocloritos + EDTA causaram a maior alteração na matriz orgânica colagenosa. A desmineralização foi observada em todos os grupos nos quais o EDTA foi usado, sendo que áreas de erosão e túbulos dentinários abertos foram detectados apenas quando as soluções foram combinadas com hipoclorito de sódio.

Charone et al. (2014) estudaram o efeito de biguanidas (polihexametileno biguanida – PHMB) e clorexidina (CHX) na erosão dentinária, devido à possível influência na degradação enzimática da matriz orgânica desmineralizada. Para tal, foram preparados espécimes de dentina bovina de acordo com os grupos de estudo e os mesmos foram submetidos a ciclos de des-remineralização (solução de ácido cítrico) por 6 dias. Na sequência, as amostras foram tratadas com água destilada (controle negativo), clorexidina 0,12% (controle positivo), PHMB 0,07% e um produto comercial, Sanifill Perio Premium™ (0,07% PHMB mais 0,05% NaF) ou solução de F 0,05% por um minuto e então submetidas a desafio enzimático por 10 minutos utilizando uma collagenase bacteriana (*Clostridium hystolicum*, 100 µg/ml). A perda dentinária foi calculada utilizando-se perfilometria (µm) diariamente. Os resultados indicam que a perda de dentina progrediu de forma significativa para todos os grupos durante os 6 dias. Após o terceiro dia, os grupos de Sanifill PerioPremium™, CHX e PHMB reduziram a erosão dentinária comparados ao controle. Ao final do sexto dia, constatou-se que o enxaguante bucal Sanifill Perio Premium™ apresentou um bom potencial na redução da perda dentinária.

Longhi et al. (2015), publicaram um artigo que objetivou analisar a literatura na degradação da interface adesiva, particularmente no papel das metaloproteinases na degradação hidrolítica da matriz de colágeno na interface de união. Foi feita uma revisão no MEDLINE com as palavras-chave metaloproteinases e união de dentina e degradação. Eles constatam que as enzimas collagenolíticas na dentina mineralizada têm comprovadamente tido um papel importante nas patologias de tecido duro dentário, além da degradação da camada híbrida. Concluem que a preservação da integridade da matriz colagênica é a chave nas tentativas de melhorar a durabilidade de união da dentina.

Epasinghe et al. (2014), compararam os efeitos biomecânicos de três flavonoides, dentre eles a Proantocianidina, na dentina desmineralizada. Para tal, utilizaram dentes molares humanos seccionados e dividiram em 3 grupos de acordo com os tratamentos: Proantocianidina a 6,5%, quercetina 6,5% e naringina 6,5%. Os espécimes foram testados em tempos progressivos, que variaram de momentâneo até no máximo 4 horas. Os resultados indicaram que tanto o módulo de elasticidade (MOE) como a força de resistência à tração foram afetados pelo tratamento com flavonoides e pelo tempo de tratamento. Eles ressaltam que o tratamento com flavonoides melhorou as propriedades mecânicas da dentina desmineralizada na seguinte ordem: Proantocianidina > quercetina > naringina. A conclusão deles é que, em termos biomecânicos, a Proantocianidina foi mais efetiva do que os outros e, portanto, melhoraria terapias preventivas e terapêuticas na odontologia.

Seguindo essa linha de pesquisa com Proantocianidina e seus efeitos, Castellan et al. (2011) caracterizaram as propriedades da matriz dentinária tratadas com dois agentes de ligação ricos em Proantocianidina (PA). Para tal, também foram utilizados dentes molares humanos. Após a análise dos resultados, concluem que propriedades mecânicas melhoradas e estabilidade da matriz dentinária podem ser alcançadas pelo uso de agentes *cross-linkers* ricos em Proantocianidina, muito provavelmente pela formação de um complexo colágeno-PA.

2.2 ESTUDOS RELACIONADOS À CRANBERRY

Bodet et al. (2008), publicaram uma revisão a respeito dos potenciais benefícios da *Cranberry* para a saúde bucal. De acordo com este grupo, os componentes da *Cranberry* são potencialmente anti-cariogênicos, uma vez que eles inibem a produção ácida, a adesão e formação do biofilme por *Streptococcus mutans*. Além disso, outros componentes da fruta alteram proteínas de ligação glucano, enzimas extracelulares, produção de carboidrato e hidrofobicidade bacteriana. Em relação a doenças periodontais, a mesma fração de *Cranberry* inibe a resposta inflamatória do hospedeiro, produção e atividade de enzimas que causam a destruição da matriz extracelular, a formação do biofilme e aderência do *Porphyromonas gingivalis*, além das atividades proteolíticas e coagregação de

periodontopatógenos. O grupo sugere ainda que uma fração da *Cranberry* pode ser incorporada à enxaguatórios bucais e dentifrícios, bem como a géis e tiras para a prevenção e/ou tratamento de doenças orais, incluindo cárie e doença periodontal.

Os potenciais benefícios dos polifenóis de *Cranberry* para doença periodontal e cárie foram estudados por Bonifait e Grenier (2010). Eles constataram, neste estudo, que os polifenóis de *Cranberry* aparentam ter potencial para prevenir e/ou tratar a cárie dental, através da inibição da produção de ácidos orgânicos e formação de biofilmes, e também a redução da resposta inflamatória, bem como a produção e atividade de enzimas proteolíticas, contribuindo para a destruição da matriz extracelular na doença periodontal. Os polifenóis de *Cranberry* também interferiram em várias atividades do *Porphyromonas gingivalis*, o maior agente etiológico causador da periodontite crônica.

Resultados promissores também foram encontrados na utilização de *Cranberry* para prevenir biofilmes de *Candida* oral (GIRARDOT et al., 2014). Ao ser adicionado ao meio de cultura, o extrato de *Cranberry* mostrou um efeito antiaderente significativo contra *Candida spp.*, quando em baixas concentrações. Ademais, o pré-tratamento superficial com esse extrato induziu uma atividade antiaderente contra leveduras de *C. glabrata* e uma atividade antiobiofilme contra *C. albicans*. Essa atividade foi dependente de concentração, tempo e compressão. Posteriormente, utilizou-se um teste anti-adesão fotoquímico bioguiado para investigar a adesão. Os resultados mostraram que três subfrações repletas em Proantocianidinas apresentaram uma atividade antiaderente em baixas concentrações do extrato. Portanto, esse estudo demonstrou, pela primeira vez, que extratos de *Cranberry* podem prevenir a formação de biofilmes de *Candida*, enaltecendo o potencial da fruta como agente antiaderente.

Ainda no tema, mas especificamente utilizando-se as Proantocianidina do *Cranberry*, estudou-se o papel preventivo das PACs no mecanismo antiaderente de *Candida albicans*. Para tal, utilizou-se incubação de biofilmes do fungo em urina artificial. Os resultados mostraram uma excelente atividade antiaderente das PACs derivadas da *Cranberry* contra a formação de biofilmes de *C. albicans* na urina (RANE et al., 2014).

Voltando a estudos focando a ação de *Cranberry* em tecidos da cavidade oral, Lombardo Bedran, Palomari Spolidorio e Grenier (2015) hipotetizaram que a

Proantocianidina do tipo A do *Cranberry* (AC-PACs) e a galato-3-epigallocatequina (EGCG) agem em sinergia com o peptídeo humano antimicrobiano catelicidina (LL-37), a fim de reduzir a secreção de mediadores inflamatórios por células da mucosa oral. Para tal, foi desenvolvido um modelo de cultura de células epiteliais gengivais e fibroblastos, as quais foram tratadas com concentrações não citotóxicas de AC-PACs, EGCG e LL-37, isoladas ou combinadas. Eles relatam que essas substâncias não tiveram efeito na regulação da secreção de MMPs, mas inibiram a secreção de diversas citocinas. O grupo concluiu que a combinação de LL-37 e polifenóis naturais do *Cranberry* e chá verde agiu em sinergia para reduzir a secreção de várias citocinas no modelo de cultura proposto. Tais combinações demonstraram resultados promissores como terapias adjuntas no tratamento de doenças periodontais.

Portanto, frente às pesquisas acima relacionadas, pressupomos efeitos promissores tanto do extrato da fruta *Cranberry* quando de um de seus polifenóis, a Proantocianidina, na redução do desgaste erosivo. Desta forma, um primeiro estudo *in vitro* torna-se crucial como início das investigações dessas substâncias bem como suas interações com o tecido dentinário.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo se propôs a avaliar, por meio da perfilometria, o efeito de diferentes concentrações de géis à base de *Cranberry* e Proantocianidina sobre a dentina submetida à erosão.

Para este fim, foi elaborada a seguinte hipótese nula:

- não há diferença nos dados perfilométricos entre os 10 grupos avaliados na minimização dos efeitos erosivos provocados por uma bebida ácida.

4 Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo *in vitro* avaliou o efeito de diferentes concentrações de géis de Proantocianidina e *Cranberry* aplicados sobre a dentina por meio de dez grupos.

Os dois princípios ativos foram avaliados em quatro concentrações (0,05%; 1%; 5% e 10%). Completaram os grupos aqueles considerados controle: positivo (gel clorexidina 0,012%) e negativo (gel placebo com nenhum princípio ativo).

Todos os géis foram aplicados sobre as superfícies dos espécimes por 5 minutos. Um total de 150 fragmentos de dentina radicular bovina, após um ordenamento planejado conforme a dureza, foram aleatoriamente divididos entre os 10 grupos de estudo. Desta forma para cada grupo foram utilizados 15 fragmentos de dentina bovina.

Os 10 grupos foram distribuídos da seguinte forma:

- **G1** - Ação da bebida ácida (Coca-Cola®) sobre a dentina bovina tratada previamente com gel de aplicação tópica à base de clorexidina (**Controle Positivo**);
- **G2** - Ação da bebida ácida (Coca-Cola®) sobre a dentina bovina tratada previamente com gel de aplicação tópica placebo (**Controle Negativo**);
- **G3** - Ação da bebida ácida (Coca-Cola®) sobre a dentina bovina tratada previamente com gel de aplicação tópica à base de extrato de *Cranberry* a 0,05%;
- **G4** - Ação da bebida ácida (Coca-Cola®) sobre a dentina bovina tratada previamente com gel de aplicação tópica à base de extrato de *Cranberry* a 1%;
- **G5** - Ação da bebida ácida (Coca-Cola®) sobre a dentina bovina tratada previamente com gel de aplicação tópica à base de extrato de *Cranberry* a 5%;

- **G6** - Ação da bebida ácida (Coca-Cola®) sobre a dentina bovina tratada previamente com gel de aplicação tópica à base de extrato de *Cranberry* a 10%;
- **G7** - Ação da bebida ácida (Coca-Cola®) sobre a dentina bovina tratada previamente com gel de aplicação tópica à base de Proantocianidina a 0,05%;
- **G8** - Ação da bebida ácida (Coca-Cola®) sobre a dentina bovina tratada previamente com gel de aplicação tópica à base de Proantocianidina a 1%;
- **G9** - Ação da bebida ácida (Coca-Cola®) sobre a dentina bovina tratada previamente com gel de aplicação tópica à base de Proantocianidina a 5%;
- **G10** - Ação da bebida ácida (Coca-Cola®) sobre a dentina bovina tratada previamente com gel de aplicação tópica à base de Proantocianidina a 10%.

Após o período experimental *in vitro*, o fragmento dentário foi submetido à análise quantitativa do desgaste dos fragmentos, por meio de teste de perfilometria, observando-se o perfil de desgaste.

A referência de dentina hígida de cada espécime foi mantida, uma vez que todos os blocos de dentina tiveram dois terços de suas superfícies protegidas por esmalte cosmético, para obtenção de áreas controle, condição imprescindível para a realização da perfilometria. Além disso, as medidas precisas dos eixos de movimentação (eixos X e Y) do perfilômetro foram fielmente mantidas na análise perfilométrica prévia e posterior à etapa experimental (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma ilustrando o delineamento experimental do trabalho

4.2 PREPARO DOS ESPÉCIMES DE DENTINA

Aproximadamente 200 dentes incisivos bovinos extraídos de gado da raça Nelore com idade média de 36 meses, abatidos para consumo no Frigorífico Vangélio Mondelli Ltda., em Bauru, SP, foram inicialmente utilizados no presente estudo.

Os incisivos foram limpos com curetas periodontais para remover resíduos de tecido gengival aderido à superfície e, posteriormente, armazenados em solução de cloreto de sódio e timol a 0,1% (pH 7,0). Os dentes ficaram imersos durante todo o período de preparo dos espécimes.

A escolha do substrato bovino ocorre em função da grande dificuldade de se obter dentes humanos para pesquisas científicas. Esse substrato tem sido aceito e utilizado em diversas pesquisas sobre erosão dentária (RIOS et al., 2006; HONÓRIO

et al., 2008; KATO et al., 2009; HONÓRIO et al., 2010a; KATO et al., 2010a). Há publicações as quais caracterizaram similaridades entre dentes humanos e bovinos quanto à morfologia, fisiologia (SCHMALZ et al., 2001) e estrutura mecânica (WEGEHAUPT et al., 2008). O grupo de Kato et al. (2010a, 2010b) conferiram a confiabilidade desse substrato para estudos envolvendo erosão dentária e atividade de metaloproteinases. Assim, face à facilidade de obtenção e ao acima exposto, a dentina bovina foi o substrato de eleição para a presente pesquisa.

Primeiramente foram removidas as raízes dos incisivos bovinos, com o auxílio de um torno para polimento odontológico adaptado para corte (Fábrica Nacional de Motores Monofásicos Nevoni / Série 16.223, Tipo: TG1/3, São Paulo, SP) e um disco diamantado Diaflex-F (Wilcos do Brasil, Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ), sendo feita uma secção na porção cervical dos dentes.

O próximo passo foi fixar a amostra, com godiva termoativada (Kerr Corporation, USA), ao centro de uma base de acrílico cristal (40 X 40 X 5 mm), para facilitar a adaptação na máquina de corte.

A placa de acrílico foi acoplada a um aparelho de corte de precisão ISOMET LowSpeedSaw (Bulher Ltda., Lake Bluff, IL, USA) e com o auxílio de dois discos diamantados dupla face (XLI 2205, high concentration, 102 X 0,3 X 127 mm; Extec Corp, Enfield, CT, USA / Ref: 12,205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm) entre os discos, com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada, colocados em um ângulo de 90° em relação ao longo eixo do dente, no sentido mésio-distal, foram obtidos discos de raiz. Após, com dois discos diamantados dupla face (XLI 2205, “high concentration”, 102 X 0,3 X 12, 7 mm; Extec Corp, Enfield, CT, USA / Ref: 12,205) e o espaçador de 4 mm, foi realizado um corte do disco no sentido vestibulo-lingual, resultando em dois espécimes de dentina de 4 X 4 mm.

4.3 PLANIFICAÇÃO E POLIMENTO DOS ESPÉCIMES DE DENTINA

Os blocos de dentina foram, na sequência, submetidos à planificação. Para tal, foram novamente fixados com cera de enceramento progressivo em bases de

acrílico de 30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura, com a superfície de dentina externa (coberta por cimento) voltada para baixo.

Os espécimes foram planificados em uma Politriz Metalográfica (APL 4, Arotec, Cotia, SP) com sistema múltiplo capaz de realizar o polimento automático e concomitante de seis corpos de prova por turno. Para tal, foi utilizada uma lixa de carbetto de silício de granulação 320 (ExtecCorp.), sob refrigeração constante com água, em baixa velocidade, durante um período de 10 a 30 segundos, dependendo da espessura do bloco.

Em seguida, os blocos foram removidos das placas acrílicas e estas foram limpas e tiveram resíduos de cera eliminados. Então, as amostras foram refixadas, mas no sentido inverso (cimento voltado para cima). Foram utilizadas sequencialmente as lixas de carbetto de silício de granulação 320 (10-20s), 600 (30-60s) e 1200 (cerca de 5 m) (ExtecCorp.), em baixa velocidade, sob refrigeração, até a obtenção de uma superfície de dentina com aspecto vítreo.

4.4 AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA SUPERFICIAL E SELEÇÃO DOS ESPÉCIMES DE DENTINA

A microdureza superficial inicial da dentina foi avaliada utilizando-se um microdurômetro (HMV-2000/ Shimadzu Corporation, Japan) acoplado a um computador e software específico (Cams – Win – New Age Industries/USA) para a análise das imagens.

O próprio sistema dispõe de um penetrador diamantado piramidal tipo KNOOP (Figura 2). Foi configurado parâmetro de carga estática de 25 g, aplicada por 5 segundos. Em cada amostra foram realizadas cinco endentações (marcações com o penetrador) aleatórias (Figura 3), englobando diferentes áreas da superfície com uma distância de 100 μ m entre elas.

Para medir as endentações realizadas, duas marcas pontilhadas que aparecem na tela do computador irão se sobrepor aos vértices agudos do losango correspondente à endentação, determinando o comprimento da maior diagonal e,

consequentemente, os resultados da dureza KNOOP através do cálculo automático feito pelo software da seguinte equação:

$$KHN = \frac{C \cdot c}{d^2}$$

Sendo: KHN = valor de dureza Knoop

C (constante) = 14,230

c = 25 gramas

d = comprimento da maior diagonal da endentação

Figura 2 - Ponta tipo Knoop

Figura 3 - Imagem em maior aumento da endentação, feita para avaliação de microdureza

Foram selecionados, após esta etapa, 200 espécimes de dentina. Após um ordenamento dos espécimes pelo valor médio de dureza (média entre as 5 endentações de cada espécime), foram descartados os 25 espécimes de menor dureza e os 25 espécimes de maior dureza. Assim, foram descartados 50 espécimes de dentina. Utilizou-se a randomização estratificada para tal finalidade.

4.5 PERFILOMETRIA INICIAL

Antes das leituras de superfícies com o perfilômetro, foram realizadas duas marcações com a lâmina de bisturi número 11 (Embramac, Itapira, SP, Brasil), objetivando delimitar as duas áreas controle e teste. Além disso, estas marcações também permitiram a exata sobreposição dos perfis inicial e final para a mensuração do desgaste final.

Para este procedimento, foi utilizado um guia de resina composta, sobre uma matriz bipartida, com as dimensões de 2 mm de largura, 1,5 mm de espessura e 2,5 cm de comprimento. Este guia foi pressionado ao centro de cada espécime para a realização das marcações. Desta maneira obtivemos duas áreas de controle nas extremidades do espécime (1 mm cada) e, ao centro, uma área de teste com 2 mm de largura.

Na avaliação da superfície inicial da dentina, foi utilizado o perfilômetro da marca Mahr (Marsurf GD 25, Göttingen, Germany) acoplado a um computador contendo um software (Mahrsurf XCR 20) específico para obtenção das imagens. Na sequência, uma sonda apalpadora esférica percorreu toda a superfície do espécime. Essa leitura resultou em uma imagem gráfica relativa à superfície. Para cada amostra foram efetuadas cinco leituras a distâncias pré-determinadas de 2,25; 2; 1,75; 1,5 e 1,25 μm . A sonda percorreu 3,5 mm em cada uma das leituras, no sentido lateral.

Um dispositivo de aço inox nas mesmas dimensões da base acrílica foi utilizado para a adaptação do espécime no perfilômetro. Dadas configurações previamente relatadas dos eixos X e Y, foi marcada a porção inferior da amostra para posicioná-la identicamente nas duas análises do perfil, ou seja, inicial e final (Figura 4).

Figura 4 - Ponta apalpadora e dispositivo adaptador do espécime

4.6 PREPARAÇÃO DOS GÉIS

Os géis foram especialmente manipulados para este experimento (Bauru Fórmulas) e todos tiveram a mesma composição base (hidrocelulose, propilenoglicol, metilparabeno, imidazolidiniluréia e água deionizada), exceto pela presença do princípio ativo respectivo de cada grupo teste e do controle positivo (clorexidina) (Figura 5).

O extrato de *Cranberry* utilizado para a confecção dos géis à base de *Cranberry* foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Anuradha Prakki, da Universidade de Toronto, no Canadá.

Figura 5 - Géis manipulados especialmente para o experimento

4.7 PROTEÇÃO DOS ESPÉCIMES

Um esmalte cosmético foi utilizado para proteger as laterais dos fragmentos contra o ataque ácido (desafio erosivo) promovido no experimento e para obtenção de superfícies de referência nos perfis (Figura 6).

Figura 6 - Proteção dos espécimes

4.8 APLICAÇÃO DOS GÉIS

Os géis foram aplicados apenas pelo pesquisador responsável e uma única vez (pela manhã) antes do início dos desafios erosivos *in vitro*. Os géis foram aplicados sobre os fragmentos por meio de uma fina camada utilizando-se um microbrush, permanecendo sobre os espécimes por 5 minutos. Em seguida, foram cuidadosamente removidos com cotonete.

4.9 CICLAGEM EROSIVA

Os espécimes foram submetidos à ciclagem de pH erosiva durante 5 dias consecutivos. Cada dia de ciclagem compreende três ciclos de:

- lavagem com água deionizada por 20s;

- desmineralização por bebida ácida Coca-Cola® em um volume de 32 mL por amostra (480 mL total), durante 5 minutos, sob temperatura ambiente e recipiente plástico (tipo Tupperware®). As amostras foram encaixadas em um dispositivo especialmente confeccionado para o experimento, de EVA;
- lavagem com água deionizada por 20s findo o tempo de imersão em Coca-Cola®;
- reimersão em recipiente plástico contendo o mesmo volume (480 mL) de saliva artificial. A saliva utilizada foi preconizada por Klimek, Hellwig e Ahrens (1982) e contém 0,33g KH_2PO_4 , 0,34g Na_2HPO_4 , 1,27g KCl, 0,16g NaSCN, 0,58g NaCl, 0,17g CaCl_2 , 16g NH_4Cl , 0,2g uréia, 0,03g glucose, 0,002g ácido ascórbico, pH 7.

Ao final de cada dia, os espécimes permaneceram imersos em saliva artificial até o dia seguinte (Figura 7 e 8).

Figura 7 - Preparo para ciclagem erosiva

Figura 8 - Imersão dos espécimes em bebida ácida

4.10 PERFILOMETRIA APÓS CICLAGEM EROSIVA

Terminada a etapa de ciclagem, os espécimes tiveram os esmaltes cosméticos removidos e foram novamente analisados no perfilômetro, sob as mesmas condições e parâmetros (Figura 9).

Figura 9 - Ilustração esquemática mostrando a quantificação do desgaste pelo perfilômetro

4.11 AVALIAÇÃO DOS PERFIS

Os valores referentes ao desgaste provocado após a ciclagem erosiva foram obtidos por meio da sobreposição dos gráficos referentes aos perfis inicial e final de

cada espécime. Foi calculada a diferença entre os valores obtidos nas sobreposições inicial e final, para a obtenção dos dados relativos às possíveis alterações superficiais após o experimento (Figura 10).

Figura 10 - Desgaste dos espécimes testados ocasionado pela erosão

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade das variâncias. Sendo obedecidas estas premissas, foi aplicado o teste de Análise de Variância seguido do teste de Fisher, para a variável de resposta testada (desgaste). Foi adotado um nível de significância de 5%. Para a realização destas análises estatísticas, foi utilizado o programa STATISTICA data analysis software system 11,0 (Stat Soft Inc.).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE DESGASTE

O teste de Análise de Variância (ANOVA) mostrou haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao desgaste.

Posteriormente, o teste de Fisher permitiu verificar que o gel de *Cranberry* (G3) na concentração de 0,05% e o gel de Proantocianidina a 10% (G10) promoveram prevenção de desgaste similares contra a perda dentinária quando comparadas ao G1, controle positivo, o gel de clorexidina a 0,12%.

Além disso, esses três grupos apresentaram menor perda dentinária quando comparados a todos os outros grupos avaliados ($p < 0,05$).

O controle negativo (G2) mostrou a maior perda dentinária dentre todos os grupos estudados ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Média $\pm$ desvio padrão de perda dentinária (μm) para os grupos estudados

GRUPOS	MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO*
G1- 0,012% Gel de clorexidina	15,6 $\pm$ 2,4 ^b
G2- Gel Placebo	23,1 $\pm$ 1,4 ^e
G3- Gel <i>Cranberry</i> 0,05%	15,1 $\pm$ 2,3 ^b
G4- Gel <i>Cranberry</i> 1%	20,4 $\pm$ 1,9 ^{cd}
G5- Gel <i>Cranberry</i> 5%	19,0 $\pm$ 2,1 ^{ac}
G6- Gel <i>Cranberry</i> 10%	18,7 $\pm$ 1,4 ^a
G7- Gel Proantocianidina 0,05%	18,2 $\pm$ 1,6 ^a
G8- Gel Proantocianidina 1%	21,1 $\pm$ 1,2 ^d
G9- Gel Proantocianidina 5%	19,2 $\pm$ 2,6 ^{ac}
G10- Gel Proantocianidina 10%	15,2 $\pm$ 2,5 ^b

*Letras diferentes significam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e Fisher's Test, $p < 0,05$).

Figura 11 - Valores de média e desvio-padrão dos diferentes grupos

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O presente estudo *in vitro* avaliou o potencial inibitório de MMPs na erosão dentinária provocada por uma bebida ácida. Para tal, foram utilizados géis em diferentes concentrações com princípios ativos de *Cranberry* e um polifenol existente nesta fruta, a Proantocianidina, usada isoladamente. Embora a degradação de colágeno não possa ser medida diretamente dentro deste protocolo, os resultados sugerem que a inibição das MMPs pelo extrato de *Cranberry* 0,05% e Proantocianidina 10%, em níveis comparados aos da clorexidina, possa ser um potencial mecanismo de ação na redução da perda dentinária.

Os modelos de estudo *in vitro* são fundamentais como primeiro passo para avaliar a interação entre os agentes químicos e os tecidos biológicos. Há vários trabalhos publicados enaltecendo a importância dos testes laboratoriais a fim de se obter parâmetros iniciais de fármacos e demais substâncias para futuros estudos *in situ*, inclusive para erosão dentinária (HONÓRIO et al., 2008; BARBOUR; LUSSI, 2014).

Por outro lado, sabe-se que há limitações nos testes *in vitro*. Wataha (2012) publicou uma revisão acerca dos diferentes modelos experimentais para estudo de materiais odontológicos. Ainda há controvérsias sobre como testes *in vitro* ou mesmo em animais deveriam ser utilizados para avaliar a segurança biológica dos materiais para uso clínico, objetivo final das pesquisas. De acordo com o autor, testes clínicos controlados continuam sendo a melhor medida isolada para testar a resposta a materiais, mas mesmo esses têm suas limitações significativas e são até mais inúteis para identificar os mecanismos que moldam a performance do material, como propriedades biomecânicas e biomoleculares.

Desta forma, os estudos *in vitro* ainda são utilizados e mundialmente aceitos como primeira estratégia para compreender o papel, prever e monitorar a segurança de novos biomateriais e fármacos (WATAHA, 2012; BARBOUR; LUSSI, 2014).

Neste estudo, optou-se pela utilização de géis para testar os princípios ativos. Os géis tem sido testados há alguns anos em experimentos como veículos de inibidores de proteases (KATO et al., 2010a, 2010b) a fim de facilitar a aplicação, padronização do tempo e contato do princípio ativo com a dentina. Desta forma, foi

proposto o tempo de 5 minutos de aplicação dos géis, de modo que esse mesmo tempo de ação possa ser, futuramente, adotado em consultórios odontológicos, sob uso profissional, em terapêuticas diversas.

A escolha da bebida ácida Coca-Cola® para a realização do desafio erosivo no presente estudo deu-se por vários motivos. Por ser industrializada, a composição e o pH são constantes, diminuindo-se, dessa forma, os vieses nas análises dos dados. Os refrigerantes de Cola possuem pH de 2,4. Esse pH oferece condições propícias à desmineralização, perda de íons cálcio e fosfato inorgânico. Um estudo de Leme et al. (2011), cujos dados foram obtidos por meio de microscopia eletrônica de varredura, concluiu que, dentre as diversas bebidas cotidianas pesquisadas, a Coca-Cola® alterou de forma mais intensa as características morfológicas e estruturais do esmalte dental.

O ciclo erosivo foi realizado com imersão em bebida ácida por 5 minutos, 3 vezes ao dia, por 5 dias, totalizando 75 minutos. As imersões em saliva foram realizadas a cada 3 horas para potencializar a degradação da matriz dentinária, uma vez que o baixo pH da bebida pode ter induzido a ativação de MMPs deste tecido (KATO et al., 2009).

É sabido que, uma vez ocorrendo a queda do pH, há por conseguinte a desmineralização do componente inorgânico da dentina. Isso leva à exposição das fibrilas colágenas e das MMPs teciduais e, em seguida, à ativação destas. Quando o pH salivar volta à neutralidade (pH=7,0) há a degradação das fibrilas colágenas pelas MMPs (MAGALHÃES et al., 2009b).

Barbour e Lussi (2014), publicaram um artigo no qual afirmam que o pH é o parâmetro singular mais importante ao determinar a taxa de dissolução de um tecido erosivo. Deve-se considerar, entretanto, vários fatores nesse processo. É sabido que para a doença cárie, há um pH crítico, mas o mesmo não ocorre para a erosão. A erosão pode progredir tanto em um pH ácido quanto em alto pH, na ausência de fatores atenuantes. Soluções supersaturadas de cálcio e fosfato não causarão dissolução do esmalte ou dentina, significando que, em concentrações suficientes de íons, a erosão não ocorre, mesmo em baixo pH.

A adição de cálcio é mais efetiva que de fosfato para reduzir a erosão em soluções ácidas. A temperatura também é um fator físico significativo: para soluções

acídicas, quanto maior a temperatura, mais rapidamente a erosão progride (BARBOUR; LUSSI, 2014).

De fato, todos os géis testados nesse estudo *in vitro* minimizaram a erosão dentinária. As informações obtidas permitiram verificar que concentração progressiva de extrato de *Cranberry* e Proantocianidina não apresentaram um efeito dose-resposta. O gel de *Cranberry* com a menor (0,05%) e o gel de Proantocianidina com a maior (10%) concentrações promoveram menores desgastes, estatisticamente significantes, em relação aos demais grupos.

Extrapolando para a prática clínica, os estudos futuros deverão avaliar por quanto tempo esses géis serão efetivos na redução da erosão, a fim de se estabelecer protocolos clínicos de utilização nos pacientes.

Os resultados pelo estudo obtidos indicam que o uso de *Cranberry* e de Proantocianidina, os quais já são conhecidos pela atividade catalítica inibitória de MMP1 e MMP9 em doenças periodontais (LA; HOWELL; GRENIER, 2009), por exemplo, também são eficientes na redução da erosão dentinária. Supõe-se que o efeito seja devido à preservação da matriz orgânica desmineralizada (BUZALAF; MAGALHÃES; WIEGAND, 2014), e não pelo impedimento da ocorrência da erosão. Ainda, nenhum desses géis foi capaz de prevenir a erosão dentinária, sugerindo que não atuam no processo des-remineralização (BUZALAF; MAGALHÃES; WIEGAND, 2014).

Um estudo de Huysmans, Young e Ganss (2014), encontrou dados indicando que o fluoreto pode promover a formação de uma camada do tipo CaF_2 ou mesmo uma cobertura superficial plena em íons metálicos, o que fez com que não fosse utilizado um gel de fluoreto como grupo controle neste estudo. Este cuidado tornou possível realizar a pesquisa focada nos componentes com capacidade exclusiva de inibir enzimas collagenolíticas.

Outrossim, há evidência (KATO et al., 2009, 2010a) de que o gel de 1,23% NaF reduz a degradação da matriz orgânica, embora a equipe de Ganss, Klimek e Schlueter (2014) relate que a matriz, por si só, não influencia o modo de ação de ingredientes ativos em dentifrícios fluoretados.

A clorexidina, por outro lado, foi relatada em estudos como potencial inibidora direta e indireta de MMPs tanto pela prevenção de erosão quanto na

inibição da degradação da matriz dentinária (KATO et al., 2010a, 2012). Desta forma, considerando-se essas propriedades, a escolha da clorexidina como controle positivo é ideal para comparação quantitativa da perda de tecido dentinário.

Nossos resultados indicam que o percentual de redução do desgaste dentinário para os grupos *Cranberry* a 0,05% e Proantocianidina a 10% foi de 35%, valor estatisticamente semelhante grupo controle positivo (clorexidina). De forma interessante, dados similares foram previamente encontrados em um estudo Magalhães et al. (2009a), no qual a clorexidina reduziu o desgaste dentinário de 30% a 40%.

Assim, apesar dos resultados mostrarem dados promissores para os géis de *Cranberry* e Proantocianidina na minimização do desgaste da dentina exposta a um agente erosivo, antes que estes sejam definitivamente considerados para a prevenção da evolução de lesões de erosão em dentina, futuros estudos, especialmente moleculares, deverão ser realizados para avaliar sua habilidade em inibir a degradação da matriz orgânica desmineralizada.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados pode-se concluir que:

- houve uma eficácia estatisticamente significativa dos géis ativos à base de *Cranberry* 0,05% e de Proantocianidina 10% na redução do desgaste da dentina submetida à erosão dentinária em relação ao grupo placebo (controle negativo) e equivalente ao controle positivo, com gel à base de clorexidina;
- estes resultados permitem a rejeição da hipótese nula inicialmente formulada.

Referências

REFERÊNCIAS

- Ali DA, Brown RS, Rodriguez LO, Moody EL, Nasr MF. Dental erosion caused by silent gastroesophageal reflux disease. *J Am Dent Assoc.* 2002;133:734-7.
- Almeida e Silva JS, Baratieri LN, Araújo E, Widmer N. Erosão dental: uma doença dos tempos atuais. *Clín Int J Braz Dent.* 2007;3(2):151-60.
- Barbosa CS, Barberio GS, Marques VR, Baldo V de O, Buzalaf MA, Magalhães AC. Dental manifestations in bariatric patients: review of literature. *J Appl Oral Sci.* 2009;17 Suppl:1-4.
- Barbosa CS, Kato MT, Buzalaf MA. Effect of supplementation of soft drinks with green tea extract on their erosive potential against dentine. *Aust Dent J.* 2011;56(3):317-21.
- Barbour ME, Lussi A. Erosion in relation to nutrition and the environment. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:143-54.
- Barron RP, Carmichael RP, Marcon MA, Sandor GK. Dental erosion in gastroesophageal reflux disease. *J Can Dent Assoc.* 2003;69:84-9.
- Bartlett D. Intrinsic causes of erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:119-39.
- Bodet C, Grenier D, Chandad F, Ofek I, Steinberg D, Weiss EI. Potential oral health benefits of Cranberry. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2008;48(7):672-80.
- Bonifait L, Grenier D. Cranberry polyphenols: potential benefits for dental caries and periodontal disease. *J Can Dent Assoc.* 2010;76:a130.
- Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res.* 2012;24(2):72-6.
- Buzalaf MA, Magalhães AC, Wiegand A. Alternatives to fluoride in the prevention and treatment of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:244-52.
- Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007;86(6):529-33.
- Castellan CS, Pereira PN, Grande RH, Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent Mater.* 2010;26(10):968-73.
- Castellan CS, Bedran-Russo AK, Karol S, Pereira PN. Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2011;4(7):1343-50.

- Charone S, Cardoso Cde A, Kato MT, Ducati P, Fukushima R, Gennaro G, Magalhães AC, Buzalaf MA. The effect of mouthwashes containing biguanides on the progression of erosion in dentin. *BMC Oral Health*. 2014;14:131.
- Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res*. 2006;85(1):22-32.
- Comar LP, Cardoso C de A, Charone S, Grizzo LT, Buzalaf MA, Magalhães AC. TiF₄ and NaF varnishes as anti-erosive agents on enamel and dentin erosion progression in vitro. *J Appl Oral Sci*. 2015;23(1):14-8.
- Darda S, Madria K, Jamenis R, Heda A, Khanna A, Sardar L. An in-vitro evaluation of effect of EDTAC on root dentin with respect to time. *J Int Oral Health*. 2014;6(2):22-7.
- Déziel BA, Patel K, Neto C, Gottschall-Pass K, Hurta RA. Proanthocyanidins from the American *Cranberry* (*Vaccinium macrocarpon*) inhibit matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in human prostate cancer cells via alterations in multiple cellular signalling pathways. *J Cell Biochem*. 2010;111(3):742-54.
- Eccles JD. Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. *J Prosthet Dent*. 1979;42(6):649-53.
- Epasinghe DJ, Yiu CK, Burrow MF, Tsoi JK, Tay FR. Effect of flavonoids on the mechanical properties of demineralised dentine. *J Dent*. 2014;42(9):1178-84.
- Eydelnant IA, Tufenkji N. Cranberry derived proanthocyanidins reduce bacterial adhesion to selected biomaterials. *Langmuir*. 2008;24(18):10273-81.
- Francisconi-dos-Rios LF, Calabria MP, Casas-Apayco LC, Honório HM, Carrilho MR, Pereira JC, et al. Chlorhexidine does not improve but preserves bond strength to eroded dentin. *Am J Dent*. 2015;28(1):28-32.
- Gandara BK, Truelove EL. Diagnosis and management of dental erosion. *J Contemp Dent Pract*. 1999;15:16-23.
- Ganss C. Definition of erosion and links to tooth wear. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:9-16.
- Ganss C, Klimek J, Schlueter N. Erosion/abrasion-preventing potential of NaF and F/Sn/chitosan toothpastes in dentine and impact of the organic matrix. *Caries Res*. 2014;48(2):163-9.
- Ganss C, Lussi A, Schlueter N. The histological features and physical properties of eroded dental hard tissues. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:99-107.
- Ghisi AC, Kopper PM, Baldasso FE, Stürmer CP, Rossi-Fedele G, Steier L, et al. Effect of superoxidized water and sodium hypochlorite, associated or not with EDTA, on organic and inorganic components of bovine root dentin. *J Endod*. 2015;41(6):925-30.

- Girardot M, Guerineau A, Boudesocque L, Costa D, Bazinet L, Enguehard-Gueiffier C, et al. Promising results of Cranberry in the prevention of oral *Candida* biofilms. *Pathog Dis*. 2014;70(3):432-9.
- Grippio JO, Simring M, Schreiner S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. *J Am Dent Assoc*. 2004;135:1109-18; quiz 63-5.
- Gupta A, Bansal K, Marwaha M. Effect of high-molecular-weight component of Cranberry on plaque and salivary *Streptococcus mutans* counts in children: An in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2015;33(2):128-33.
- Gupta K, Chou MY, Howell AB, Wobbe C, Grady R, Stapleton AE. Cranberry products inhibit adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to primary cultured bladder and vaginal epithelial cells. *J Urol*. 2007;177(6):2357-60.
- Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, González-Cabezas C, Zero DT. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res*. 2005;39(2):134-8.
- Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H, editors. *The Flavonoids*. London: Chapman & Hall; 1975.
- Hemingway CA, Parker DM, Addy M, Barbour ME. Erosion of enamel by non-carbonated soft drinks with and without toothbrushing abrasion. *Br Dent J*. 2006;201(7):447-50.
- Hicks MJ, Flaitz CM, Silverstone LM. Initiation and progression of caries-like lesions of enamel: effect of periodic treatment with synthetic saliva and sodium fluoride. *Caries Res*. 1985;19(6):481-9.
- Hocman G. Prevention of cancer: vegetables and plants. *Comp Biochem Physiol B*. 1989;93(2):201-12.
- Honório HM, Rios D, Francisconi LF, Magalhães AC, Machado MA, Buzalaf MA. Effect of prolonged erosive pH cycling on different restorative materials. *J Oral Rehabil*. 2008;35(12):947-53.
- Honório HM, Rios D, Santos CF, Buzalaf MA, Machado MA. Influence of dental plaque on human enamel erosion: *in situ* / *ex vivo* study. *Oral Health Prev Dent*. 2010a;8(2):179-84.
- Honório HM, Rios D, Santos CF, Magalhães AC, Delbem AC, Buzalaf MA, et al. Cross-sectional microhardness of human enamel subjected to erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges. *Caries Res*. 2010b;44(1):29-32.
- Howell AB, Reed JD, Krueger CG, Winterbottom R, Cunningham DG, Leahy M. A-type Cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry*. 2005;66(18):2281-91.

Huysmans MC, Young A, Ganss C. The role of fluoride in erosion therapy. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:230-43.

Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci.* 1996;104:151-5.

Kapila YL, Kashani H. Cocaine-associated rapid gingival recession and dental erosion. A case report. *J Periodontol.* 1997;68:485-8.

Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J Appl Oral Sc.* 2009;17(6):560-4.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion *in situ*. *J Dent Res.* 2010a;89:468-72.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Oliveira RC, Pereira JC, Tjäderhane L, et al. Effect of iron on matrix metalloproteinase inhibition and on the prevention of dentine erosion. *Caries Res.* 2010b;44(3):309-16.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhães AC, Pereira JC, et al. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J Dent Res.* 2012;91(12):1119-23.

Kato MT, Bolanho A, Zarella BL, Salo T, Tjäderhane L, Buzalaf MA. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res.* 2014;93(1):74-7.

Klimek J, Hellwig E, Ahrens G. Effect of plaque on fluoride stability in the enamel after amine fluoride application in the artificial mouth. *Dtsch Zahnarztl Z.* 1982;37(10):836-40.

Koli K, Saxena G, Ogbureke KU. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-20 and potential interaction with dentin sialophosphoprotein (DSPP) in human major salivary glands. *J Histochem Cytochem.* In press 2015.

Kondo M, MacKinnon SL, Craft CC, Matchett MD, Hurta RA, Neto CC. Ursolic acid and its esters: occurrence in cranberries and other *Vaccinium* fruit and effects on matrix metalloproteinase activity in DU145 prostate tumor cells. *Journal of the science of food and agriculture.* 2011;91(5):789-96.

La VD, Howell AB, Grenier D. Cranberry proanthocyanidins inhibit MMP production and activity. *J Dent Res.* 2009;88(7):627-32.

Leme RMP, Faria RA, Gomes JB, Mello JDB, Castro-Filice LS. Comparação *in vitro* do efeito de bebidas ácidas no desenvolvimento da erosão dental: Análise por microscopia de eletrônica de varredura. *Bioscience Journal.* 2011;27(1):162-9.

- Lombardo Bedran TB, Palomari Spolidorio D, Grenier D. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate and Cranberry proanthocyanidins act in synergy with cathelicidin (LL-37) to reduce the LPS-induced inflammatory response in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2015;60(6):845-53.
- Longhi M, Cerroni L, Condò SG, Ariano V, Pasquantonio G. The effects of host derived metalloproteinases on dentin bond and the role of MMPs inhibitors on dentin matrix degradation. *Oral Implantol*. 2015;7(3):71-9.
- Lussi A, Carvalho TS. The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. *Caries Res*. 2015;1:18-29.
- Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res*. 2004;38 Suppl 1:34-44.
- Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion *in situ*. *J Dent*. 2009a;37(12):994-8.
- Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci*. 2009b;17(2):75-86.
- Moezizadeh M, Alimi A. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate paste and sodium fluoride mouthwash on the prevention of dentine erosion: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2014;17(3):244-9.
- O'Sullivan EA, Curzon ME, Roberts GJ, Milla PJ, Stringer MD. Gastroesophageal reflux in children and its relationship to erosion of primary and permanent teeth. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(3):765-9.
- Ozcan S, Seseogullari-Dirihan R, Uctasli M, Tay FR, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Effect of polyacrylic acid on dentin protease activities. *Dent Mater*. 2015;20:138-4.
- 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;83(3):216-21.
- Preetha A, Sujatha D, Patil BA, Hegde S. Oral manifestations in gastroesophageal reflux disease. *Gen Dent*. 2015;63(3):e27-31.
- Rane HS, Bernardo SM, Howell AB, Lee SA. Cranberry derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urinethrough biofilm-and adherence-specific mechanisms. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(2):428-36.
- Rice-Evans CA, Miller NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans*. 1996;24(3):90-5.

- Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, et al. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an *in situ/ex vivo* study. *Caries Res*. 2006;40(3):218-23.
- Rios D, Magalhães AC, Honório HM, Buzalaf MA, Lauris JR, Machado MA. The prevalence of deciduous tooth wear in six-year-old children and its relationship with potential explanatory factors. *Oral Health Prev Dent*. 2007;5(3):167-71.
- Rytomaa I, Jarvinen V, Kanerva R, Heinonen OP. Bulimia and tooth erosion. *Acta Odontol Scand*. 1998;56(1):36-40.
- Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys*. 1995;322(2):339-46.
- Schlueter N, Hardt M, Klimek J, Ganss C. Influence of the digestive enzymes trypsin and pepsin *in vitro* on the progression of erosion in dentine. *Arch Oral Biol*. 2010;55(4):294-9.
- Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod*. 2001;27(1):23-30.
- Shellis RP, Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:63-79.
- Tao DY, Hao G, Lu HX, Tian Y, Feng XP. Dental erosion among children aged 3-6 years and its associated indicators. *J Public Health Dent*. In press 2015.
- Teel RW. Antimutagenic effects of polyphenolic compounds. Castonguay A. *Cancer Lett*. 1992;66(2):107-13.
- Tjäderhane 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;77(8):1622-9.
- Vidal CM, Tjaderhane L, Scaffa PM, Tersariol IL, Pashley D, Nader HB, et al. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. *J Dent Res*. 2014;93(3):269-74.
- Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater*. 2012;28(1):23-40.
- Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T. Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? *J Oral Rehabil*. 2008;35(5):390-4.

Zandim-Barcelos DL, Kielbassa AM, Sampaio JE, Tschoppe P. Saliva substitutes in combination with high-fluoride gel on dentin remineralization. Clin Oral Investig. 2015;19(2):289-97.

Zero DT. Etiology of dental erosion – extrinsic factors. Eur J Oral Sci. 1996;104(2):162-77.

Apêndice

APÊNDICE A

In vitro effect of Cranberry and Proanthocyanidin on dentin erosion

Short Title: Cranberry and Proanthocyanidin on dentin erosion

Heitor M. Honório¹, Marcela M. Tagliani¹, Ana Paula Boteon², Brunna M. Ferrairo³, Anuradha Prakki⁴, Marília Afonso Rabelo Buzalaf⁵, José Roberto P. Lauris¹, Daniela Rios¹

¹Department of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Public Health, Bauru School of Dentistry - University of São Paulo, Bauru-SP, Brazil

²Department of Restorative Dentistry, Endodontics and Dental Materials, Bauru School of Dentistry - University of São Paulo, Bauru-SP, Brazil

³Department of Prosthetic Dentistry, Bauru School of Dentistry - University of São Paulo, Bauru-SP, Brazil

⁴Department of Clinical Sciences (Restorative), Faculty of Dentistry - University of Toronto, Toronto-ON, Canada

⁵Department of Biological Science, Bauru School of Dentistry - University of São Paulo, Bauru-SP, Brazil

Keywords: Collagen, Dentin, Erosion, Preventive dentistry and Wear

Corresponding Author:

Heitor Marques Honório
Bauru School of Dentistry- University of São Paulo (FOB-USP)
Department of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Public Health
Alameda Octávio Pinheiro Brisola, 9-75, Vila Universitária
ZIP CODE: 17012-901 Bauru- SP / Brazil
Telephone: 00-55-14-32358256
Fax: 00-55-14-3223-4679
e-mail: heitorhonorio@usp.br

In vitro effect of Cranberry and Proanthocyanidin on dentin erosion

ABSTRACT

Objectives: The aim of this *in vitro* study was to evaluate the effect of Cranberry and Proanthocyanidin gels used in different concentrations on dentin before an erosive challenge.

Methods: For this purpose, 150 bovine root dentin blocks were randomly divided into 10 groups and treated by different gels: G1- 0.012% Chlorhexidine Gel (positive control), G2- Placebo gel with no active principle (negative control), G3- 0.05% Cranberry gel, G4- 1% Cranberry gel, G5- 5% Cranberry gel, G6- 10% Cranberry gel, G7- 0.05% Proanthocyanidin gel, G8- 1% Proanthocyanidin gel, G9- 5% Proanthocyanidin gel and G10- 10% Proanthocyanidin gel. The gels were applied over dentin blocks one time before the first erosive challenge for 5 minutes. After that, the blocks were subjected to 3 sequential erosive cycles per day, during 5 days. Profilometry was used to quantify the dentin wear (μm). Data were analyzed by ANOVA and Fisher's test ($p < 0.05$). **Results:** 0.05% Cranberry gel (G3) and 10% Proanthocyanidin gel (G10) presented similar results when compared to positive control group (G1), and these three groups showed the statistically lowest wear when compared to all other evaluated groups. **Conclusions:** Results of this study suggest a significant efficacy of Cranberry and Proanthocyanidin gels in preventing wear of dentin subjected to dental erosion *in vitro*.

1 INTRODUCTION

Besides dental enamel, dentin may also be affected by erosive agents. However, dentin has different composition when compared to enamel¹, which results in more complex demineralization mechanism.^{2,3}

The dentin erosive demineralization rate decreases when the amount of degradable collagen increases, because the demineralized matrix layer serves as a barrier against acids diffusion, reducing the erosion progression.⁴ However, the organic matrix can be chemically degraded, which can contribute to the progression of dentin wear.^{4,5} This chemical degradation occurs specially by matrix metalloproteinases (MMPs), present in dentin and saliva, which can be activated when local pH drops below 4.5.⁶⁻⁸

Thus, the application of MMP inhibitors aims to reduce exposed organic matrix degradation, decreasing dentin loss in case of subsequent erosive challenges. Some studies evaluated several agents, such as chlorhexidine, compounds present in green tea (EGCG) and ferrous sulphate, confirming the preventive effect of protease inhibitors against dentin erosion.⁹⁻¹²

Studies in many areas showed that Cranberry's polyphenols could also inhibit the activity of hydrolytic enzymes (MMPs).¹³⁻¹⁶ Proanthocyanidin (PA) is one of the Cranberry polyphenols. The anti-proteolytic effect of PA by means of resin-dentin bonding durability showed positive results.^{17,18} In addition, the demineralized dentin treated with PA-based agents decreased collagenase degradation, increasing mechanical properties and reducing water absorption.^{19,20} Recently, a study showed that PA was able to inactivate more than 89% of the total active MMPs in dentin.²¹

Whereas the effect of Cranberry and Proanthocyanidin might favor the reduction of dentin erosion, the aim of this *in vitro* study is to evaluate the role of different gel concentrations of Cranberry extract and Proanthocyanidin-rich extract on preventing dentin erosion.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Experimental design

This *in vitro* study evaluated the effect of Cranberry and Proanthocyanidin gels applied on 150 dentin specimens randomly and equally divided among 10 groups [G1: 0.012% chlorhexidine gel,

G2: placebo gel (no active agent), G3: 0.05% Cranberry gel, G4: 1% Cranberry gel, G5: 5% Cranberry gel, G6: 10% Cranberry gel, G7: 0.05% Proanthocyanidin gel, G8: 1% Proanthocyanidin gel, G9: 5% Proanthocyanidin gel and G10: 10% Proanthocyanidin gel]. The erosive challenge was conducted for 5 days. The response variable was depth of wear (surface loss) measured by means of profilometry.

2.2 Sample Preparation

Two hundred root dentin specimens (4 X 4 X 3 mm) were prepared from extracted bovine incisors as reported in previous studies.^{22,23} Specimens were selected and allocated to groups according to surface hardness (Knoop diamond, 25 g, 10 sec, HMV-2000; Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) and stratified randomization.

2.3 Treatment and erosive cycling

The gels from different groups were applied over specimens one time before the first erosive challenge for 5 minutes. All gel formulations presented essentially the same composition⁹ except for the active vehicle of each group [0.012% Chlorhexidine, Cranberry (Shaanxi M.R Natural Product Co.,Ltd) and Proanthocyanidin (95% proanthocyanidin. Changsha NutraMax Inc.)]. Specimens were subjected to 3 sequential erosive cycles per day, during 5 days. Each cycle consisted of the immersion of the specimens in cola drink (17.6 mL per sample) for 5 minutes at 25°C under constant motion, followed by rinsing with deionized water (20s) and immersion in artificial saliva (17.6 mL per sample) for 2 h. At the end of each day, the samples were stored overnight (15 hours) in artificial saliva.²⁴

2.4 Profilometric Analysis

The dentin samples were maintained wet until the analysis to avoid shrinkage of the organic layer. Immediately before the profilometric measurement, only the excess of water was carefully removed with filter paper. Prior to treatment, identification marks were made on the sample surfaces using a scalpel, which allowed for accurate repositioning of the stylus. Subsequently, five baseline surface profiles were obtained from all the samples using a profilometer (MarSurf GD 25, Göttingen, Germany) at certain distances from the edge: 2.25, 2.0, 1.75, 1.5, and 1.25 µm. The marks and two external thirds of the dentin surface were covered with nail varnish in order to allow reference surfaces for wear analysis. After five days of erosive cycling the nail varnish was removed and profilometric analysis was performed again at the same sites as the baseline measurements. The dentin loss was quantitatively determined using specific software (MarSurf XCR 20, Göttingen, Germany) by calculating the average depth of the eroded surface relative to the baseline surface profiles. Since the dentin samples could be precisely repositioned in the wells of the profilometer, it was possible to match the respective baseline and final profiles.

2.5 Statistical Analysis

The groups were compared using One Way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Fisher's test. The level of significance was set at 5%.

3 RESULTS

The mean wear data of the studied groups are shown in Table 1. The statistical analysis revealed that 0.05% Cranberry gel (G3) and 10% Proanthocyanidin gel (G10) promoted similar prevention against dentin loss when compared to 0.012% chlorhexidine (G1), the positive control. In addition, these groups showed lower dentin loss when compared to all other evaluated groups

($p < 0.05$). Negative control group (G2) showed the significantly highest dentin loss among the studied groups ($p < 0.05$).

Table 1 - Mean ($\pm$ SD) of dentin loss (μ m) for the studied groups

GROUPS	MEAN $\pm$ SD*
G1- 0.012% Chlorhexidine Gel	15.6 $\pm$ 2.4 ^b
G2- Placebo Gel	23.1 $\pm$ 1.4 ^e
G3- 0.05% Cranberry Gel	15.1 $\pm$ 2.3 ^b
G4- 1% Cranberry Gel	20.4 $\pm$ 1.9 ^{cd}
G5- 5% Cranberry Gel	19.0 $\pm$ 2.1 ^{ac}
G6- 10% Cranberry Gel	18.7 $\pm$ 1.4 ^a
G7- 0.05% Proanthocyanidin Gel	18.2 $\pm$ 1.6 ^a
G8- 1% Proanthocyanidin Gel	21.1 $\pm$ 1.2 ^d
G9- 5% Proanthocyanidin Gel	19.2 $\pm$ 2.6 ^{ac}
G10- 10% Proanthocyanidin Gel	15.2 $\pm$ 2.5 ^b

Different letters mean statistical differences between groups (ANOVA and Fisher's Test, $p < 0.05$).

4 DISCUSSION

Protease inhibitors have been studied for dentin erosion therapy in different vehicles, such as rinsing solutions or gels for topical application. Rinsing solutions are for home use by patients, however their application is not practical, since it is necessary to rinse the solutions immediately after each erosive challenge. On the other hand, gels are for professional use, presuming no need for frequent application. In the present study different concentrations of Cranberry and proanthocyanidin were tested as gels with single application before an erosive challenge of 5 days. In gastro-esophageal reflux patients, the pH drops below 5.5 for 4.3 minutes during 24 hours.²⁵ Thus an erosive time of about 4 minutes with HCl (pH 3.0) might simulate one day of erosion on a clinical situation. When extrapolating this simulation to the present cycling protocol, even knowing that cola drink (pH 2.4) is an extrinsic acid, the dentin was subjected to erosion for 75 minutes (3 x 5 min x 5 days), which might simulate 18 or more *in vivo* days. All the tested gels were able to minimize dentin wear during the studied period. However, on future studies it is important to evaluate how long the gels protective effect lasts, for predicting the time need for professional reapplication.

The gels containing progressive concentrations of Cranberry and proanthocyanidin did not show a dose-response effect. The Cranberry gel with the lowest (0.05%) and the proanthocyanidin gel with the highest concentration (10%) promoted statistically less dentin wear compared to the other studied concentrations. Independently of concentration, the results reported here indicate that the use of Cranberry and proanthocyanidin, that are known for their ability to inhibit catalytic activity of MMP 1 and 9 in periodontal disease for instance¹⁵, was effective in the reduction of dentin erosion. This effect might be due to the preservation of the demineralised organic matrix itself.²⁶ In addition, none of the studied gels were able to prevent dentin wear occurrence, suggesting that they do not present action on the de- and remineralization process.²⁶

Fluoride gel was not used as control because fluoride can promote the formation of a CaF_2 – like layer or an acid-resistant coating of metal-rich surface²⁷ and in the study reported here, the focus was on assessing compounds only with the ability to inhibit collagenolytic enzymes. There is some evidence⁹⁻¹² that the gel containing 1.23% NaF can reduce demineralized organic matrix degradation, although Ganss et al.²⁸ found that the matrix *per se* does not influence the mode of action of the active ingredients in fluoridated toothpastes. Taking these aspects into account, chlorhexidine was used as positive control, since there are studies showing indirect and direct inhibition of MMP by prevention of erosive dentin loss and inhibition of dentin matrix degradation, respectively.^{9,10} The effect on dentin

wear reduction of 0.05% Cranberry and 10% Proanthocyanidin was around 35%, which was similar to 0.012% Chlorhexidine. Rinses with Chlorhexidine also reduced dentin wear around 30-40%.²³ Before Cranberry and proanthocyanidin can be considered for dentin erosion treatment, further research is necessary to address their ability to inhibit demineralized organic matrix degradation using molecular studies.

5 CONCLUSION

Results showed significant efficacy of Cranberry and Proanthocyanidin gels in preventing wear of dentin subjected to dental erosion *in vitro*, suggesting possible MMPs inhibitory effect during dentin erosion.

REFERENCES

1. Ganss C, Lussi A, Schlueter N. The histological features and physical properties of eroded dental hard tissues. *Monographs in oral science*. 2014;25:99-107.
2. Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Advances in dental research*. 2012;24(2):72-6.
3. Buzalaf MA, Pessan JP, Honorio HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monographs in oral science*. 2011;22:97-114.
4. Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, Gonzalez-Cabezas C, Zero DT. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries research*. 2005;39(2):134-8.
5. Ganss C, Klimek J, Starck C. Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Archives of oral biology*. 2004;49(11):931-5.
6. Schlueter N, Hardt M, Klimek J, Ganss C. Influence of the digestive enzymes trypsin and pepsin *in vitro* on the progression of erosion in dentine. *Archives of oral biology*. 2010;55(4):294-9.
7. 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. *Journal of dental research*. 1998;77(8):1622-9.
8. Vidal CM, Tjaderhane L, Scaffa PM, Tersariol IL, Pashley D, Nader HB, et al. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. *Journal of dental research*. 2014;93(3):269-74.
9. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion *in situ*. *Journal of dental research*. 2010;89(5):468-72.
10. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhaes AC, Pereira JC, et al. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *Journal of dental research*. 2012;91(12):1119-23.
11. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Oliveira RC, Pereira JC, Tjaderhane L, et al. Effect of iron on matrix metalloproteinase inhibition and on the prevention of dentine erosion. *Caries research*. 2010;44(3):309-16.
12. Kato MT, Magalhaes AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2009;17(6):560-4.
13. Déziel BA, Patel K, Neto C, Gottschall-Pass K, Hurta RA. Proanthocyanidins from the American Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) inhibit matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in human prostate cancer cells via alterations in multiple cellular signalling pathways. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;111(3):742-54.
14. Kondo M, MacKinnon SL, Craft CC, Matchett MD, Hurta RA, Neto CC. Ursolic acid and its esters: occurrence in cranberries and other *Vaccinium* fruit and effects on matrix metalloproteinase activity in DU145 prostate tumor cells. *Journal of the science of food and agriculture*. 2011;91(5):789-96.

15. La VD, Howell AB, Grenier D. Cranberry proanthocyanidins inhibit MMP production and activity. *Journal of dental research*. 2009;88(7):627-32.
16. Ruel G, Pomerleau S, Couture P, Lemieux S, Lamarche B, Couillard C. Plasma matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels are reduced following low-calorie Cranberry juice supplementation in men. *Journal of the American College of Nutrition*. 2009;28(6):694-701.
17. Liu RR, Fang M, Zhang L, Tang CF, Dou Q, Chen JH. Anti-proteolytic capacity and bonding durability of proanthocyanidin-biomodified demineralized dentin matrix. *International journal of oral science*. 2014;6(3):168-74.
18. Nagpal R, Manuja N, Pandit IK. Effect of proanthocyanidin treatment on the bonding effectiveness of adhesive restorations in pulp chamber. *The Journal of clinical pediatric dentistry*. 2013;38(1):49-53.
19. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Karol S, Pereira PN. Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2011;4(7):1343-50.
20. Castellan CS, Pereira PN, Grande RH, Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2010;26(10):968-73.
21. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee K, Turco G, de Souza Costa CA, et al. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin. *Operative dentistry*. 2014;39(2):152-8.
22. Magalhaes AC, Rios D, Moino AL, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA. Effect of different concentrations of fluoride in dentifrices on dentin erosion subjected or not to abrasion *in situ/ex vivo*. *Caries research*. 2008;42(2):112-6.
23. Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion *in situ*. *Journal of dentistry*. 2009;37(12):994-8.
24. Attin T, Zirkel C, Hellwig E. Brushing abrasion of eroded dentin after application of sodium fluoride solutions. *Caries research*. 1998;32(5):344-50.
25. Bartlett DW, Evans DF, Anggiansah A, Smith BG. A study of the association between gastro-oesophageal reflux and palatal dental erosion. *British dental journal*. 1996;181(4):125-31.
26. Buzalaf MA, Magalhaes AC, Wiegand A. Alternatives to fluoride in the prevention and treatment of dental erosion. *Monographs in oral science*. 2014;25:244-52.
27. Huysmans MC, Young A, Ganss C. The role of fluoride in erosion therapy. *Monographs in oral science*. 2014;25:230-43.
28. Ganss C, Klimek J, Schlueter N. Erosion/abrasion-preventing potential of NaF and F/Sn/chitosan toothpastes in dentine and impact of the organic matrix. *Caries research*. 2014;48(2):163-9.