**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

ISABELLA RODRIGUES ZIOTTI

**Viabilidade do uso de soluções de extratos naturais no tratamento
restaurador da dentina**

**Ribeirão Preto
2015**

ISABELLA RODRIGUES ZIOTTI

**Viabilidade do uso de soluções de extratos naturais no tratamento
restaurador da dentina**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências*

Programa: Odontologia Restauradora

*Área de concentração: Odontologia Restauradora (Opção:
Dentística)*

Orientadora: Profa. Dra. Aline Evangelista de Souza Gabriel

Ribeirão Preto

2015

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

Assinatura do autor: _____

Data: ____/____/ 2015.

Ficha Catalográfica

Ziotti, Isabella Rodrigues

Viabilidade do uso de soluções de extratos naturais no tratamento restaurador da dentina. Ribeirão Preto, 2015.

90 p.: il.; 30 cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP). Área de concentração: Odontologia Restauradora - Dentística.

Orientador: Profa. Dra. Aline Evangelista de Souza Gabriel

1. Adesividade. 2. Dentina. 3. Extratos vegetais. 4. Microscopia eletrônica de varredura.

ZIOTTI, I. R. Viabilidade do uso de soluções de extratos naturais no tratamento restaurador da dentina. 2015. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Dentística da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com auxílio de pesquisa da CAPES.

***D**edicatória*

Aos meus pais, **Sidnei Ziotti e Adriana Dandaro Rodrigues**, por terem me criado com princípios morais, me proporcionarem as oportunidades educacionais ao longo da minha caminhada e por nunca medirem esforços para realizar meus sonhos. São exemplos de honestidade e trabalho. Obrigada pelo amor e carinho em todos os momentos da minha vida. Amo vocês.

Aos meus irmãos, **Sidnei Ziotti Junior, Fernanda Rodrigues Ziotti e Henrique Frateschi de Andrade**, meus melhores amigos, com quem sei que sempre posso contar. Exemplos de caráter e perseverança. Obrigada por tudo. Amo vocês.

Agradecimentos

À **Deus**, por todos os momentos de felicidade e aprendizado concedidos em minha passagem por esse mundo. Eu não teria chegado até aqui sem a ajuda de alguns anjos que Ele me enviou.

À **Profa. Dra. Aline Evangelista Souza Gabriel**, minha orientadora, por exercer papel fundamental na minha formação. Agradeço a confiança a mim depositada, toda dedicação, carinho, ensinamentos transmitidos e por incentivar-me a apoiar-me em todos os momentos.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Manoel D. Sousa Neto**.

Ao Chefe do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Prof. Dr. Marcelo Oliveira Mazzetto**.

À Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da **Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto**.

À **Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb**, exemplo de profissional. Agradeço pelo apoio, pela imensurável contribuição em minha formação acadêmica desde a graduação, pelo carinho e conselhos em todos os momentos que precisei.

À **Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona**, muito obrigada por todo o conhecimento transmitido ao longo desses anos, sempre com um sorriso no rosto e uma palavra amiga. Pessoa doce e inspiradora.

À **Profa. Dra. Ana Paula Ramos**, docente do Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade em ajudar e pelo empréstimo de equipamentos, e ao seu aluno de iniciação científica, **Lucas Fabricio Bahia Nogueira**, por toda a ajuda na realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Galo**, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, pela disponibilidade em ajudar durante a realização deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório, **Dra. Débora Fernandes Costa Guedes, Dra Juliana Jendiroba Faraoni Romano, Patrícia Marchi**, pela ajuda e disponibilidade para a execução deste trabalho.

Ao secretário, **Carlos Feitosa dos Santos**, pela paciência e carinho que dedica a todos os alunos, sempre prestativo, atencioso e sorridente. Obrigada pela ajuda e amizade durante todo o curso.

Aos funcionários, **Luiza Pitol, Rosângela Angelini e Reginaldo Santana da Silva**, pelo carinho e sorrisos todas as manhãs.

Às secretárias do Departamento de Odontologia Restauradora, **Maria Amália de Melo Ribeiro e Maria Izabel Cezário F. Miguel**, por toda a atenção e auxílio.

Às funcionárias do Serviço de Pós-graduação **Isabel Cristina Sola, Regiane Moi Sacilotto e Mary Possani Carmessano**, pela atenção e disponibilidade em ajudar.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelas disciplinas ministradas e todos os conhecimentos transmitidos.

Aos queridos, **Rafaella Mariana F. de Bragança, Isabela Lima de Mendonça, Mirian Saavedra Lopes, Reinaldo Dias Neto, Odinê Rego Bechara, Mario Torigoe, Keila de Almeida Franceschini e Fabiana Curylofo** pela amizade, palavras de incentivo, ajuda e por me aguentarem sempre que eu estava de mal humor. Sem vocês tenho certeza que não conseguiria.

Aos amigos da pós-graduação, com os quais dividi divertidos e agradáveis momentos, pela amizade construída, pelas risadas nos momentos de descontração no laboratório e por fazerem parte da minha vida.

Ao meu padrasto, **Antônio Francisco B. Bernardes**, pelo carinho, paciência, incentivo e por sempre me tratar como filha. Obrigada por tudo!

À minha madrastra, **Estela Regina Frateschi**, pelo compreensão, carinho e confiança em mim depositada em minha vida profissional.

À minha cunhada, **Ana Paula Cassiano Silveira Ziotti**, pelo carinho e incentivo em todos os momentos.

Aos meus verdadeiros amigos, pelo amor, carinho, paciência e compreensão, mesmo nos momentos de ausência desta etapa de formação acadêmica.

À **CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pela bolsa concedida para o meu desenvolvimento e desse projeto.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

*R*esumo

ZIOTTI, I. R. Viabilidade do uso de soluções de extratos naturais no tratamento restaurador da dentina – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Este estudo teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a viabilidade do uso de soluções de extratos naturais no tratamento restaurador da dentina, por meio do ensaio de resistência à microtração e análise qualitativa da superfície dentinária e interface adesiva em microscopia eletrônica de varredura (MEV). A amostra foi composta de 90 fragmentos de dentina bovina. Os fragmentos foram planificados, polidos e condicionados com ácido fosfórico 37% e, em seguida, divididos de acordo com o tratamento da dentina em 5 níveis: GI – Sem tratamento (controle), GII – Solução de extrato de *Camellia sinensis* (chá verde), GIII – Solução de extrato de *Punica granatum* (romã), GIV – Solução de extrato de *Vitis vinifera* (semente de uva), GV – Solução de extrato de *Lycium barbarum* (goji berry). Os espécimes que foram utilizados na análise da resistência de união e interface adesiva tiveram as superfícies restauradas com adesivo (Adper Single Bond 2 - 3M) e resina composta (Filtek Z250 - 3M). Os 60 fragmentos utilizados para o teste de microtração (6 mm x 6 mm x 6 mm) foram seccionados em palitos de aproximadamente 1 mm², obtendo-se 4 palitos por dente (n=12). Após o teste, o padrão de falhas foi analisado em microscopia de varredura confocal a laser (MVCL). Para análise da interface adesiva, 15 fragmentos (6 mm x 3 mm x 3 mm) foram tratados com as soluções (n=3), restaurados e preparados para MEV. Os 15 fragmentos (3 mm x 3 mm x 3 mm) destinados à análise da superfície foram tratados com as soluções (n=3) e preparados para MEV. Os dados do teste de microtração (MPa) foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey (p=0,05). Os maiores valores médios de resistência adesiva (p < 0,05) foram obtidos nos grupos controle (sem tratamento, GI – 25,69 ± 6,32), extrato de *Camellia sinensis* (chá verde, GII - 28,14 ± 7,66) e extrato de *Vitis vinifera* (semente de uva, GIV - 25,55 ± 4,00), sendo estes iguais entre si (p > 0,05). Os fragmentos tratados com o extrato de *Punica granatum* apresentaram os menores valores médios (p < 0,05) de resistência adesiva (Romã, GIII – 17,42 ± 4,82). Os fragmentos que receberam o extrato de *Lycium barbarum* apresentaram valores intermediários (Goji Berry, GV - 23,44 ± 6,78), ora similares aos dos grupos com maiores médias, ora iguais ao grupo de menor média de resistência adesiva (p > 0,05). Falhas adesivas foram predominantes nos grupos experimentais. Na análise em MEV da superfície dentinária, verificou-se superfície regular, sem camada de *smear* e com abertura dos túbulos dentinários em todos os grupos analisados. Na análise da interface adesiva, houve boa hibridização da embocadura dos canais, e presença de *tags* resinosos na maioria dos túbulos dentinários, sugerindo formação de camada híbrida. As soluções de *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera* e *Lycium barbarum* não interferiram negativamente na resistência de união quando comparados ao grupo controle, sem tratamento.

Palavras-chave: adesividade, dentina, extratos vegetais, microscopia eletrônica de varredura.

*A*bstract

Ziotti, IR. **Viability of using natural extracts solutions in dentin restorative treatment** - Ribeirão Preto Dental School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

This study aimed to evaluate, *in vitro*, the viability of using natural extracts solutions in dentin restorative treatment, by microtensile bond strength test and qualitative analysis of dentin morphology surface and adhesive interface under scanning electron microscopy (SEM). Sample was composed of 90 fragments of intracoronary bovine dentin. The fragments were flattened, etched with 37% phosphoric acid and then were divided according to the dentin treatments: GI - Untreated (control), GII - *Camellia sinensis* extract solution (green tea), GIII - *Punica granatum* extract solution (pomegranate), GIV - *Vitis vinifera* extract solution (grape seed), GV - *Lycium barbarum* extract solution (goji berry). Specimens that were used on the bond strength test and adhesive interface analysis were restored with adhesive (Single Bond 2 - 3M) and composite resin (Filtek Z250 - 3M). The 60 fragments used to microtensile test (MPa) (6mm x 6mm x 6mm) were sectioned at approximately 1mm² sticks, 4 destined to the bonding interface analysis (n=12). After the test, the failure pattern was analyzed in confocal laser scanning microscopy (CLSM). For adhesive interface analysis, 15 pieces (6mm x 3mm x 3mm) were treated with solutions, restored and prepared for SEM (n=3). The 15 fragments (3mm x 3mm x 3mm) destined for surface analysis were treated with solutions and prepared for SEM (n=3). The microtensile test (MPa) data were submitted to ANOVA and Tukey test (p=0.05). The highest values of bond strength (p<0.05) were obtained in the control groups (untreated, GI - 25.69 ± 6.32), *Camellia sinensis* extract (green tea, GII - 28.14 ± 7.66) and *Vitis vinifera* extract (grape seed, GIV - 25.55 ± 4.00), which are equal to each other (p>0.05). The fragments treated with *Punica granatum* extract (Pomegranate, GIII - 17.42 ± 4.82) showed lowest values of bond strength (p <0.05). Fragments treated with *Lycium barbarum* extract showed intermediate values (Goji Berry, GV - 23.44 ± 6.78), similar to those of groups with higher values and to the lower values group of bond strength (p>0.05). Adhesive failures were predominant in all groups. The SEM analysis of the dentin surface demonstrated that there was a regular surface, without smear layer and open dentinal tubules in all groups analyzed. The adhesive interface analysis, showed that there was good hybridization of the entrance of dentinal tubules, and presence of resin tags in most dentinal tubules, suggesting formation of hybrid layer. The extracts solutions of *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera* and *Lycium barbarum* did not interfere negatively on the bond strength when compared to the control group without treatment.

Keywords: adhesion, dentin, plant extracts, scanning electron microscopy.

Sumário

SUMÁRIO

Introdução.....	01
Proposição.....	07
Materiais e Métodos.....	11
Resultados.....	27
Discussão.....	35
Conclusões.....	45
Referências.....	49

***I**ntrodução*

Introdução

Medicamentos à base de plantas têm sido utilizados para o tratamento de diversas doenças (OLIVEIRA et al., 2013; LI et al., 2014). Na Odontologia, o uso de extratos naturais está sendo estudado em diferentes áreas, como soluções irrigantes para desinfecção dos canais radiculares (GHONMODE et al., 2013), agente inibidor de bactérias cariogênicas e de doenças periodontais (SAKANADA; HOKADA, 2004; HIASAWA et al., 2006; SUYAMA et al., 2011; JAZAERI et al., 2015), para redução da abrasão e erosão dental (MAGALHÃES et al., 2009) antimicrobianos contra patógenos orais (ABDOLLAHZEDEH et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013), meio de armazenamento para dentes avulsionados (TAVASSOLI-HOJJATI et al., 2014; BHARATH et al., 2015), agente antifúngico utilizado em próteses (ANTUNES et al., 2014) e como agente oxidante após clareamento dental (KHAMVERDI et al., 2013).

Os extratos naturais têm sido empregados na Odontologia Restauradora visando melhorar a estabilidade do colágeno e inibir a ativação das metaloproteinases (MMPs) (KATO et al., 2012; HIRAISHI et al., 2013; VIDAL et al., 2014), enzimas proteolíticas que atuam na biodegradação da matriz orgânica da dentina (DU et al., 2012; HIRAISHI et al., 2013; ZHENG et al., 2015). Previamente ao procedimento restaurador, o condicionamento com ácido fosfórico expõe as fibrilas da matriz de colágeno, que são infiltradas com monômeros resinosos (TEZVERGIL-MUTLUAY et al., 2013), em seus espaços interfibrilares, formando a camada híbrida (CASTELLAN et al., 2013; TEZVERGIL-MUTLUAY et al., 2013), responsável pela retenção

micromecânica do material resinoso ao substrato (CASTELLAN et al., 2013; SCHEFFEL et al., 2014).

A impregnação insuficiente de adesivo na matriz colágena da dentina pode causar exposição e desorganização das fibras de colágeno (CASTELLAN et al., 2013). Além disso, acelera a degradação do colágeno e reduz a capacidade de adesão do material restaurador à dentina (SANTOS et al., 2011; LIU, R. R. et al., 2014). Falhas na penetração dos adesivos dentais podem acelerar a ação das MMPs endógenas da matriz dentinária, degradando as fibras de colágeno da dentina, e por consequência, causa fragilização da interface resina/dentina (DU et al., 2012; LIU, R. R. et al., 2014).

O colágeno tipo I corresponde a 90% da matriz orgânica dentinária, enquanto os outros 10% correspondem à proteínas não colágenas, como fosfoproteínas e proteoglicanos (BEDRAN-RUSSO et al., 2006; CASTELLAN et al., 2010). Estudos têm proposto o pré-tratamento da dentina com soluções a fim de induzir a formação de ligações cruzadas nas fibras colágenas, para melhorar a estabilidade da matriz (CASTELLAN, et al., 2010 FANG et al., 2012; CASTELLAN et al., 2013).

Dentre as soluções utilizadas para o pré-tratamento da dentina, destacam-se aquelas compostas por extratos naturais. O chá verde é extraído da planta *Camellia sinensis* (KHAMVERDI et al., 2013). Seus compostos são antioxidantes, pois têm a capacidade de destruir os radicais livres (KHAMVERDI et al., 2013) e possui atividade inibitória contra MMPs (DU et al., 2012; SANTIAGO et al., 2013). A epigallocatequina-3-galato (EGCG) é a catequina mais ativa e abundante no chá verde (DU et al., 2012; SANTIAGO et al., 2013) e tem sido utilizada na Odontologia para a prevenção de cárie (NAROTZKI et al., 2012), diminuição da perda de dentina em processos erosivos e

abrasivos (MAGALHÃES et al., 2009), redução de halitose (NAROTZKI et al., 2012) e na redução de biofilme causador de doenças periodontais (ASAHI et al., 2014).

A romã (*Punica granatum*) é nativa da região norte da Índia, cultivada também em partes do sudoeste da América, Califórnia, México, Arizona e África (ABDOLLAHZADEH et al., 2010). Possui ação antibactericida, antifúngica e antiviral (ABDOLLAHZADEH et al., 2010; BAKKIYARAJ et al., 2013). Está sendo estudada no tratamento de hemorragias, patologias respiratórias e hipertensão arterial (TAVASSOLI-HOJJATI et al., 2014). Em Odontologia, o extrato da *Punica granatum* tem demonstrado possuir propriedades antibacterianas (BHADBHADE et al., 2011; BAKKIYARAJ et al., 2013) e antifúngicas (BAKKIYARAJ et al., 2013), porém, seu efeito como agente modificador da matriz colágena dentinária ainda é desconhecido.

O extrato de semente de uva é derivado das sementes de *Vitis vinifera* (PERUMALLA; RETTIARACHCHY, 2011), e consiste principalmente em proantocianidinas (PERUMALLA; RETTIARACHCHY, 2011; LIU, Y. et al., 2014) que interagem com proteínas ricas em prolina, como o colágeno (HIRAISHI et al., 2013), aumentando a resistência à biodegradação da matriz dentinária por enzimas colagenolíticas (EPASINGHE et al., 2014). O extrato de semente de uva possui propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatórias e anticancerígenas (ZHAO et al., 2014). Na dentina, diminui as taxas de biodegradação (BREDAN-RUSSO et al., 2011; LIU, Y. et al., 2014), melhora as propriedades mecânicas da matriz orgânica (BREDAN-RUSSO et al., 2011; SANTOS et al., 2011) e possui capacidade de induzir ligações cruzadas na matriz colágena (LIU; WANG, 2013; LIU, R. R. et al., 2014).

O Goji Berry (*Lycium barbarum*) é encontrado principalmente na região sudoeste e central da Ásia e Mediterrâneo, mas também é cultivada na América do Norte e Austrália (POTTERAT, 2010). O Goji Berry está sendo avaliado em diversas áreas devido às suas propriedades nutritivas (CARNÉS et al., 2013; MOCAN et al., 2014), antioxidantes (SONG et al., 2011; MOCAN et al., 2014), anti-cancerígenas (LI et al., 2014), hipoglicêmicas (MOCAN et al., 2014), antiinflamatórias (SONG et al., 2011; WU et al., 2012) e no tratamento de glaucoma (SONG et al., 2011). Entretanto, ainda não há estudos com esse extrato natural em Odontologia.

Considerando que os componentes bioativos das soluções de extratos naturais podem modificar o colágeno da matriz dentinária, reumidificar a superfície desmineralizada pelo ácido fosfórico, além de proteger as fibras expostas, torna-se relevante avaliar a capacidade adesiva do material restaurador à dentina e a morfologia da interface previamente tratadas com tais soluções.

***P**roposição*

Proposição

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o uso de soluções de extratos naturais (extrato de *Camellia sinensis*, extrato de *Punica granatum*, extrato de *Vitis vinifera* e extrato de *Lycium barbarum*), durante o tratamento restaurador da dentina. Para tanto, o trabalho será dividido em objetivos específicos, no quais serão analisadas a:

- 1) Resistência de união da interface adesiva por meio de teste de microtração (MPa), seguida da análise do padrão de fratura em microscopia de varredura confocal a laser.
- 2) Morfologia da superfície dentinária e da interface adesiva após o tratamento com as soluções propostas, em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Materiais e Métodos

Materiais e Metodos

Delineamento experimental

O estudo foi realizado de modo casualizado e a amostra foi composta de 90 fragmentos de dentina intracoronária bovina, sendo 60 fragmentos utilizados na análise da resistência adesiva ($n=12$), 15 fragmentos utilizados na análise da superfície dentinária ($n=3$) e 15 fragmentos na análise da interface adesiva ($n=3$).

O fator de variação foi o *tratamento da superfície dentinária* com soluções de extratos naturais em 5 níveis: sem tratamento (controle), extrato de *Camellia sinensis* (chá verde), extrato de *Punica granatum* (romã), extrato de *Vitis vinifera* (semente de uva) e extrato de *Lycium barbarum* (goji berry).

As variáveis de respostas foram: 1) análise da resistência de união da interface adesiva por meio de teste de microtração (Mpa), seguida da avaliação do padrão de fratura; 2) análise qualitativa da morfologia da superfície dentinária e da interface adesiva por meio de MEV.

O desenho esquemático do delineamento experimental deste estudo está representado na Figura 1.

Figura 1 – Desenho esquemático do delineamento experimental.

Seleção da amostra

Foram selecionados 72 incisivos bovinos, examinados macroscopicamente por meio de lupa estereoscópica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) com aumento de 20x, que não apresentassem fissuras profundas ou fraturas na coroa. Os incisivos foram conservados em solução de timol 0,1% a 9°C e lavados em água corrente por 24 horas para completa eliminação do mesmo.

Preparo da amostra

Os dentes foram fixos com cera para fundição em placa de acrílico e seccionados transversalmente na junção amelocementária para separar as coroas das raízes, utilizando disco diamantado dupla face (Isomet 1000; Buehler, Alemanha)

sob refrigeração, montado em máquina de corte (Isomet 1000; Buehler, Alemanha) (Figura 1).

Seccionou-se as faces vestibulares das coroas de forma a obter fragmentos de 6 mm de altura x 6 mm de largura x 3 mm de espessura (Figura 2). Os fragmentos tiveram as superfícies dentinárias planificadas em politriz refrigerada (Arotec, Cotia, SP, Brasil) com lixa de carvão de silício de granulação 600, durante 15 segundos, para padronizar a camada de *smear* (Figura 3).

Os 8 fragmentos dentinários utilizados nos testes de análise da interface adesiva, por meio de MEV, foram seccionados ao meio, de forma a obter 16 fragmentos de 6 mm de altura x 3 mm de largura x 3 mm de espessura, enquanto que para a análise da superfície dentinária, 4 fragmentos foram seccionados de forma a obter-se 16 fragmentos de cada, com 3 mm de altura x 3 mm de largura x 3 mm de espessura, dos quais 15 foram utilizados e 1 descartado.

Figura 1 – Incisivos bovinos: **(a)** e **(b)** Incisivos selecionados; **(c)** Incisivo fixado à placa de acrílico com cera para fundição para posterior secção dos espécimes.

Figura 2 – Secção dos espécimes: **(a)** Incisivo bovino posicionado em máquina de corte; **(b)** Espécimes seccionados, sem planificação e polimento.

Figura 3 – Planificação e polimento: **(a)** Espécime sendo polido; **(b)** Espécimes planificados e polidos.

Preparo das soluções

As soluções foram aviadas no Laboratório de Pesquisas em Dentística do Departamento de Odontologia Restauradora da FORP-USP, no momento do uso.

O extrato aquoso de *Camellia sinensis* foi preparado utilizando-se pó do extrato de chá verde (Aurea Pharma, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e água destilada (MAGALHÃES et al., 2009; KATO et al., 2009). O extrato de *Punica granatum* foi preparado utilizando-se pó do extrato de Romã (Aurea Pharma, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e água destilada (WANG et al., 2013). O extrato de *Vitis vinifera* foi preparado

utilizando-se pó do extrato de semente de uva (Aurea Pharma, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e água destilada (LIU; WANG, 2013). O extrato de *Lycium barbarum* foi preparado utilizando-se pó do extrato de goji berry (Aurea Pharma, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e água destilada (WU et al., 2012).

Todas as soluções foram preparadas na concentração de 0,5%, padronizadas em estudo piloto. Os extratos foram pesados em balança analítica, adicionou-se água destilada e as soluções permaneceram em agitador por 15 minutos, seguida de ultrassom por 15 minutos e após, agitação novamente por 15 minutos. Após o preparo, as soluções foram levadas ao Laboratório de Físico-química de Superfícies e Colóides, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, para serem submetidas a centrifugação (Mini Hight Speed Centrifuge, Topscien Instrument, Ningbo, China), por 2 minutos, a velocidade de 11 rpm e posterior separação do líquido do precipitado.

Para avaliar se houve dissolução dos extratos, os mesmos foram preparados e mantidos em repouso por 24 horas. Observou-se que os extratos de *Camellia sinensis* e de *Vitis vinifera* se solubilizaram totalmente e não houve precipitado, o que não ocorreu com os extratos de *Punica granatum* e *Lycium barbarum*, e por isso, soluções, permaneceram em estufa a 60°C por 24 horas, para completa evaporação do solvente e posterior pesagem do precipitado (Figura 4).

Figura 4 – Pesagem do precipitado: **(a)** Solução pronta; **(b)** Após evaporação da água; **(c)** Pesagem da parte sólida.

Tratamento da superfície

Realizou-se a aplicação de ácido fosfórico a 37% (Condac 37, FGM, São Paulo, Brasil) por 15 segundos na superfície de todos os fragmentos, seguida de lavagem com água destilada por 30 segundos e secagem com papel absorvente. Em seguida, os espécimes foram divididos aleatoriamente em 5 grupos e receberam tratamento da superfície dentinária com as seguintes soluções experimentais: GI – sem tratamento (controle), GII – solução de extrato de *Camellia sinensis* (chá verde), GIII – solução de extrato de *Punica granatum* (romã), GIV – solução de extrato de *Vitis vinifera* (semente de uva), GV – solução de extrato de *Lycium barbarum* (goji berry). Foi aplicado 1 mL de cada solução na superfície dental com micropipeta e permaneceu em contato com a dentina por 1 minuto. Em seguida, o excesso das soluções foi removido com auxílio de cânula de sucção e os fragmentos foram secos com papel absorvente.

MEV da superfície dentinária

Após o tratamento da dentina com as soluções propostas, os fragmentos destinados à MEV da superfície dentinária foram imersos em glutaraldeído a 2,5% tamponado com cacodilato de sódio a 0,1M com pH 7,4 à temperatura de 4°C por 12 horas, seguido de lavagem em água destilada por 3 minutos e imersão em água destilada por 1 hora, com trocas a cada 20 minutos. Em seguida, os espécimes sofreram desidratação em etanol de 25°, 50°, 75°, 95° GL, mediante imersão por 20 minutos em cada solução, posterior imersão por 1 h em etanol 100° GL, e por fim, foram imersos em HMDS por 10 minutos, a fim de obter-se secagem química dos fragmentos. Finalizada a desidratação, foram fixos em *stubs* metálicos e cobertos com fina camada da liga ouro-paladium em aparelho de metalização a vácuo (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). A varredura de toda a superfície do espécime foi realizada e posteriormente, foi fotografada, em diferentes aumentos, a área mais representativa de cada grupo.

Procedimento restaurador

Posteriormente ao tratamento das superfícies, nos fragmentos que foram submetidos ao teste de microtração e à MEV da interface adesiva, aplicou-se, de acordo com as normas do fabricante, duas camadas do adesivo (Adper Single Bond 2, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) de forma ativa com posterior evaporação do solvente e fotopolimerização por 20 segundos. Utilizou-se a resina composta Filtek Z250 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) (Figura 5), incluída em incrementos de 1 mm cada, com

auxílio de espátula n. 1 (Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) polimerizada mediante aplicação de luz LED (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 20 segundos em cada incremento, mantendo-se o aparelho à distância de 10 cm da superfície da resina, com auxílio de um dispositivo pré-fabricado, formando um bloco de resina com dimensões de 6 mm de altura x 6 mm de largura x 3 mm de espessura (Figura 6). Após o procedimento restaurador, os espécimes foram armazenados em água destilada a 37°C por 24 horas.

Figura 5 - Materiais utilizados durante o procedimento restaurador: **(A)** Resina composta Filtek Z250 XT (3M ESPE); **(B)** Ácido fosfórico à 37% Condac 37 (FGM); **(C)** Adesivo Adper Single Bond 2 (3M ESPE).

Figura 6 – Procedimento restaurador: **(a)** Espécime inicial; **(b)** Aplicação de ácido fosfórico a 37%; **(c)** Lavagem do ácido fosfórico; **(d)** Aplicação do adesivo; **(e)** Acomodação da resina composta no espécime.

Secção dos espécimes para o teste de microtração

Os 60 espécimes restaurados para o teste de microtração foram seccionados com irrigação constante em cortadeira de precisão (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) (Figura 7). Descartaram-se as extremidades da restauração e foram obtidos 4 palitos de $1,0 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ de área transversal, extraídos da porção central do espécime (PROFETA et al., 2012). A espessura do fragmento será confirmada com paquímetro digital (Mitutoyo, Toquio, Japão).

Figura 7 – Secção dos palitos para o teste de microtração: **(a)** Espécime restaurado posicionado em máquina de corte; **(b)** Primeiras secções em único sentido.

Teste de resistência adesiva à microtração

Os espécimes foram posicionados em suporte próprio e fixados entre as duas barras da máquina universal de ensaio (Instron Corporation, Canton, MA, EUA) por meio de um adesivo à base de cianocrilato (SuperBonder, Henkel Ltda., São Paulo, SP, Brasil), e submetidos a força de tração com velocidade de 0,5 mm/min, utilizando uma célula de carga de 50 kgf, até a falha (Figura 8). Os valores de resistência adesiva foram expressos em megapascal (MPa), fornecidos pelo programa por meio do cálculo das secções transversais dos palitos, medidas previamente ao teste.

As superfícies envolvidas na fratura de cada espécime foram analisadas em microscópio de varredura confocal a laser 3D (LEXT OLS4000®, Olympus Corporation, Japão) para classificação quanto ao padrão de fratura. Foram classificadas em adesiva, quando a superfície dentinária estivesse coberta por fina camada de material adesivo; coesiva do material, quando a superfície estivesse coberta por resina composta; coesiva do substrato, quando a falha ocorrer na dentina; e mista, nas situações em que houver a combinação dos tipos adesiva e coesiva, como demonstrado na figura 9.

Figura 8 – Teste de microtração: **(a)** Palito fixado ao dispositivo com adesivo à base de cianocrilato; **(b)** Palito fraturado após o teste; **(c)** Dispositivo posicionado na máquina de ensaio.

Figura 9 – Análise do padrão de falha: **(a)** Falha adesiva; **(b)** Falha do material restaurador; **(c)** Falha do substrato (dentina); **(e)** Falha mista.

MEV da interface adesiva

Dez espécimes restaurados com o mesmo material empregado no teste de microtração foram destinados à análise da interface adesiva, por meio de MEV. Cada espécime foi cortado ao meio, e as secções foram polidas com lixas de granulação 600 e 1.200 por 30 segundos cada, seguida de polimento com discos de feltro e alumina 0,3 µm e 0,05 µm, por 5 minutos cada. Após polimento, as secções receberam

ácido fosfórico a 37% (Condac 37, FGM, São Paulo, Brasil) por 20 segundos, seguido de lavagem pelo mesmo tempo e então, foram imersos em cuba ultrassônica por 10 minutos (sendo realizada a troca da água após 5 minutos) e imersas em glutaraldeído a 2,5% tamponado com cacodilato de sódio a 0,1M com pH 7,4 à temperatura de 4°C por 12 horas, seguido de lavagem em água destilada corrente por 3 minutos e imersão em água destilada por 1 hora, com trocas a cada 20 minutos. Em seguida, os espécimes sofreram desidratação em etanol de 25°, 50°, 75°, 95° GL, mediante imersão por 20 minutos em cada solução, posterior imersão por 1 h em etanol 100° GL, e por fim, foram imersos em HMDS por 10 minutos, a fim de obter-se secagem química dos fragmentos. Posteriormente, os corpos de prova, foram fixados em *stubs* metálicos, metalizados e analisados em microscópio eletrônico de varredura (EVO 50; Carl Zeiss, Cambridge, Inglaterra). A interface adesiva foi analisada de forma qualitativa e foram observadas a presença e uniformidade da camada híbrida, os *tags* e possíveis *gaps*, e as falhas de união da interface adesiva submetida aos diferentes pré-tratamentos da dentina.

Análise dos dados

Os dados obtidos após o ensaio de resistência adesiva à microtração foram submetidos à análise estatística por meio do *software Statistical Package for Social Science* para Windows (SPSS 19, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA), com o nível de significância de 5%.

Os dados apresentaram distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogênea (teste de Barlett) e foram então analisados por Análise de Variância a um critério e teste complementar de Tukey ($p < 0,05$).

A análise do tipo de falha após o teste de resistência adesiva foi realizada em microscopia de varredura confocal a laser e ilustrada em gráfico. Realizou-se também análise qualitativa das imagens obtidas em microscopia eletrônica de varredura da superfície e interface material restaurador/dentina.

*R*esultados

Resultados

1. Ensaio de resistência adesiva à microtração

Para este ensaio, foram obtidos quatro palitos por dente, e os valores médios de resistência adesiva à microtração foram calculados por elemento dental ($n = 12$).

Os dados apresentaram-se normais e homogêneos e foram analisados por Análise de Variância ($p < 0,05$) com um fator de variação: *soluções de extratos naturais*. Após a Análise de Variância, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0013$). Os valores médios e desvio-padrões da resistência adesiva dos grupos estudados estão dispostos na Tabela I e ilustrados na Figura 10.

Tabela I. Médias dos valores de resistência adesiva e desvio-padrões dos grupos estudados.

Grupos experimentais	Média e desvio padrão	Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)*
GI – controle, sem tratamento	25,69 $\pm$ 6,32	a
GII – extrato de <i>Camellia sinensis</i>	28,14 $\pm$ 7,66	a
GIII – extrato de <i>Punica granatum</i>	17,42 $\pm$ 4,82	b
GIV – extrato de <i>Vitis vinífera</i>	25,55 $\pm$ 4,00	a
GV – extrato de <i>Lycium barbarum</i>	23,44 $\pm$ 6,78	ab

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Realizado o teste complementar de Tukey, observou-se que os maiores valores médios de resistência adesiva ($p < 0,05$) foram obtidos nos grupos controle (sem tratamento, GI – $25,69 \pm 6,32$), extrato de *Camellia sinensis* (chá verde, GII - $28,14 \pm 7,66$) e extrato de *Vitis vinifera* (semente de uva, GIV - $25,55 \pm 4,00$), sendo estes iguais entre si ($p > 0,05$).

Os fragmentos de dentina tratados com o extrato de *Punica granatum* apresentaram os menores valores médios ($p < 0,05$) de resistência adesiva (Romã, GIII – $17,42 \pm 4,82$).

Os fragmentos que receberam o extrato de *Lycium barbarum* apresentaram valores intermediários (Goji Berry, GV - $23,44 \pm 6,78$), ora similares aos dos grupos com maiores médias, ora iguais ao grupo de menor média de resistência adesiva ($p > 0,05$).

Figura 10 - Representação gráfica dos valores médios e desvios-padrões obtidos no teste de resistência adesiva à microtração.

Os padrões de fratura foram analisados em microscopia de varredura confocal a laser (Figura 11) e classificados em: adesiva, coesiva da dentina, coesiva do material restaurador e mista.

Verificou-se predomínio de falhas adesivas em todos os grupos. O GV (extrato de *Lycium barbarum*) foi o grupo que apresentou maior quantidade de fraturas mistas.

Figura 11 – Representação gráfica dos valores percentuais do padrão de fratura nos diferentes grupos experimentais.

2. Análise qualitativa da morfologia da superfície dentinária tratada com as diferentes soluções

Após a aplicação das soluções de extratos naturais nas superfícies dentinárias tratadas previamente com ácido fosfórico 37%, verificou-se superfície regular, sem camada de *smear* e com abertura dos túbulos dentinários em todos os grupos analisados.

Observa-se nos grupos GIII (extrato de *Punica granatum*), GIV (extrato de *Vitis vinífera*) e GV (extrato de *Lycium barbarum*) maior desmineralização da dentina peritubular e maior abertura da embocadura dos túbulos dentinários e diminuição da dentina intertubular, representados nas figuras 12 e 13.

Figura 12 – Fotomicrografias (1000x) representativas da superfície dentinária de cada grupo experimental: (a) GI – grupo controle, tratamento apenas com ácido fosfórico 37%; (b) GII – ácido fosfórico 37% seguido da aplicação de extrato de *Camellia sinensis*; (c) GIII – ácido fosfórico 37% seguido de extrato de *Punica granatum*; (d) GIV – ácido fosfórico 37% seguido de extrato de *Vitis vinifera*; (e) GV – ácido fosfórico 37% seguido de extrato de *Lycium barbarum*.

Figura 13 – Fotomicrografias em maior aumento (2000x) representativas da superfície dentinária tratadas com ácido fosfórico seguido das soluções: (a) Extrato de *Camellia sinensis*; (b) Extrato de *Punica granatum*; (c) Extrato de *Vitis vinifera*; (d) GV – Extrato de *Lycium barbarum*. Notar a possível presença de grânulos residuais da solução de *Punica granatum* presentes no interior dos túbulos dentinários (setas).

Nota-se nas imagens do extrato de *Punica granatum* presença de grânulos no interior de alguns túbulos dentinários, possivelmente decorrente de resíduos da solução.

3. Análise qualitativa da morfologia da interface adesiva

A interface adesiva foi analisada por meio de MEV (Figura 14) e pode-se observar que nos grupos GI (controle, sem aplicação de solução), GII (extrato de *Camellia sinensis*), GIV (extrato de *Vitis vinifera*) e GV (extrato de *Lycium barbarum*) houve hibridização da embocadura dos canais, e presença de *tags* resinosos na maioria dos túbulos dentinários, sugerindo formação de camada híbrida.

No GIII (extrato de *Punica granatum*), sugere-se presença de grânulos no interior dos túbulos dentinários. No GV (extrato de *Lycium barbarum*) nota-se formação mais discreta e menos homogênea da camada híbrida, em comparação aos demais grupos.

Figura 14 – Imagens obtidas através de MEV, representativas da interface adesiva de cada grupo: (a) GI – grupo controle; (b) GII – grupo extrato de *Camellia sinensis*; (c) GIII – grupo extrato de *Punica granatum*; (d) GIV – grupo extrato de *Vitis vinifera*; (e) GV – grupo extrato de *Lycium barbarum*. R=Resina, A=Adesivo, CH=Camada híbrida, T=Tag, D=Dentina.

Em todos os grupos, podem-se observar túbulos dentinários parcialmente hibridizados e presença de tags resinosos.

***D**iscussão*

A literatura recente tem destacado as propriedades favoráveis ao uso de extratos naturais em Odontologia (CASTELLAN et al., 2010; ABDOLLAHZADEH et al., 2011; FANG et al., 2012; KHAMVERDI et al., 2013; CASTELLAN et al., 2013; LIU et al., 2014; BHARATH et al., 2015; JAZAERI et al., 2015; ZHENG et al., 2015). Essas soluções podem reidratar a dentina desmineralizada pelo ácido fosfórico, proteger as fibras colágenas e permitir a completa penetração dos monômeros resinosos do adesivo na matriz colágena e túbulos dentinários (DE MUNCK et al., 2005; BRESCHI et al., 2008; CARDOSO et al., 2011). No entanto, pouco se sabe sobre a viabilidade do uso dessas soluções para o aumento da capacidade adesiva do material restaurador ao substrato dental.

Assim, foi proposto a análise da força de adesão do material restaurador resinoso à dentina tratada com soluções de extratos naturais, por ensaio de microtração, e análise em MEV da superfície dentinária e interface adesiva.

Neste estudo, utilizou-se o teste de microtração, por possibilitar a mensuração da resistência adesiva em diferentes regiões do mesmo dente, além de permitir melhor distribuição das tensões e garantir resultados fidedignos (GIANNINI et al., 2004). Apesar da dificuldade técnica do preparo dos espécimes (PASHLEY et al., 1999), os estudos que utilizam a técnica de microtração estão aumentando nos últimos anos (NERI et al., 2011; FANG et al., 2012; SANTIAGO et al., 2013; LIU, R. R. et al., 2014). No entanto, é preciso ressaltar que devido às dimensões reduzidas do espécime utilizado no teste de microtração, a análise do padrão de falhas deve ser realizada em equipamento com alta resolução e aumento, como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) ou a microscopia de varredura confocal a laser (MVCL), sendo esta última a escolhida no presente estudo, tendo em vista a capacidade de gerar imagens tridimensionais.

A análise qualitativa da superfície dentinária e da interface adesiva foi realizada por meio de MEV, método pelo qual se consegue caracterizar a topografia da superfície dental tratada com diferentes substâncias, assim como a interface adesiva, por possuir alta resolução e contraste de densidade (PROFETA et al., 2012).

Outro aspecto da metodologia que merece destaque é o fato de ter sido utilizado o ácido fosfórico na dentina previamente à aplicação das soluções. Para que ocorra a formação da camada híbrida, é necessário a remoção da camada de *smear*, com consequente exposição dos túbulos dentinários e das fibrilas da matriz de colágeno por meio da aplicação do ácido na superfície da dentina (DE MUNCK et al., 2005; PERDIGÃO, 2007; BRESCHI et al., 2008). Posterior à desmineralização da dentina, é preciso que haja certa umidade no substrato para facilitar a impregnação dos túbulos e o encapsulamento das fibrilas de colágeno pelos monômeros do adesivo (PERDIGÃO, 2007), que após a polimerização, se tornam micromecanicamente entrelaçados nos espaços criados (DE MUNCK et al., 2005; BRESCHI et al., 2008; CARDOSO et al., 2011).

A substituição incompleta do conteúdo mineral pelos monômeros resinosos resulta em colágeno exposto e desprotegido, tornando-o mais susceptível à degradação ao longo do tempo (LIU et al., 2011; CARDOSO et al., 2011). Supõe-se que as soluções de extratos naturais possam reumidificar a superfície dentinária desmineralizada e aumentar a quantidade de ligações cruzadas da matriz colágena, a fim de evitar o colapso das fibras. Dessa forma, ocorreria aumento da força de adesão imediata e maior resistência à degradação da interface adesiva (BEDRAN-RUSSO et al., 2014; SABATINI; PASHLEY, 2014).

Os resultados deste estudo mostraram que a aplicação do extrato de *Camellia sinensis* e do extrato de *Vitis vinifera* na dentina condicionada promoveu resistência

de união do material restaurador semelhante à dentina que não recebeu solução (controle tratado apenas com ácido fosfórico), e estes não diferiram dos espécimes tratados com o extrato de *Lycium barbarum*.

Resultado similar ao presente estudo foi observado por Neri et al. (2011), no qual encontraram valores semelhantes de resistência adesiva imediata da dentina tratada com chá verde quando comparada ao controle sem tratamento. Já Santiago et al. (2013) verificaram resistência de união imediata (teste de microtração) do material restaurador à dentina inferior quando a dentina foi tratada com extrato de *camellia sinensis*.

O extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) é composto por cerca de 4.000 compostos bioativos, constituídos principalmente por polifenóis (SUMPIO et al., 2006; MAHMOOD et al., 2010) no qual encontram-se as catequinas e os flavonóides (SUMPIO et al., 2006), sendo a epigallocatequina (EGCG) a mais abundante (MAHMOOD et al., 2010; DU et al., 2012; KHAMVERDI et al., 2013). A EGCG atua na reumidificação do substrato dentinário (ZHENG et al., 2015) e apresenta efeito indutor de ligações cruzadas no colágeno dentinário (JACKSON et al., 2010; VIDAL et al., 2014), atribuída à síntese de hidroxiprolina e hidrolisina, com estabilização da tripla hélice da molécula, que por sua vez, proporciona maior resistência fibrilar da matriz (JACKSON et al., 2010).

Além dessas propriedades, estudos (KATO et al., 2012; VIDAL et al., 2014; ZHENG et al., 2015) tem demonstrado a capacidade da solução de chá verde inibir a ação das metaloproteinases, que são enzimas endógenas do substrato dental capazes de degradar a matriz de colágeno.

O extrato de semente de uva, derivado das sementes de *Vitis vinifera*, possui baixa toxicidade (MACEDO et al., 2009) e tem como constituinte principal as

proantocianidinas (MACEDO et al., 2009; PERUMALLA; RETTIARACHCHY, 2011), que são bioflavonóides (BEDRAN-RUSSO et al., 2006) também capazes de induzir ligações cruzadas na matriz colágena dentinária (MACEDO et al., 2009; LIU; WANG, 2013; LIU, R. R. et al., 2014).

O mecanismo de reticulação entre as proantocianidinas e colágeno ainda não é bem definido (CASTELAN et al., 2010), por isso, há 4 hipóteses de interações propostas: as ligações covalentes, ligações iônicas, ligações de hidrogênio e interações hidrófobas (BEDRAN-RUSSO et al., 2006; MACEDO et al., 2009). Acredita-se, portanto, que os bioflavonóides também sejam capazes de induzir a formação de ligações adicionais intra- e intermoleculares do colágeno (BEDRAN-RUSSO et al., 2006), e assim melhorar as propriedades mecânicas da dentina (BEDRAN-RUSSO et al., 2006; MACEDO et al., 2009; CASTELAN et al., 2010).

Pesquisas anteriores (MACEDO et al., 2009; CASTELLAN et al., 2010; SRINIVASULU et al., 2012; CASTELLAN et al., 2013) avaliaram a efetividade do extrato de semente de uva como agente modificador da matriz colágena dentinária na força de união e estabilidade da dentina e demonstraram que seu uso aumentou a resistência de união da resina composta à dentina. Uma possível explicação para a diferença encontrada entre os estudos anteriores e o presente estudo é o fato das concentrações serem diferentes. Nestes estudos foram utilizadas concentrações de 6,5% (MACEDO et al., 2009; CASTELLAN et al., 2010; SRINIVASULU et al., 2012; CASTELLAN et al., 2013) e de 5 a 15% (FANG et al., 2012) e utilizou-se, no presente estudo 0,5% para todas as soluções.

Optou-se por padronizar a concentração das soluções em 0,5% com base nos estudos prévios que também utilizaram concentrações reduzidas das soluções (BEDRAN-RUSSO et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2009; BERTRAN-RUSSO et al.,

2011; HIRAIISHI et al., 2013) e obtiveram resultados positivos com os extratos de chá verde e semente de uva. Além disso, foi realizado estudo piloto em microscopia eletrônica de varredura com diferentes concentrações (0,5%, 1% e 5%), a fim de selecionar aquela que deixasse menos resíduo granuloso do pó na solução e proporcionasse interface adesiva favorável.

Na análise da interface adesiva por MEV, tanto dos espécimes tratados com extrato de chá verde quanto nos de semente de uva, pode-se observar que houve formação de camada híbrida homogênea e presença de *tags* resinosos, semelhante à interface do grupo controle.

Os espécimes tratados com o extrato de *Punica granatum* (romã) apresentaram os menores valores de resistência adesiva, estatisticamente similares apenas aos tratados com o extrato de *Lycium barbarum* (goji berry).

A romã possui como constituintes os flavonóides polifenólicos, que possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antibacterianas (TAVASSOLI-HOJJATI et al., 2014; BAKKIYARAJ et al., 2013). Estudos em Odontologia sugerem a eficácia do tratamento com *Punica granatum* no controle de agentes patogênicos orais responsáveis pela cárie, (ABDOLLAHZEDEH et al., 2011, MEHTA et al., 2014), por doenças periodontais (ABDOLLAHZEDEH et al., 2011, BATISTA et al., 2014), como agente antimicrobiano e antifúngico (ABDOLLAHZEDEH et al., 2011, MANSOURIAN et al., 2014), como solução inibidora de formação de biofilme em fios ortodônticos (VAHID DASTJERDI et al., 2014) e como meio de armazenamento para dentes avulsionados (TAVASSOLI-HOJJATI et al., 2014). Não há trabalhos até o momento utilizando o extrato da *Punica granatum* em estudos de resistência adesiva e não se sabe ao certo se este composto promove efeito modificador da matriz colágena dentinária.

Os fragmentos dentais deste estudo tratados com o extrato de *Punica granatum* apresentaram indícios de resíduos granulosos no interior dos túbulos dentinários e na superfície, visto em microscopia eletrônica de varredura. Supõe-se que esses grânulos tenham influenciado negativamente os valores de resistência adesiva. Acredita-se que outros métodos de extração do componente bioativo, como a infusão da casca ou da folha da planta, possa eliminar a ocorrência de resíduos granulosos e, se a solução for realizada em maior concentração, pode ocorrer a potencialização dos efeitos.

Os espécimes que foram tratados com o extrato de *Lycium barbarum* (goji berry) apresentaram valores intermediários de resistência de união à microtração. Este extrato não reduziu a força de união quando comparado ao controle, e também foi estatisticamente semelhante aos extratos de *Camellia sinensis* e de *Vitis vinífera*.

A goji berry é constituída por polissacarídeos, carotenoides, flavonoides, vitaminas, em especial riboflavina, tiamina e ácido ascórbico, e aminoácidos livres, como a prolina (POTTERAT et al., 2010). Os componentes nela encontrados possuem várias atividades biológicas, como neuroproteção, imunomodulação, propriedades antioxidantes (MOCAN et al., 2014; SONG et al., 2011), atividade anticancerígena (MOCAN et al., 2014, WU et al., 2012), citoproteção, efeitos sobre o envelhecimento (MOCAN et al., 2014) e atividade antiinflamatória (SONG et al., 2011; WU et al., 2012). Até o momento, não há estudos publicados com o extrato de *Lycium barbarum* na Odontologia.

Pela análise em MEV deste estudo, sugere-se que o extrato de *Lycium barbarum* promoveu ligeira desmineralização da dentina peritubular, com consequente abertura da embocadura dos túbulos, quando comparados aos tratados

apenas com ácido fosfórico, possivelmente contribuindo para a formação de boa interface adesiva.

Na análise do padrão de falhas, em MVCL, observou-se predomínio de falhas adesivas nos grupos experimentais, porém o grupo tratado com extrato de *Lycium barbarum* (goji berry), foi o que apresentou maior quantidade de fraturas mistas (combinação dos tipos adesiva e coesiva) quando comparado aos outros grupos. A maior porcentagem de falhas mistas sugere melhor interface adesiva e consequente resistência de união (PERDIGÃO, 2007; FANG et al., 2012).

Apesar das soluções de extrato de *Camellia sinensis*, *Vitis vinífera* e *Lycium barbarum* não terem aumentado a resistência adesiva em relação ao controle, estas soluções não interferiram negativamente na resistência de união imediata do material restaurador à dentina. Por esse fato, aliado às inúmeras propriedades positivas acima supracitadas, não se deve descartar o potencial promissor dessas soluções como biomodificadoras da dentina.

Apesar das limitações de um estudo *in vitro*, essa pesquisa abre perspectivas para que novas sejam conduzidas a fim de avaliar outros protocolos de extração do princípio bioativo, diferentes concentrações da solução e modos de aplicação das soluções de extratos naturais na dentina. Essas novas propostas de protocolo adesivo tem potencial para melhorar durabilidade da interface a longo prazo e podem ser uma abordagem adjuvante de outras estratégias, tais como a remineralização do substrato dental.

*C*onclusões

Assim, com base na metodologia utilizada e nos resultados obtidos neste estudo, é lícito concluir que:

1. O uso das soluções de extratos naturais de *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera* e *Lycium barbarum* não interferiu negativamente na resistência de união da interface adesiva quando comparados ao controle (dentina tratada apenas com ácido fosfórico).
2. A solução de *Punica granatum* diminuiu a resistência de união do material restaurador à dentina quando comparada ao controle.
3. As soluções de extrato naturais não interferiram negativamente na morfologia da interface adesiva, pois proporcionaram formação de camada híbrida com *tags* resinosos. Os espécimes tratados com solução de *Punica granatum* exibiram indícios de grânulos residuais da solução na dentina.

Referências

ABDOLLAHZADEH, S.; MASHOUF, R.; MORTAZAVI, H.; MOGHADDAM, M.; ROOZBAHANI, N.; VAHEDI, M. Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. **Journal of Dentistry**. v. 8, n. 1, p. 1-6, 2011.

ANTUNES, D. P.; SALVIA, A. C.; DE ARAÚJO, R. M.; DI NICOLÓ, R.; KOGA ITO, C. Y.; DE ARAUJO, M. A. Effect of green tea extract and mouthwash without alcohol on *Candida albicans* biofilm on acrylic resin. **Gerodontology**. 2014 (in press)

ASAHI, Y.; NOIRI, Y.; MIURA, J.; MAEZONO, H.; YAMAGUCHI, M.; YAMAMOTO, R.; AZAKAMI, H.; HAYASHI, M.; EBISU, S. Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**.v. 116, n. 5, p. 1164-1171, 2014.

BAKKIYARAJ, D.; NANDHINI, J. R.; MALATHY, B.; PANDIAN, S. K. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum L.*) extract against human bacterial and fungal pathogens. **Biofouling**.v. 29, n. 8, p. 929-937, 2013.

BATISTA, A. L.; LINS, R. D.; DE SOUZA COELHO, R.; DO NASCIMENTO BARBOSA, D.; MOURA BELÉM, N.; ALVES CELESTINO, F. J. Clinical efficacy analysis of the mouth rinsing with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction. **Complementary Therapies in Clinical Practice**. v. 20, n. 1, p.93-98, 2014.

BEDRAN-RUSSO, A. K.; CASTELLAN, C. S.; SHINOHARA, M.S.; HASSAN, L.; ANTUNES, A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. **Acta Biomaterialia**. v. 7, n. 4, p. 1735-1741, 2011.

BEDRAN-RUSSO, A. K.; PAULI, G. F.; CHEN, S. N.; MCALPINE, J.; CASTELLAN, C. S.; PHANSALKAR, R. S.; AGUIAR, T. R.; VIDAL, C. M.; NAPOTILANO, J. G.; NAM, J. W.; LEME, A. A. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. **Dental Materials**. v. 30, n. 1, p. 62-76, 2014.

BEDRAN-RUSSO, A. K.; PAULI, G. F.; CHEN, S.N.; MCALPINE, J.; CASTELLAN, C.S.; PHANSALKAR, R. S.; AGUIAR, T. R.; VIDAL, C. M.; NAPOTILANO, J. G.; NAM, J.W.; LEME, A. A. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. **Dental Materials**. v. 30, n.1, p. 62-76, 2014.

BEDRAN-RUSSO, A. K.; PEREIRA, P. N.; DUARTE, W. R.; DRUMMOND, J. L.; YAMAUCHI, M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. v. 80, n. 1, p. 268-272, 2007.

BHADDBHADE, S. J.; ACHARYA, A. B.; RODRIGUES, S.V.; THAKUR, S. L. The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse. **Quintessence International**. v. 42, n. 1, p. 29-33, 2011.

BHARATH, M. J.; SAHADEV, C. K.; RAMACHANDRA, P. K.; RUDRANAIAK, S.; GEORGE, J.; THOMAS, A. Comparative evaluation of four transport media for maintaining cell viability in transportation of an avulsed tooth - An in vitro study. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**. v. 5, n. 1, p. 69-73, 2015.

BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; RUGGERI, A.; CADENARO, M.; DI LENARDA, R.; DE STEFANO DORIGO, E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. **Dental Materials**. v. 24, n.1, p. 90-101, 2008.

CARDOSO, M.V.; DE ALMEIDA NEVES, A.; MINE, A.; COUTINHO, E.; VAN LANDUYT, K.; DE MUNCK, J.; VAN MEERBEEK, B. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. **Australian Dental Journal**. v. 56, n. 1 p. 31-44, 2011.

CARNÉS, J.; DE LARRAMENDI, C. H.; FERRER, A.; HUERTAS, A. J.; LÓPEZ-MATAS, M. A.; PAGÁN, J.A.; NAVARRO, L. A.; GARCÍA-ABUJETA, J. L.; VICARIO, S.; PEÑA, M. Recently introduced foods as new allergenic sources: sensitization to Goji berries (*Lycium barbarum*). **Food Chemistry**. v. 137, n. 1-4, p. 130-135, 2013.

CASTELLAN, C. S.; PEREIRA, P. N.; GRANDE, R. H.; BEDRAN-RUSSO, A. K. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. **Dental Materials**. v. 26, n. 10, p. 968-73, 2010.

CASTELLAN, C.S.; BEDRAN-RUSSO, A. K.; ANTUNES, A.; PEREIRA, P. N. Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: one-year bond strength study. **International Journal of Dentistry**. v. 2013, 918010, 2013.

DE MUNCK, J.; VAN LANDUYT, K.; PEUMANS, M.; POITEVIN, A.; LAMBRECHTS, P.; BRAEM, M.; VAN MEERBEEK, B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. **Journal of Dental Research**. v. 84, n. 2, p. 118-132, 2005.

DU, X.; HUANG, X.; HUANG, C.; WANG, Y.; ZHANG, Y. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive. **Journal of Dentistry**. v. 40, n. 6, p. 485-492, 2012.

EPASINGHE, D. J.; YIU, C. K.; BURROW, M. F.; TSOI, J. K.; TAY, F. R. Effect of flavonoids on the mechanical properties of demineralised dentine. **Journal of Dentistry**. v. 42, n. 9, p. 1178-1184, 2014.

FANG, M1.; LIU, R.; XIAO, Y.; LI, F.; WANG, D.; HOU, R.; CHEN, J. Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin-dentin bonds. **Journal of Dentistry**. v. 40, n. 6, p. 458-466, 2012.

GHONMODE, W. N.; BALSARAF, O. D.; TAMBE, V. H.; SAUJANYA, K. P.; PATIL, A. K.; KAKDE, D. D. Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extracts, grape seed extracts and 3% sodium hypochlorite against *E. feacalis* - An in vitro study. **Journal of International Oral Health**.v. 4, n. 6, p. 61-66, 2013.

GIANNINI, M.; SOARES, C. J.; DE CARVALHO, R. M. Ultimate tensile strength of tooth structures. **Dental Materials**. v. 20, n. 4, p. 322-329, 2004.

HIASAWA, M.; TAKADA, K.; OTAKE, S. Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by green tea catechins. **Caries Research**. v. 40, p. 265–270, 2006.

HIRAISHI, N.; SONO, R.; SOFIQUL, I.; YIU, C.; NAKAMURA, H.; OTSUKI, M, TAKATSUKA T, TAGAMI J. *In vitro* evaluation of plant-derived agents to preserve dentin collagen. **Dental Materials**. v. 29, n. 10, p. 1048-1054, 2013.

JACKSON, J. K.; ZHAO, J.; WONG, W.; BURT, H. M. The inhibition of collagenase induced degradation of collagen by the galloyl-containing polyphenols tannic acid, epigallocatechin gallate and epicatechin gallate. **The Journal of Materials Science**. v. 21, n. 5, p. 1435-1443, 2010.

JAZAERI, M.; PAKDEK, F.; REZAEI-SOUFI, L.; ABDOLSAMADI, H.; RAFIEIAN, N. Cariostatic effect of green tea in comparison with common anticariogenic agents: an *in vitro* study. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**. v. 9, n.1, p. 44-48, 2015.

KATO, M. T.; LEITE, A. L.; HANNAS, A. R.; CALABRIA, M. P.; MAGALHÃES, A. C.; PEREIRA, J. C.; BUZALAF, M. A. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. **Journal of Dental Research**. V. 91, n. 12, p. 1119-1123, 2012.

KHAMVERDI, Z.; REZAEI-SOUFI, L.; KASRAEI, S.; RONASI, N.; ROSTAMI, S. Effect of Epigallocatechin Gallate on shear bond strength of composite resin to bleached enamel: an *in vitro* study. **Restorative dentistry & endodontics**. v. 38, n. 4, p. 241-247, 2013.

LI, J.; PAN, L.; NAMAN, C. B.; DENG, Y.; CHAI, H.; KELLER, W. J.; KINGHORN, A. D. Pyrrole alkaloids with potential cancer chemopreventive activity isolated from a goji berry-contaminated commercial sample of *African mango*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v. 62, n. 22, p. 5054-5060, 2014.

LIU, R. R.; FANG, M.; ZHANG, L.; TANG, C. F.; DOU, Q.; CHEN, J. H. Anti-proteolytic capacity and bonding durability of proanthocyanidin-biomodified demineralized dentin matrix. **International Journal of Oral Science**. v. 6, n. 3, p. 168-174, 2014.

LIU, Y.; DUSEVICH, V.; WANG, Y. Addition of Grape Seed Extract Renders Phosphoric Acid a Collagen-stabilizing Etchant. **Journal of Dental Research**.v. 93, n. 8, p. 821-827, 2014.

LIU, Y.; TJÄDERHANE, L.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; LI, N.; MAO, J.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. **Journal of Dental Research**. v. 90, n. 8, p. 953-968, 2011.

LIU, Y.; WANG, Y. Proanthocyanidins' efficacy in stabilizing dentin collagen against enzymatic degradation: MALDI-TOF and FTIR analyses. **Journal of Dentistry**.v. 41, n. 6, p. 535-542, 2013.

MACEDO, G. V.; YAMAUCHI, M.; BEDRAN-RUSSO, A. K. Effects of chemical cross-linkers on caries-affected dentin bonding. **Journal of Dental Research**. v. 88, n. 12, p.1096-1100, 2009.

MAGALHÃES, A. C.; WIEGAND, A.; RIOS, D.; HANNAS, A.; ATTIN, T.; BUZALAF, M. A. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. **Journal of Dentistry**.v. 37, n. 12, p. 994-998, 2009.

MAHMOOD, T.; AKHTAR, N.; KHAN, B.A. The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Camellia sinensis*'tea. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 4, n. 19, p. 2028-2033, 2010.

MANSOURIAN, A.; BOOJARPOUR, N.; ASHNAGAR, S.; MOMEN BEITOLLAHI, J.; SHAMSHIRI, A. R. The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; an *in vitro* study. **Journal of Medical Mycology**. v. 24, n. 4, p. 163-168, 2014.

MEHTA, V. V.; RAJESH, G.; RAO, A.; SHENOY, R.; B.H., M. P. Antimicrobial Efficacy of *Punica granatum mesocarp*, *Nelumbo nucifera* Leaf, *Psidium guajava* Leaf and *Coffea Canephora* Extract on Common Oral Pathogens: An *In-vitro* Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 8, n. 7, p. 65-68, 2014.

MOCAN, A.; VLASE, L.; VODNAR, D. C.; BISCHIN, C.; HANGANU, D.; GHELDIU, A. M.; OPREAN, R.; SILAGHI-DUMITRESCU, R.; CRISAN, G. Polyphenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. Leaves. **Molecules**. v. 19, n. 7, p. 10056-10073, 2014.

NAROTZKI, B.; REZNICK, A. Z.; AIZENBUD, D.; LEVY, Y. Green tea: a promising natural product in oral health. **Archives of Oral Biology**. v. 57, n. 5, p. 429-435, 2012.

NASCIMENTO, A. L.; BUSANELLO, F.H.; SÓ, M. V.; KUGA, M. C.; PEREIRA, J. R.; GRECCA, F. S. Residues of diferente gel formulations on dentinal walls: A SEM/EDS analysis. **Microscopy Research Technique**. 2015 (*in press*).

NERI, J.R.; OSORIO, R.; SANTIAGO, S. L.; FERNANDES, C. A. D. O.; MENDONÇA, R. M.; CARVALHO, R. M. Effects of dentin pretreatment on the preservation of resin-

dentin bonds [abst 2469]. In: Proceedings of the 89th IADR Mar; San Diego, USA; 2011.

OLIVEIRA, J. R.; DE CASTRO, V. C.; DAS GRAÇAS FIGUEIREDO VILELA, P.; CAMARGO, S. E.; CARVALHO, C. A.; JORGE, A. O.; DE OLIVEIRA, L. D. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 13, p. 208, 2013.

PASHLEY, D. H.; CARVALHO, R. M.; SANO, H.; NAKAJIMA, M.; YOSHIYAMA, M.; SHONO, Y.; FERNANDES, C. A.; TAY, F. The microtensile bond test: a review. **The Journal of Adhesive Dentistry**. v. 1, n.4, p. 299-309, 1999.

PERDIGÃO, J. New developments in dental adhesion. **Dental Clinics of North America**. v. 51, n. 2, p. 333-357, 2007.

PERUMALLA, A. V. S.; HETTIARACHCHY, N. S. Green tea and grape seed extracts - Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**. v. 44, n. 4, p. 827-839, 2011.

POTTERAT, O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. **Planta Medica**. v. 76, n. 1, p. 7-19, 2010.

PROFETA, A. C.; MANNOCCI, F.; FOXTON, R. M.; THOMPSON, I.; WATSON T. F.; SAURO, S. Bioactive effects of a calcium/sodium phosphosilicate on the resin–dentine interface: a microtensile bond strength, scanning electron and confocal microscopy study. **European Journal of Oral Sciences**. v. 120, n. 4, p. 353-362, 2012.

SABATINI, C.; PASHLEY, D. H. Mechanisms regulating the degradation of dentin matrices by endogenous dentin proteases and their role in dental adhesion. A review. **American journal of dentistry**. v. 27, n.4, p. 203-214, 2014.

SAKANADA, S.; OKADA, Y. Inhibitory effects of green tea polyphenols on the production of a virulence factor of the periodontal-disease-causing anaerobic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 1688–1692, 2004.

- SANO, H.; SHONO, T.; SONODA, H.; TAKATSU, T.; CIUCCHI, B.; CARVALHO, R.; PASHLEY, D. H. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test. **Dental Materials**. v. 10, n. 4, p. 236-240, 1994.
- SANTIAGO, S. L.; OSORIO, R.; NERI, J. R.; CARVALHO, R. M.; TOLEDANO, M. Effect of the flavonoid epigallocatechin-3-gallate on resin-dentin bond strength. **The journal of adhesive dentistry**. v. 15, n. 6, p. 535-540, 2013.
- SANTOS, P. H.; KAROL, S.; BEDRAN-RUSSO, A. K. Nanomechanical properties of biochemically modified dentin bonded interfaces. **Journal of Oral Rehabilitation**. v. 38, n. 7, p. 541-546, 2011.
- SCHEFFEL, D. L.; HEBLING, J.; SCHEFFEL, R. H.; AGEE, K. A.; CADENARO, M.; TURCO, G.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; COSTA, C. A.; PASHLEY, D. H. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, *in vitro*. **Dental Materials**. v. 30, n. 2, p. 227-233, 2014.
- SONG, M. K.; SALAM, N. K.; ROUFOGALIS, B. D.; HUANG, T. H. *Lycium barbarum* (Goji Berry) extracts and its taurine component inhibit PPAR- γ -dependent gene transcription in human retinal pigment epithelial cells: Possible implications for diabetic retinopathy treatment. **Biochemical Pharmacology**. v. 82, n. 9, p. 1209-1218, 2011.
- SRINIVASULU, S.; VIDHYA, S.; SUJATHA, M.; MAHALAXMI, S. Shear bond strength of composite to deep dentin after treatment with two different collagen cross-linking agents at varying time intervals. **Operative Dentistry**. v. 37, n. 5, p. 485-491, 2012.
- SUMPIO, B. E.; CORDOVA, A. C.; BERKE-SCHLESSEL, D. W.; QIN, F.; CHEN, Q. H. Green tea, the "Asian paradox," and cardiovascular disease. **The Journal of the American College of Surgeons**. v. 202, n. 5, p. 813-825, 2006.
- SUYAMA, E.; TAMURA, T.; OZAWA, T.; SUZUKI, A.; IIJIMA, Y.; SAITO, T. Remineralization and acid resistance of enamel lesions after chewing gum containing fluoride extracted from green tea. **Australian Dental Journal**. v. 56, p. 394-400, 2011.
- TAVASSOLI-HOJJATI, S.; ALIASGHAR, E.; BABAKI, F. A.; EMADI, F.; PARSA, M.; TAVAJOHI, S.; AHMADYAR, M.; OSTAD, S. N. Pomegranate juice (*Punica granatum*):

a new storage medium for avulsed teeth. **Journal of Dentistry**. v. 11, n.2, p. 225-232, 2014.

TEZVERGIL-MUTLUAY, A.; MUTLUAY, M.; SESEOGULLARI-DIRIHAN, R.; AGEE, K. A.; KEY, W. O.; SCHEFFEL, D. L.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; TJÄDERHANE, L.; NISHITANI, Y.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. **Journal of Dental Research**. v. 92, n. 1, p. 87-91, 2013.

VAHID DASTJERDI, E.; ABDOLAZIMI, Z.; GHAZANFARIAN, M.; AMDJADI, P.; KAMALINEJAD, M.; MAHBOUBI, A. Effect of *Punica granatum* L. flower water extract on five common oral bacteria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. **Iranian Journal of Public Health**. v. 43, n. 12, p. 1688-1694, 2014.

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

WANG, Y.; ZHANG, H.; LIANG, H.; YUAN, Q. Purification, antioxidant activity and protein-precipitating capacity of punicalin from pomegranate husk. **Food Chemistry**. v. 138, n. 1, p. 437-443, 2013.

WU, W. B.; HUNG, D. K.; CHANG, F. W.; ONG, E. T.; CHEN, B. H. Anti-inflammatory and anti-angiogenic effects of flavonoids isolated from *Lycium barbarum* Linnaeus on human umbilical vein endothelial cells. **Food & Function**. v. 3, n. 10, p. 1068-1081, 2012.

ZHAO, W.; XIE, Q.; BEDRAN-RUSSO, A. K.; PAN, S.; LING, J.; WU, CD. The preventive effect of grape seed extract on artificial enamel caries progression in a microbial biofilm-induced caries model. **Journal of Dentistry**. v. 42, n. 8, p. 1010-1018, 2014.

ZHENG, P.; ZARUBA, M.; ATTIN, T.; WIEGAND, A. Effect of different matrix metalloproteinase inhibitors on microtensile bond strength of an etch-and-rinse and a self-etching adhesive to dentin. **Operative Dentistry**. v. 40, n.1, p. 80-86, 2015.