



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Juliane Silva Rodrigues

Ação da solução de chá verde encapsulada em nanoquitosana na dentina submetida à biocorrosão: Resistência adesiva da interface e atividade das metaloproteinases da matriz

RIBEIRÃO PRETO – SP

2022

Juliane Silva Rodrigues

Ação da solução de chá verde encapsulada em nanoquitosana na dentina submetida à biocorrosão: Resistência adesiva da interface e atividade das metaloproteinases da matriz

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo nível Mestrado. Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora. Área de concentração: Dentística.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Evangelista Souza Gabriel

RIBEIRÃO PRETO - SP

2022

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

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

Assinatura do autor: _____ Data: ___/___/2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues, Juliane Rodrigues.

Ação da solução de chá verde encapsulada em nanoquitosana na dentina submetida à biocorrosão: Resistência adesiva da interface e atividade das metaloproteinases da matriz.

Juliane Silva Rodrigues. Ribeirão Preto, 2022.

96p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), área de concentração: Odontologia Restauradora – Opção: Dentística.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Evangelista Souza Gabriel

1. Biocorrosão, 2. Metaloproteinases, 3. Chá verde, 4. Quitosana, 5. Nanopartícula, 6. Adesivo Dentinário

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodrigues, Juliane Silva. Ação da solução de chá verde encapsulada em nanoquitosana na dentina submetida à biocorrosão: Resistência adesiva da interface e atividade das metaloproteinases da matriz.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências – Programa: Odontologia Restauradora. Área de Concentração: Odontologia Restauradora (Opção: Dentística).

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 de pesquisa foi realizado nas dependências clínicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e nos Departamentos de Odontologia Restauradora e de Clínica Infantil, com bolsa de mestrado concedida no âmbito do convênio com Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo nº 130195/2019-7.

Dedicatória



A **Deus** e ao meu guia espiritual **M. Gabriel** por me iluminar e dar o suporte em todos os momentos dessa minha jornada.

“**Honra** teu **pai** e tua **mãe** para que se prolonguem os teus dias na terra, que o Senhor, Teu Deus, Te dá”. Aos meus amados pais toda minha honra e gratidão, **Mário Filho e Lêda**, que sempre me incentivam e dedicam suas vidas para que eu possa ter estudo e progresso na vida.

Ao meu esposo querido e amado, **Wilson Ricardo Garcia**, que está sempre ao meu lado com companheirismo, incentivo, paciência e carinho para que eu pudesse alcançar este sonho e me ver feliz.

Aos meus **amigos** e **familiares** que sempre estavam torcendo para realização dessa conquista.

Aos amigos **José Roberto Miziara Yunes** e **Maria de Fátima Pereira Yunes** pela paciência e amor a mim dedicados.

Ao casal querido de amigos **Rogério Fernandes Ribeiro** e **Maria Antônia de Oliveira** pelo abrigo amoroso em seu lar e nos seus corações que me proporcionou paz para chegar até aqui.

Aos Amigos **João Edison** e **Cachoeira** pela compreensão, incentivo e apoio nessa jornada.

Aos Amigos e médicos Marcos Rondon e José Luiz Iunes pelo auxílio prestado em minha saúde, que foi de fundamental importância para chegar até aqui.

In memoriam e muito especial ao meu padrinho **Mário Alves Rodrigues** e **Ana Maria de Lima Sousa** que de onde eles estiverem estão felizes com essa minha vitória

Agradecimento Especial



À Prof.^a Dr.^a Aline Evangelista Souza Gabriel, por me receber com todo carinho, paciência, dedicação e compartilhamento de seu conhecimento. Agradeço a orientação e confiança em mim depositada. Sou imensamente grata por todo seu auxílio na realização deste projeto. Gratidão por incentivar, apoiar, acalmar e orientar durante todo esse período e a superar as dificuldades nesses últimos tempos que foram durante a pandemia. Você foi de extrema importância para meu crescimento pessoal e profissional.

“Ensinar não é transferir conhecimento,
é **criar as possibilidades** para
a sua produção ou a sua construção.
Quem ensina aprende ao ensinar
e quem aprende ensina ao aprender”.
(Paulo Freire)

Agradecimentos



À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São, tendo como diretor o **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho** e vice-diretor o **Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva**, por possibilitarem a realização da minha pós-graduação e o desenvolvimento deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Antônio Miranda da Cruz Filho**, coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, agradeço pelas oportunidades a mim concedidas e por ter me acolhido no Programa para a realização dos meus estudos.

Ao **Prof. Dr. Manoel Damião de Souza Neto**, chefe do Departamento de Odontologia Restauradora. Agradeço por todos os ensinamentos voltados à pesquisa científica que me foram transmitidos durante o período da pós-graduação.

A **Prof.^a Dr.^a Silmara Aparecida Milori Corona**, por todo aprendizado pelo seu jeito alegre e leve de ser, motivação, dedicação, atenção, carinho, seus conhecimentos foram de fundamental importância para a realização deste projeto.

Ao **Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva** pelo carinho, disponibilidade, dedicação, conhecimento transmitido e apoio na fase laboratorial experimental desse estudo.

Ao **Prof. Dr. Antônio Claudio Tedesco** pela dedicação e competência. Em especial no desenvolvimento da solução experimental utilizada neste estudo.

A **Prof.^a Dr.^a Regina Guenka Palma-Dibb** pela sua importante contribuição a esse projeto durante a análise em Microscopia Confocal. Agradeço por sempre estar disponível, pela convivência harmoniosa e pelo aprendizado. Sempre serei grata.

Ao **Prof. Dr. Jardel Francisco Mazzi Chaves** pelo auxílio na análise de microtração realizadas nesse estudo.

Aos demais **professores da FORP-USP** por auxiliarem na expansão dos meus conhecimentos, serei sempre grata por tudo o que aprendi com vocês.

Aos amigos professores da minha origem da graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, “*eternamente presente em meus pensamentos e coração*” em especial a minha primeira inspiração, **Prof.^a Dr.^a Flávia Cohen Carneiro**. Meus sinceros agradecimentos por terem plantado em mim bases sólidas para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao doutorando e amigo **Thiago Cortez** pela amizade, pelos conselhos, auxílio e contribuições na fase experimental desse trabalho.

A doutora e amiga especial **Thaís Fillus** pela amizade sincera e alegria da sua companhia.

Aos amigos da pós-graduação, **Bruna Abreu, Renato Reis, Suemy, Verônica, Gabriela Paiva, Gabriela, Lisi, Larissa, Miguel, Helena, Gerusa, Júlia, Enir, Nayara, Pâmella, Bárbara Jobim, Isabella Quero, Laís Peloso, Leonardo Lobo, Mirian Saavedra, Paula Zarpellon e Fabiana Curylofo** pela companhia, auxílios e amizade durante essa etapa.

Aos **alunos do laboratório e da clínica de graduação em Dentística FORP-USP**, agradeço a oportunidade de participar no processo de ensino e aprendizado de vocês.

As minhas queridas amigas da graduação em Odontologia da FAO-UFAM **Daniely Meireles, Natália Novello e Giselle Sousa**, pela amizade mais que especial de vocês em minha vida.

Aos técnicos de Laboratório **Patrícia Marchi e Reginaldo Santana**, por sua companhia diária dando força e estímulo todos os dias, pela atenção dispensada e eficiência em todas as oportunidades que tiveram para me ajudar.

A querida técnica de Laboratório **Nilza Letícia Magalhães** por sua gentileza, simpatia, alegria e competência para auxiliar.

As funcionárias **Maria Amália Oliveira, Maria Isabel, Rosângela Angelini**, e o funcionário **Fred Augusto** agradeço por sempre me receberem bem e me dar todo auxílio e suporte quando necessário, pelo companheirismo e amizade que tive alegria de conquistar.

Ao querido secretário **Carlos Feitosa** que sempre tão cativante e atencioso para auxiliar no que foi preciso. Foi a pessoa quem me deu a notícia que havia sido chamada para ingressar no mestrado, a minha profunda gratidão e amizade que sempre levarei em meu coração.

Aos funcionários da pós-graduação **Mary Possani Carmessano** e **Mauro Henrique Leoni Bernardo**, pela paciência e atenção.

A todos participantes desta pesquisa pela cooperação, empenho e preocupação dispendidas a este trabalho.

Ao **CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**, pelo auxílio financeiro fornecido.

“Quem trabalha Deus ajuda. Quem faz pela vida, tem. Trabalhe e estude sempre. Não espere por ninguém. Trabalhando com firmeza, a Vitória um dia vem”

(José Luiz de Oliveira)

Resumo



RODRIGUES, J. S. Ação da solução de chá verde encapsulada em nanoquitosana na dentina submetida à biocorrosão: Resistência adesiva da interface e atividade das metaloproteinases da matriz. 2022. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Novas soluções a base de compostos naturais podem ser utilizadas no substrato dental antes do procedimento restaurador a fim de inibir a atividade das metaloproteinases (MMPs) e melhorar a estabilidade da interface adesiva, especialmente em dentes submetidos à biocorrosão endógena ou exógena. Este estudo avaliou o efeito do pré-tratamento com a solução experimental de chá verde encapsulada com nanoquitosana (NanoQ) na resistência adesiva da interface e na inibição de metaloproteinases (MMPs) em dentina submetida à biocorrosão *in vitro*. Setenta e oito molares humanos hígidos foram seccionados e divididos aleatoriamente de acordo com o substrato: hígido (controle) e biocorroído (ácido cítrico 0,3% por 2h). Os espécimes foram subdivididos de acordo com o pré-tratamento da dentina: água destilada (controle), CHX (digluconato de clorexidina) a 2%, e solução de chá verde + NanoQ. As soluções foram aplicadas de modo ativo (10 mL, 1 min) e secas com papel absorvente. Em seguida, aplicou-se o adesivo Single Bond Universal (3M), os espécimes foram restaurados (FilTek Z350, 3M) e termociclados (2000 ciclos). Sessenta molares (10 dentes por grupo) foram seccionados em palitos ($0,8 \pm 0,2 \text{ mm}^2$), obtendo-se no mínimo 6 palitos por dente. Realizou-se o teste de resistência à microtração (μTBS) em Máquina Universal de Ensaio (0,5 mm/min, 50 kgf), e as falhas foram analisadas em microscopia confocal a laser (n=10 dentes, 4 palitos por dente). O ensaio de zimografia foi realizado (n=10 dentes, 1 palito por dente) para avaliar a atividade das MMPs por microscopia de fluorescência (Leica DMI 6000). Para a quantificação das MMPs, determinou-se a área de fluorescência da interface (*software* Image J). A expressão da MMP-20 e MMP-9 foram avaliadas por imunofluorescência (n=10 dentes, 1 palito por dente). Os 18 dentes restantes restaurados foram seccionados ao meio, polidos e a interface foi analisada em microscopia confocal a laser (n=3 dentes). Os dados de μTBS (MPa) foram analisados por ANOVA a dois critérios e teste de Tukey HSD. As áreas aferidas (μm^2) em zimografia foram analisadas por ANOVA e Holm-Sidak ($\alpha=0,05$). As imagens de imunofluorescência e microscopia confocal foram analisadas qualitativamente. A dentina hígida ($24,26 \pm 9,96$) apresentou maior resistência adesiva que biocorroída ($13,62 \pm 7,56$). O tratamento da dentina promoveu diferença significativa entre os grupos ($p = 0,011$). Os maiores valores foram encontrados na dentina tratada com chá verde + NanoQ e os menores, na tratada apenas com água. O pré-tratamento da superfície antes da aplicação do adesivo com CHX 2% ou chá verde + NanoQ inibiu a atividade enzimática das MMPs ($p < 0,0001$) em dentina biocorroída. A imunofluorescência revelou a expressão de MMP-20 em maior intensidade que a MMP-9, independentemente do substrato ou tratamento. Conclui-se que a aplicação da solução de chá verde + NanoQ previamente ao adesivo aumentou a resistência de união da resina nas dentinas hígida e biocorroída, e que essa solução experimental reduziu a atividade das MMPs em dentina biocorroída de modo semelhante à clorexidina.

Palavras-chave: biocorrosão, metaloproteinases, chá verde, quitosana, nanopartícula, adesivo dentinário.

Abstract



RODRIGUES, J. S. Green tea solution encapsulated with nanoparticulated chitosan on biocorroded dentin: Interface bond strength and metalloproteinases activity. 2022. – Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo.

New natural composite-based solutions are used in dentin before the restorative procedure to inhibit the activity of metalloproteinases (MMPs) and improve the stability of the adhesive interface, especially in teeth for endogenous or exogenous biocorrosion. This study was to assess the effect of pretreated with experimental assay green tea-loaded chitosan nanoparticles (Gt + Nchi) on bond strength (μ TBS) and inhibition activity of MMPs on biocorrosion *in vitro* study. Seventy-eight caries-free human molars were sectioned, and randomly divided according to the substrate: sound (control) and biocorroded (0.3% citric acid for 2h). Samples were subdivided according to dentin pretreatment: distilled water (control), 2% CHX (chlorhexidine digluconate), and Gt + Nchi. The solutions were actively applied (10 mL, 1 min) and dried with absorbent paper. After, Single Bond Universal (3M) adhesive was applied, the samples were restored (FilTek Z350, 3M) and thermocycled (2000 cycles). Sixty molars (10 teeth per group) were sectioned into sticks ($0.8 \pm 0.2 \text{ mm}^2$), obtaining 6 sticks per tooth. The microtensile strength test (μ TBS) was performed in the Universal Testing Machine (0.5 mm/min, 50 kgf), and failures were analyzed in confocal laser microscopy (n=10 teeth, 4 toothpicks per tooth). The zymography assay was performed (n=10 teeth, 1 toothpick per tooth) to evaluate the activity of MMPs by fluorescence microscopy (Leica DMI 6000). For the quantification of MMPs, the fluorescence area of the interface was determined (Image J software). The expression of MMP-20 and MMP-9 were evaluated by immunofluorescence (n=10 teeth, 1 toothpick per tooth). The remaining 18 restored teeth were sectioned in half, polished and the interfaces were analyzed on confocal laser microscopy (n=3 teeth). μ TBS (MPa) data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's HSD test. The measured areas (μm^2) *in situ* zymography were analyzed by ANOVA and Holm-Sidak ($\alpha=0.05$). Immunofluorescence and confocal microscopy images were qualitatively analyzed. Sound dentin (24.26 ± 9.96) showed greater bond strength than biocorroded (13.62 ± 7.56). The dentin pretreatment promoted a significant difference between the groups ($p = 0.011$). The highest values were found in dentin treated with Gt + Nchi and the lowest in dentin treated with water only. Pretreatment of the surface before application of the adhesive with CHX 2% or Gt + Nchi inhibited the enzymatic activity of MMPs ($p < 0.0001$) in biocorroded dentin. Immunofluorescence revealed the expression of MMP-20 at a higher intensity than MMP-9, regardless of the substrate or treatment. It was concluded that applying Gt + Nchi prior to the adhesive increased the bond strength of the resin in sound and biocorroded dentin, and that this experimental solution reduced the activity of MMPs in biocorroded dentin in a similar way to chlorhexidine.

Keywords: biocorrosion, metalloproteinases, green tea, chitosan, nanoparticle, dentin adhesive.

Sumário



1 Introdução.....	39
2. Proposição.....	45
3 Materiais e Métodos.....	49
4 Resultados	67
5 Discussão.....	79
6 Conclusões.....	89
Referências.....	93
Anexos.....	105

Introdução



A erosão dental é a perda patológica da estrutura dental causada pela ação ácida não bacteriana na cavidade bucal (BELMAR DA COSTA et al., 2021). A biocorrosão é a degradação progressiva molecular de um tecido vivo por meio de ação bioquímica e eletroquímica, sendo esta uma definição mais ampla que o termo “erosão” (GRIPPO et al., 2018; PEUMANS; POLITANO; VAN MEERBEEK, 2020).

Na estrutura dental a biocorrosão pode ocorrer por ação química de ácidos exógenos, endógenos, enzimas proteolíticas sem envolvimento bacteriano e também por efeitos piezoelétricos na matriz orgânica da dentina (DONOVAN et al., 2021; GRIPPO et al., 2018). A exposição frequente e prolongada das superfícies dentais aos ácidos extrínsecos e intrínsecos (suco gástrico) associada ao estresse oclusal, atrição e abrasão favorece a perda de estrutura dentária. Portanto, os hábitos alimentares (bebidas e alimentos ácidos), o uso prolongado de medicações ácidas e alterações sistêmicas têm sido associados a fatores de risco para progressão da biocorrosão dentária (DONOVAN et al., 2021; GRIPPO et al., 2018; WANG et al., 2018).

As enzimas proteolíticas do estômago (pepsina) e pâncreas (tripsina) podem degradar a matriz orgânica desmineralizada (KANZOW et al., 2016; PEUMANS; POLITANO; VAN MEERBEEK, 2020). Essas enzimas podem penetrar na boca durante condições de refluxo gastroesofágico, regurgitação e bulimia (ORTIZ et al., 2021; PICOS; BADEA; DUMITRASCU, 2018). Além do tipo e da frequência da exposição aos ácidos, outros fatores biológicos determinam a extensão e progressão da biocorrosão, dentre eles pode-se citar o fluxo salivar, a capacidade de tampão, o pH e a composição da saliva (BUZALAF; MAGALHÃES; RIOS, 2018; KANZOW et al., 2016; WANG et al., 2018).

A exposição aos fatores que causam biocorrosão ocasionam a perda da substância inorgânica do tecido duro e expõem a matriz da dentina (KATO et al., 2021; KANZOW et al., 2016). Essa matriz é resistente à escovação e protege a dentina contra forças mecânicas. No entanto, a matriz orgânica da dentina pode ser degradada pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) derivadas do hospedeiro (JOÃO-SOUZA et al., 2019; KATO et al., 2021). A MMP 20 é secretada pelos ameloblastos durante o desenvolvimento dental e atua na mineralização do esmalte e da dentina (MCGUIRE et al., 2014a; RETANA-LOBO et al., 2021).

As MMPs 2, 8 e 9 são consideradas responsáveis pela hidrólise dos componentes da matriz e colágeno durante processo de biocorrosão dental (COSTA et al., 2019; MARAVIC et al., 2021).

O tratamento da biocorrosão dental consiste na utilização de fluoretos, aconselhamento dietético, tratamento médico e psicológico dependo da patologia associada (COSTA et al., 2019; PEUMANS; POLITANO; VAN MEERBEEK, 2020). Além disso, o aumento da perda de estrutura dentária pode avançar e a intervenção restauradora ser necessária. Assim, o procedimento restaurador reduz ou interrompe a progressão da biocorrosão na superfície dentinária exposta, diminui sintomas de dor, restaura a estética e a função (SIQUEIRA et al., 2018a; WIEGAND; LECHTE; KANZOW, 2021).

No entanto, o aspecto químico-morfológico da dentina após biocorrosão representa um desafio para adesão dentária do material restaurador (PAPADOGIANNIS et al., 2019; SIQUEIRA et al., 2018a; WIEGAND; LECHTE; KANZOW, 2021). Devido a camada de colágeno exposta, esta é inadequadamente infiltrada pelos monômeros resinosos dos materiais adesivos (ALBUQUERQUE et al., 2019; DAOOD et al., 2019).

Diante desse impasse, novas estratégias para prevenir a degradação da matriz dentinária são essenciais para aumentar a longevidade das restaurações (ANSHIDA et al., 2020; BETANCOURT; BALDION; CASTELLANOS, 2019; DAOOD et al., 2019; GRIPPO et al., 2018). Com o intuito de aumentar estabilidade e durabilidade nas interfaces adesivas o conceito de biomodificação da dentina tem sido empregado (DE SOUZA et al., 2021; PRAKKI et al., 2018). Os biomodificadores podem ser usados para pré-tratar a superfície da dentina ou serem incorporados aos materiais adesivos (URURAHY et al., 2021; WIEGAND; LECHTE; KANZOW, 2021).

Dentre os pré-tratamentos na dentina, destacam-se os obtidos a partir das folhas da *Camellia sinensis* (chá verde) (AGUIAR et al., 2014; CURYLOFO-ZOTTI et al., 2021; DIETZ; DEKKER, 2017). O chá verde possui compostos biologicamente ativos polifenólicos, sendo as catequinas em maior abundância (ABUDUREHEMAN et al., 2022; MAZUR et al., 2021; VALADAS et al., 2021). Contém ainda cerca de 35% de ingredientes solúveis em água, catequinas, cafeína, aminoácidos (L-teanina), vitaminas B1, B2, B3 e B12 e cerca de 65% dos ingredientes não solúveis em água são fibras, proteínas, caroteno, clorofila e vitaminas E, D e K (DIETZ; DEKKER, 2017; TÜRKÖZÜ; TEK, 2017). Possui aproximadamente 30 a 42% de polifenóis na forma de flavonóides, sendo que a maioria são: epigallocatequina-3-galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e epicatequina (EC) (ABUDUREHEMAN et al., 2022; MAZUR et al., 2021). O chá verde é conhecido por possuir vários efeitos biológicos, incluindo propriedades antioxidantes, antitumorais e antibacterianas (TEIXEIRA; SOUSA, 2021; VALADAS et al., 2021).

Além disso, é um inibidor natural das MMPs capaz de promover ligações cruzadas entre as fibras de colágeno e proteger a matriz dos ácidos extrínsecos (COSTA et al., 2019; DE MORAES et al., 2016; HANNAS et al., 2016).

No entanto, a utilidade dos polifenóis do chá verde é limitada devido à rápida degradação e a baixa bioabsorção (KUMAR; MEENA; RAJAMANI, 2016; LI et al., 2014). O desenvolvimento da nanotecnologia na Odontologia tem permitido a utilização de nanoencapsulamento como alternativa para proteger os compostos bioativos da degradação (SHETTA; KEGERE; MAMDOUH, 2019). Estes novos materiais com partículas de tamanho nanométrico permitem o aumento do potencial de ação das concentrações terapêuticas dos compostos bioativos no local específico (ALBUQUERQUE et al., 2019; TYAGI et al., 2021).

Diferentes nanocarreadores poliméricos e à base de lipídios têm sido utilizados para encapsulação. No entanto, a baixa capacidade de encapsular o fármaco são consideradas as principais desvantagens dos nanocarreadores lipídicos. Portanto, os poliméricos naturais e ecológicos estão recebendo interesse neste tipo de encapsulamento (BAENA et al., 2020; DE CARVALHO et al., 2019; SHETTA; KEGERE; MAMDOUH, 2019).

Dentre estes, a quitosana é um biopolímero policatiônico, não tóxico, biocompatível e biodegradável obtido por meio de desacetilação alcalina da quitina, principal componente do exoesqueleto de crustáceos (FAKHRI et al., 2020; PASCHOINI et al., 2021). Além disso, tem propriedades antimicrobianas e a capacidade de ser combinada com uma variedade de biomateriais (BAENA et al., 2020; DE CARVALHO et al., 2019). O sistema de administração de entrega das drogas em nanoestrutura é uma das áreas que mais emergem no aprimoramento da biodisponibilidade de diferentes drogas (FAKHRI et al., 2020; SHAHCHERAGHI et al., 2022).

No entanto, são necessários estudos sobre as novas substâncias químicas capazes de pré-tratar a dentina e inibir a atividade das MMPs e contribuir para melhora da estabilidade da interface adesiva das restaurações. O uso da solução de chá verde encapsulada com nanoquitosana (Chá verde + NanoQ) poderá auxiliar no pré-tratamento da matriz dentinária após processo biocorrosivo da dentina.

Proposição



O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso da solução experimental de chá verde + NanoQ previamente à aplicação do sistema adesivo em dentina submetida ao processo biocorrosivo. Dessa forma, o trabalho foi dividido em quatro objetivos específicos, sendo eles:

1. Analisar a resistência de união da interface adesiva da dentina pré-tratada com a solução de chá verde + NanoQ por meio de teste de microtração (μ TBS) e das falhas em microscopia confocal de varredura a laser;
2. Avaliar o efeito da solução de chá verde + NanoQ na atividade das metaloproteinases da matriz em dentina após processo biocorrosivo, por meio de teste de zimografia *in situ*;
3. Identificar as metaloproteinases (MMP-9 e MMP-20) da matriz em dentina, por meio de ensaio de imunofluorescência;
4. Analisar qualitativamente a interface adesiva da dentina biocorroída pré-tratada com a solução de chá verde + NanoQ, por meio de microscopia confocal de varredura a laser.

As seguintes hipóteses nulas foram estudadas:

1. Não há diferença estatisticamente significativa na resistência de união da interface adesiva das dentinas hígida e biocorroída tratadas com a solução experimental;
2. Não há diferença estatisticamente significativa na atividade das MMPs das dentinas hígida e biocorroída tratadas com a solução experimental;
3. Não há diferença estatisticamente significativa na identificação das metaloproteinases (MMP-9 e MMP-20) das matrizes dentinárias hígida e biocorroída;
4. Não há diferença qualitativa na morfologia da interface adesiva das dentinas hígida e biocorroída tratadas com a solução experimental.

Materiais e Métodos



Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CAAE: 27613419.0.0000.5419) da Universidade de São Paulo, SP, Brasil – FORP/USP (Anexo).

Delineamento experimental

As unidades experimentais utilizadas foram 78 molares permanentes humanos, que receberam diferentes preparos e tratamentos da superfície antes das restaurações de resina composta. Os fatores de estudo foram: 1) substrato dentinário, em 2 níveis: hígido e biocorroído; 2) pré-tratamento da dentina, em 3 níveis: água destilada (controle); CHX a 2% e solução de chá verde + NanoQ (experimental). As variáveis respostas foram: 1) análise da resistência de união do material restaurador à dentina pelo teste de microtração e análise das falhas pós-teste (n=10 dentes e 4 palitos por dente); 2) análise semi-quantitativa da atividade gelatinolítica das MMPs pelo teste de zimografia *in situ* (n=10 dentes e 1 palito por dente); 3) identificação da MMP-9 e MMP-20 por imunofluorescência (n=10 dentes e 1 palito por dente) e análise da interface adesiva em microscopia confocal de varredura a laser (n=3 dentes).

A Figura 1 ilustra o fluxograma do estudo.

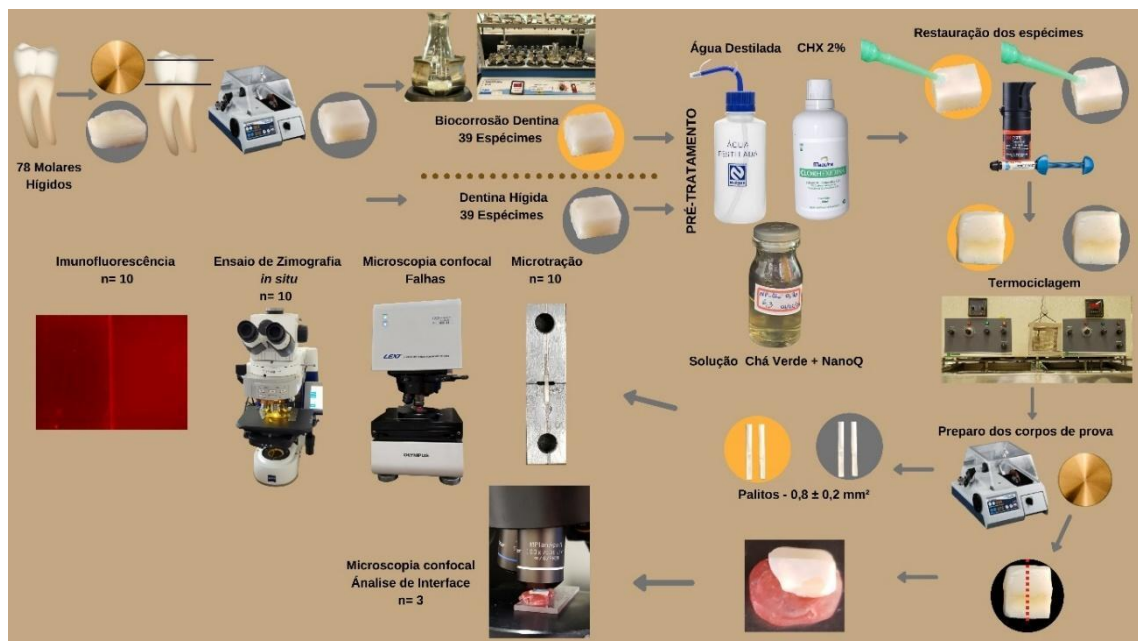


Figura 1. Desenho esquemático ilustrativo das etapas do estudo.

Seleção dos dentes

A amostra foi constituída de 78 molares permanentes humanos, superiores e inferiores, obtidos junto ao Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que foram limpos e armazenados em solução salina a 4°C. O tecido periodontal foi removido com curetas periodontais (Neumar, São Paulo, SP, Brasil) e limpos com pasta de pedra-pomes (S.S. White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água, em taça de borracha (Microdont, São Paulo, SP, Brasil) montada em baixa rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os dentes foram examinados macroscopicamente por meio de lupa estereoscópica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) com aumento de 20x, e descartados os que apresentaram lesões de cárie, restaurações, trincas ou fraturas na coroa.

Preparo da amostra

Os 78 molares humanos hígidos foram fixados 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 sob refrigeração, montado em máquina de corte (Isomet 1000; Buehler, Alemanha). A porção oclusal das coroas dos dentes também foi seccionada em cortadeira (Isomet 1000) com disco de diamante para remoção do esmalte dental, exposição da dentina coronária e obtenção de fragmentos de 6 mm de altura x 6 mm de largura x 3 mm de espessura. Após isso, as superfícies foram polidas por 20 segundos, utilizando lixas d'água de granulação #1200 montadas em Politriz (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) (Figura 2). As superfícies foram então avaliadas em lupa estereoscópica (Carls Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com o aumento de 40 x para assegurar que o esmalte foi totalmente removido. Finalizando essa etapa, os dentes permaneceram em água destilada a 4°C.

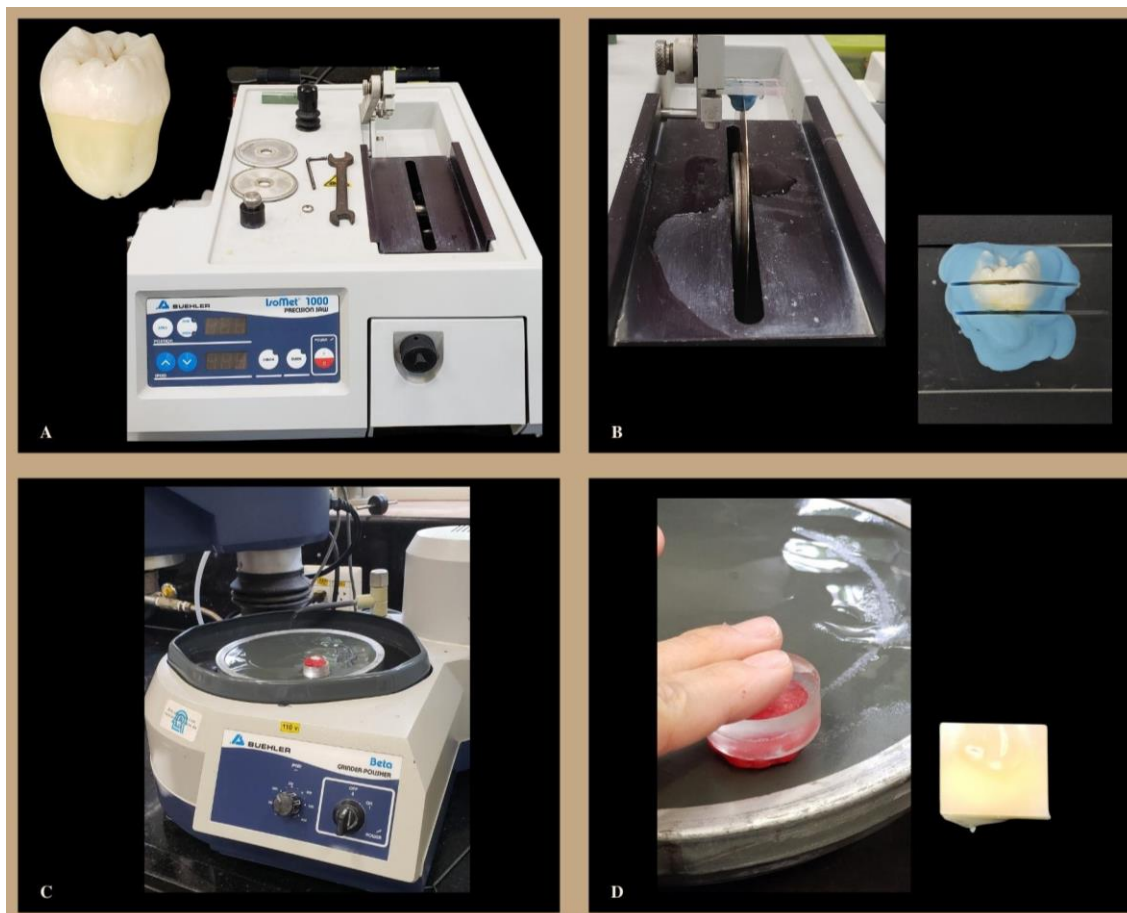


Figura 2. (a) Molar Humano selecionado e máquina de corte; (b) Corte na junção amelocementária e porção oclusal; (c) Politriz e (d) Espécime de dentina coronária polido.

Biocorrosão dos espécimes

Para induzir ao processo de biocorrosão, foi utilizado o protocolo estabelecido por (URURAHY et al., 2017; URURAHY et al., 2021; VANUSPONG; EISENBURGER; ADDY, 2002). Cada espécime de dentina foi imerso em 20 mL de ácido cítrico 0,3% (pH=2.6). Foram individualmente alocados na mesa agitadora (Cientec-CT 155), e ficaram sob agitação constante numa velocidade de 50 rpm por um período de 2 horas. Após esse período, os espécimes foram lavados com água deionizada e armazenados individualmente em eppendorff contendo 10 mL de saliva artificial por 24 horas a 4° C (Figura 3). A saliva utilizada foi a descrita por (AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1999), contendo a seguinte composição: metilparabeno (2,0 g), carboximetilcelulose (10,0 g), KCl (0,625 g), MgCl₂.6H₂O (0,059 g), CaCl₂.2H₂O (0,166 g), K₂HPO₄ (0,804 g) e KH₂PO₄ (0,326 g).



Figura 3. (a) Mesa agitadora; (b) Fragmento de dentina hígida em ácido cítrico 0,3%; (c) espécime lavado com água deionizada e (d) espécime armazenado em eppendorff em saliva artificial.

Formulação da solução de chá verde encapsulado com NanoQ

A solução de chá verde + NanoQ foi sintetizada no Centro de Nanotecnologia e Engenharia de Tecidos da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As partículas de NanoQ foram preparadas pelo método de reticulação iônica usando tripolifosfato de sódio (TPP). A quitosana (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) de baixo peso molecular (75-85% de desacetilação) foi dissolvida em 0,33%(v/v) ácido acético glacial para uma solução de 2 mg/mL. O extrato do chá verde (400 mg, Now Supplements, EUA) foi adicionado gota a gota na solução de nanopartículas de quitosana. As nanopartículas de chá verde + NanoQ atingiram um tamanho médio de 350 nm e o potencial zeta + 30 mV. Foram poucas variações no período de 88 dias e com isso indicou estabilidade a longo prazo da fórmula (CURYLOFO-ZOTTI et al., 2021).

Pré-tratamento da superfície e restauração dos espécimes

O protocolo de pré-tratamento e restauração dos fragmentos dentinários foram realizados de acordo com os grupos do delineamento experimental (Figura 4). A dentina (hígida ou biocorroída) foi tratada com uma das três soluções de acordo com a divisão dos grupos: água destilada (controle), CHX 2% (Maquira, Maringá, PR, Brasil), e solução de chá verde + NanoQ. Cada pré-tratamento foi aplicado na dentina dos seus grupos do mesmo modo: 10 mL do líquido foi lentamente pipetado na superfície dentinária, ativado por fricção com microaplicador nº2 (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) durante 1 minuto, e em seguida, a superfície foi seca com papel absorvente (ARNAUD; DE BARROS NETO; DINIZ, 2010).

O fragmento dental foi então restaurado com o adesivo Single Bond Universal (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) com a técnica auto-condicionante, conforme a indicação do fabricante. O adesivo foi aplicado com microaplicador nº 2 (KG Sorensen) de forma ativa sendo friccionado por 20s e fotoativado por 10 s (Radii-Xpert; SDI, Bayswater, Austrália). Em seguida, os espécimes de dentina foram restaurados com incrementos 2 mm de resina na cor A2B (FillTek Z350 XT, 3M ESPE, Sumaré, SP, Brasil) com auxílio de espátula nº 1 (Duflex SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e fotoativados por 20 segundos com 1200 mW/cm² (Radii-Xpert) até a obtenção de um bloco de 4 mm de altura (Figura 5).

Após a restauração, os espécimes foram submetidos à degradação térmica e hidrolítica da interface adesiva em máquina termocicladora (Ética Odontológica, São Paulo, SP, Brasil), por meio de 2000 ciclos de imersão a 5°C e 55°C em água. O tempo de imersão em cada banho foi de 30 segundos e o tempo de transferência entre os dois banhos foi de 2 segundos (Figura 5).



Figura 4. (a) Água destilada; (b) CHX 2% (Maquira); (c) solução experimental de Chá verde + NanoQ e (d) adesivo Single Bond Universal (3M).

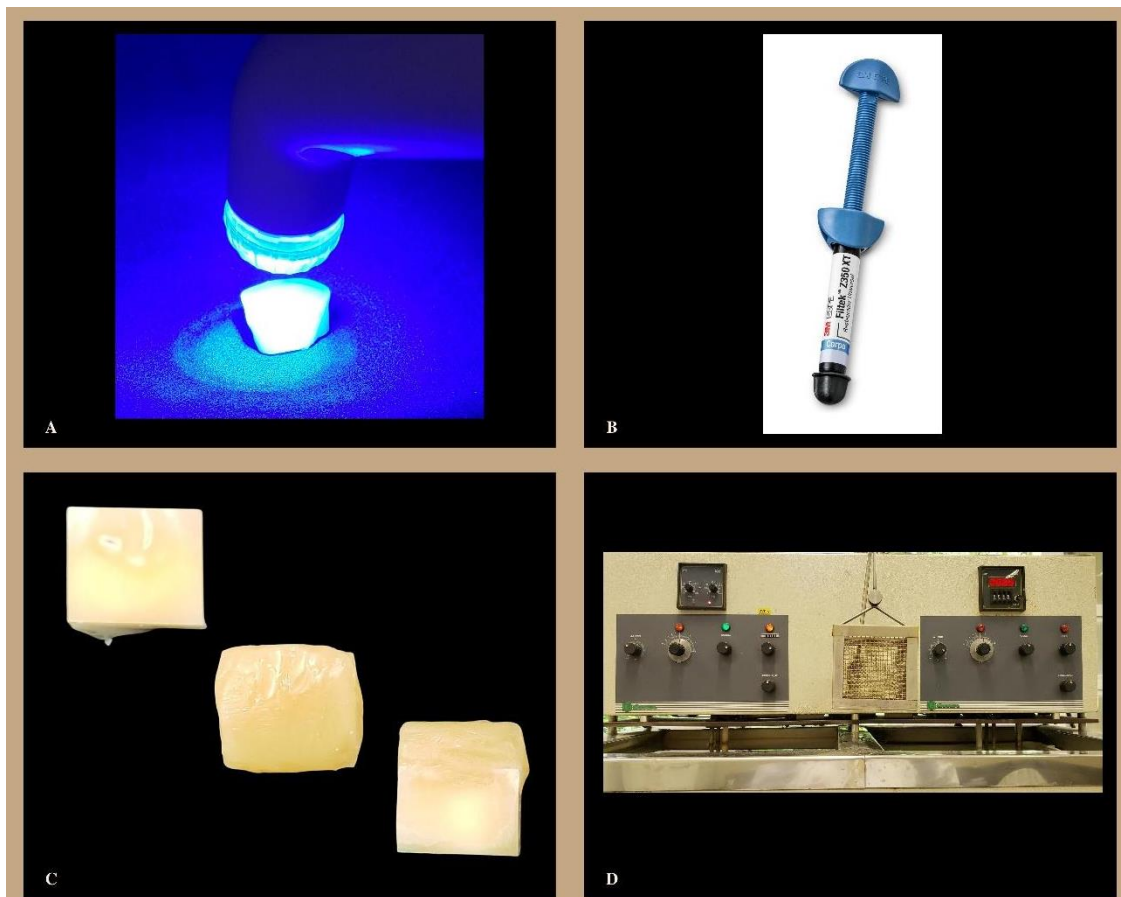


Figura 5. (a) Fotopolimerização adesivo universal; (b) resina composta (FillTek Z350 XT, 3M); (c) espécime de dentina coronária restaurado e (d) Máquina de Termociclagem.

Ensaio de resistência de união a microtração (μ TBS)

Sessenta espécimes (conjunto dentina/resina) foram seccionados em cortadeira de precisão (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com irrigação constante para realização de cortes no sentido ocluso-pulpar de acordo com a técnica de teste de microtração *non-trimming* (PASHLEY et al., 1999). Foram obtidos no mínimo 6 palitos de $0,8 \pm 0,2$ mm² de área transversal, extraídos da porção central do dente. A espessura de cada fragmento foi confirmada com paquímetro digital (Mitutoyo, Toquio, Japão).

Os corpos-de-prova em formato de palitos foram adaptados em dispositivos metálicos compostos de duas partes cilíndricas. Foram fixados no centro do dispositivo com éster de cianoacrilato gel (Super Bonder Flex Gel, Henkel Loctite Ltda., São Paulo, Brasil) na união entre as duas partes do dispositivo. Cada segmento foi então acoplado às extremidades da Máquina de Teste Universal (Instron Corporation, Canton, MA, EUA), sendo realizado o teste à velocidade de 0,5 mm/min com célula de carga de 50 kgf, até a falha

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. Calculou-se a média de resistência adesiva dos palitos por dente.

Após as superfícies envolvidas na fratura de cada corpo-de-prova foram analisadas microscópio confocal a laser (LEXT, 3D Measuring Laser Microscope OLS 4000, Olympus Corporation), nos aumentos de 5x e 10x. As falhas foram classificadas em adesiva, quando a superfície dentinária estava coberta por fina camada de material adesivo; coesiva do material, quando a superfície estava coberta por resina composta; coesiva do substrato, quando a falha ocorreu na dentina; e mista, nas situações em que houve a combinação dos tipos adesiva e coesiva.

Ensaio de Zimografia *in situ*

A avaliação da atividade das metaloproteinases da matriz (MMPs) foi realizada pelo ensaio de zimografia *in situ*, utilizando gelatina contendo um fluoróforo (Kit EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay) que emite fluorescência verde quando clivado por MMPs. Para tanto, utilizou-se um palito de cada dente ($0,8 \pm 0,2$ mm²) dos diferentes grupos experimentais (n=10).

A solução estoque de gelatina fluorescente foi diluída na proporção 1:10 em água destilada. Oitenta μ L da solução foi aplicada sobre cada poço e as amostras foram protegidas da luz e incubadas em câmara umidificada a 37°C (Figura 6). As capturas das imagens foram realizadas após 2 horas de incubação (MAZZONI et al., 2012; QUEIROZ et al., 2019).

A hidrólise do substrato, indicativo de atividade enzimática gelatinolítica, foi avaliada por microscopia de fluorescência em aumento de 20x (Leica DMI 6000, Buffalo Grove, IL, EUA). O programa foi calibrado em 100 μm para cada imagem analisada. Em seguida, foram definidos os parâmetros de análise (área e densidade integrada). As áreas escuras representavam a região do material restaurador (resina) e as áreas mais claras (*spots* de fluorescência verde) representavam a dentina. Foi desenhado um polígono na região de interface em direção à dentina para o cálculo dos valores de área e densidade. Os resultados foram obtidos a partir da razão da densidade integrada dividida pela área (Figura 7).

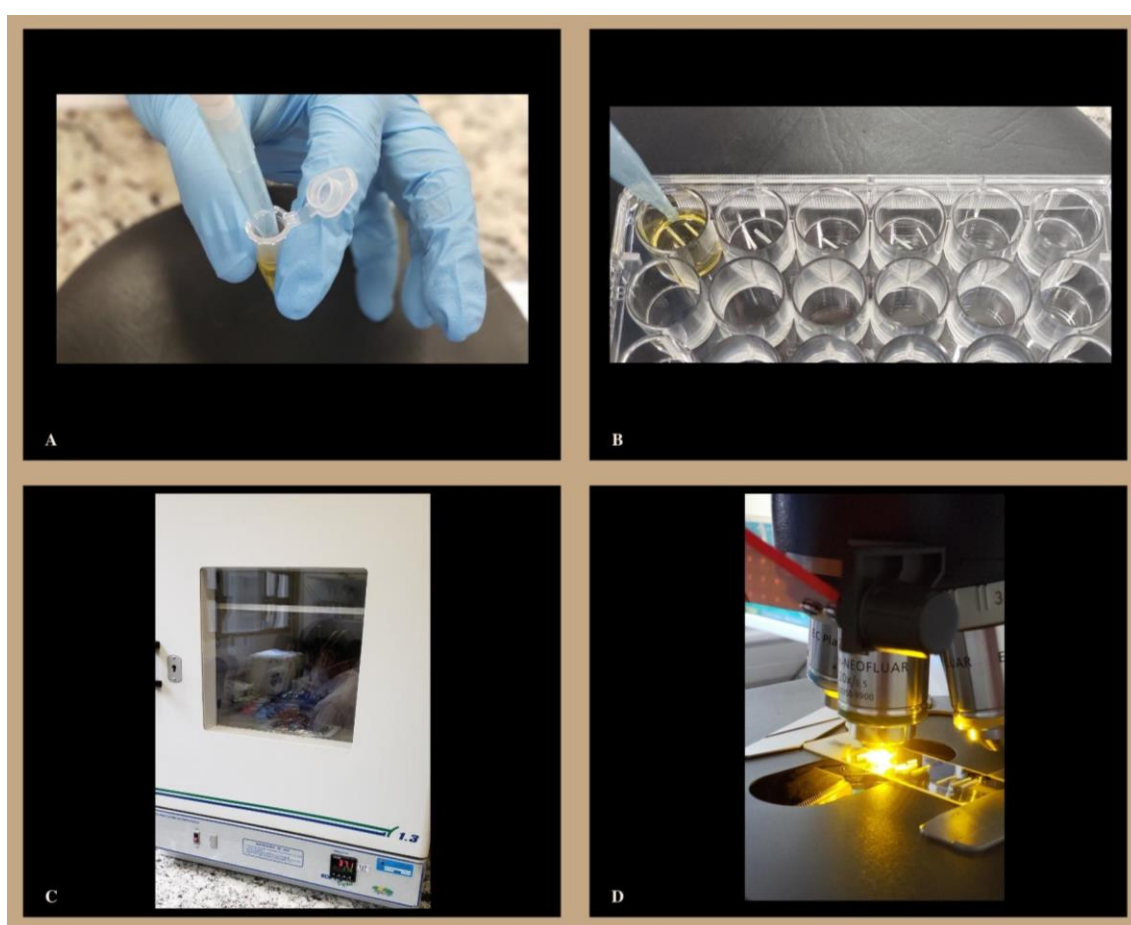


Figura 6. (a) Solução da gelatina fluorescente diluída; (b) Oitenta μL da solução nos poços com as amostras (c) Amostras protegidas da luz e incubadas em câmara umidificada a 37°C e (d) Microscopia de fluorescência em aumento de 20x.

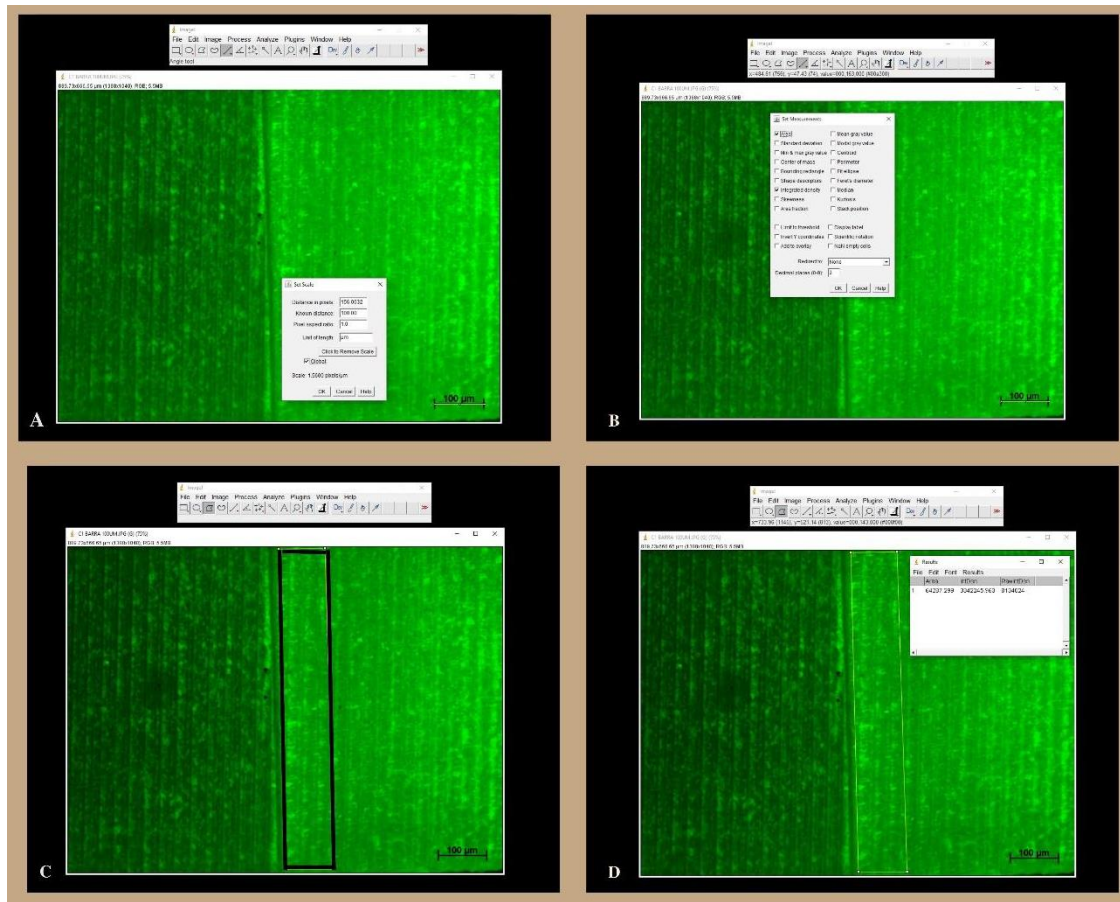


Figura 7. (a) Calibração do software; (b) Parâmetros de análise; (c) Desenho do polígono (fluorescência verde) e (d) Mensuração da densidade integridade e da área.

Ensaio de imunofluorescência

A avaliação da presença e da localização das metaloproteinases da matriz foi realizada por meio da imunofluorescência em dentina humana. Com o objetivo de avaliar se as MMPs foram expressas, as secções de dentes foram imersas em solução salina fosfatada tamponada (PBS) por 30 minutos no primeiro dia. A seguir, foram imersos em solução de borohidreto de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, SP, Brasil) a 1 mg/mL por 15 minutos (3×). Os sítios de ligação não-específica foram bloqueados com albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich) a 1% por 45 minutos.

A imunomarcagem foi realizada utilizando anticorpo primário para MMP-9 (sc-6840; anticorpo policlonal produzido em cabras, Santa Cruz, Biotechnology Inc.) e MMP-20 (sc-26926; anticorpo policlonal produzido em cabras, Santa Cruz, Biotechnology Inc.) à 4°C na geladeira por uma noite.

No dia seguinte, o fragmento foi lavado em PBS por 30 minutos e incubado com anticorpo secundário anti-cabra conjugado ao fluoróforo Texas Red® (sc-2783; produzido em macacos, Santa Cruz, Biotechnology Inc.) por 30 minutos, em câmara escura. Em seguida, os fragmentos foram lavados em PBS novamente por 3 minutos (3×).

Lâminas-controle foram utilizadas para testar a especificidade da imunomarcção, nas quais o anticorpo primário foi omitido e os fragmentos incubados com PBS (Figura 8). A porcentagem de fluorescência foi avaliada em dentina. Primeiramente, a dentina foi fotografada em microscopia de fluorescência em aumento de 20x, utilizando o filtro Texas Red® 64HE (Carl Zeiss, Alemanha). Posteriormente, as imagens foram analisadas por dois avaliadores calibrados, sem o conhecimento do grupo ao que pertencia cada espécime.

Os resultados foram expressos por meio de análise descritiva utilizando o programa Image J (NIH, Frederick, MD, EUA). O programa foi calibrado para cada imagem analisada para garantir a utilização nos mesmos parâmetros. Em seguida, foram definidos os parâmetros de análise semelhantes ao da zimografia *in situ*. As áreas escuras a região do material restaurador (resina) e as áreas mais claras com spots de fluorescência vermelha representaram a dentina (Figura 9).

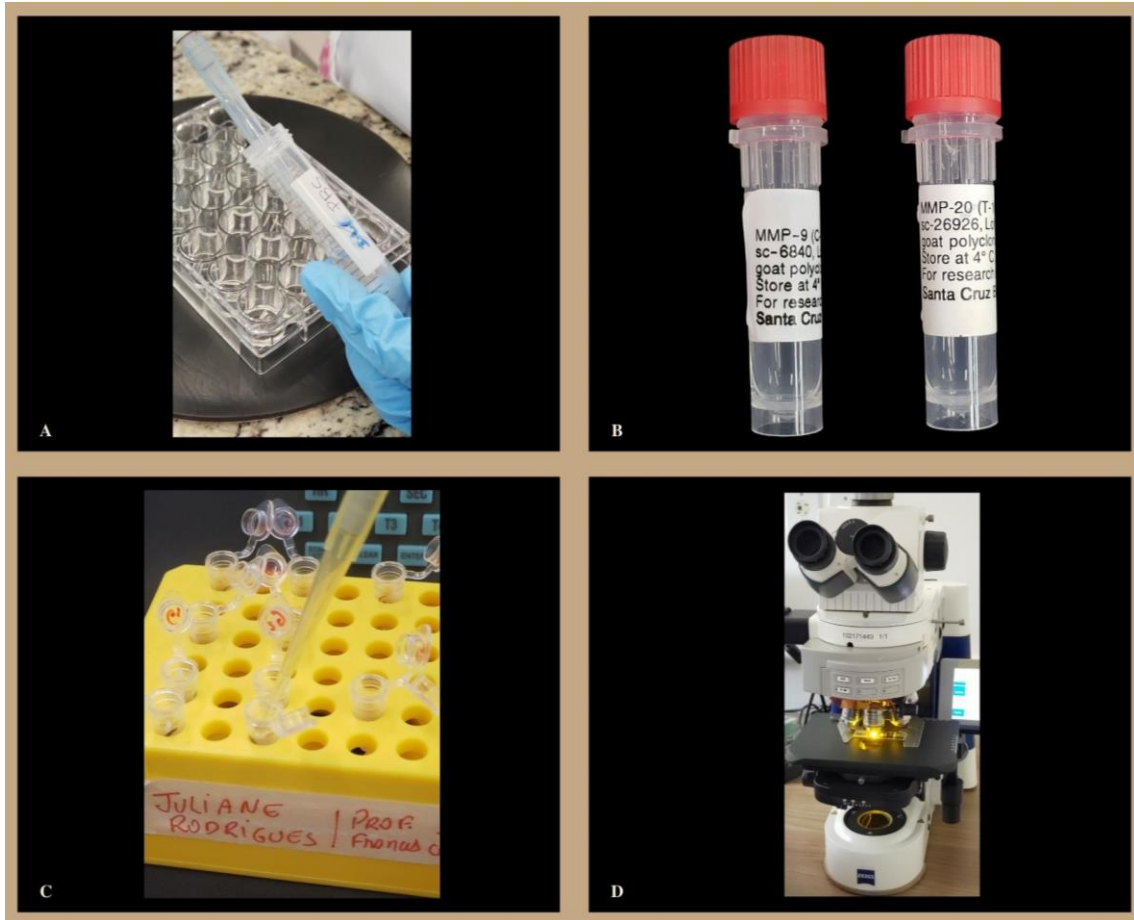


Figura 8. (a) Solução de PBS, (b) Lavagem com PBS das amostras (c) Anticorpos primários – MMP-9 e MMP-20 e (d) Microscopia de fluorescência em aumento de 20x.

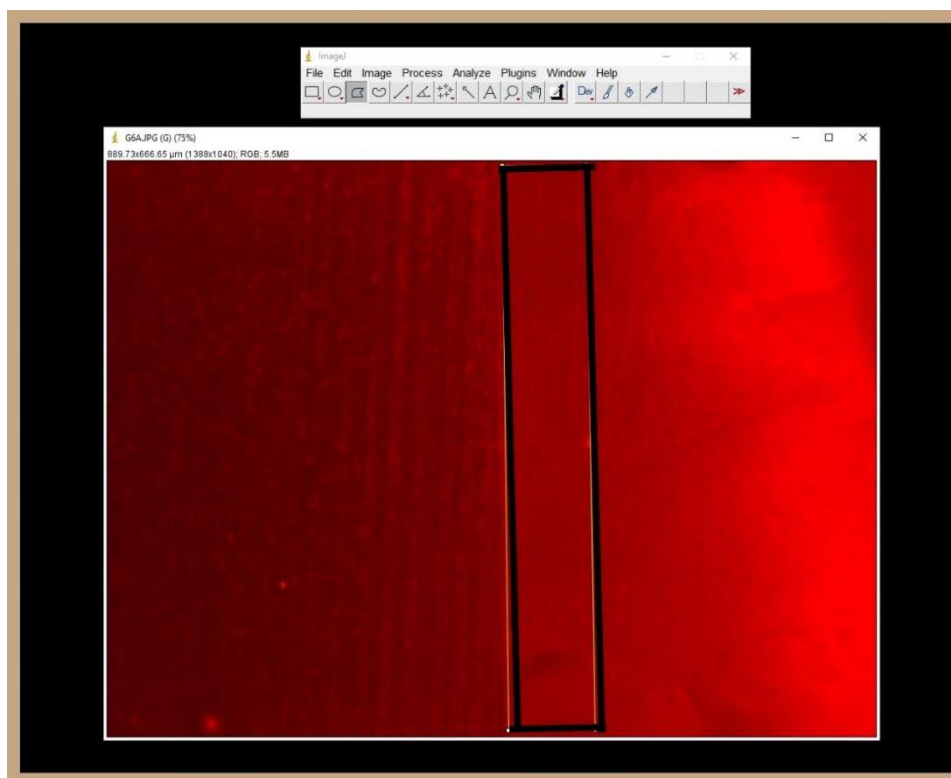


Figura 9. Desenho do polígono para mensuração da densidade integridade e da área.

Microscopia confocal da interface adesiva

Os 18 espécimes restaurados restantes foram fixados com cera para fundição em placa de acrílico e seccionados ao meio no sentido longitudinal para obter as metades dos espécimes com a exposição da interface dental, utilizando disco diamantado dupla face sob refrigeração, montado em máquina de corte (Isomet 1000; Buehler, Alemanha). Após isso, as superfícies foram polidas com a regularização de sua superfície com lixa d'água de granulação 1200, por 1 minuto cada uma, por meio da máquina politriz giratória (APL-4, Arotec S/A Ind. E Comércio, São Paulo, SP, Brasil), com discos de feltro de 0,3 e 0,5 μm , juntamente com os líquidos para preparação metalográfica de alumina (Arotec Sj685/A Ind. E Comércio, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 10).

No momento da análise da interface material obturador/dentina pelo microscópio confocal a laser, as superfícies foram submetidas ao condicionamento com ácido fosfórico 35% (Sigma-Aldrich) por 10 segundos, lavadas com água destilada e secas com papel toalha absorvente.

Na sequência, os espécimes foram planificados em placa de acrílico e posicionados paralelamente à mesa do Microscópio Confocal de Varredura a Laser (LEXT, 3D Measuring Laser Microscope OLS 4000, Olympus Corporation) para obtenção de imagens da interface material obturador/dentina, por meio do software OLS4000. O corpo de prova foi posicionado junto ao aparelho, que permitiu a obtenção de imagens fornecida pela magnificação da interface material pela lente objetiva de 100x. Foram capturadas as imagens do material obturador/dentina, para possibilitar a visualização da qualidade da interface da restauração (Figura 11).

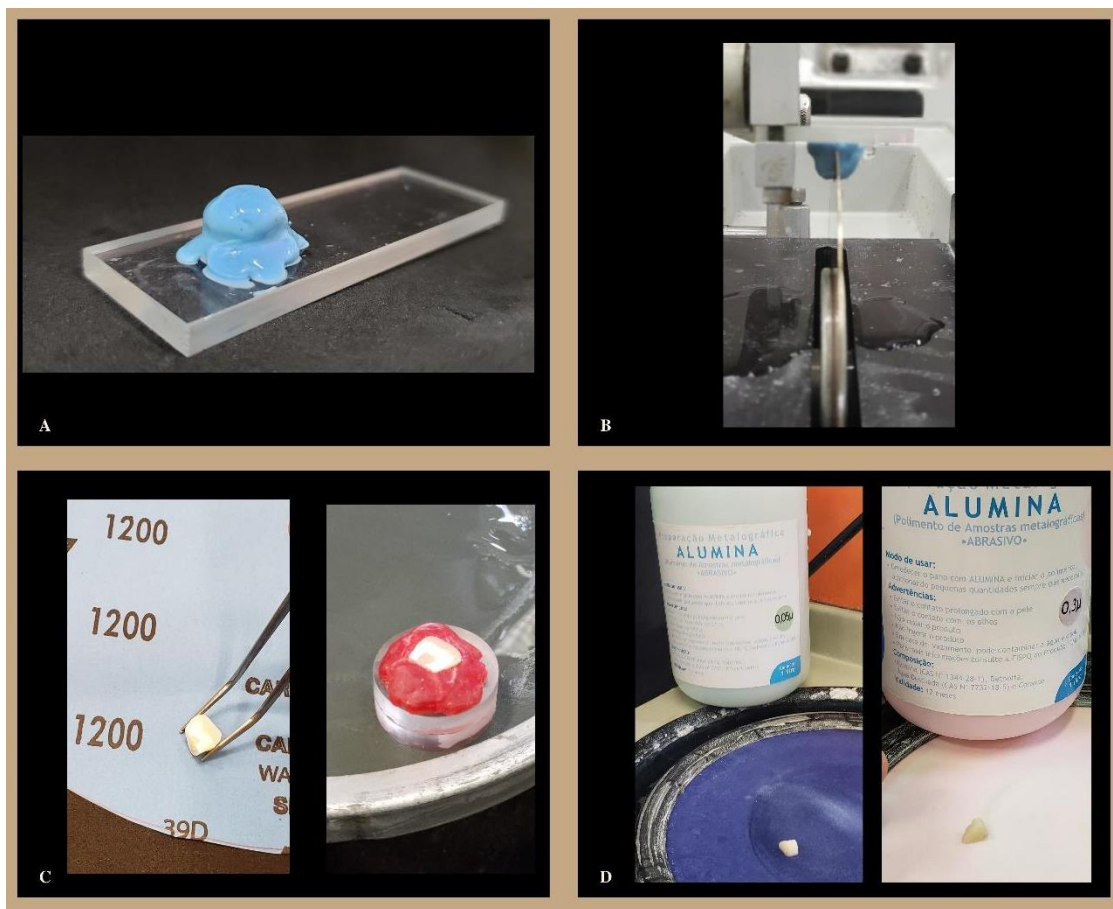


Figura 10. (a) Espécime preparado com cera, (b) espécime em máquina de corte (c) polimento inicial com lixa d'água e (d) polimento final com os discos e alumina.

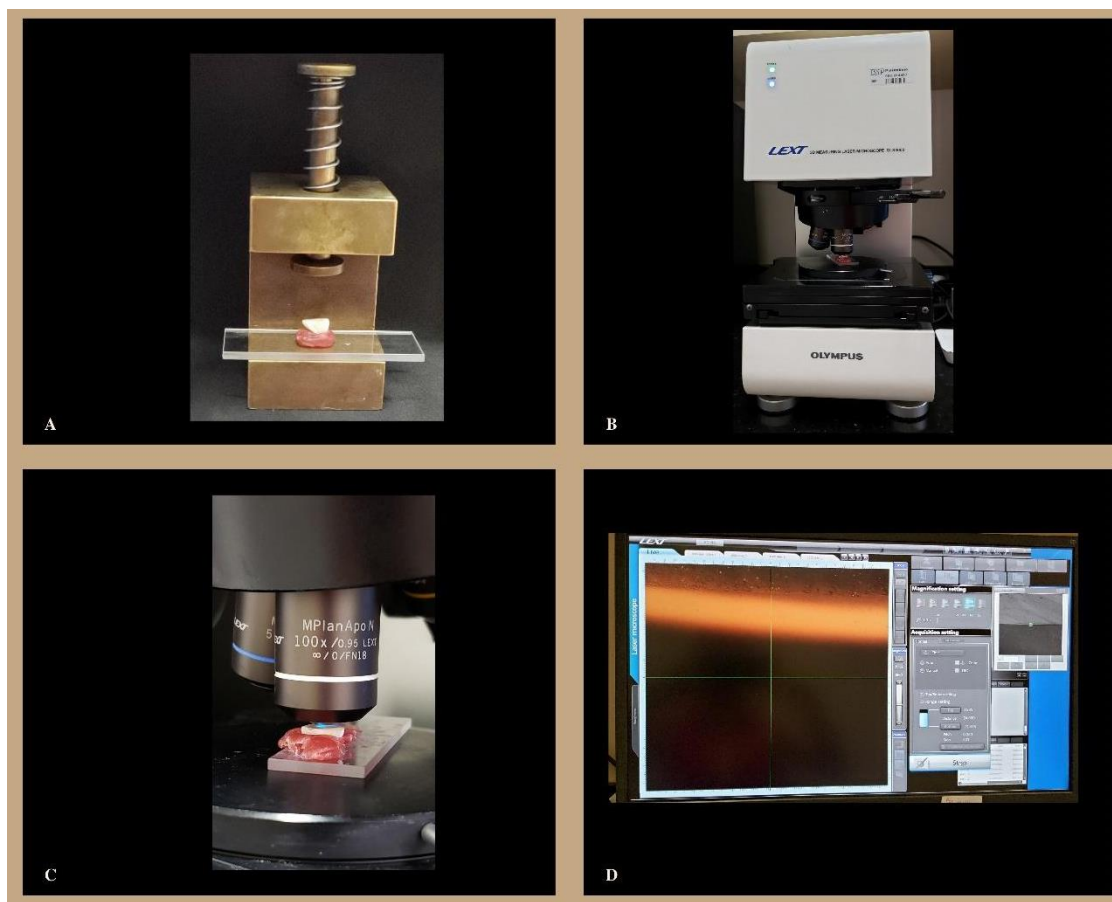


Figura 11. (a) Espécime planificado, (b) espécime em microscópio confocal (c) lente com aumento de 100x (d) obtenção da imagem no software.

Análise dos dados

Os testes foram realizados com software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS v25, IBM, Armonk, NY, EUA), com nível de significância padronizado em 5%. Os dados referentes ao teste de resistência de união (MPa) foram submetidos a testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (Levene). Como a amostra se apresentou normal e homogênea realizou-se a Análise de Variância à dois critérios (substrato x tratamento da dentina), e teste complementar de Tukey HSD. As falhas obtidas após o ensaio de microtração foram analisadas em microscópio confocal a laser e os escores analisados pelos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Dunn.

As imagens obtidas após teste de zimografia *in situ* e imunofluorescência foram analisadas por dois examinadores calibrados ($Kappa > 0,8$). Nesses testes, os achados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência por μm^2 e analisados por meio do teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak, com nível de significância de 5%. As imagens

obtidas na análise da interface adesiva foram avaliadas qualitativamente por dois examinadores calibrados ($Kappa > 0,8$).

Resultados



Resistência de união da interface adesiva (μ TBS)

A Análise de Variância a dois critérios mostrou diferença estatisticamente significativa entre o *substrato* ($p = 0,000$), sendo que a dentina hígida ($24,26 \pm 9,96$ MPa) apresentou maior média de resistência adesiva que a dentina que foi submetida ao processo de biocorrosão ($13,62 \pm 7,56$ MPa). O tratamento da dentina também promoveu diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,011$). Não houve diferença significativa na interação dos fatores *substrato* x *tratamento* da superfície ($p = 0,682$).

O teste complementar de Tukey HSD foi aplicado à variável tratamento (Tabela 1). Verificou-se que os maiores valores foram encontrados na dentina tratada com solução de chá verde + NanoQ, seguida pelo tratamento com CHX 2%, independentemente do tipo de substrato. Os menores valores de resistência de união (μ TBS) foram verificados no grupo tratado apenas com água ($p < 0,05$).

Tabela 1. Médias e desvios-padrões da resistência de união (μ TBS) do sistema restaurador à dentina submetida aos tratamentos de superfície.

Tratamento da dentina	Média \pm desvio padrão*
Água	(15,78 \pm 6,54 MPa) b
CHX 2%	(17,42 \pm 5,89 MPa) b
Chá verde + NanoQ	(27,84 \pm 9,53 MPa) a

* Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Tukey HSD: Água x CHX – $p = 0,934$; Água x Chá verde + NanoQ - $p = 0,016$; CHX x Chá verde + NanoCsQ – $p = 0,04$.

A Tabela 2 traz os valores médios e os desvios-padrões da resistência de união (μ TBS) do sistema restaurador à dentina submetida a diferentes tratamentos de superfície, considerando os dois tipos de substratos.

Tabela 2. Médias e desvios-padrões da resistência de união (μ TBS) do sistema restaurador à dentina hígida ou após biocorrosão, submetidas à diferentes tratamentos de superfície.

	Água	CHX 2%	Chá verde + NanoQ
Dentina hígida	(20,81 \pm 7,62) Ab	(22,79 \pm 8,75) Ab	(29,17 \pm 12,02) Aa
Dentina biocorroída	(10,75 \pm 6,69) Bb	(12,04 \pm 5,61) Bb	(18,08 \pm 8,69) Ba

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da mesma coluna (tratamento, $p=0,011$)

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da mesma linha (substrato, $p=0,000$)

Foi observado que os tratamentos na superfície da dentina influenciaram nos valores de resistência de união por microtração (μ TBS) ($p < 0,05$). Para os grupos tratados com solução de Chá verde + NanoQ apresentaram valores de μ TBS superiores aos demais tratamentos. A dentina tratada com água ou com CHX 2% mostraram baixos valores de μ TBS. A resistência de união da dentina hígida foi superior à da dentina biocorroída ($p < 0,05$).

Tabela 3. Frequência de distribuição das falhas obtidas após teste de resistência de união ($n=10$ dentes, 4 palitos por dente - total 40 palitos).

	Dentina Hígida			Dentina com biocorrosão		
	Água	CHX	Chá verde + NanoQ	Água	CHX	Chá verde + NanoQ
Adesiva	36/40	34/40	18/40	32/40	30/40	20/40
Coesiva (substrato)	4/40	4/40	6/40	0/40	5/40	6/40
Coesiva (material)	0/40	0/40	12/40	0/40	0/40	10/40
Mista	0/40	2/40	4/40	8/40	7/40	4/40
Kruskall-Wallis e Dunn test ($p < 0,05$)	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>B</i>

Houve predomínio de falha adesiva em todos os grupos experimentais, independentemente do tratamento da superfície ou tipo de substrato. Foram encontradas falhas mistas na dentina hígida tratada com CHX, solução de chá verde + NanoQ e dentina submetida à biocorrosão tratada com água, CHX ou solução de chá verde + NanoQ.

Falhas coesivas do material (resina) foram encontradas apenas nos espécimes que receberam o tratamento com solução de chá verde + NanoQ. A Figura 12 ilustra as falhas obtidas após o ensaio de microtração, após análise em microscopia confocal a laser.

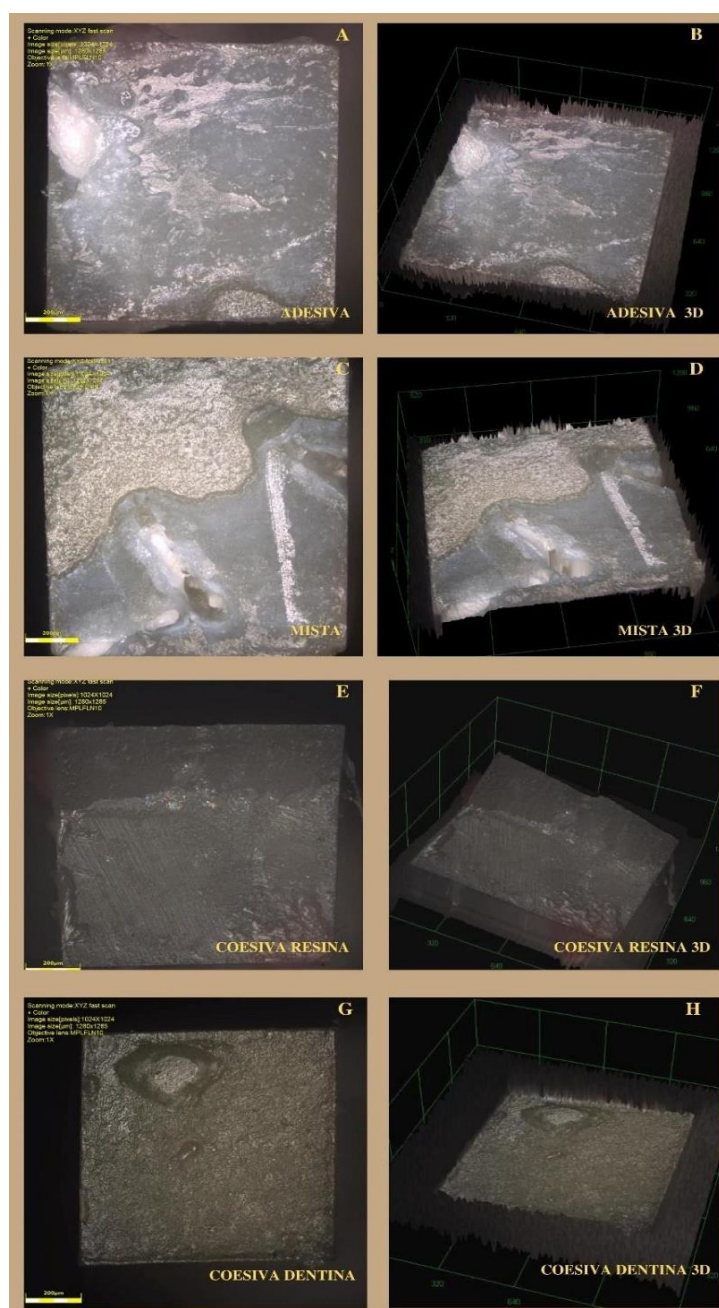


Figura 12. Tipo de falhas observadas em microscópio confocal a laser: imagens 2D e 3D – (a, b) adesiva; mista (c,d); coesiva resina (e,f) e coesivas dentina (g,h).

Ensaio de Zimografia *in situ*

Na dentina hígida, foi observado que as aplicações dos diferentes tratamentos de superfície não modularam a atividade enzimática, ou seja, não foram capazes de ativar as MMPs, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (água, $p = 0,962$; CHX 2%, $p = 0,745$; Chá verde + NanoQ, $p = 0,997$).

Por outro lado, o tratamento na superfície biocorroída apenas com água promoveu o aumento da atividade gelatinolítica na dentina ($p = 0,002$), estatisticamente diferente dos demais tratamentos. O uso da CHX 2% ($p < 0,0001$) ou da solução de Chá verde + NanoQ ($p < 0,0001$) na dentina biocorroída inibiu significativamente a atividade enzimática da MMPs, sem diferença significativa entre eles ($p = 0,999$). A Figura 13 ilustra graficamente os resultados e a Figura 14 traz imagens do ensaio de zimografia *in situ*.

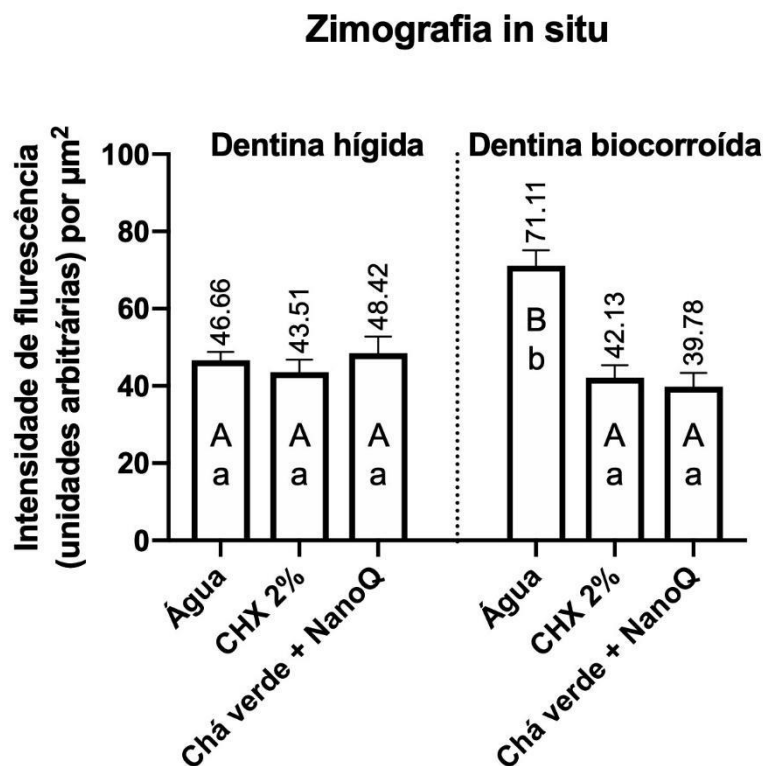


Figura 13. Atividade gelatinolítica nas dentinas híginas e biocorroídas expostas aos diferentes tratamentos de superfície (água - controle negativo, CHX 2% - controle positivo e solução Chá verde + NanoQ). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA e pós-teste Holm-Sidak, $p < 0,05$).

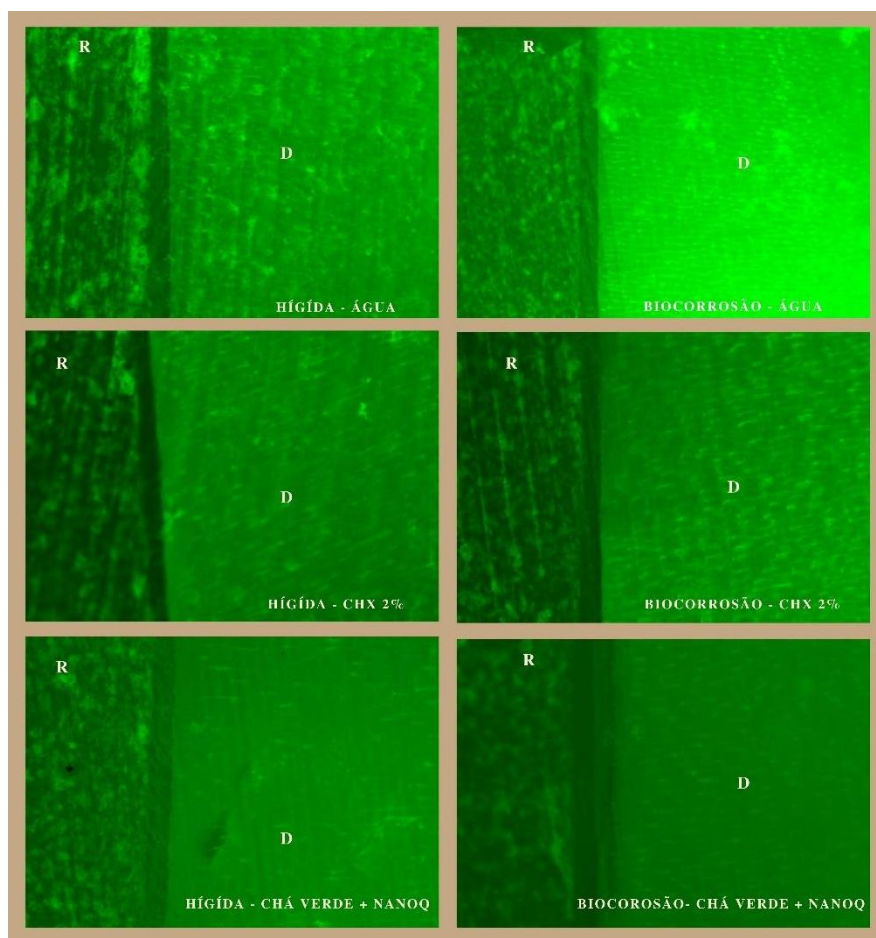


Figura 14. Atividade gelatinolítica no palito de dente permanente. Imagens no aumento de 20x R (resina) e D (dentina). As dentinas hígidas e biocorroída expostas aos diferentes tratamentos de superfície (água - controle, CHX 2% e solução Chá verde + NanoQ). O tratamento na superfície biocorroída apenas com água promoveu o aumento da atividade gelatinolítica na dentina como visto pelo aumento da intensidade de fluorescência na imagem.

Ensaio de Imunofluorescência

Com a finalidade de investigar as MMPs presentes na dentina, dentes hígidos e dentes após biocorrosão foram utilizados para avaliar a expressão gelatinolítica da MMP-9 e de uma MMP específica de tecidos dentais e importante durante a amelogênese (MMP-20), por meio de ensaio de imunofluorescência indireta.

Foi observada a presença tanto de MMP-9 como de MMP-20 na dentina. No entanto, não houve diferença entre dentes hígidos e após a biocorrosão, tanto para a MMP-9 ($p = 0,970$) como para a MMP-20 ($p = 0,967$). A exposição da dentina aos diferentes tratamentos não modulou a síntese proteica de MMP-9 e de MMP-20. As Figuras 15 e 16 ilustram graficamente a imunofluorescência indireta para identificação das MMPs.

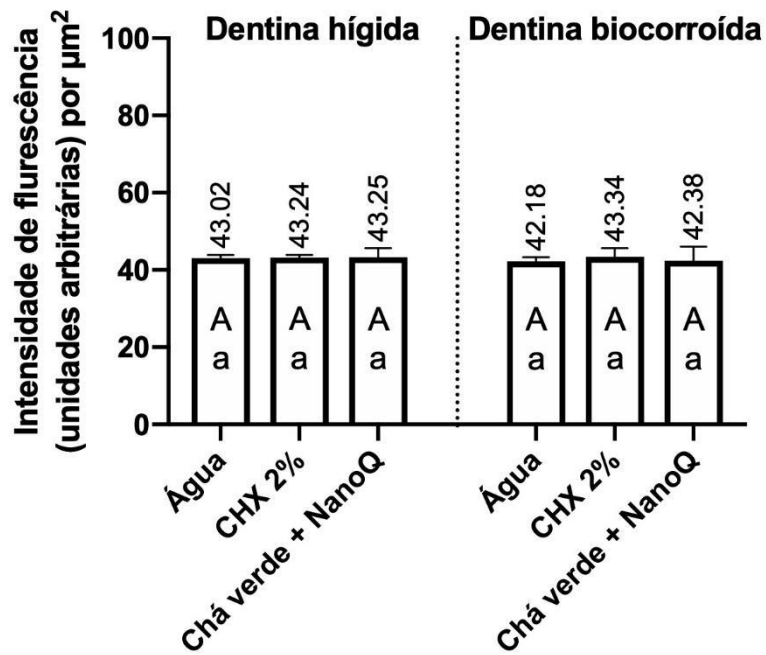
MMP-9

Figura 15. Imunofluorescência indireta para identificação da MMP-9 na dentina hígida e biocorroída tratada com água, CHX 2% e com solução de Chá verde + NanoQ. Gráfico expressa a média e desvio-padrão em unidades arbitrárias por área de dentina em μm^2 (ANOVA, $p = 0,970$).

MMP-20

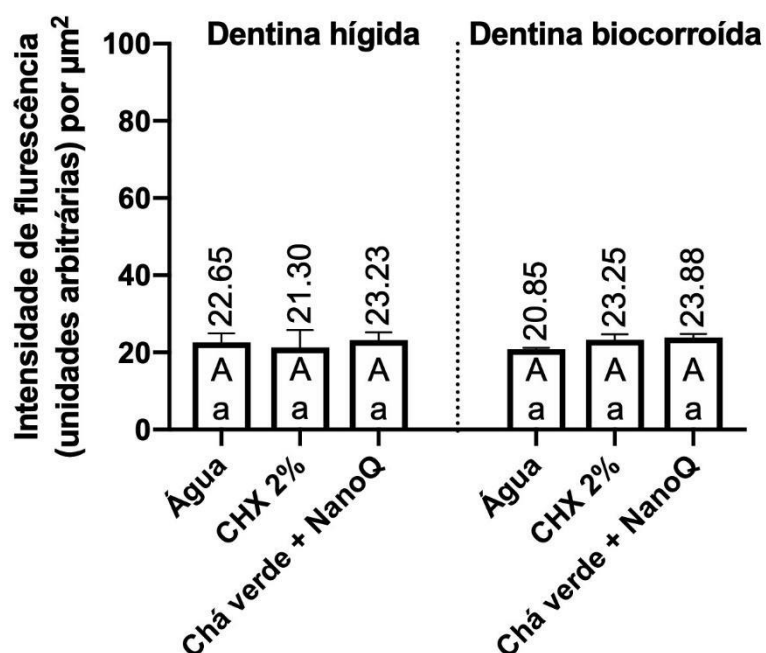


Figura 16. Imunofluorescência indireta para identificação da MMP-9 na dentina hígida e biocorroída tratada com água, CHX 2% e com solução de Chá verde + NanoQ. Gráfico expressa a média e desvio-padrão em unidades arbitrárias por área de dentina em μm^2 (ANOVA, $p = 0,967$).

Na análise qualitativa, verificou-se maior intensidade de fluorescência para a MMP-9 do que para a MMP-20. As Figuras 17 e 18 ilustram o ensaio de imunofluorescência para a MMP-9 e MMP-20 (respectivamente), nos diferentes grupos experimentais.

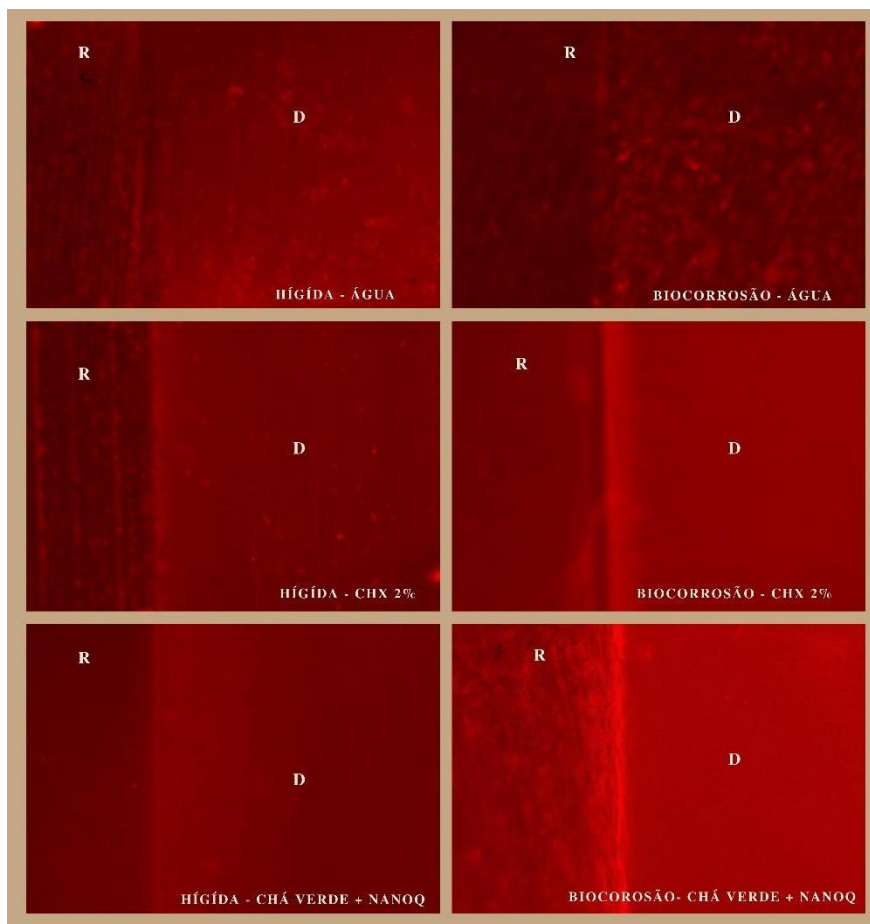


Figura 17. Não houve diferença de intensidade nas dentinas hígida e biocorroída expostas aos diferentes tratamentos de superfície (água - controle, CHX 2% e solução Chá verde + NanoQ). No entanto, verificou-se maior intensidade de fluorescência para a MMP-9 do que para a MMP-20.

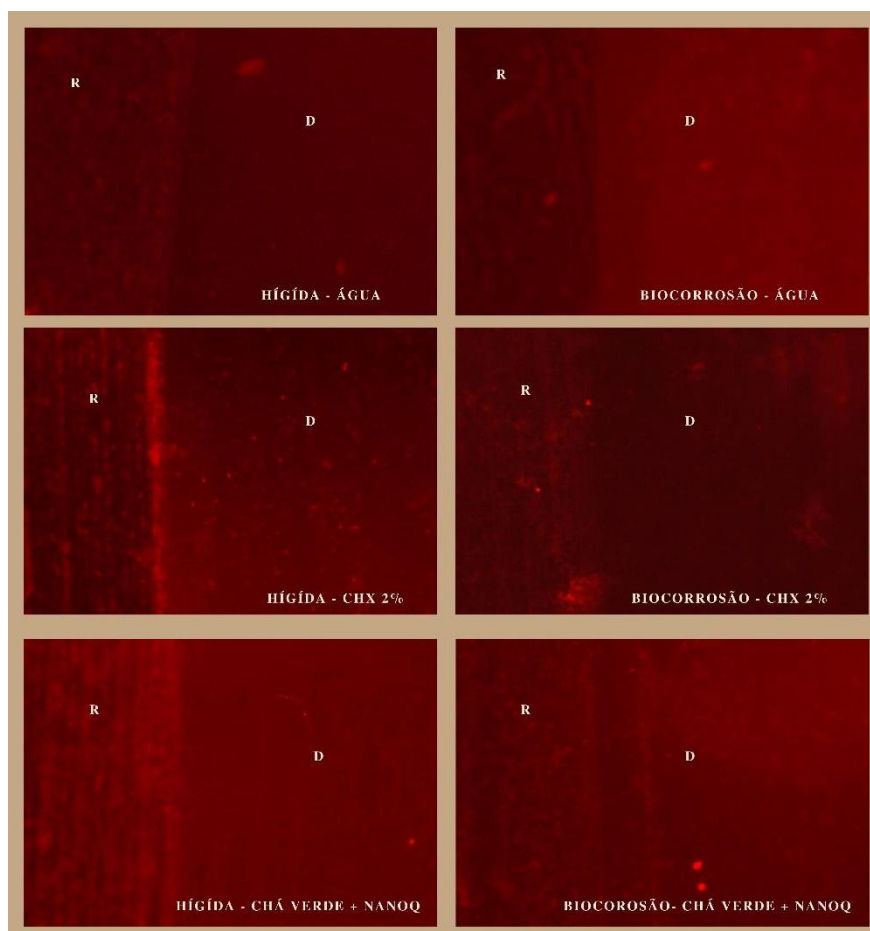


Figura 18. Não houve diferença de intensidade nas dentinas hígida e biocorroída expostas aos diferentes tratamentos de superfície (água - controle, CHX 2% e solução Chá verde + NanoQ). No entanto, verificou-se menor intensidade de fluorescência para a MMP-20 do que para a MMP-9.

Análise da interface em microscopia confocal

Análise qualitativa da interface adesiva, na maioria dos espécimes, a uniformidade das linhas entre o material obturador e a dentina foram irregular, resultando em interface descontínua, representada nas imagens da Figura 19 (A - dentina hígida + água destilada, B – dentina com biocorrosão + água destilada, C - dentina hígida + clorexidina 2% e D – dentina com biocorrosão + clorexidina 2%). Pode-se observar também que alguns espécimes apresentaram áreas com fenda entre o material obturador e a dentina. Entretanto, foram observadas interface adesiva uniforme, com áreas praticamente sem fendas (Figuras 19: E - dentina hígida e chá verde + NanoQ e F - dentina biocorrosão e chá verde + NanoQ).

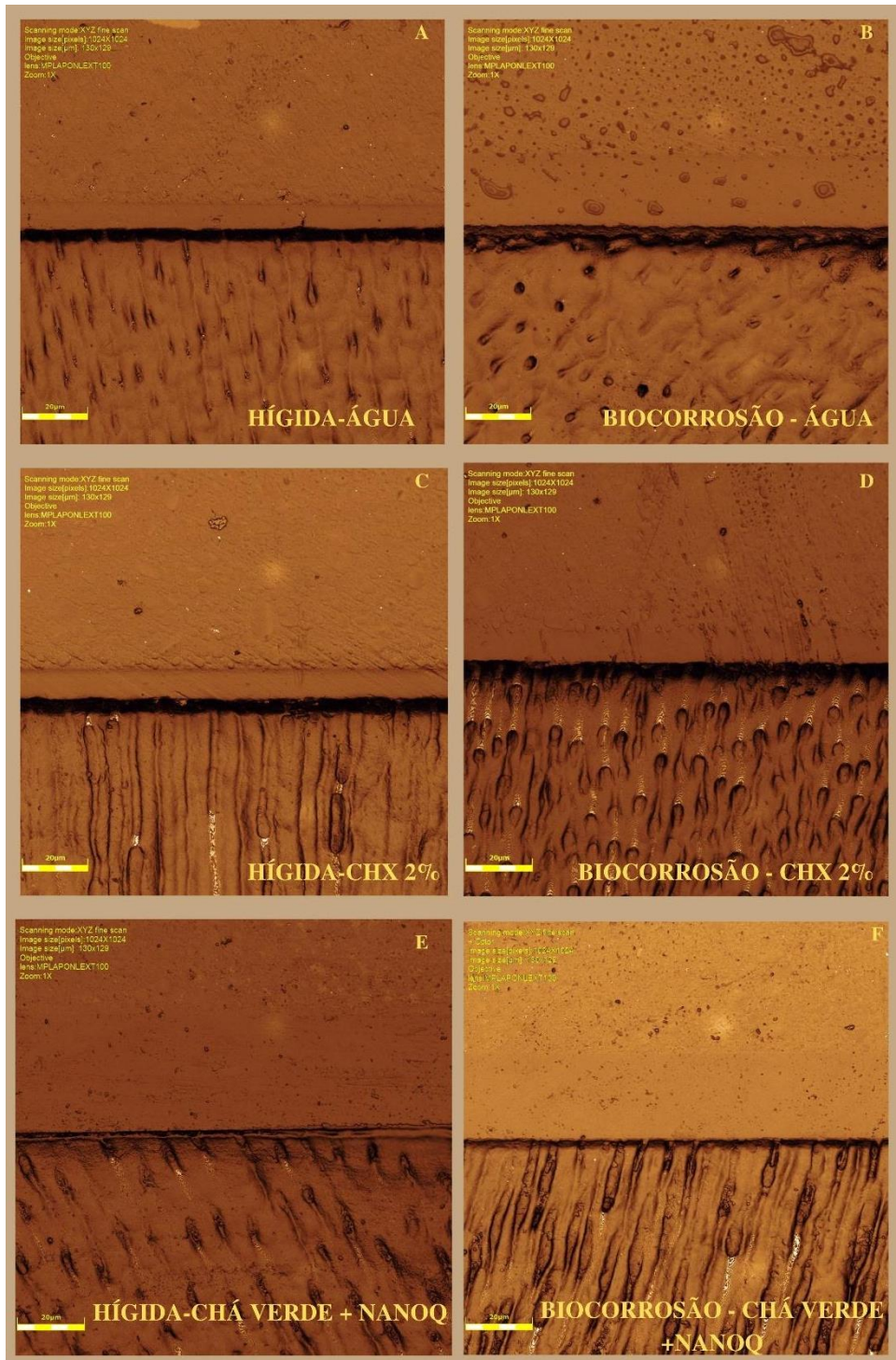


Figura 19. Análise qualitativa das interfaces adesivas demonstrou que os espécimes com pré-tratamento de chá verde + NanoQ a interface apresentou com mais uniformidade, sendo mais retilíneas e sem grandes falhas (gaps) na delimitação da interface área obturada – dentina.

Discussão



A utilização de biomateriais em nanoestruturas no pré-tratamento da dentina tem sido investigada como estratégia para fortalecer a rede de colágeno e controlar as taxas de biodegradação em condições patológicas dos componentes da matriz orgânica e assim melhorar a adesão do material restaurador (BANDEIRA et al., 2020; URURAHY et al., 2021). O objetivo deste estudo foi investigar o efeito de uma nova solução experimental de chá verde encapsulada em nanoquitosana (chá verde + NanoQ) como pré-tratamento da dentina bicorroída, a fim de melhorar os valores de resisência adesiva do material restaurador ao substrato.

Optou por utilizar substrato submetido à processo de biocorrosão, pois trata-se de patologia com crescente prevalência no Brasil (LUCIANO; FERREIRA; PASCHOAL, 2017), além de causar danos irreversíveis na superfície dental que a tornam desfavorável ao processo restaurador (SIQUEIRA et al., 2018b; WIEGAND; LECHTE; KANZOW, 2021). No entanto, não há padronização da metodologia *in vitro* para biocorrosão dentária. A variedade de fatores, tais como concentração, pH, viscosidade e tipo de solução ácida desempenham um papel nas propriedades biomacânicas do substrato biocorroído (BELMAR DA COSTA et al., 2021; WIEGAND; LECHTE; KANZOW, 2021; JAGER et al., 2012; MELO et al., 2021; ZIMMER et al., 2015). Estudos *in vitro* mostraram modelos de ciclagem de pH para induzir a biocorrosão (BELMAR DA COSTA et al., 2021; SIQUEIRA et al., 2018b) em exposição única (JAGER et al., 2012) e com tempos variados (MELO et al., 2021; WIEGAND; LECHTE; KANZOW, 2021).

Nesse estudo, utilizou-se o protocolo de biocorrosão proposto por Vanuspong, Eisenburger e Addy (2002) e replicado por outros autores (URURAHY et al., 2017, URURAHY et al., 2021). O ácido cítrico utilizado é um ácido simples, reprodutível e eficaz na desmineralização da superfície dentinária (KANNIAPPAN; HARI; JUJARE, 2022; SIQUEIRA et al., 2018a). A escolha do tempo de imersão em ácido por 2 horas não se correlaciona com o consumo de única dose de bebida ácida. O tempo de exposição prolongado simula *in vitro* vários dias de exposição a bebidas e alimentos ácidos e potencializa a atividade proteolítica na dentina (ZIMMER et al., 2015).

Na metodologia desse estudo, a solução de chá verde + NanoQ foi elaborada livre de solventes orgânicos e foi associada ao tripolifosfato de sódio (TPP), que é agente de reticulação iônica não tóxico que melhora a biodistribuição (CURYLOFO-ZOTTI et al., 2021).

A presença do grupo amino catiônico é um dos fatores que ajuda as partículas a não se agregarem e confere estabilidade das nanopartículas (CAVALCANTE et al., 2021; CURYLOFO-ZOTTI et al., 2021; NEVES et al., 2021).

A quitosana deste estudo foi sintetizada por meio de procedimentos químicos em nanopartículas de baixo peso molecular e demonstrou favoráveis propriedades transportadoras (CAVALCANTE et al., 2020; CURYLOFO-ZOTTI et al., 2021, NEVES et al., 2021). As nanopartículas (350 nm) permitiram maior penetração nos túbulos dentinários e possível interação com as fibras de colágeno dental (CURYLOFO-ZOTTI et al., 2021; DE SOUZA et al., 2021; FAKHRI et al., 2020). Outro fator importante é solubilidade dessas nanopartículas em pH ácido, que associada ao chá verde, melhorou a estabilidade da entrega dos polifenóis aumentando a reticulação do colágeno (CURYLOFO-ZOTTI et al., 2021).

Em referência ao protocolo restaurador, optou-se pela técnica *self-etch* (autocondicionante) com adesivo universal (Single Bond Universal, 3M ESPE). Os adesivos universais foram planejados para simplificar as estratégias adesivas, permitindo a aplicação em diferentes situações clínicas (SIQUEIRA et al., 2018a). O modo autocondicionante demonstraram maior penetração na dentina que o condicionamento total, evitando a penetração incompleta do adesivo na rede de colágeno (CHEN et al., 2022; SOUZA, DI NICOLÓ; BRESCIANI, 2018). Além disso, o adesivo universal selecionado contém o monômero 10-metacrilóiloxidecil di-hidrogênio fosfato (10-MDP), capaz de se ligar aos íons cálcio da hidroxiapatita e fornecer ligação química relativamente estável da interface dentina-adesivo se comparado a outros monômeros funcionais (CHEN et al., 2022; DE SOUZA et al., 2021; MENG et al., 2021; WIEGAND; LECHTE; KANZOW, 2021).

Os resultados desse estudo referentes à análise de microtração demonstraram que houve diferença na interação com o substrato. A dentina hígida sem tratamento (água destilada – grupo controle) apresentou os maiores valores. Estudos anteriores demonstraram que a dentina após a biocorrosão é mais complexa devido a formação de camada desmineralizada e rede de colágeno (densa e fibrosa) desorganizada que afetam o desempenho dos adesivos (BELMAR DA COSTA et al., 2021; SIQUEIRA et al., 2018a).

Estudos prévios (SIQUEIRA et al., 2018a; WIEGAND; LECHTE; KANZOW, 2021) corroboram nossos resultados de menor resistência de união para a dentina artificialmente biocorroída independentemente do pré-tratamento utilizado.

A exposição do colágeno desorganizado pode estar associada a desmineralização mais profunda da dentina intertubular e peritubular (ANSHIDA et al., 2020). Isso poderia ter influência negativa no sistema adesivo, dificultando sua penetração na matriz dentinária (CARDENAS et al., 2021; SIQUEIRA et al., 2018a). Dessa forma, a primeira hipótese nula desse estudo foi rejeitada, pois houve diferença significativa na resistência de união da interface adesiva entre os grupos testados.

Os resultados de outros estudos realizados em dentina biocorroída, relataram mais falhas do tipo adesiva (SOUZA, DI NICOLÓ; BRESCIANI, 2018; VERMELHO et al., 2017), o que está de acordo com o presente estudo e indica falha no agente de ligação. O uso do sistema adesivo universal na técnica autocondicionante pode oferecer uma solução para adesão em dentes biocorroídos (SIQUEIRA et al., 2021), pois remove apenas a camada de *smear* intertubular sem dissolver os *plugs* tubulares (ANASTASIADIS; VERDELIS; ELIADES, 2021). Além disso, são considerados mais compatíveis do que o uso do ácido fosfórico em relação a estabilidade do colágeno na dentina (ANASTASIADIS; VERDELIS; ELIADES, 2021).

Um dos mecanismos de mineralização dos tecidos duros é o controle enzimático ativo realizado por diferentes proteinases da família das MMPs. As MMPs atuam em locais específicos na célula, no substrato, na sinalização, desenvolvimento e remodelação de tecidos. Nos seres humanos, são identificadas a família de 23 metaloproteinases sendo divididas em 6 grupos com base na especificidade e tipo de substrato. Na dentina humana foram identificadas a colagenase MMP8, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 e a enamelinase MMP-20 (CABRAL-PACHECO et al., 2020; GOBBI et al., 2021).

As MMPs são enzimas metais-dependentes (zinco e cálcio) (VIEIRA et al., 2018; OU et al., 2018) secretadas pelos odontoblastos como proenzimas (zimógenos) (CABRAL-PACHECO et al., 2020) e quando ativadas nos processos patológicos podem contribuir para a progressão da biocorrosão, expondo a estrutura dental a novos desafios ácidos (COSTA et al., 2019; BUZALAF; MAGALHÃES; RIOS, 2018; GRIPPO et al., 2018; RETANA-LOBO et al., 2021).

Alguns desses fatores são responsáveis pela degradação da interface adesiva, como o baixo pH e aumento na atividade das MMPs na camada híbrida (CABRAL-PACHECO et al., 2020; FREITAS et al., 2021; MARAVIC et al., 2021; WIEGAND; LECHTE; KANZOW, 2021). Esta zona de interdifusão (dentina/material restaurador) imperfeita pode reduzir a adesão à dentina com o passar do tempo se degradar pela ação das MMPs ativadas (ANSHIDA et al., 2020; ZHENG et al., 2015).

Diferentes agentes inibidores de MMPs estão sendo testados para melhorar a capacidade da adesão dentinária a longo prazo. Apesar do adesivo universal possuir monômeros ácidos ($\text{pH} \pm 2.7$) (AHMET; SESEOGULLARI-DIRIHAN; TEZVERGIL-MUTLUAY, 2020; DE CARDOSO et al., 2019) não houve uma ativação significativa das MMPs da matriz em dentina hígida quando da aplicação apenas do sistema adesivo na dentina (OKAMOTO et al., 2018).

Os extratos de *C. sinensis* (chá verde) são ricos em polifenóis e com a função de inibidores das MMPs (DE MORAES et al., 2021; VALADAS et al., 2021). Quando aplicados sobre a dentina, há formação de camada protetora pelas ligações cruzadas (*cross-linking*) entre fibrilas de colágeno. Isso pode ser devido à presença de grupos hidroxila, capazes de induzir mais ligações covalentes e não covalentes pela epigalocatequina-3-galato (EGCG) e outras catequinas que promovem efeito quelante (BEDRAN-RUSSO et al., 2014; DE MORAES et al., 2021;).

A alta atividade biológica e baixa toxicidade dos extratos naturais ricos em polifenóis pode suprimir a atividade de MMPs específicas da matriz (MMP-2 e MMP-9), tendo como efeito biológico a inibição da degradação do colágeno e o aumento da reticulação do colágeno (AGUIAR et al., 2014; DE MORAES et al., 2021; YU et al., 2017). Além de bloquear túbulos dentinários, aumentar resistência aos ácidos e reduzir a perda mineral durante novos desafios ácidos (COSTA et al., 2019; PASSOS et al., 2018).

No presente estudo, após o processo de biocorrosão houve aumento da atividade gelatinolítica e expressiva diminuição da atividade após o pré-tratamento com a solução de chá verde + NanoQ. Estes achados estão em concordância com estudos anteriores que mostraram efeitos favoráveis na inibição das metaloproteinases do substrato tratado com chá verde (ANSHIDA et al., 2020; DE MORAES et al., 2021; COSTA et al., 2019).

A técnica de zimografia *in situ* permitiu avaliar a eficácia de diferentes biomodificadores para inibir a atividade enzimática, o que pode auxiliar no desenvolvimento de novas técnicas e materiais para melhorar a qualidade das restaurações adesivas (MAZZONI et al., 2012, MARAVIC et al., 2021; QUEIROZ et al., 2019). Essa técnica foi escolhida para detectar e localizar atividades específicas das proteases na dentina utilizando a microscopia de fluorescência. Esses achados mostraram a ativação das MMPs na dentina, em processos fisiológicos e aumentado no patológico (biocorrosão), indicando um provável mecanismo envolvido na degradação da camada híbrida (MAZZONI et al., 2012, MARAVIC et al., 2021).

Neste estudo, a segunda hipótese foi rejeitada, pois a atividade enzimática foi inibida pelo uso da solução experimental de Chá verde + NanoQ.

Apesar das características benéficas dos polifenóis do chá verde, a ausência do nanoencapsulamento demonstrou uma queda nas propriedades da *C. sinensis* (ALANIA et al., 2022; ZOKTI et al., 2016). Portanto, a associação de nanopartículas de quitosana tem sido correlacionada a proteção das catequinas do chá verde e o aumento das qualidades biológicas (CAVALCANTE et al., 2020; TYAGI et al., 2021; WANG, C., et al., 2021; ZOKTI et al., 2016).

A nanoquitosana tem propriedades de um biomaterial favorável (CURYLOFO-ZOTTI et al., 2021; DE SOUSA et al., 2021) com a capacidade de diminuir a atividade e inativar as MMPs (NEVES et al., 2021). Estudo anterior associando chá verde + NanoQ demonstrou que a biomodificação da dentina parcialmente desmineraizada previamente ao procedimento adesivo melhorou a microdureza do tecido (CURYLOFO-ZOTTI et al., 2021). No entanto, nenhum estudo foi encontrado verificando a atividade das MMPs na dentina no pré-tratamento com a associação chá verde + NanoQ. Nosso estudo demonstrou que essa solução diminuiu a atividade de proteases endógenas em dentina pós processo de biocorrosão.

Esse fato pode estar relacionado à quantidade de hidroxila livre e grupos aminos que formam complexos iônicos com a nanoquitosana e podem se incorporar com a tripla hélice do colágeno dentinário (MARAVIC et al., 2021). O colágeno reticulado possui ação nos domínios não catalíticos das enzimas, diminuindo a atividade colagenolítica e prejudicando a capacidade das MMPs de reconhecer e clivar o substrato dental (BAENA et al., 2020; CURYLOFO-ZOTTI et al., 2021; MARAVIC et al., 2021).

Além dos testes realizados para avaliar a ação solução de Chá verde + NanoQ na atividade das MMPs, também se utilizou a imunofluorescência para identificação das MMPs. As vantagens do uso com anticorpos clonais primários específicos, estão relacionadas a identificação bioquímica específica das principais MMPs. Porém, apesar de permitir a localização de MMPs específicas, a imunofluorescência não fornece informação sobre a atividade das MMPs (MAZZONI et al., 2012). A zimografia *in situ* foi utilizada neste estudo para solucionar essa limitação.

A MMP-20 observada no nosso estudo está de acordo com outro trabalho no qual identificou a presença na dentina mineralizada e desmineralizada e menor intensidade de fluorescência (MCGUIRE et al., 2014a; RETANA-LOBO et al., 2021; SULKALA et al., 2002).

A MMP-20 tem como principal fonte os odontoblastos no início do desenvolvimento da dentina sendo incorporada na matriz mineralizada (OKAMOTO et al., 2018) e também auxilia na mineralização do esmalte e dentina (MCGUIRE et al., 2014a). Os estudos sugerem que está em envolvida na organização da matriz orgânica durante a formação da dentina e na degradação do colágeno tipo IV (MCGUIRE et al., 2014a; QUEIROZ et al., 2019). A MMP-20 pode ser encontrada nos túbulos dentinários na progressão de processo carioso (OKAMOTO et al., 2018; SULKALA et al., 2002) e também relacionada à degradação da interface dentinária após radioterapia (GOMES-SILVA et al., 2017; MCGUIRE et al., 2014a).

O uso de inibidores de MMPs, antes da aplicação do sistema adesivo na dentina parece ser um passo importante para qualidade da camada híbrida 43,44. A clorexidina como pré-tratamento demonstrou ser eficaz na redução da degradação da interface resina-dentina (DENIZ et al., 2021, GIACOMINI et al., 2020). No entanto, o resultado do presente estudo demonstrou que o uso do chá verde + NanoQ, usado no pré-tratamento da dentina interferiu positivamente na melhora na preservação da qualidade interface adesiva.

No presente estudo, a expressão da MMP-9, por meio de imunofluorescência indireta, foi mais intensa no dente humano do que outras MMPs, o que está de acordo com demais estudos (DE OLIVEIRA et al., 2021; MAZZONI et al., 2007). No entanto, não houve diferença entre os substratos e, portanto, a terceira hipótese não pôde ser rejeitada. Em estudos anteriores foram identificadas as MMP-9 em dentes permanentes em túbulos dentinários e dentina intertubular (NIU et al., 2011; MAZZONI et al., 2007, 2009). As MMP-9 também foram detectadas em lesões cariosas (BALLAL et al., 2021) e na biocorrosão dental (MCGUIRE et al., 2014b; ORTIZ et al., 2021). Um fator importante foi a maior expressão das MMP-9 em pacientes com distúrbio de refluxo gastroesofágico (MONTIEL-JARQUÍN et al., 2019) e em condições clínicas podem contribuir para progressão da biocorrosão dental (PEUMANS; POLITANO; VAN MEERBEEK, 2020).

Uma das limitações desta pesquisa foi o fato de ser um estudo *in vitro*. Na cavidade oral há diversos fatores que podem levar à deterioração da restauração. Além disso, não houve forças mastigatorias e situações mais severas (estágios mais avançados de biocorrosão), que frequentemente podem ser observadas na clínica e certamente afetariam os resultados.

Considerando os desfechos relatados, destaca-se a importância de realizar estratégias para compensar a força de união reduzida na dentina biocorroída antes da aplicação do adesivo. Devido aos resultados promissores da nova solução experimental testada, estudos adicionais serão conduzidos para avaliar a aplicação clínica do pré-tratamento da dentina com a solução de chá verde + NanoQ e, no futuro, melhor regular a atividade das MMPs e os resultados dos procedimentos adesivos na Odontologia.

Conclusões



De acordo com os resultados obtidos nesse estudo *in vitro* concluir que:

- A biocorrosão dental afetou negativamente a adesividade do material restaurador à dentina;
- A aplicação da solução experimental de chá verde + NanoQ previamente ao adesivo mostrou efeitos positivos na resistência de união do material restaurador nas dentinas hídida e biocorroída;
- A dentina com pré-tratamento de chá verde + NanoQ demonstrou interface adesiva uniforme e com poucas fendas;
- A solução de chá verde + NanoQ diminuiu a atividade das MMPs em dentina biocorroída de modo semelhante à clorexidina;

A MMP-9 teve maior expressão do que a MMP-20, independentemente do substrato ou do tratamento prévio.

Referências



- ABUDUREHEMAN, B.; YU, X.; FANG, D.; ZHANG, H. Enzymatic oxidation of tea catechins and its mechanism. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 942-967, 2022.
- AGUIAR, T. R.; VIDAL, C. M. P.; PHANSALKAR, R. S.; TODOROVA, I.; NAPOLITANO, J. G.; MCALPINE, J. B.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F.; BEDRAN-RUSSO, A. K. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 4, p. 417-422, 2014.
- ALANIA, Y.; ZHOU, B.; REIS, M.; LEME-KRAUS, A. A.; MCALPINE, J. B.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F.; BEDRAN-RUSSO, A. K. Paradoxical effects of galloyl motifs in the interactions of proanthocyanidins with collagen-rich dentin. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 110, n. 1, p. 196-203, 2022.
- ALBUQUERQUE, N.; NERI, J. R.; LEMOS, M.; YAMAUTI, M.; DE SOUSA, F.; SANTIAGO, S. L. Effect of polymeric microparticles loaded with catechin on the physicochemical properties of an adhesive system. **Operative Dentistry**, v. 44, n. 4, p. E202-E211, 2019.
- AHMET, B.S.O.; SESEOGULLARI-DIRIHAN, R.; TEZVERGIL-MUTLUAY, A. Activation of matrix-bound endogenous proteases by self-etch adhesives. **Dental Materials Journal**, v. 39, n. 6, p. 1044-1049, 2020.
- AMAECHE, B. T.; HIGHAM, S. M.; EDGAR, W. M. Techniques for the production of dental eroded lesions in vitro. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 26, n. 2, p. 97-102, 1999.
- ANSHIDA, V.; KUMARI, Ra.; MURTHY, C.; SAMUEL, A. Extracellular matrix degradation by host matrix metalloproteinases in restorative dentistry and endodontics: An overview. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 24, n. 2, p. 352-361, 2020.
- ANASTASIADIS K, VERDELIS K, ELIADES G. The effect of universal adhesives on dentine collagen. **Dental Materials**, v. 37, n. 8, p. 1316-1324, 2021.
- ARNAUD, T. M. S.; DE BARROS NETO, B.; DINIZ, F. B. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: An in vitro evaluation. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 11, p. 848-852, 2010.
- BAENA, E.; CUNHA, S. R.; MARAVIĆ, T.; COMBA, A.; PAGANELLI, F.; ALESSANDRI-BONETTI, G.; CEBALLOS, L.; TAY, F. R.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A. Effect of chitosan as a cross-linker on matrix metalloproteinase activity and bond stability with different adhesive systems. **Marine Drugs**, v. 18, n. 5, p. 263-277, 2020.
- BALLAL, N. V.; DUNCAN, H. F.; WIEDEMEIER, D. B.; RAI, N.; JALAN, P.; BHAT, V.; BELLE, V. S.; ZEHNDER, M. MMP-9 Levels and NaOCl lavage in randomized trial on direct pulp capping. **Journal of Dental Research**, v. 101, n. 4, p. 414-419, 2021.

- BANDEIRA, M. F. C. L.; FREITAS, A. L.; MENEZES, M. de S. C.; SILVA, J. dos S.; SOMBRA, G. A. D.; ARAÚJO, E. A. M.; TODA, C.; MORESCHI, A. R. C.; CONDE, N. C. de O. Adhesive resistance of a copaiba oil-based dentin biomodifier. **Brazilian Oral Research**, v. 34, e.001, 2020.
- BEDRAN-RUSSO, A. K.; PAULI, G. F.; CHEN, S.-N.; MCALPINE, J.; CASTELLAN, C. S.; PHANSALKAR, R. S.; AGUIAR, T. R.; VIDAL, C. M. P.; NAPOTILANO, J. G.; NAM, J.-W.; LEME, A. A. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. **Dental Materials**, v. 30, n. 1, p. 62–76, 2014.
- BELMAR DA COSTA, M.; DELGADO, A. H. S.; PINHEIRO DE MELO, T.; AMORIM, T.; MANO AZUL, A. Analysis of laboratory adhesion studies in eroded enamel and dentin: a scoping review. **Biomaterial Investigations in Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 24–38, 2021.
- BETANCOURT, D. E.; BALDION, P. A.; CASTELLANOS, J. E. Resin-Dentin Bonding Interface: Mechanisms of Degradation and Strategies for Stabilization of the Hybrid Layer. **International Journal of Biomaterials**, v. 2019, ID 5268342, 2019.
- BUZALAF, M. A. R.; MAGALHÃES, A. C.; RIOS, D. Prevention of erosive tooth wear: Targeting nutritional and patient-related risks factors. **British Dental Journal**, v. 224, n. 5, p. 371-378, 2018.
- CABRAL-PACHECO, G. A.; GARZA-VELOZ, I.; ROSA, C. C. D. La; RAMIREZ-ACUÑA, J. M.; PEREZ-ROMERO, B. A.; GUERRERO-RODRIGUEZ, J. F.; MARTINEZ-AVILA, N.; MARTINEZ-FIERRO, M. L. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9739-9793. 2020.
- CAVALCANTE L.L.R.; TEDESCO A.C.; TAKAHASHI L.A.U.; CURYLOFO-ZOTTI F.A.; SOUZA-GABRIEL A.E.; CORONA S.A.M. Conjugate of chitosan nanoparticles with chloroaluminium phthalocyanine: Synthesis, characterization and photoinactivation of *Streptococcus mutans* biofilm. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, p. 101709-101718, 2020.
- CARDENAS A.F.M.; ARAUJO L.C.R.; SZESZ A.L. DE JESUS TAVAREZ R.R.; SIQUEIRA F.S.F.; REIS A.; LOGUERCIO A.D. Influence of Application of Dimethyl Sulfoxide on the Bonding Properties to Eroded Dentin. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v. 23, n. 6, p. 589-598, 2021.
- CHEN H.; FENG S.; JIN Y.; HOU Y.; ZHU S. Comparison of bond strength of universal adhesives using different etching modes: A systematic review and meta-analysis. **Dental Materials Journal**, v. 41, n. 1, p. 1-10, 2022.
- COSTA, C. A. G. De; PASSOS, V. F.; NERI, J. R.; MENDONÇA, J. S.; SANTIAGO, S. L. Effect of Metalloproteinase Inhibitors on bond strength of a self-etching adhesive on erosively demineralized dentin. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v. 21, n. 4, p. 337–344, 2019.

- CURYLOFO-ZOTTI F.A.; TEDESCO A.C.; LIZARELLI G.T.C; TAKAHASHI L.A.U; CORONA S.A.M. Effect of green tea-loaded chitosan nanoparticles on leathery dentin microhardness. **Odontology**, v. 109, n. 4, p. 860-867, 2021.
- DAOOD, U.; AKRAM, Z.; MATINLINNA, J. P.; FAWZY, A. S. Dentine collagen cross-linking using tiopronin-protected Au/EDC nanoparticles formulations. **Dental Materials**, v. 35, n. 7, p. 1017–1030, 2019.
- DE CARVALHO, F. G.; MAGALHÃES, T. C.; TEIXEIRA, N. M.; GONDIM, B. L. C.; CARLO, H. L.; DOS SANTOS, R. L.; DE OLIVEIRA, A. R.; DENADAI, Â. M. L. Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation. **Materials Science and Engineering**, v. 104, p. 109885-109894, 2019.
- DE MORAES, M.D.; CARNEIRO J.R.; PASSOS V.F.; SANTIAGO S.L. Effect of green tea as a protective measure against dental erosion in coronary dentine. **Brazilian Oral Research**, v. 30, e13, 2016.
- DE MORAES, M. D. R.; PASSOS, V. F.; PADOVANI, G. C.; BEZERRA, L. C. B. da R.; VASCONCELOS, I. M.; SANTIAGO, S. L. Protective effect of green tea catechins on eroded human dentin: an in vitro/in situ study. **Brazilian Oral Research**, v. 35, e108, 2021.
- DE SOUZA, J. C.; TEDESCO, A. C.; TAKAHASHI, L. A. U.; CURYLOFO-ZOTTI, F. A.; SOUZA-GABRIEL, A. E.; CORONA, S. A. M. Influence of nanoparticulated chitosan on the biomodification of eroded dentin: clinical and photographic longitudinal analysis of restorations. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 32, n. 1, p. 11-19, 2021.
- DENIZ, S.T.; OGLAKCI, B.; YESILIRMAK, S.O.; DALKILIC, E.E. The effect of immediate dentin sealing with chlorhexidine pretreatment on the shear bond strength of dual-cure adhesive cement. **Microscopy research and technique Microsc**, v. 84, n. 12, p. 3204-3210, 2021.
- DIETZ, C.; DEKKER, M. Effect of Green Tea Phytochemicals on Mood and Cognition. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 19, p. 2876–2905, 2017.
- DONOVAN, T.; NGUYEN-NGOC, C.; ABD ALRAHEAM, I.; IRUSA, K. Contemporary diagnosis and management of dental erosion. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 33, n. 1, p. 78–87, 2021.
- FAKHRI, E.; ESLAMI, H.; MAROUFI, P.; PAKDEL, F.; TAGHIZADEH, S.; GANBAROV, K.; YOUSEFI, M.; TANOMAND, A.; YOUSEFI, B.; MAHMOUDI, S.; KAFIL, H. S. Chitosan biomaterials application in dentistry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 956–974, 2020.

- FREITAS, P. H.; ANDRÉ, C. B.; FRONZA, B. M.; GIANNINI, M.; ROSALEN, P. L.; CONSANI, S.; FRANÇA, R. Physicochemical properties, metalloproteinases inhibition, and antibiofilm activity of doxycycline-doped dental adhesive. **Journal of Dentistry**, v. 104, 103550, 2021.
- GOBBI, P.; MARAVIC, T.; COMBA, A.; MAZZITELLI, C.; MANCUSO, E.; FALCONI, M.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A. Biochemical and immunohistochemical analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in human sound dentin. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, n. 8, p. 5067-5075, 2021
- GRIPPO, J. O.; COLEMAN, T. A.; MESSINA, A. M.; OH, D. S. A literature review and hypothesis for the etiologies of cervical and root caries. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 30, n. 3, p. 187-192, 2018.
- GIACOMINI, M.C.; SCAFFA, P.M.C.; GONÇALVES, R.S.; ZABEU G.S.; VIDAL, C.M.P.; CARRILHO, M.R.O.; HONÓRIO, H.M.; WANG, L. Profile of a 10-MDP-based universal adhesive system associated with chlorhexidine: Dentin bond strength and in situ zymography performance. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 110, p. 103925-10401, 2020.
- HANNAS, A. R.; KATO, M. T.; CARDOSO, C. A. B.; MAGALHÃES, A. C.; PEREIRA, J. C.; TJÄDERHANE, L.; BUZALAF, M. A. R. Preventive effect of toothpastes with MMP inhibitors on human dentine erosion and abrasion in vitro. **Journal of Applied Oral Science**, v. 24, n. 1, p. 61-66, 2016.
- JAGER D.H; VIEIRA A.M.; RUBEN J.L.; HUYSMANS M.C. Estimated erosive potential depends on exposure time. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 12, p. 1103-1108, 2012.
- JOÃO-SOUZA, S. H.; SCARAMUCCI, T.; BÜHLER BORGES, A.; LUSSI, A.; SAADS CARVALHO, T.; CORRÊA ARANHA, A. C. Influence of desensitizing and anti-erosive toothpastes on dentine permeability: An in vitro study. **Journal of Dentistry**, v. 89, 103176, 2019.
- KANZOW, P.; WIEGAND, A.; WEGEHAUPT, F. J.; ATTIN, T. Etiology and pathogenesis of dental erosion. **Quintessence International**, v. 47, n. 4, p. 275-278, 2016.
- KANNIAPPAN G.; HARI P.; JUJARE R.H. Comparative Evaluation of Resin Dentin Interface using Universal and Total- Etch Adhesive Systems on Sound and Eroded Dentin: In Vitro Study. **European Journal of Dentistry**. v. 16, n. 1, p. 153-160, 2022.
- KATO, M. T.; HANNAS, A. R.; CARDOSO, C. A. B.; CASSIANO, L. P. S.; NAVES, P. A.; MAGALHÃES, A. C.; TJÄDERHANE, L.; BUZALAF, M. A. R. Dentifrices or gels containing MMP inhibitors prevent dentine loss: in situ studies. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, n. 4, p. 2183-2190, 2021.

- KUMAR, S.; MEENA, R.; RAJAMANI, P. Fabrication of BSA–Green Tea Polyphenols–Chitosan Nanoparticles and Their Role in Radioprotection: A Molecular and Biochemical Approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 30, p. 6024-6034, 2016.
- LI, Z.; HA, J.; ZOU, T.; GU, L. Fabrication of coated bovine serum albumin (BSA)-epigallocatechin gallate (EGCG) nanoparticles and their transport across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1278-1285, 2014.
- LUCIANO L.C.O.; FERREIRA M.C.; PASCHOAL M.A. Prevalence and factors associated with dental erosion in individuals aged 12-30 years in a northeastern Brazilian city. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 9, p. 85-91, 2017.
- MARAVIC T.; BRESCHI L.; PAGANELLI F.; BONETTI G.A.; MARTINA S.; DI GIORGIO G.; BOSSÙ M.; POLIMENI A.; CHECCHI V.; GENERALI L.; TAY F.R.; CADENARO M.; MAZZONI A. Endogenous Enzymatic Activity of Primary and Permanent Dentine. **Materials**, v. 14, n. 14, p. 4043-4051, 2021.
- MAZUR, M.; NDOKAJ, A.; JEDLINSKI, M.; ARDAN, R.; BIETOLINI, S.; OTTOLENGHI, L. Impact of Green Tea (*Camellia Sinensis*) on periodontitis and caries. Systematic review and meta-analysis. **Japanese Dental Science Review**, v. 57, p. 1-11, 2021.
- MAZZONI, A.; MANNELLO, F.; TAY, F. R.; TONTI, G. A. M.; PAPA, S.; MAZZOTTI, G.; DI LENARDA, R.; PASHLEY, D. H.; BRESCHI, L. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 5, p. 436-440, 2007.
- MAZZONI, A.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; GOBBI, P.; ORSINI, G.; RUGGERI, A.; CARRILHO, M.; TJÄDERHANE, L.; DI LENARDA, R.; BRESCHI, L. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 88, n. 3, p. 697-703, 2009.
- MAZZONI, A.; NASCIMENTO, F. D.; CARRILHO, M.; TERSARIOL, I.; PAPA, V.; TJÄDERHANE, L.; DI LENARDA, R.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; BRESCHI, L. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. **Journal of Dental Research**, v. 91, n. 5, p. 467-72, 2012.
- MAZZONI A.; ANGELONI V.; COMBA A.; MARAVIC T.; CADENARO M.; TEZVERGIL-MUTLUAY A.; PASHLEY D.H.; TAY F.R.; BRESCHI L. Cross-linking effect on dentin bond strength and MMPs activity. **Dental Materials**, v. 34, n. 2, p. 288-295, 2018.

- MCGUIRE, J. D.; MOUSA, A. A.; ZHANG, B. J.; TODOKI, L. S.; HUFFMAN, N. T.; CHANDRABABU, K. B.; MORADIAN-OLDAK, J.; KEIGHTLEY, A.; WANG, Y.; WALKER, M. P.; GORSKI, J. P. Extracts of irradiated mature human tooth crowns contain MMP-20 protein and activity. **Journal of Dentistry**, v. 42, n. 5, p. 626-635, 2014a.
- MCGUIRE, J. D.; GORSKI, J. P.; DUSEVICH, V.; WANG, Y.; WALKER, M. P. Type IV collagen is a novel DEJ biomarker that is reduced by radiotherapy. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 10, p. 1028-1034, 2014b.
- MELO E.S.P.; MELO E.; ARAKAKI D.; MICHELS F.; NASCIMENTO V.A. Methodology to Quantify and Screen the Demineralization of Teeth by Immersing Them in Acidic Drinks (Orange Juice, Coca-Cola™, and Grape Juice): Evaluation by ICP OES. **Molecules**, v. 26, n. 11, p.3337-3352, 2021.
- MENG, Y.; HUANG, F.; WANG, S.; LI, M.; LU, Y.; PEI, D.; LI, A. Bonding Performance of Universal Adhesives Applied to Nano-Hydroxyapatite Desensitized Dentin Using Etch-and-Rinse or Self-Etch Mode. **Materials**, v. 14, n. 16, 4746-4761, 2021.
- MONTIEL-JARQUÍN, Á. J.; VÁZQUEZ DE LARA-CISNEROS, L. G.; LÓPEZ-COLOMBO, A.; SOLÍS-MENDOZA, H. A.; PALMER-MÁRQUEZ, M. L.; ROMERO-FIGUEROA, M. S. Expression of metalloproteinase-9 in patients with mild and severe forms of gastroesophageal reflux disease. **Cirugia y Cirujanos (English Edition)**, v. 87, n. 4, p. 436–442, 2019.
- NEVES J.G.; MARCATO P.D.; DE PAULA E SILVA F.W.G.; MANTOVANI C.P.T.; PRADO H.S.; AIRES C.P.; MASSARO T.N.C.; BORSATO M.C. Synthesis and characterization of an experimental primer containing chitosan nanoparticles - Effect on the inactivation of metalloproteinases, antimicrobial activity and adhesive strength. **Archives of Oral Biology**, v. 127, p. 105148-105154, 2021.
- NIU, L. N.; ZHANG, L.; JIAO, K.; LI, F.; DING, Y. X.; WANG, D. Y.; WANG, M. Q.; TAY, F. R.; CHEN, J. H. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. **Journal of Dentistry**, v. 39, n. 8, p. 536–542, 2011.
- OKAMOTO, M.; TAKAHASHI, Y.; KOMICHI, S.; COOPER, P. R.; HAYASHI, M. Dentinogenic effects of extracted dentin matrix components digested with matrix metalloproteinases. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10690-10706, 2018.
- ORTIZ, A. D. C.; FIDELES, S. O. M.; POMINI, K. T.; BUCHAIM, R. L. Updates in association of gastroesophageal reflux disease and dental erosion: systematic review. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 9, p. 10371046, 2021.
- PASCHOINI, V. L.; ZIOTTI, I. R.; NERI, C. R.; CORONA, S. A. M.; SOUZA-GABRIEL, A. E. PASCHOINI. Chitosan improves the durability of resin-dentin interface with etch-and-rinse or self-etch adhesive systems. **Journal of Applied Oral Science**, v. 29, e20210356, 2021.

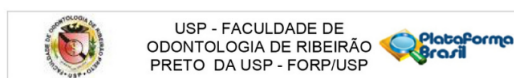
- PASSOS, V. F.; MELO, M. A. S. De; LIMA, J. P. M.; MARÇAL, F. F.; COSTA, C. A. G. de A.; RODRIGUES, L. K. A.; SANTIAGO, S. L. Active compounds and derivatives of camellia sinensis responding to erosive attacks on dentin. **Brazilian Oral Research**, v. 32, e40, 2018.
- PEUMANS, M.; POLITANO, G.; VAN MEERBEEK, B. Treatment of noncarious cervical lesions: when, why, and how. **The International Journal of Esthetic Dentistry**, v. 15, n. 1, p. 16–42, 2020.
- PICOS, A.; BADEA, M. E.; DUMITRASCU, D. L. Dental erosion in gastro-esophageal reflux disease. A systematic review. **Medicine and Pharmacy Reports**, v. 91, n. 4, p. 387–390, 2018.
- PRAKKI, A.; XIONG, Y.; BORTOLATTO, J.; GONÇALVES, L. L.; BAFAIL, A.; ANDERSON, G.; STAVROULLAKIS, A. T. Functionalized epigallocatechin gallate copolymer inhibit dentin matrices degradation: Mechanical, solubilized telopeptide and proteomic assays. **Dental Materials**, v. 34, n. 11, p. 1625–1633, 2018.
- QUEIROZ, A. M.; BONILLA, C. M. C.; PALMA-DIBB, R. G.; OLIVEIRA, H. F.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L. A. B.; LUCISANO, M. P.; PAULA-SILVA, F. W. G. Radiotherapy Activates and Protease Inhibitors Inactivate Matrix Metalloproteinases in the Dentinoenamel Junction of Permanent Teeth. **Caries Research**, v. 53, n. 3, p. 253–259. 2019.
- RETANA-LOBO, C.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; TANOMARU-FILHO, M.; MENDES DE SOUZA, B. D.; REYES-CARMONA, J. Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Downregulate MMP Expression on Radicular Dentin. **International Journal of the Kuwait University**, v. 30, n. 5, p. 470–476, 2021.
- SHAHCHERAGHI, N.; GOLCHIN, H.; SADRI, Z.; TABARI, Y.; FOROUGH BORHANIFAR, .; MAKANI, S. Nano-biotechnology, an applicable approach for sustainable future. **3 Biotech**, v. 12, n. 3, p. 1–24, 2022.
- SHETTA, A.; KEGERE, J.; MAMDOUH, W. Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, in-vitro release, antioxidant and antibacterial activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 731–742, 2019.
- SIQUEIRA, F. S. F.; CARDENAS, A. M.; HASS, V.; BANDECA, M. C.; OCAMPO, J. B.; GOMES, J. C.; REIS, A.; LOGUERCIO, A. D. Bonding performance of universal adhesives to eroded dentin. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 20, n. 2, p. 121–132, 2018a.
- SIQUEIRA F.; CARDENAS A.; GOMES G.M.; CHIBINSKI A.C.; GOMES O.; BANDECA M.C.; LOGUERCIO A.D.; GOMES J.C. Three-year effects of deproteinization on the in vitro durability of resin/dentin-eroded interfaces. **Operative Dentistry**. V.43, n. 1, p. 60-70, 2018b.

- SIQUEIRA F.S.F.; SZESZ A.L.; MOREIRA P.H.A.; ARAUJO L.C.R.; REIS A.; CARDENAS A.F.M.; LOGUERCIO A.D. Collagen cross-linking agents + dimethyl sulfoxide improving the adhesive properties of erosive lesion dentin. **Brazilian Dental Journal**, v. 32, n. 6, p. 93-106, 2021.
- SOUZA M.Y.; DI NICOLÓ R.; BRESCIANI E. Influence of ethanol-wet dentin, adhesive mode of application, and aging on bond strength of universal adhesive. **Brazilian Oral Research**. v. 32, e102, 2018.
- SULKALA, M.; LARMAS, M.; SORSA, T.; SALO, T.; TJÄDERHANE, L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 9, p. 603–607, 2002.
- TEIXEIRA, A. M.; SOUSA, C. A Review on the Biological Activity of Camellia Species. **Molecules**, v. 26, n. 8, p. 2178-2042, 2021.
- TÜRKÖZÜ, D.; TEK, N. A. A minireview of effects of green tea on energy expenditure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 254-258, 2017.
- TYAGI, T.; GARLAPATI, P. K.; YADAV, P.; NAIKA, M.; MALLYA, A.; KANDANGATH RAGHAVAN, A. Development of nano-encapsulated green tea catechins: Studies on optimization, characterization, release dynamics, and in-vitro toxicity. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 11, e13951, 2021.
- URURAHY, M. S. L.; CURYLOFO-ZOTTI, F. A.; LIZARELLI, G. T. C.; DOS REIS, A. B.; RAMOS, A. P.; CORONA, S. A. M. Effect of phosphorylated chitosan and carbodiimide biomodification on the chemical composition of eroded dentin. **American Journal of Dentistry**, v. 34, n. 2, p. 105-109, 2021.
- URURAHY M.S.; CURYLOFO-ZOTTI F.A.; GALO R.; NOGUEIRA L.F; RAMOS A.P; CORONA S.A. Wettability and surface morphology of eroded dentin treated with chitosan. **Archives of Oral Biology**, v. 75, p. 68-73, 2017.
- VERMELHO P.M.; REIS A.F.; AMBROSANO GMB, GIANNINI M. Adhesion of multimode adhesives to enamel and dentin after one year of water storage. **Clinical Oral Investigations**. v. 21, n. 5, p. 1707-1715, 2017.
- VIEIRA G.C.S.; ANTUNES H.S.; PÉREZ A.R.; GONÇALVES L.S.; ANTUNES F.E.; SIQUEIRA J.F. JR.; RÔÇAS I.N. Molecular analysis of the antibacterial effects of photodynamic therapy in endodontic surgery: a case series. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 10, p. 1593-1597, 2018.
- VALADAS L.A.R.; DE OLIVEIRA FILHO R.D.; RODRIGUES NETO E.M.; BANDEIRA M.A.M.; FONTELES M.M.F.; PASSOS V.F.; FIALLOS A.C.M.; LOTIF M.A.L.; DE SENA N.J.C.; DANTAS T.C.F.B.; LIMA SOARES I.; LOBO P.L.D.; SQUASSI A.F. Camellia sinensis in Dentistry: Technological prospection and scientific evidence. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 30, 9966738, 2021.

- VANUSPONG, W.; EISENBURGER, M.; ADDY, M. Cervical tooth wear and sensitivity: erosion, softening and rehardening of dentine; effects of pH, time and ultrasonication. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 4, p. 351-357, 2002.
- WANG, Y. L.; CHANG, H. H.; CHIANG, Y. C.; LU, Y. C.; LIN, C. P. Effects of fluoride and epigallocatechin gallate on soft-drink-induced dental erosion of enamel and root dentin. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 117, n. 4, p. 276-282, 2018.
- WANG, C.; CHEN, P. X.; XIAO, Q.; YANG, Q. M.; WENG, H. F.; ZHANG, Y. H.; XIAO, A. F. Chitosan activated with genipin: a nontoxic natural carrier for tannase immobilization and its application in enhancing biological activities of tea extract. **Marine Drugs**, v. 19, n. 3, p. 166-184, 2021.
- WIEGAND, A.; LECHTE, C.; KANZOW, P. Adhesion to eroded enamel and dentin: systematic review and meta-analysis. **Dental Materials**, v. 37, n. 12, p. 1845-1853, 2021.
- YU H.H.; ZHANG L.; XU S.; LI F.; YU F.; LIU Z.Y.; HUANG L.; CHEN J.H. Effects of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the bond strength of fiber posts to Sodium hypochlorite (NaOCl) treated intraradicular dentin. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4235. 2017.
- 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.
- ZIMMER S.; KIRCHNER G.; BIZHANG M.; BENEDIX M. Influence of various acidic beverages on tooth erosion. Evaluation by a new method. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. 0129462. 2015.
- ZOKTI J.A.; SHAM BAHARIN B.; MOHAMMED A.S.; ABAS F. Green Tea Leaves Extract: Microencapsulation, Physicochemical and Storage Stability Study. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 940, 2016.

Anexos





USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP - FORP/USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade de gelatinases e resistência de união da interface adesiva após tratamento da dentina erodida com extrato de chá verde encapsulado com nanopartículas de quitosana

Pesquisador: JULIANE SILVA RODRIGUES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 27613419.0.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.897.534

Apresentação do Projeto:

Trata-se de nova submissão de projeto de pesquisa para análise no CEP - FORP-USP, em atendimento ao parecer anterior (07/02/2020) com situação "Pendente".

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a atividade das MMPs em dentina e a resistência de união da interface adesiva após a biomodificação da dentina com nanopartículas de quitosana incorporadas com compostos biologicamente ativos do extrato de chá verde.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

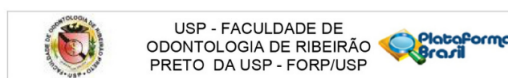
Como trata-se de estudo experimental, utilizando dentes humanos oriundos de banco de dentes, a avaliação de riscos e benefícios "não se aplica".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto tem fundamentação científica e descreve detalhadamente os objetivos, métodos, forma de análise dos resultados e cronograma.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou declarações do Biobanco de dentes, folha de rosto e autorizações de infraestrutura.



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP - FORP/USP



Continuação do Parecer: 3.897.534

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa aprovado.

Considerações Finais e critério do CEP:

Projeto aprovado conforme deliberado na 234ª Reunião Ordinária do CEP/FORP de 02/03/2020.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1484415.pdf	17/02/2020 15:23:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	17/02/2020 15:19:57	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infra2.pdf	17/02/2020 15:14:17	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infra1.pdf	17/02/2020 15:13:58	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	12/12/2019 11:19:42	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biobancotres.pdf	12/12/2019 11:19:29	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	bancodentesdois.pdf	12/12/2019 11:18:50	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	bancodentes.pdf	12/12/2019 11:15:29	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito

Situação do Parecer:

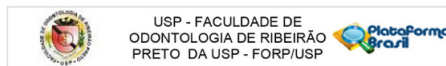
Aprovado

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: csp@forp.usp.br

Página 01 de 03

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: csp@forp.usp.br

Página 02 de 03



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP - FORP/USP

Continuação do Parecer: 3.897.534

Necessita Apreciação da CONEP:

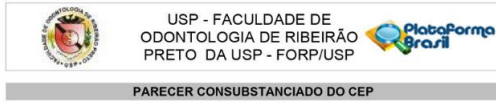
Não

RIBEIRÃO PRETO, 04 de Março de 2020

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: csp@forp.usp.br

Página 03 de 03



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Atividade de gelatinas e resistência de união da interface adesiva após tratamento da dentina erodida com extrato de chá verde encapsulado com nanopartículas de quitosana

Pesquisador: JULIANE SILVA RODRIGUES

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 27613419.0.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.023.829

Apresentação do Projeto:

Emenda. Devido a pandemia e a suspensão das atividades na Universidade não foi possível executar o projeto no tempo descrito anteriormente. Sendo que o prazo na pós graduação foi estendido até dia 28/02/2022.

Objetivo da Pesquisa:

Os mesmos descritos inicialmente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os mesmos descritos inicialmente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Solicitação de prorrogação de prazo. Emenda justificada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide o item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Vide o item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada.

Endereço: Avenida do Café s/nº - Bloco K, sala K.10
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br



Continuação do Parecer: 5.023.829

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda aprovada conforme deliberado na 252ª Reunião Ordinária do CEPIFORP de 05/10/2021.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_183053_8_ET1.pdf	29/09/2021 11:35:56		Aceito
Outros	relatorio_parcial.pdf	29/09/2021 11:08:03	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Outros	emenda_pdf.pdf	29/09/2021 11:06:49	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projeto.pdf	17/02/2020 15:19:57	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Investigador	infra2.pdf	17/02/2020 15:14:17	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infra1.pdf	17/02/2020 15:13:58	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	12/12/2019 11:19:42	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biopostório / Biobanco	biobancotres.pdf	12/12/2019 11:19:29	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biopostório / Biobanco	bancodedentesdois.pdf	12/12/2019 11:18:50	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biopostório / Biobanco	bancodedentes.pdf	12/12/2019 11:15:29	JULIANE SILVA RODRIGUES	Aceito

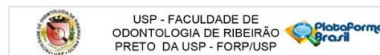
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Avenida do Café s/nº - Bloco K, sala K.10
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

Página 02 de 03



Continuação do Parecer: 5.023.829

Não

RIBEIRÃO PRETO, 06 de Outubro de 2021

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
 (Coordenadora)

Endereço: Avenida do Café s/nº - Bloco K, sala K.10
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

Página 03 de 03