



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

BEATRIZ MARIA DA FONSECA

**PROPRIEDADES MECÂNICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E
BIOLÓGICA DE ADESIVO EXPERIMENTAL COM
INCORPORAÇÃO DE EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO**

2015

BEATRIZ MARIA DA FONSECA

**PROPRIEDADES MECÂNICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E
BIOLÓGICA DE ADESIVO EXPERIMENTAL COM
INCORPORAÇÃO DE EPIGALOCATEQUINA-3-
GALATO**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade de DENTÍSTICA.

Orientador: Prof. Adj. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves
Co-orientadora: Profa. Dra. Anuradha Prakki (University of Toronto)

São José dos Campos
2015

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2015.

Fonseca, Beatriz Maria da

Propriedades mecânicas, físico-químicas e biológica de adesivo
experimental com incorporação de epigalocatequina-3-galato /
Beatriz Maria da Fonseca. - São José dos Campos : [s.n.], 2015.
142 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em
Odontologia Restauradora - Instituto de Ciência e Tecnologia de São
José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2015.

Orientador: Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves

Co-orientador: Anuradha Prakki.

1. Resistência Adesiva. 2. Dentina. 3. Monômeros. 4. Adesivo. I.
Gonçalves, Sérgio Eduardo de Paiva, orient. II. Prakki, Anuradha, co-
orient. III. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos
Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. IV. Universidade Estadual
Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ Estadual
Paulista. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 29 de outubro de 2015
E-mail: beatrizmfonseca@bol.com.br

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Tit. Kátia Regina Hostílio Cervantes Dias

Faculdade de Odontologia do Centro de Ciências de Saúde
UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Roberta Caroline Bruschi Alonso

Faculdade de Odontologia
Universidade Anhanguera de São Paulo

Prof. Adj. César Rogério Pucci

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 29 de Outubro de 2015.

DEDICATÓRIA

A Deus, acima de tudo por estar ao meu lado em todos os momentos, principalmente àqueles que pareciam impossíveis e os quais pensei em desistir. Por me dar forças e me fazer seguir em frente, e por colocar pessoas especiais ao longo dessa jornada para que o trajeto fosse percorrido de forma mais leve e suave.

*Aos meus queridos pais e maiores incentivadores, **Antonio e Angelica**, por todo investimento, apoio e credibilidade ao longo de todos esses anos. Por acreditar em minha capacidade intelectual e profissional. E principalmente por todas as abdições para que eu chegasse até aqui. Vocês com certeza são meus maiores exemplos. Espero que um dia eu consiga retribuir tudo que sempre fizeram e tenho certeza que ainda farão por mim. Devo tudo à vocês, e mais essa conquista é para vocês e com vocês e de vocês. E por mais palavras que eu possa usar para expressar tudo o que sinto, seriam insuficientes para agradecer por tudo que são e representam para mim.*

Por isso só tenho como dizer Muito Obrigada!

*A minha irmã **Camila**, por toda ajuda, incentivo e apoio ao longo dessa fase. Por ter me ouvido incansáveis vezes me preparando para as apresentações, lamuriando as frustrações ocorridas durante o caminho e os dias em que tudo parecia não dar certo e acabava descontando em você.*

Obrigada por estar ao meu lado sempre e por ter em mim um exemplo a seguir.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Adjunto **Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves**, por ter me acolhido com tanto carinho quando troquei de orientador. Pelo conhecimento e experiência passados durante o doutorado. Foi muito gratificante o convívio durante esses anos e por me permitir fazer parte da “Família Gonçalves”. Obrigada por ter me dado liberdade para expressar minhas ideias e opiniões e por permitir que eu continuasse em minha linha de pesquisa. Guardarei com imenso carinho e admiração ter sido sua orientada.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. **Anuradha Prakki** da Universidade de Toronto no Canadá, por todo apoio durante a elaboração do projeto de pesquisa, formulação dos adesivos experimentais e as etapas laboratoriais da tese. Pelos e-mails prontamente respondidos, dúvidas cessadas e reuniões por Skype. A distância física foi um mero detalhe nessa nossa parceria. Sua ajuda foi fundamental para execução deste trabalho. Meu muito obrigada!

A todos os professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, em nome da Profa. Titular **Kátia Regina Cervantes Dias**, por terem me apoiado durante toda Graduação e Especialização em Dentística, e por toda ajuda

necessária durante a minha formação para eu chegasse até aqui.

A toda minha família, por todo apoio recebido e pela torcida sincera para que eu alcançasse mais esse objetivo.

Aos meus amigos queridos que sempre me apoiaram e torceram por mim, em especial **Marcelle Almeida, Carolina Berger, Juliane Otoni, Laís Figueiredo, Carlos Rosa, Jorge Ferreira, Jéssica Lopes, Ana Carolina Pimentel**. Obrigada por mostrarem que as verdadeiras amizades permanecem independente da distância física e dos períodos de ausência.

As minhas queridas amigas da “Família Gonçalves” **Daphne Câmara, Tânia Mara, Lucélia Lemes, Stella Esteves, Maria Ângela Esper e Karen Yui**. Foi maravilhoso nosso convívio e troca de experiências. Criamos muito mais que laços de amizade, formamos uma verdadeira família durante essa fase. Sentirei saudades do convívio diário, dos cafés ao fim da tarde, das confraternizações, das horas no laboratório, do ombro amigo quando mais precisei e de toda ajuda prestada durante todo o doutorado. Guardarei com imenso carinho a lembrança de cada uma de vocês.

Aos meus amigos da “República” **Felipe Oliveira, Rodnei Rossoni, Rose Soares e Evelyn Souza**. Obrigada pela amizade criada, as adversidades respeitadas, a sinceridade ímpar, pelo ombro amigo nos momentos mais difíceis e todo carinho comigo

desde que eu cheguei. Vocês foram essenciais.

Aos meus colegas de Pós Graduação em Odontologia Restauradora em Dentística, em especial a **Maria Beatriz Kamozaki, Letícia Perote, Natália Gutierrez, Heleine Rêgo, Rayssa Zanatta, Érica Crastechini, Fernanda Feitosa, Laura Elia e Daniele Ávila**, por terem dividido comigo as experiências da Pós Graduação, pelo apoio quando tudo parecia sem solução, pelas trocas de conhecimento e pela amizade além dos laboratórios de pesquisa.

As meninas da Pós Graduação em Endodontia, **Rafaela Vasconcelos, Gleyce Oliveira e Monique Costa** por todo o carinho e amizade durante todos os anos de convivência, as trocas de experiência entre as diferentes áreas da Odontologia e por serem amigas nos momentos em que mais precisei.

Aos meus colegas de trabalho da Clínica Vipdent, **Larissa Bandeira, Tatiana Gomes, Patrícia Silva, Flávia Tavares, Pâmella Omori e Amaurir Jr.** Em especial ao querido Dr. **Caio Marcelo Lourenço Ferreira**, por ter me apoiado e incentivado durante todo o Doutorado. Por ter me dado oportunidade de trabalhar em sua clínica mesmo sabendo que eu estudava em São Paulo, pelas trocas de experiências, pelos ensinamentos diários, e em especial pela amizade construída. Obrigada por ter acreditado em minha capacidade profissional e por todo incentivo durante essa fase. Tenha certeza que fez toda diferença.

Ao Prof. Adjunto **Alexandre Luiz Souto Borges** por ter me ajudado na parte experimental do trabalho, me permitindo usar os equipamentos do laboratório do departamento de Prótese Dentária da instituição, assim como a salinha de manipulação dos adesivos. E principalmente por ter cessado minhas dúvidas quanto à elaboração da metodologia de vários dos testes que realizei, sempre muito solícito e disposto a ajudar. Tenho certeza que sem sua ajuda parte desse trabalho não teria sido realizado.

Ao Prof. Dr. **Ivan Balducci**, pelas análises estatísticas realizadas não só para a tese, mas também para todos os trabalhos elaborados durante a Pós Graduação.

Ao Prof. Dr. **Eduardo Moreira da Silva** do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense, pela realização das leituras das amostras de interface adesiva da minha tese em Microscópio Eletrônico de Varredura. Por toda a gentileza e disponibilidade em fazer comigo as leituras e pelas trocas de conhecimento em adesão durante esse período.

Ao Dr. **Álvaro José Damião** do Instituto de Estudos Avançados – IEAV de São dos Campos por ter cedido o uso da balança de alta precisão para que eu pudesse fazer as medições do EGCG para manipulação dos adesivos experimentais.

A minha querida amiga Profa. Dra. **Dhapne Câmara Barcellos**, por ter sido uma orientadora para mim, por ter me ajudado em todas as etapas do meu trabalho, desde a ideia inicial, toda a metodologia, elaboração dos resultados, análises estatísticas e ajuda na parte escrita do meu artigo. Tenha absoluta certeza que grande parte da realização desse trabalho eu devo a sua ajuda. Obrigada pelo seu companheirismo e amizade. Sentirei sua falta!

Ao Prof. Assistente **Bruno das Neves Cavalcanti** da Universidade de Michigan nos Estados Unidos. Obrigada por toda ajuda enquanto professor de Endodontia da Faculdade de Odontologia do ICT-UNESP. Pela elaboração e desenvolvimento de toda parte laboratorial do teste de citotoxicidade e por todo ensinamento em biologia celular. Obrigada por tirar minhas dúvidas da parte escrita da metodologia, pela estatística e por fazer comigo toda parte laboratorial.

A Profa. Titular **Maria Amélia Máximo de Araújo**, minha querida orientadora de Mestrado. Obrigada por toda orientação, apoio e carinho durante o Mestrado. Pelo incentivo para que eu fizesse o Doutorado e por toda torcida pelo meu crescimento pessoal e profissional.

A todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora. Em especial aos professores de Dentística **Clóvis Pagani, Filomena Huhtala, Carlos Torres,**

Alessandra Buhler, Taciana Caneppele e Eduardo Bresciani, pela troca de conhecimentos e por todo aprendizado durante essa etapa.

Aos funcionários da FOSJC, em especial as funcionárias do Departamento de Odontologia Restauradora, a secretária Rosângela e as técnicas do laboratório, Josiana e Fernanda. Por toda ajuda e colaboração, se mostrando sempre solícitas e disponíveis.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa da coordenadora Profa. Titular Márcia Carneiro Valera Garakis.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Estevão Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Rebeca Di Nicoló.

A CAPES pela concessão da bolsa.

E a todos aqueles que de alguma maneira incentivaram e colaboraram para que eu chegasse até aqui. Meu muito obrigado!

*“Você é o que repetidamente faz.
Excelência não é um evento, é um hábito”
(Aristóteles)*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	18
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	22
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	28
2.1 Epigalocatequina-3-galato.....	28
2.2 Teste de resistência à microtração.....	44
3 PROPOSIÇÃO.....	52
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Manipulação dos adesivos experimentais.....	53
4.2 Análises mecânicas.....	58
4.2.1 Resistência flexural em três pontos (RF), Módulo de elasticidade (ME) e Módulo de resiliência (RE).....	58
4.2.2 Resistência à compressão (RCo).....	60
4.3 Análises físico-químicas.....	62
4.3.1 Absorção (A) e Solubilidade (S) em água.....	62
4.3.2 Contração de polimerização (CP).....	65
4.4 Teste de resistência adesiva.....	66
4.4.1 Seleção dos dentes.....	66
4.4.2 Seleção e preparo dos espécimes.....	67

4.4.3 Procedimento adesivo.....	69
4.4.4 Procedimento restaurador.....	70
4.4.5 Teste de resistência adesiva à microtração (RA).....	72
4.4.6 Microscopia eletrônica de varredura.....	77
4.5 Análise Biológica.....	78
4.5.1 Ensaio de citotoxicidade (CI).....	78
4.5.1.1 Descongelamento.....	78
4.5.1.2 Preparo dos meios condicionados.....	79
4.5.1.3 Teste de viabilidade celular por SRB.....	81
4.6 Planejamento Estatístico.....	82
4.7 Análise Estatística.....	83
4.7.1 Análises mecânicas.....	83
4.7.2 Análises físico-químicas.....	84
4.7.3 Teste de resistência à microtração.....	84
4.7.4 Análise biológica.....	85
5 RESULTADO.....	86
5.1 Análises mecânicas.....	86
5.1.1 Resistência flexural em três pontos, Módulo de elasticidade e Módulo de resiliência.....	86
5.1.2 Resistência à compressão.....	87
5.2 Análises físico-químicas.....	88
5.2.1 Absorção e Solubilidade em água.....	88
5.2.2 Contração de Polimerização.....	90
5.3 Teste de resistência adesiva.....	91
5.3.1 Teste de resistência à microtração.....	91
5.3.2 Análise do padrão de fratura.....	93

5.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	95
5.4 Análise Biológica.....	99
5.4.1 Ensaio de Citotoxicidade.....	99
6 DISCUSSÃO.....	102
7 CONCLUSÃO.....	124
8 REFERÊNCIAS.....	126
ANEXO.....	140

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Materiais usados para manipulação dos adesivos experimentais. A) HEMA e BisGMA; B) Recipiente de vidro âmbar para manipulação e armazenamento dos adesivos; C) DMAEMA e Canforoquinona..... 54
- Figura 2 - Estruturas químicas dos componentes usados para manipulação dos adesivos. A) EGCG; B) BisGMA; C) HEMA; D) Canforoquinona; E) DMAEMA..... 55
- Figura 3 - A) Matriz de Teflon para confecção dos espécimes; B) Inserção do adesivo com auxílio de uma micropipeta; C) Corpo-de-prova rígido; D) Corpo-de-prova sobre o suporte metálico para realização do teste; E) Pino metálico equidistante aos pontos de apoio; F) Espécime fraturado..... 59
- Figura 4 - A) Dispositivos usados no teste; B) Espécime colocado no dispositivo; C) Disco começando a comprimir o espécime; D) espécime fraturado..... 62
- Figura 5 - A) Inserção do adesivo com auxílio de uma micropipeta na matriz de Teflon para confecção dos espécimes; B) Espécime de adesivo em forma de disco; C) Disco de adesivo imerso individualmente em 1 ml de água destilada dentro do

ependorff; D) Espécime em ependorff sem água contendo géis de sílica para desidratação; E) Espécime pesado individualmente em balança analítica eletrônica de precisão..... 64

Figura 6 - A e B) Aparelho de vídeo-imagem Acuvol™; C) Base do equipamento onde é gotejado o adesivo; D) Fotopolimerização da gota de adesivo após acomodação; E) Leitura da gota de adesivo polimerizada..... 66

Figura 7 - Preparo e embutimento dos espécimes. A) Molar humano hígido; B) Desgaste da superfície de esmalte para exposição de uma área de dentina oclusal plana; C) Dente com a superfície oclusal plana; D) Padronização da *smear layer*; E) Matriz de silicone para embutir os espécimes; F) Preenchimento com resina acrílica quimicamente ativada; G) Remoção do espécime após reação de presa; H) Polimento dos espécimes para planificação e padronização das superfícies..... 68

Figura 8 - Procedimento adesivo e restaurador. A) Condicionamento da superfície oclusal com ácido fosfórico 37% por 15 s; B) Superfície oclusal após remoção do excesso de umidade com papel absorvente; C) Aplicação do adesivo experimental; D) Dente restaurado com resina composta..... 71

Figura 9 - Secções perpendiculares à interface adesiva nos sentidos MD e VL em cortadeira de precisão em baixa

velocidade Labcut 1010; B) Obtenção de nove palitos por dente; C) Corpo-de-prova na forma de paralelogramo de resina composta e estrutura dental; D) Mensuração da área de cada palito com auxílio de um paquímetro digital..... 74

Figura 10 - Teste de microtração. A) Fixação individual do corpo-de-prova no dispositivo para teste de microtração; B) Corpo-de-prova posicionado na máquina EMIC para realização do ensaio de microtração; C) Corpo-de-prova fraturado..... 75

Figura 11 - Tipos de fratura dos espécimes após teste de microtração..... 76

Figura 12 - A) Tambor de nitrogênio e puxador com as caixas contendo as células congeladas; B) Coleta das células fibroblastos de polpa dentária humana do tubo criogênico; C) Passagem das células para a garrafa de cultivo celular..... 79

Figura 13 - A) Meio contendo adesivo não polimerizado antes da agitação no Vortex; B) Remoção do meio antigo; C) Placa de 96 poços com o plaqueamento de seis poços por diluição dos extratos originais e os controles..... 81

Figura 14 - A) Placa de 96 poços após ação de solução Tris-base 10 mM/l; B) Espectrofotômetro com a placa acoplada para leitura da absorbância..... 82

Figura 15 - Gráfico de colunas – classificação do padrão de fratura dos grupos em porcentagem.....	95
Figura 16 - Fotomicrografias da interface de união entre dentina (DE) e resina composta (RC) no período de tempo imediato com o aumento de 2000 x. AD = adesivo; CH = camada híbrida. A) Grupo Controle; B) EGCG 0.5; C) EGCG 1.0; D) EGCG 1.5.....	97
Figura 17 - Fotomicrografias da interface de união entre dentina (DE) e resina composta (RC) no período de tempo de seis meses de armazenamento com o aumento de 2000 x. AD = adesivo; CH = camada híbrida. A) Grupo Controle; B) EGCG 0.5; C) EGCG 1.0; D) EGCG 1.5.....	98
Figura 18 - Gráfico representativo da sobrevida celular em % nas diferentes diluições e extratos originais para os quatro grupos de adesivos experimentais.....	100

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Materiais usados no estudo, fabricantes, suas composições e lotes.....	72
Tabela 1 - Teste de Dunn (5%) para o grau de conversão entre os grupos.....	57
Tabela 2 - Teste de Tukey para resistência flexural (valores de média em MPa).....	86
Tabela 3 - Teste de Tukey para módulo de elasticidade (valores de média em MPa).....	87
Tabela 4 - Teste de Tukey para módulo de resiliência (valores de média em MPa).....	87
Tabela 5 - Teste de Tukey para resistência a compressão (valores de média em MPa).....	88
Tabela 6 - Teste de Tukey para o teste de absorção (valores de média em gramas).....	89

Tabela 7 - Teste de Tukey para o teste de solubilidade (valores de média em gramas).....	90
Tabela 8 - Teste de Tukey para contração de polimerização (valores de média de perda de volume em porcentagem).....	90
Tabela 9 - ANOVA dois fatores para estratégias adesivas e armazenamento dos grupos.....	91
Tabela 10 - Teste de Tukey para interação entre os adesivos experimentais (valores de média em MPa).....	92
Tabela 11 - Teste de Tukey para interação entre os tempos de armazenamento (valores de média em MPa).....	92
Tabela 12 - Teste de Tukey para interação entre os adesivos e os tempos de armazenamento (valores de média em MPa).....	93
Tabela 13 - Efeito da Citotoxicidade dos adesivos diluídos (expresso em porcentagem de células viáveis).....	99
Tabela 14 - Teste de Dunn para comparação dos adesivos na concentração 0,1% (% de células sobreviventes).....	101
Tabela 15 - Teste de Dunn para comparação dos adesivos na concentração 1% (% de células sobreviventes).....	101

Fonseca BM. Propriedades mecânicas, físico-químicas e biológica de um adesivo experimental com incorporação de epigallocatequina-3-galato [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da adição de EGCG em adesivo experimental na manutenção da camada híbrida, avaliando suas propriedades mecânicas, físico-químicas e biológica. A primeira etapa do estudo envolveu a manipulação do adesivo com incorporação de EGCG (0,5%, 1,0% e 1,5%) na relação BisGMA 55% / HEMA 45%, canforoquinona 0,5% e DMAEMA 0,5%. O grau de conversão (GC) dos monômeros foi avaliado por Espectroscopia micro-Raman (GC : EGCG 1.5 - 99,11a; EGCG 1.0 - 99,02a; EGCG 0.5 - 96,58ab; Controle - 85,47b). A segunda etapa envolveu a realização de análises mecânicas e físico-químicas [resistência flexural (RF) e módulo de elasticidade (ME); módulo de resiliência (RE) e resistência a compressão(RCo); sorção (A) e solubilidade (S) em água; contração de polimerização (CP)]; teste de resistência à microtração (RA) imediato (24 h) e longitudinal (6 meses); e teste biológico [ensaio de citotoxicidade (CI)]. Os resultados foram: RF, ME, RE, RCo e CP não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Os testes de A e S apresentaram redução dos valores para os grupos EGCG 0.5 e 1.0; RA imediato (24 h) não apresentou diferença entre os grupos. Após 6 meses houve redução dos valores somente para os grupos Controle e EGCG 1.5, os grupos EGCG 0.5 e 1.0 mantiveram os valores de RA constantes. CI: a incorporação de EGCG aumentou a viabilidade celular nas diluições de 0,1% e 1,0%, comparado ao grupo Controle. Pôde-se concluir que a incorporação de EGCG independente da concentração não afetou o GC. As concentrações de 0,5% (100 µg/ml) e 1,0% (200 µg/ml) em volume

de EGCG é capaz de preservar a camada híbrida formada e prorrogar a longevidade das restaurações em resina composta, além de aumentar a viabilidade celular.

Palavras-chave: Resistência Adesiva. Dentina. Monômeros. Adesivo.

Fonseca BM. Mechanical, physicochemical and biological analysis in an experimental adhesive with incorporation of EGCG [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of EGCG in an experimental adhesive to reduce the hybrid layer degradation, through mechanical, physical-chemical and biological analysis. The first step of this study involved manipulation of the adhesive model with the incorporation three different concentrations of EGCG (0.5%, 1.0% and 1.5%) in relation BisGMA 55% / 45% HEMA, 0.5% camphorquinone and 0.5% DMAEMA. The conversion degree (DC) of adhesive monomers was evaluated by micro-Raman spectroscopy (GC: EGCG 1.5 (1.5%) - 99,11a; EGCG 1.0 (1.0%) - 99,02a; EGCG 0.5 (0.5%) - 96,58ab; Control - 85,47b). The second step involved the mechanical and physicochemical analysis [flexural strength (FS) and elastic modulus (EM); resiliency modulus (RM) and compressive bond strength (CBS), sorption (A) and solubility (S) in water; shrinkage polymerization (SP)]; microtensile bond strength test (μ TBS) immediately (24 h) and longitudinal (6 months) and biological analyze [cytotoxicity assay (CY)]. The results were: FS, EM, RM, CBS and SP showed no significant difference between groups; A and S tests showed reduced values only for EGCG 0.5 and 1.0 groups. RA immediately (24) did not differ between groups. After six months there was a reduction of the values only for the control and EGCG 1.5 groups, EGCG groups 0.5 and 1.0 maintained the RA values. CY: EGCG incorporation increased the cell viability in 0.1% and 1.0% dilutions compared to the control group. It was concluded incorporation of EGCG at 0.5, 1.0 and 1.5 concentrations did not affect the degree of conversion of the monomers. Thus, the incorporation of 0.5% (100 μ g/ml) and 1.0% (200 μ g/ml) EGCG

amount can preserve the hybrid layer formed and prolong longevity composite resin restorations in addition to increasing cell viability.

Keywords: Bond Strength. Dentin. Monomers. Adhesive. Catechin.

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços em pesquisa, a longevidade e a manutenção da adesão entre a estrutura dental e o material restaurador continuam representando um desafio para a comunidade científica, devido a grande variabilidade de fatores envolvidos (Breschi et al., 2008; Spencer et al., 2012). Os sistemas adesivos devem ser compreendidos como a primeira linha de defesa contra a penetração bacteriana em direção à polpa, sendo constantemente desafiados pela ação degradante destes microorganismos e pela inadequada conversão monômero/polímero, separação de fases dos adesivos, absorção de água e insuficiente densidade de ligações cruzadas (Spencer et al., 2012).

O princípio fundamental da união entre os substratos dentais e os sistemas adesivos é baseado na substituição dos materiais inorgânicos do dente por resinas sintéticas (Nakabayashi et al., 1982), com a formação da camada híbrida, conhecida como uma camada funcional de retenção e proteção obtida pela infiltração dos monômeros resinosos hidrófilos e hidrófobos nas superfícies dentais condicionadas (Nakabayashi et al., 1982; Pashley et al., 1993).

Entretanto, apesar da adesão imediata parecer efetiva (Gaston et al., 2001), em longo prazo os valores de adesão à dentina sofrem significativa redução (Garcia-Godoy et al., 2007) e a interface

adesiva torna-se passível de degradação (Shono et al., 1999b). Essa degradação se deve em parte: às características hidrófilas dos monômeros resinosos, e à variável permeabilidade associada às alterações fisiológicas que ocorrem na dentina (Pashley, Carvalho, 1997); à presença de solventes residuais pela evaporação incompleta durante o procedimento adesivo, contribuindo para a formação de uma zona hipertônica na interface adesiva, que aumenta sua hidrofilia podendo acelerar o processo de degradação (Tay et al., 2004); à distribuição não homogênea do adesivo sobre o substrato dentinário que pode ocasionar uma polimerização incompleta dos monômeros infiltrados, afetando a estabilidade longitudinal química e mecânica da camada híbrida formada (Eliades et al., 2001). Além disso, a presença de monômeros resinosos não polimerizados em contato com fluidos orais acelera o processo de degradação da camada híbrida (Loguercio et al., 2009).

A lise estrutural das fibras colágenas expostas por falhas na formação da camada híbrida é aceita como principal fator no processo de degradação da interface adesiva (Pashley, 1991). Estudos mostram que a camada híbrida criada pelos sistemas adesivos atuais é imperfeita e susceptível à degradação enzimática (De Munck et al., 2010; Zou et al., 2010). Sob condições clínicas, os fluidos podem permear o colágeno exposto e não protegido, possibilitando o ataque enzimático às fibras colágenas (Guo et al., 2008; Kostoryz et al., 2009; Park et al., 2010). No entanto, essa deterioração pode ser acelerada por enzimas proteolíticas endopeptidases, cálcio e zinco-dependentes, denominadas

metaloproteinases de matriz (MMPs) (Tezvergil-Mutluay et al., 2010) e enzimas catepsinas de cisteína (van Strijp et al., 2003; Liu et al., 2011; Tjaderhane et al., 2013) presentes na saliva, na matriz dentinária mineralizada e na matriz extracelular de células humanas (Hashimoto et al., 2006), e apresentam atividade metabólica de degradação e remodelação de vários tipos de fibras colágenas (Bourd-Boittin et al., 2005).

As MMPs são produzidas em grande quantidade pelos odontoblastos em forma de pró-enzima inativas, que quando ativas degradam os componentes da matriz extracelular. Na dentina, as modalidades mais significativas são as gelatinases e as colagenases. As gelatinases, que incluem a 2-MMP (Gelatinase A) e a 9-MMP (Gelatinase B), e as colagenases (8-MMP) são responsáveis por degradar rapidamente o colágeno tipo I desnaturado após a desmineralização, também denominado de gelatina (Hannas et al., 2007), mesmo na ausência de enzimas bacterianas (Pashley et al., 2004).

Um dos fatores que promovem a ativação dessas pró-enzimas é o baixo pH (Visse, Nagase, 2003; Tjaderhane et al., 2013), como ocorre no processo de desmineralização da dentina durante os procedimentos adesivos (Mazzoni et al., 2009; Zhang, Kern, 2009). Desse modo, alternativas de modificação de adesivos comerciais (Du et al., 2012; Toledano et al., 2012), bem como o desenvolvimento de compósitos resinosos (Prakki et al., 2009; Pallan et al., 2012) e adesivos experimentais (Cilli et al., 2009) vêm sendo investigados como uma forma de reduzir a degradação dos componentes resinosos

e do colágeno exposto, objetivando melhorar o desempenho clínico e a longevidade das restaurações à base de resina. Uma dessas alternativas é a incorporação de polifenóis do chá verde (Du et al., 2012; Pallan et al., 2012), em especial a epigallocatequina-3-galato (EGCG).

O EGCG é um polifenol presente nas ervas das plantas da família *Camellia sinensis*, sendo em maior quantidade no chá verde. Apresenta diversas propriedades benéficas à saúde, tais como: ação antioxidante, antimicrobiana, e anti-inflamatória (Ferrazzano et al., 2011). Além disso, propicia interações hidrófobas com colagenases e gelatinases capazes de modificar a estrutura secundária das MMPs (Demeule et al., 2000), inibindo sua atividade (Chaussain-Miller et al., 2006). Entretanto, há poucos relatos na literatura sobre a utilização do EGCG na modificação de sistemas adesivos e sua influência na manutenção da camada híbrida (Du et al., 2012; Hiraishi et al., 2013).

Dessa forma, o EGCG mostra-se um agente promissor na melhora da resistência longitudinal da união adesiva dentinária. No entanto, sua influência nas propriedades químicas, físico-mecânicas intrínsecas ao adesivo a ele associado, e biológica necessita investigação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo tem como objetivo esclarecer alguns dos temas que são importantes para a melhor compreensão do presente estudo e abordar as pesquisas mais relevantes realizadas até então. Desse modo, a revisão de literatura será subdividida em dois tópicos: 2.1 Epigallocatequina-3-galato; e 2.2 Testes de adesão por microtração.

2.1 Epigallocatequina-3-galato (EGCG)

Desde a Antiguidade, as plantas são utilizadas nas terapêuticas medicinais alternativas, como prevenção, tratamento e até mesmo cura de diversas patologias humanas. Dentro elas, os chás apresentam grande importância na medicina alternativa, por sua composição rica em componentes ativos, sendo grande fonte de flavonoides (Duffy et al., 2001).

O chá verde é o mais rico em compostos com atividades funcionais, contendo cerca de 4000 componentes bioativos, sendo 1/3 constituído de polifenóis (Tariq et al., 2010), diretamente relacionados às suas propriedades funcionais. Dentre

eles, as catequinas, teaflavinas e os flavonoides, sendo este último o mais abundante (Sumpio et al., 2006).

As principais catequinas presentes no chá verde são: (-)-catequina (**C**), (-)-catequina galato (**CG**), (-)-galocatequina galato (**GCG**), (-)-epicatequina (**EC**), (-)-epicatequina galato (**ECG**), (-)-epigalocatequina (**EGC**), (-)-epigalocatequina-3-galato (**EGCG**). O EGCG é a catequina mais ativa e em maior quantidade (Wang et al., 2000), cuja principal propriedade terapêutica é a de antioxidante (Henning et al., 2004). Dessa forma, estudos estão aplicando o EGCG em diversas áreas da Odontologia, como nos descritos a seguir.

Demeule et al., 2000 avaliaram o efeito de componentes biológicos de diferentes produtos naturais – resveratrol, genisteína, polifenóis do chá verde e componentes organossulfatos do alho – na atividade das MMPs -2, -9 e -12. Para isso foi realizada a análise de fluorescência da elastase pancreática e da atividade das MMPs-2 e -9 para determinar a quantidade mínima de substratos e enzimas usados. A taxa de proteólises na presença e ausência dos polifenóis do chá verde foi mensurada pelo aumento na fluorescência. Tumores de cérebros humanos foram homogeneizados em cinco volumes a 4 °C para determinação das proteínas. A MMP-12 foi parcialmente purificada em um meio por 2 h a 4 °C para remoção das gelatinases, determinando a atividade específica somente para elastina. A ativação da proMMP-2 também foi mensurada por zimografia de gelatina. Análises de fluorescência mostraram uma maior inibição das três enzimas pelos polifenóis do chá verde, em

uma relação dose-dependente, sem afetar a atividade da elastase pancreática. Polifenóis do chá verde a 35 µg/ml foram capazes de inibir a atividade elastinolítica da MMP-12 em 90%, no entanto, na presença das catequinas isoladas do chá verde, as três MMPs foram inibidas pela ECG em 97% e EGCG em 100%. A ativação da MMP-2 foi inibida em 35 µg/ml de polifenóis do chá verde adicionados ao meio. Os resultados encontrados nesse estudo, portanto, sugerem que as catequinas do chá verde inibem tanto a atividade das MMPs quanto a ativação da proMMP-2.

Em um estudo realizado por Madhan et al., 2007 sobre a ação dos polifenóis C e EGCG do chá verde na atividade das colagenases sobre o colágeno, mostrou que o colágeno tratado pelas C e EGCG apresentou 56% e 95% de resistência, respectivamente, em relação as hidrólises colagenolíticas causadas pelas colagenases. Enquanto interações diretas entre as C e EGCG e as colagenases apresentaram 70% e 88%, respectivamente, de inibição da atividade colagenolítica das colagenases sobre o colágeno, em uma relação de concentração dose-dependente. A estrutura secundária das colagenases apresentou uma mudança significativa quando tratadas com altas concentrações de C e EGCG. Esta estabilidade das fibras colágenas tratadas contra a ação das colagenases pode ter sido gerada pela ligação de ambos os sítios ativos do colágeno, que são reconhecidos pelas colagenases, com a C e a EGCG. No entanto, a maior inibição pelo EGCG comparado a C pode ser atribuído à capacidade de o EGCG apresentar melhor adesão com as ligações de hidrogênio e interações hidrófobas com as colagenases.

Nakanishi et al., 2010 avaliaram o efeito do EGCG e ECG na expressão de citosinas pro-inflamatórias e adesão molecular nas células da polpa dental estimuladas por fatores de virulência bacteriana. Para isso, células na polpa dental humana foram pré-tratadas com ou sem a presença de catequinas (1 – 50 µg/ml) em soro fetal bovino a 2% contendo um meio de cultura específico DMEM por 1 h e incubadas com lipopolisacarídeo (1 µg/ml) ou peptidoglicano (10 µg/ml) por 4 e 24 h. Após os períodos de tempo, os sobrenadantes foram coletados e usados para determinar a quantidade de interleucina (IL)-6 e IL-8 e as células tratadas foram usadas para extração do RNA e análise de fluxo citométrico. Os resultados mostraram que a presença de EGCG e ECG reduziram significativamente a expressão de IL-6 e IL-8 e em células pulpares expostas às citosinas em uma concentração dose-dependente. Moléculas de adesão intercelular foram reduzidas enquanto moléculas de adesão celular vascular foram inibidas pela EGCG e EGC, sugerindo que o chá verde possa prevenir a exacerbação de pulpites.

Arab et al., 2011 fizeram uma revisão de literatura sobre os efeitos terapêuticos do chá verde na saúde oral e periodontal. Com relação à gengivite e periodontite, os estudos realizados reportaram que as catequinas presentes no chá verde possuem efeito inibitório nas patogêneses periodontais, sendo seu consumo diário uma forma simples de manutenção da saúde periodontal. Assim como a prevenção da cárie dental, causada por bactérias cariogênicas, pelas catequinas ECG e EGCG que inibem a glicosiltransferase e

consequentemente a aderência bacteriana à superfície dental. A inibição da proliferação de diversas células tumorais e inibição da indução de apoptoses em estudos *in vitro* e com animais, especialmente pelas catequinas EGCG e ECG que apresentam atividade antioxidante, mostraram capacidade em reduzir o risco do desenvolvimento de câncer em humanos. Além da prevenção da halitose pelos polifenóis do chá, pela interação com bactérias periodontais responsáveis pela produção dos componentes sulfúricos voláteis e pela reação química entre o EGCG com a metilmercaptano (CH_3SH), principal fonte da halitose. Esta revisão sugere, portanto, que o consumo do chá verde pode prevenir e tratar diversas doenças orais e periodontais. O consumo do chá durante as refeições é um hábito simples e possível para auxiliar na manutenção da saúde oral.

Du et al., 2012 estudaram as propriedades físico-químicas e o potencial antimicrobiano de um adesivo comercial com incorporação de diferentes concentrações de EGCG, em longo prazo. Para isso, o EGCG foi dissolvido em álcool absoluto nas concentrações de 5 mg/ml, 10mg/ml e 15 mg/ml e adicionado ao adesivo Single Bond 2 (SB) na proporção de 2% obtendo-se as concentrações finais de 100 (EGCG100), 200 (EGCG200), e 300 (EGCG300) $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. O SB sem EGCG foi usado como controle. O efeito dos adesivos modificados sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* foi determinado por teste de contato direto e microscopia eletrônica de varredura (MEV), nos tempos imediato e após um mês. Também foram realizados testes de resistência de união para avaliar a propriedade mecânica dos

adesivos, nos tempos imediato e após seis meses de armazenamento, e avaliação do grau de conversão por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Comparado ao grupo controle SB, os grupos EGCG200 e EGCG300 foram capazes de inibir o crescimento do *S. mutans*. Os adesivos com incorporação de 100 e 200 µg/ml de EGCG apresentaram valores de resistência de união imediata maiores que o grupo controle, já o grupo EGCG300 não apresentou diferença em relação ao controle. Após 6 meses de armazenamento todos os grupos com incorporação de EGCG foram maiores que o controle. Além disso, o grau de conversão dos sistemas adesivos não foi significativamente afetado pela incorporação de EGCG nas diferentes concentrações. Dessa forma, os autores concluíram que o adesivo SB com incorporação de 200 µg/ml tem potencial para desempenhar a função antimicrobiana concomitante com a capacidade de manutenção de união resina-dentina em longo prazo.

Pallan et al., 2012 avaliaram as propriedades e as características de copolímeros baseados em BisGMA diluído com TEGDMA (R1), ou propoxilato de bisGMA-CH₃bisGMA (R2) ou fluoretado de bisGMA-CF₃bisGMA (R3), incorporados com EGCG ou clorexidina (CLX), pelos testes de propriedades mecânicas (resistência flexural e módulo de elasticidade), grau de conversão por FTIR, absorção e solubilidade em água. Para isso, cada co-monômero experimental foi preparado combinando BisGMA com os diluentes na proporção de 70/30 mol%. Cada monômero, com exceção dos grupos controles, foi incorporado ao EGCG ou clorexidina na

proporção de 0,2%, 1,0%, e 2,0% em peso. Todos os grupos, com exceção do grupo BisGMA diluído com TEGDMA, não apresentaram alteração do grau de conversão e absorção em água. A solubilidade em água apresentou relação diretamente proporcional ao aumento da proporção em peso incorporada ao monômero. A resistência à flexão e o módulo de elasticidade foram variáveis e dependentes do material. As taxas de liberação droga/dependente foram significativamente maiores para a clorexidina do que para o EGCG, e diferiram de acordo com as seguintes proporções 2,0% > 1,0% > 0,2%, sendo que a liberação da droga no primeiro dia foi maior que nos demais para ambas as drogas. Com isso, os autores concluíram que o tipo de monômero, o grau de conversão e a porcentagem em peso do EGCG e clorexidina incorporadas levam a diferentes interações entre as resinas e os materiais incorporados. Sendo possível, então, desenvolver diferentes resinas baseadas nas necessidades clínicas.

Chandra et al., 2012 investigaram a interação entre o EGCG e as nanopartículas de prata. Para isso, colóides de prata foram preparados utilizando boro-hidreto de sódio (NaBH₄) e água deionizada. Após o preparo, a solução foi deixada à temperatura ambiente por aproximadamente 1 h, até se obter uma solução amarelo transparente, e então adicionado EGCG 0,5 mM. Espectros de luz visíveis (UV-Vis) foram registrados usando um espectrofotômetro. Para as medições de absorção óptica, as amostras foram mantidas em microcubetas com um comprimento da trajetória óptica de 1 cm. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que a adição de 5 mM de

EGCG foi capaz de reduzir o pH da solução de 8,43 para 7,22. Assim, as medições espectroscópicas indicam que a adição de EGCG é capaz de isolar os íons borato a partir da superfície das partículas coloidais de prata na solução, formando ésteres de borato. O que indica implicações em termos de uso de nanopartículas metálicas como transportadores de algumas drogas.

Kato et al., 2012 estudaram a ação de inibidores de proteases na degradação da matriz orgânica dentinária desmineralizada. Para isso, fatias de dentina de incisivos bovinos foram desmineralizadas por 36 h com ácido cítrico 0,87 M. Após, os espécimes foram tratados por 1 min com géis (n = 45) contendo EGCG (400 μ M), CLX (0,012%), sulfato ferroso (FeSO_4) (1mM), fluoreto de sódio (NaF) (1,23%), ou sem componente ativo (P, placebo), além do grupo sem tratamento (ST); e armazenados em saliva artificial com adição da collagenase obtida pelo *Clostridium histolyticum*I (100 U/ml) por 5 dias a 37 °C. A degradação do colágeno foi, então, analisada por ensaio de hidroxiprolina nas soluções incubadas (n = 5), e a perda de matriz orgânica dentinária por perfilometria de contato (n = 12). Os tratamentos com os géis contendo EGCG, CLX e FeSO_4 , tiveram um significante redução na concentração de hidroxiprolina nas soluções incubadas, assim como na perda de matriz orgânica dentinária quando comparado aos tratamentos com os géis contendo NaF, P ou ST. O grupo NaF apresentou significante redução na concentração de hidroxiprolina comparado ao P e ST. Os autores concluíram que os inibidores de proteases testados apresentam potencial em prevenir erosão

dentinária.

Santiago et al., 2013 estudaram o feito do pré-tratamento da dentina com solução de EGCG na preservação da interface adesiva usando adesivos de condicionamento ácido prévio. Para isso, trinta molares humanos recém extraídos foram preparados expondo a superfície dentinária e divididos em cinco grupos de acordo com a solução aplicada. As superfícies de dentina foram condicionadas com ácido fosfórico 35% por 15 s, lavadas por 30 s, secas com jatos de ar por 10 s, e reidratadas com de água destilada, solução de EGCG 0,02%; 0,1% ou 0,5% ou solução de CLX 2%, 5 µl cada, por 60 s, com remoção do excesso de solução com papel absorvente deixando a superfície dentinária visivelmente úmida. Após, foi aplicado o sistema adesivo Single Bond 2, segundo recomendações do fabricante e restauração com cinco incrementos de 1 mm cada de resina composta. Os espécimes foram então seccionados nos sentidos mesio-dista e vestibulo-lingual obtendo-se palitos de aproximadamente 1,0 mm². Metade dos espécimes foram testados após 24 h por teste de resistência adesiva à microtração, e a outra metade testados após seis meses de armazenamento em solução de acetato de sódio 3 mM/l em estufa bacteriológica a 37 °C. Análises do padrão de fratura foram analisados. Os resultados obtidos mostraram que após 24 h de armazenamento o grupo que foi reidratado com EGCG 0,5% valores de resistência de união menor que os demais grupos, com exceção do grupo EGCG 0,02%. No entanto, após seis meses de armazenamento, somente o grupo controle apresentou redução nos valores de resistência adesiva. Os

demais grupos mantiveram seus valores estáveis após o armazenamento. Dessa forma, os autores concluíram que o pré-tratamento com EGCG previamente a aplicação de Single Bond 2 após seis meses de armazenamento foram semelhantes ao pré-tratamento usando CLX.

Mankovskaia et al., 2013 avaliaram o efeito da incorporação de EGCG em resinas, comparado à resinas com CLX em sua composição, na inibição do crescimento de *S mutans in vitro*. Primeiramente foi calculada a concentração inibitória mínima (CIM) do EGCG e da CLX. Discos de resina foram preparadas de BisGMA/TEGDMA (G1) e BisGMA/CH3BisGMA (G2), puros (a), com incorporação de EGCG (b) e com incorporação de CLX (c). Sendo duas concentrações diferentes incorporadas aos discos de resina. Cada amostra foi imersa em um meio contendo cultura de bactéria e incubada por 24 h sob agitação. Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada pela contagem do número de colônias em placas de réplica de ágar. Os resultados mostraram que para cada resina testada tanto o EGCG quanto a CLX mostrou a inibição significativa do crescimento bacteriano para as concentrações testadas. Com isso, os autores concluíram que tanto o EGCG quanto o CLX foram capazes de inibir o crescimento de *S. mutans* quando incorporados a matriz resinosa.

Hiraishi et al., 2013 avaliaram o efeito de vários agentes derivados de plantas (hesperidina, proantocianidina, EGCG e genipina) na estabilidade da matriz colágena e resistência à degradação pelas colagenases. Dessa forma, terceiros molares

humanos foram preparados para o teste de resistência a tração e teste de taxa de absorção. As amostras de dentina foram tratadas com glutaraldeído (0,5% e 5,0%) e cada solução dos agentes testados (0,5%) por 12 h, a 37 °C. Os grupos controles foram tratados com água destilada. Terceiros molares não irrompidos foram preparados para o teste de degradação por colagenase, até a obtenção do pó de dentina desmineralizado que foi incubado com os agentes testados nas concentrações de 0,02%, 0,1% e 0,5%, seguidas pela digestão do colágeno por colagenases bacterianas. A extensão da degradação do colágeno foi avaliada por meio de teste de ensaio de hidroxiprolina. Os testes de resistência à tração e teste de taxa de absorção mostraram que as propriedades mecânicas da dentina foram melhoradas pelo uso dos agentes naturais. Em relação à degradação do colágeno, a hesperidina, a proantocianidina e o EGCG foram capazes de reduzir a degradação do colágeno, num efeito dose-dependente. O glutaraldeído 0,5% e a genipina 0,5% foram menos eficazes na estabilidade do colágeno comparado aos demais grupos. Desse modo, os autores concluíram que o uso da hesperidina, proantocianidina e EGCG poderia melhorar as propriedades mecânicas do colágeno além de resistir à degradação enzimática.

Neri et al., 2014 investigaram a influência da incorporação de EGCG nas propriedades físico-químicas de um adesivo a base de metacrilato. Para isso, EGCG foi adicionado nas concentrações de 0,01% e 0,1% ao adesivo comercial autocondicionante de uma fase Adper Easy One, e misturados até a homogeneização usando um agitador por 1 min. Os três adesivos

testados (controle; EGCG 0,01% e EGCG 0,1%) foram avaliados *in vitro* em relação à absorção e solubilidade em água, grau de conversão e resistência flexural. Para os testes de absorção e solubilidade em água discos de adesivo (n = 10; 10 x 1 mm) foram preparados usando uma matriz de Teflon. O grau de conversão foi avaliado por FTIR. Espectros dos adesivos não polimerizados (n = 10) foram obtidos através de 32 leituras com alcance de 4000 – 400 cm^{-1} a 4 cm^{-1} em modo de transmissão. Os adesivos foram então fotopolimerizados por 20 s e novos espectros FTIR foram obtidos imediatamente após a cura. A resistência flexural foi avaliada pelo teste de resistência flexural em três pontos, com a inserção de 25 μl de cada adesivo em uma matriz de teflon para confecção de barras de adesivo (25 x 2 x 2 mm), que foram fotopolimerizadas por 40 s em três diferentes posições (direita, esquerda e centro) da amostra. Após 24 h armazenados em água destilada a 37 °C os espécimes foram submetidos ao teste de flexão em três pontos. Os resultados mostraram não haver diferença significativa para o grau de conversão, absorção em água e resistência flexural entre as diferentes concentrações de EGCG. Entretanto, os adesivos com incorporação de EGCG apresentaram redução nos valores de solubilidade comparada ao controle. Dessa forma, os autores concluíram que a incorporação de EGCG em adesivos autocondicionantes reduz a solubilidade sem interferir em outras propriedades dos materiais, podendo ser útil na aderência terapêutica a dentina, aumentando a longevidade dos procedimentos adesivos.

Vidal et al., 2014 avaliaram sistematicamente a

interação das catequinas monoméricas quimicamente bem definidas com os componentes da matriz extracelular da dentina pela avaliação das propriedades mecânicas da dentina, e da atividade das MMPs e catepsinas de cisteínas (CTs). Para isso, palitos de dentina desmineralizados (n=15) foram incubados por 1 h com 0,65% de C, CG, GCG, EC, ECG, EGC e EGCG. O módulo de elasticidade (ME) e o aumento de vezes no ME foram determinados pela comparação das amostras antes e após os tratamentos. As taxas de biodegradação da dentina foram avaliadas pela diferença em porcentagem de massa seca, antes e após a incubação em colagenase bacteriana. A inibição de MMP-9 e CT-B por 0,65%, 0,065% e 0,0065% de cada catequina foi determinado usando kits de ensaio proteolíticos fluorimétricos. Todas as catequinas monoméricas conduziram a um aumento significativo no ME. O EGCG apresentou um maior aumento de vezes no ME, seguido por ECG, GCG e CG. Estas quatro catequinas monoméricas também reduziram significativamente as taxas de biodegradação com inibição da MMP-9 e CT-B na concentração de 0,65%. De uma forma geral, as catequinas monoméricas 3-O-galato são bem mais potentes que seus análogos não-galato em melhorar as propriedades mecânicas da dentina, assim como, na estabilização do colágeno contra a degradação proteolítica. Estes resultados obtidos indicam que o galato é um componente essencial nas catequinas monoméricas, bem como nas proantocianidinas oligoméricas por exibirem um elevado potencial de ligação cruzada com a matriz extracelular da dentina.

Liu et al., 2015 investigaram a relação entre os

componentes polifenólicos presentes no extrato da semente da uva (ESU) e sua atividade na ligação cruzada do colágeno dentinário e sua relevância clínica. Para isso, representantes monoméricos e diméricos constituintes do extrato da semente da uva foram adquiridos ou sintetizados: (+)-catequina (pCT), (-)-catequina (CT), (-)-epicatequina (EC), (-)-epilagocatequina (EGC), (-)-epicatequina galato (ECG), (-)-epigalocatequina galato (EGCG), procianidina B2 e um dímero pCT-pCT. ESU foi separado em frações de baixo (PALM) e alto peso molecular (PAHM). Filmes e palitos de dentina foram preparados de molares humanos hígidos, desmineralizados com ácido fosfórico 35% por 15 s, 11 grupos de filmes (n = 5) foram, então, tratados com os reagentes descritos acima por 1 min (1% em peso em 50/50 etanol/água), e um grupo foi tratado com água destilada (controle). Os filmes foram então submetidos à espectroscopia em FTIR. Análises de digestão de colagenase foram realizadas após FTIR. Os filmes de colágeno foram incubados em 30 µl de colagenase por 1 h a 37 °C, após, os filmes restantes e o líquido digerido foram incubados por mais 24 h para solubilização do colágeno em tripeptídeos, e a porcentagem de filme de dentina digerido e os sobrenadantes foram medidos por espectroscopia de massa. As propriedades mecânicas dos palitos de dentina desmineralizados com ácido fosfórico 10%, por 6 h, foram avaliados (9 grupos; n = 7) após 2 h e 24 h dos tratamentos por testes de tração. Os resultados deste estudo mostram que os tratamentos com ECG e EGCG levaram a mudanças sutis no espectro de colágeno, já PALM, ESU e PAHM causaram alterações mais visíveis. Os tratamentos com

pCT, CT, EGC não foram capazes de melhorar a estabilidade enzimática do colágeno e os filmes de dentina foram completamente digeridos pelas colagenases. Já os tratamentos com ECG e EGCG aumentaram significativamente a resistência do colágeno diminuindo a digestão do mesmo. Em relação aos testes de tração, o tratamento por 24 h resultou em um aumento significativo na resistência de tração para todos os reagentes testados. Com isso, os autores concluíram que os tratamentos com os monômeros presentes no extrato da semente da uva são eficazes na estabilização da matriz dentinária desmineralizada.

de Assis et al., 2015 estudaram o efeito do EGCG nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% como solução antimicrobiana em lesões de cárie formadas *in vitro* por modelos bacterianos. Dessa forma, 25 amostras de dentina humana (4 x 4 x 2 mm) foram submetidas ao processo de formação de cárie *in vitro* por imersão em solução de *S mutans* por 5 dias. Somente a dentina oclusal foi desmineralizada, as outras superfícies foram protegidas com um verniz ácido-resistente. Após o período de desmineralização, os espécimes foram randomizados em cinco grupos: I) solução salina 0,9% (controle negativo), II) CLX 2% (controle positivo), III) EGCG 0,5%, IV) EGCG 1%, e V) EGCG 2%. Os grupos foram tratados com 15 µl de cada solução, por 60 s e secos com papel absorvente. Após os tratamentos, as amostras de dentina cariada foram coletadas e analisadas por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados obtidos mostraram que os tratamentos com as diferentes concentrações de EGCG não diferiram estatisticamente da

solução salina 0,9% e nem entre as diferentes concentrações usadas. Somente a CLX 2% apresentou resultados significantes quanto ação antimicrobiana. Dessa forma, os autores concluíram que o EGCG nas concentrações estudadas não foi efetivo na eliminação de *S mutans* em lesões de dentina cariada.

Khamverdi et al., 2015 avaliaram o efeito da adição de EGCG na resistência adesiva dentinária de dois adesivos auto-condicionantes. Para isso, 64 terceiros molares hígidos foram divididos em 16 grupos. Incorporou-se extrato de EGCG 95% nas concentrações de 0 μM , 25 μM , 50 μM e 100 μM , diluídos em solução água/etanol (1:1), aos sistemas adesivos Clearfill SE Bond e Filtek Silorane System. O grau de conversão com a incorporação do EGCG foi realizado por espectroscopia FTIR, com análise de uma pequena quantidade de cada adesivo colocado sobre um filme de polietileno, após evaporação do solvente por 10 s. Os molares foram preparados com a remoção da superfície de esmalte oclusal expondo uma área de dentina de 5 mm, polidas com lixa d'água de granulação 600 por 30 s para padronização da *smear layer*. Após os procedimentos restauradores, os dentes foram seccionados longitudinalmente para obtenção de palitos de $1 \pm 0,1 \text{ mm}^2$, que ficaram armazenados em água destilada a 37 °C. Três palitos de cada dente foi testado quanto a resistência à microtração após 24 h (controle), outros 3 sofreram 2500 ciclos de ciclagem térmica (5° C / 55° C, com tempo de permanência de 30 s), e os 3 restantes testados após 6 meses de armazenamento em água destilada a 37° C. Duas amostras de cada dente foram avaliadas em MEV. Os resultados

obtidos mostraram não haver diferença significativa no grau de conversão dos adesivos com incorporação de EGCG para nenhuma concentração usada. Os valores médios de microtração foram significativamente maiores para o grupo Clearfill SE Bond em relação ao Filtek Silorane System. O tempo de estocagem só foi significativo para o grupo Clearfill SE Bond sem EGCG (0 μM). Os resultados de MEV mostraram que a maioria das fraturas ocorreu na região da camada híbrida. Portanto, os autores concluíram que a adição de 100 μM de EGCG ao Clearfill SE Bond pode preservar a adesão dentinária e aumentar sua estabilidade, entretanto, a incorporação ao Filtek Silorane System, especialmente em altas concentrações reduz a resistência adesiva após 6 meses de armazenamento.

2.2 Teste de resistência à microtração

Sano et al., 1994a desenvolveram uma metodologia para avaliar a adesão dentinária através do teste de microtração. Para isto, dentes molares tiveram suas superfícies oclusais planificadas com remoção de todo o esmalte, polimento com lixas de sílica com granulação 600 e posterior condicionamento ácido e aplicação dos sistemas adesivos, aplicados segundo os fabricantes. Os sistemas adesivos usados foram: Scotchbond Multi-Purpose, Clearfil Liner Bond 2 e Vitremer. Os dentes foram restaurados de modo plano com resina composta ou ionômero de vidro, apresentando 5,0 mm de

altura. Após, foram armazenados em água a 37 °C por 24 h. Cortes seriados e entalhes do tipo ampulheta foram realizados na interface adesiva obtendo dessa forma fatias de 0,5 e 3,0 mm, com área de 0,5 x 0,5 mm e 3,0 x 3,0 mm. Cada corpo-de-prova foi, então, fixado a um dispositivo com cianoacrilato e submetido ao tracionamento a uma velocidade de 1,0 mm / min até a fratura. As superfícies fraturadas foram analisadas quanto ao tipo de fratura e verificou-se que a maioria das fraturas foi do tipo adesiva. Os resultados obtidos mostraram uma correlação inversa entre a força adesiva e a área de superfície com diferença estatisticamente significativa. Os autores concluíram que o teste é capaz de mensurar altos valores de resistência de união sem que houvesse fraturas coesivas. O teste foi então, denominado microtração.

Sano et al., 1994b avaliaram a relação entre a resistência de união dos materiais adesivos e a área de união dentinária. Foram usados 20 terceiros molares humanos que tiveram o esmalte oclusal seccionado com disco diamantado e a superfície dentinária polida com disco de lixa de granulação 600. Após, a dentina foi condicionada e restaurada com os sistemas adesivos: Scotchbond Multi-Purpose, Clearfil Liner Bond 2 e Vitremer, segundo as recomendações dos fabricantes. Os dentes foram restaurados com um bloco de resina composta ou ionômero de vidro, com 5,0 mm de altura. Foram obtidas fatias de espessura entre 0,5 e 3,0 mm pela realização de cortes seriados. Desgastes do tipo ampulheta foram confeccionados nas interfaces adesivas, com área entre 0,5 x 0,5 e 3,0 x 3,0 mm. Os resultados mostraram haver relação

entre valores de união e área adesiva para todos os sistemas adesivos estudados. Concluiu-se que o teste de microtração é capaz de mensurar altos valores de resistência de união sem que houvesse fraturas coesivas, e dessa forma, permite a redução do número de dentes usados.

Schreiner et al., 1998 compararam a adesão de 5 sistemas adesivos à dentina de 75 terceiros molares. Seis dentes foram usados para cada grupo de sistema adesivo para o teste de microtração, e 7 dentes por grupo de adesivo para o ensaio de cisalhamento. Após os testes foram observados os tipos de fratura em MEV. Os resultados demonstraram que o teste de microtração é superior ao teste de cisalhamento, obtendo-se uma resistência de união mais elevada pelo ensaio de microtração. Isso pode ser verificado pela maior incidência de fraturas do tipo coesiva quando realizado o teste de cisalhamento. Com isso os autores concluíram que o teste de microtração determina de uma maneira mais efetiva a resistência adesiva dos materiais testados, se aproximando de uma forma mais verídica das aplicações clínicas, em que a maioria das falhas adesivas ocorre por forças de tração e não por cisalhamento.

Shono et al., 1999a devido a grande variação nos valores obtidos nos testes de microtração, sugeriram uma modificação na confecção dos corpos-de-prova. Ao invés de forma de ampulheta, foram cortados em forma de palitos, com secção transversal de 1,0 x 1,0 mm. Com os resultados obtidos percebeu-se que é possível comparar os valores relacionados à força adesiva entre os palitos e os corpos-de-prova em forma de ampulheta. No entanto,

com o uso dos palitos é possível observar diferenças na região de adesão dentinária.

Loguercio et al., 2005 estudaram a influência da região do espécime nos valores de união e durabilidade da interface de união resina/dentina. Para isso utilizou-se 30 terceiros molares humanos que tiveram o esmalte removido, com exposição da dentina. Após, dois sistemas adesivos (Single Bond e One-Step) foram aplicados segundo a recomendação do fabricante e aplicou-se RC (Z-250) em camadas até a obtenção de um bloco. Esses dentes, foram então, divididos em 3 grupos (n= 5). Grupo A: confecção de palitos com área de união de $0,8 \text{ mm}^2$, submetidos ao ensaio imediatamente após o corte. Grupo B: armazenamento dos dentes restaurados, por período de 6 meses, antes do corte em palitos. Grupo C: secção dos palitos e armazenagem durante 6 meses. A localização dentinária dos palitos foi avaliada (centrais e periféricos) nos grupos A e B. Os resultados mostraram que para o Single Bond os valores do grupo A foram maiores estatisticamente que os grupos B e C. Para o One Step o grupo A apresentou maior valores de união que o grupo B e este maior que o C. A análise da região dentinária mostrou que não houve diferença estatística entre as regiões quando se realizou o ensaio mecânico imediatamente após o corte dos palitos. No entanto, após armazenamento por 6 meses, os palitos periféricos apresentaram valores de união menores que os centrais. Os autores concluíram que o corte dos palitos com posterior armazenamento, altera os valores de união e que valores de união são maiores na região central, quando comparados com a periferia.

Yamaguchi et al., 2006 avaliaram a influência da velocidade progressiva durante o ensaio de microtração com sistemas adesivos de dois passos. Superfícies dentinárias de incisivos bovinos foram restauradas usando os sistemas adesivos Clearfil SE Bond e Single Bond e a resina composta Clearfil AP-X. Os dentes foram seccionados em fatias e tiveram suas interfaces de união adesivas desgastadas em forma de ampulheta, com área de união de 1,0 mm². As amostras foram então submetidas ao ensaio de microtração com velocidade progressiva de corte de 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 mm/ min. Os resultados mostraram não haver diferença estatística significativa em relação à progressão da velocidade nas diferentes estratégias. Entretanto, o tipo de sistema adesivo usado influenciou na resistência adesiva, sendo o sistema Single Bond o que apresentou os melhores valores.

Betamar et al., 2007 avaliaram a influência do design dos espécimes na resistência adesiva dentinária ao ensaio de microtração usando três diferentes sistemas adesivos, através da análise experimental e elemento finito. Para isso 270 incisivos centrais bovinos, que tiveram suas superfícies de dentina expostas, foram divididos em três grupos experimentais para cada sistema adesivo usado (n = 90): Adper Prompt L-Pop, Adper Scotchbond 1XT e Adper Scotchbond Multi-Purpose Plus e restaurados com uma camada de 5 a 6 mm de RC Filtek supreme. E então divididos de acordo com o design dos espécimes (n = 30) em palito, haltere e ampulheta. Para os espécimes em forma de palito, após estocagem em água a 37 °C por 24 h, foram seccionados verticalmente em palitos de

aproximadamente 1 mm^2 , em que foram selecionados 3 palitos de cada dente com margens regulares e formato uniforme mensurando as dimensões $0,9 \times 1,2 \times 12 \text{ mm}$ para o teste de microtração. Os espécimes preparados em forma de haltere e ampulheta após os procedimentos adesivos foram seccionados em forma de palito de aproximadamente $0,9 \times 3,5 \times 12 \text{ mm}$. Dois palitos de cada dente foram selecionados, desgastados na região da interface com broca diamantada de $1,15 \text{ mm}$ de diâmetro em peça de mão, em alta velocidade sob refrigeração, ficando a porção mais estreita na interface adesiva, um na forma de haltere e o outro na forma de ampulheta, sendo utilizados para isso, um molde de plástico para cada desenho assegurando a uniformidade das formas. Foi realizado então o teste de resistência adesiva a uma velocidade de $0,5 \text{ mm/min}$ e os espécimes fraturados analisados em microscópio óptico e microscopia eletrônica de varredura. Modelos para análise de elemento finito foram desenvolvidos para os três designs usando o programa TOMECH e visualizados pelo software de visualização FEMSYS. Os resultados foram analisados pelos testes de ANOVA um fator, Tukey e Kaplan-Meier que não encontraram diferenças significativas entre a resistência adesiva dentinária e os três designs estudados para o mesmo sistema adesivo ($p > 0,05$). No entanto houve diferenças significativas entre os 3 sistemas adesivos quando se utiliza um único design para os espécimes. Os resultados da análise do elemento finito não mostraram diferenças significativas entre os três designs na tensão máxima no interior da camada adesiva, embora a distribuição de tensões para o formato de ampulheta seguiu um

padrão diferente. Os autores concluíram que os diferentes designs das amostras não influenciaram a resistência de união adesiva aos sistemas adesivos. Os resultados da análise por elemento finito foram consistentes com os resultados experimentais.

Toledano et al., 2012 avaliaram a resistência de união resina-dentina e a degradação do colágeno pela ação das MMPs sobre a camada híbrida formada usando um adesivo de condicionamento ácido total impregnado por zinco (Zn). Para isso, foram usados os adesivos Single Bond (SB) e Clearfil SE Bond (CSE). 10% de partículas de óxido de Zn (ZnO) foram adicionadas ao SB, e o conjunto ZnO-SB foi vigorosamente agitado por 1 min usando um agitador em um ambiente escuro. Sendo então verificada a degradação da dentina pela determinação da concentração de telopeptídeo C-terminal (ICTP). Para isso, 30 terceiros molares humanos inclusos e não cariados tiveram suas superfícies de esmalte, cimento e polpa removidos, obtendo-se discos de dentina da porção média da coroa, usando um disco diamantado. Quatro palitos de dentina foram obtidos de cada disco, totalizando 50 palitos, que foram tratados previamente a realização dos protocolos adesivos (n= 10). (1) Sem tratamento; (2) desmineralização por ácido fosfórico a 37%; (3) semelhante ao (2), seguida da aplicação do SB por 20 s; (4) semelhante ao (2), seguida da aplicação de ZnO-SB por 20 s; (5) aplicação de CSE primer 20 s e aplicação CSE adesivo 20 s. Dois espécimes de cada grupo foram armazenados em saliva artificial, seus sobrenadantes formados foram removidos após 24 h, 1 semana e 4 semanas de agitação, e analisados quanto a liberação do produto da

degradação do colágeno tipo I (ICTP). Para avaliação da resistência adesiva, 30 molares não cariados foram seccionados abaixo da junção dentina-esmalte (JDE) e divididos em três grupos: (1) SB; (2) ZnO-SB; (3) CSE. Todos os adesivos aplicados segundo o fabricante, seguido da restauração com resina composta. Após 24 h de armazenagem em água deionizada, os dentes foram seccionados em palitos. Parte deles avaliados imediatamente e a outra metade após 3 meses, pelo teste de microtração. Os resultados obtidos mostraram que a degradação do colágeno é significativamente reduzida pela infiltração de adesivo, e para os três tempos estudados seguiu o padrão de $ZnO-SB < CSE < SB$ para os valores de ICTP. Quanto ao teste de resistência adesiva, em 24 h todos os adesivos foram semelhantes, no entanto, após 3 meses, somente o SB teve redução dos valores. Com isso os autores concluíram que a adição de ZnO ao SB reduz a degradação do colágeno e aumenta a durabilidade de união resina-dentina.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um adesivo experimental de condicionamento ácido prévio, variando três concentrações de epigallocatequina-3-galato (EGCG) visando à longevidade das restaurações adesivas em resina composta, com a manutenção da camada híbrida; e realizar a análise das propriedades mecânicas, físico-químicas, e biológica das diferentes formulações adesivas manipuladas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, sob parecer de nº 532.725 em 11/02/2014 CEPa (ANEXO A).

4.1 Manipulação dos adesivos experimentais

A composição dos sistemas adesivos baseou-se em trabalhos que pré-estabelecem o protocolo de formulação dos mesmos (Park et al., 2009a, 2009b) e a manipulação foi supervisionada pela Faculty of Dentistry - University of Toronto, por parceria entre as Instituições envolvidas. Todos os componentes utilizados para a manipulação dos adesivos foram do fabricante Sigma Aldrich (Alemanha).

Para o preparo dos adesivos experimentais, foram adicionados Bisfenol glicidil metacrilato (BisGMA) e 2-Hidroxi-etil metacrilato (HEMA) na proporção de 55% / 45% em peso (Park et al., 2009a, 2009b) (Figura 1A). Os monômeros foram inseridos em recipiente de vidro escuro na cor âmbar (Figura 1B) e misturados à

velocidade de 2000 rotações por minuto (rpm) por 30 min em ambiente sem luminosidade. Dois componentes foram utilizados para a fotoiniciação: o fotoiniciador hidrofóbico canforoquinona (0,5% mol), o co-fotoiniciador 2-dimetil-aminoetil-metacrilato (DMAEMA) (0,5% mol) (Figura 1C) (Ye et al., 2009). A concentração de tais componentes foi calculada a partir da quantidade total dos monômeros, e a mistura realizada à velocidade de 2000 rpm por 12 h (Park et al., 2009a, 2009b).

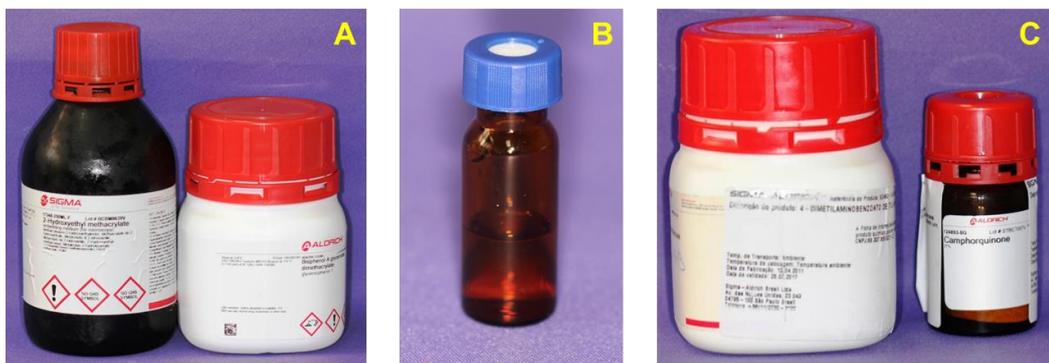


Figura 1 – Materiais usados para manipulação dos adesivos experimentais: A) HEMA e BisGMA; B) Recipiente de vidro âmbar para manipulação e armazenamento dos adesivos; C) DMAEMA e Canforoquinona.

Em seguida, os adesivos foram divididos em dois grupos experimentais:

- a) **Grupo Controle** – adesivo experimental de condicionamento ácido prévio simplificado 2 passos, manipulado sem qualquer modificação na formulação;

b) Grupo EGCG – adesivo experimental de condicionamento ácido prévio simplificado 2 passos, modificado com a inserção de epigallocatequina-3-galato (EGCG) em três diferentes concentrações, dividindo-o em três subgrupos (EGCG 0.5; EGCG 1.0; EGCG 1.5).

A estrutura química dos componentes utilizados na manipulação dos adesivos experimentais está ilustrada na Figura 2.

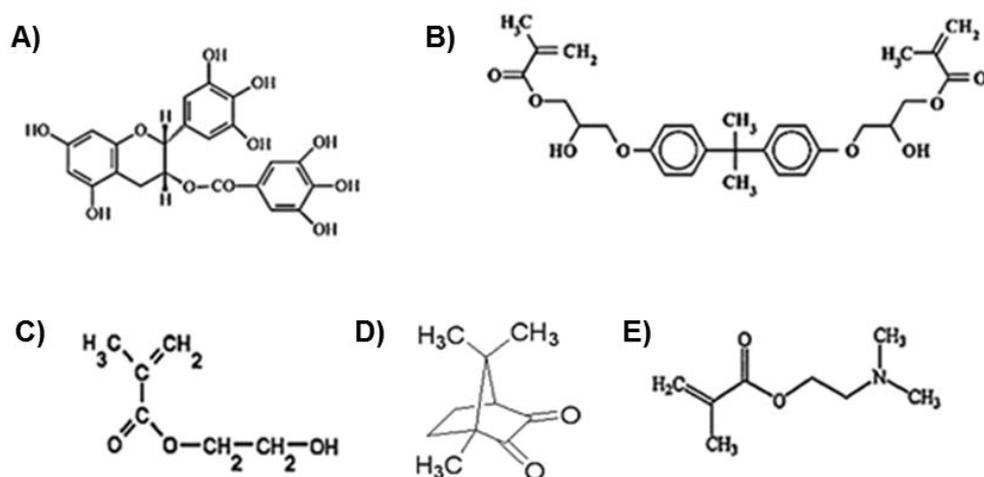


Figura 2 – Estruturas químicas dos componentes usados para manipulação dos adesivos. A) EGCG; B) BisGMA; C) HEMA; D) Canforoquinona; E) DMAEMA.

Um estudo preliminar foi realizado para determinar as concentrações de EGCG a serem adicionadas ao adesivo experimental. As proporções de 0,5% (EGCG 0.5), 1,0% (EGCG 1.0)

e 1,5% (EGCG 1.5), em peso, foram as selecionadas e adicionadas ao adesivo experimental, sendo calculadas a partir da quantidade total do adesivo em peso (Du et al., 2012). Para isso, o componente EGCG foi dissolvido em álcool etílico absoluto 99,5% (Sigma Aldrich, Alemanha) nas concentrações de 5 mg/ml (0,5%); 10 mg/ml (1,0%); 15 mg/ml (1,5%) e adicionado ao adesivo experimental manipulado, na proporção de 2%, chegando as concentrações finais de 100 µg/ml, 200 µg/ml e 300 µg/ml, respectivamente. Os adesivos foram, então, levados ao tubo agitador e misturados vigorosamente por 15 min a 2000 rpm, em ambiente sem luminosidade para homogeneização dos componentes.

A escolha das proporções de EGCG adicionadas ao adesivo baseou-se no grau de conversão (GC) em espectroscopia Micro-Raman (Sistema 2000, Renishaw Engineering, Wotton-under-Edge, UK) dos adesivos modificados pelas diferentes concentrações de EGCG, comparado ao adesivo Controle. Para determinação do GC, cinco gotas (3,0 µl cada) de cada adesivo foram fotopolimerizadas usando um fotopolimerizador de LED (1100 mW/cm² de intensidade) a 3 mm de distância, e analisadas por meio de quatro leituras consecutivas, 1 min cada, no equipamento Micro-Raman, sob uma região de espectro entre 875-1785 cm⁻¹. Através da comparação entre as razões obtidas dos adesivos não polimerizados e polimerizados, feitas pelo próprio equipamento, calculou-se a proporção de ligações C=C alifáticas transformadas em ligações simples C-C, caracterizando a conversão.

Para o cálculo do grau de conversão utilizou-se a seguinte fórmula (Atai et al., 2007):

$$\%GC = 1 \left[- \left(\frac{(1637(\text{cm}^{-1} \text{ interface interna})) \text{ pico após a fotopolimerização}}{(1637(\text{cm}^{-1} \text{ interface interna})) \text{ pico antes da fotopolimerização}} \right) \right] \times 100$$

Foram selecionadas as proporções (% em peso) de EGCG adicionadas ao adesivo que não alteraram o GC dos mesmos, comparado ao adesivo controle experimental, através do cálculo da média do GC de cada adesivo e comparação entre os grupos através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW = 15,388; p = 0,0015) e Teste de Dunn (5%) realizados pelo programa Statistix 8.0 (Tabela 1). Os adesivos com as concentrações de EGCG 1.0 e EGCG 1.5 apresentaram valores de GC estatisticamente maiores que o Controle. Este foi semelhante ao grupo EGCG 0.5.

Tabela 1 – Teste de Comparações Múltiplas de Dunn (5%) para o grau de conversão (em porcentagem) entre os grupos

Adesivos Experimentais	Média % (± DP)	Mediana (25°-75°)	Grupos homogêneos	
EGCG 1.5	99,11 (± 0,65)	99,54 (98,46 - 99,55)	A	
EGCG 1.0	99,02 (± 0,31)	99,05 (98,73 – 99,31)	A	
EGCG 0.5	96,58 (± 1,72)	97,02 (94,76 – 98,17)	A	B
Controle	85,47 (± 7,16)	87,43 (78,19 – 91,78)		B

4.2 Análises mecânicas

4.2.1 Resistência flexural em três pontos (RF), Módulo de elasticidade (ME) e Módulo de resiliência (Re)

Dez amostras de cada adesivo ($n = 10$) foram confeccionadas. Para isso, uma matriz de Teflon (Figura 3A) com dimensões retangulares (12 mm comprimento x 2 mm largura x 2 mm altura) foi utilizada (Odeme Equipamentos Médicos e Odontológicos Ltda, Luzerna, SC). Cada adesivo ainda não polimerizado foi inserido com auxílio de uma micropipeta (Figura 3B) (Pipetman Stater Kit – Gilson S.A.S. – Villiers-le-Bel, Fr), e uma tira de poliéster transparente (FAVA, São Paulo, SP) posicionada sobre a matriz seguida de fotopolimerização por 40 s (20 s em cada metade do corpo de prova) utilizando o mesmo fotopolimerizador de LED, resultando em corpos-de-prova rígidos (Figura 3C).

Cada amostra teve suas dimensões mensuradas com paquímetro digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., Itú, SP, Brasil), e então armazenadas em água destilada por 24 h a 37 °C em estufa bacteriológica (ECB 11 Digital - Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil) antes da realização dos testes. Após esse período, cada corpo-de-prova foi colocado sobre um suporte metálico (Figura 3D) fixado na base da máquina de ensaios universal EMIC, e submetidos ao ensaio de flexão em modificado (Condon, Ferracane, 1996), conforme norma ISO 4049, para determinar a resistência à

microflexão em três pontos e o módulo de elasticidade. Esse suporte é vazado na porção central, contém duas superfícies paralelas distantes entre si por 9,0 mm, o que proporciona dois apoios nas extremidades (Figura 3E). Utilizando uma célula de carga de 10 Kg, um pino metálico é fixado na parte superior da EMIC e exerce uma força de 0,5 Nm/s a uma velocidade de 0,5 mm/min no centro do corpo-de-prova, equidistante aos pontos de apoio, gerando a força de flexão até a fratura (Figura 3F).

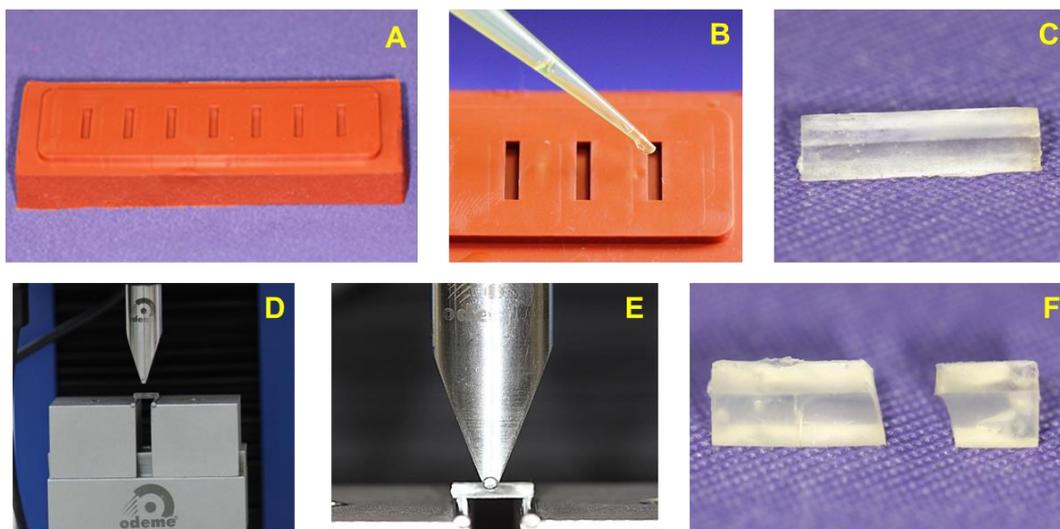


Figura 3 – A) Matriz de Teflon para confecção dos espécimes; B) Inserção do adesivo com auxílio de uma micropipeta; C) Corpo-de-prova rígido; D) Corpo-de-prova sobre o suporte metálico para realização do teste; E) Pino metálico equidistante aos pontos de apoio; F) Espécime fraturado.

Os resultados de resistência flexural em três pontos foram computados automaticamente por um computador acoplado para mapeamento de ensaio em N e convertidos em MPa utilizando a fórmula da especificação ISO 4049, descrita a seguir:

$$\mathbf{RF} = 3\mathbf{FI} / 2\mathbf{bh}^2$$

Onde **RF** é a resistência flexural (MPa), **F** é carga máxima suportada (N), **I** é o comprimento entre os pontos de apoio (9 mm), **b** é a largura do espécime (2 mm) e **h** é a espessura do espécime (2 mm).

O cálculo do ME foi realizado a partir das curvas de deflexão da carga registradas (Arcis et al., 2002), seguindo a fórmula:

$$\mathbf{ME} = \mathbf{I3} \times \mathbf{F1} / 4\mathbf{fbh}^3$$

Onde **I** é a distância entre os suportes, **b** (2 mm) e **h** (2mm) são respectivamente a largura e a altura dos corpos de prova, **F1** (N) a carga e **f** (mm) a deflexão da barra (na fase elástica).

O módulo de resiliência (Re) foi calculado para cada amostra pela seguinte equação:

$$\mathbf{Re} = (\mathbf{RF})^2 / 2\mathbf{ME}$$

Onde **RF** é a resistência flexural, e **ME** o módulo de elasticidade (Peutzfeldt, Asmussen, 1992).

4.2.2 Resistência à compressão (RCo)

Para o cálculo da resistência a compressão (RCo) (MPa) foram confeccionados dez corpos-de-prova em forma de cilindro para cada grupo utilizando-se uma matriz de Teflon cilíndrica (6 mm diâmetro x 3 mm espessura) (Wendt, 1987). Os adesivos foram inseridos nos moldes de Teflon com auxílio de uma micropipeta, uma tira de poliéster sobreposta sobre a matriz para não haver evaporação do adesivo, e fotopolimerização por 40 s. As rebarbas de material foram removidas com uma lâmina de bisturi nº 12.

Todos os corpos-de-prova foram então submetidos a uma carga diametral de 1000 Kg (EMIC DL-1000 – Equipamentos e Sistemas Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil) com velocidade de carregamento de 1,0 mm/min e aplicação da carga no sentido da compressão (Figura 4A), em direção ao longo eixo dos espécimes (Figuras 4B e 4C), até a fratura (Figura 4D).

Os valores de RCo foram calculados em MPa, para cada amostra, através da seguinte equação:

$$RCo = F / A_b$$

Onde **F** é a carga necessária para a fratura (N), e **A_b** é a área da base do corpo-de-prova ($A_b = \pi r^2$) em mm² ($\pi = 3,14$).

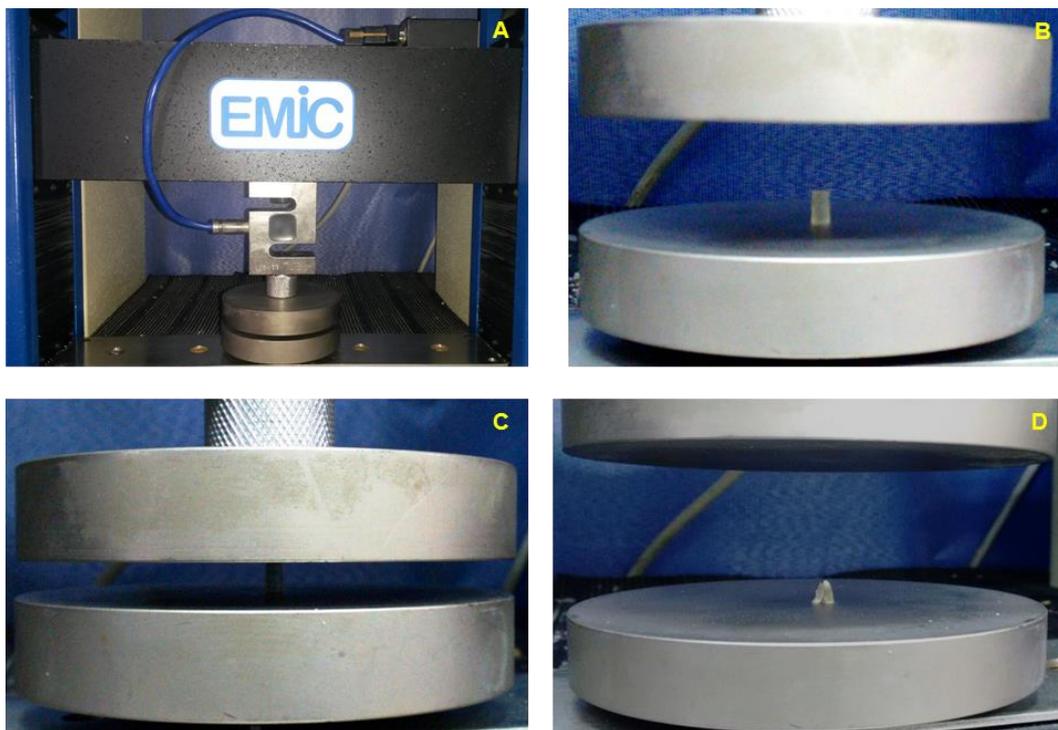


Figura 4 – A) Dispositivos usados no teste; B) Espécime colocado no dispositivo; C) Disco começando a comprimir o espécime; D) espécime fraturado.

4.3 Análises Físico-Químicas

4.3.1 Sorção (A) e Solubilidade (S) em água

Para cada adesivo testado foram confeccionados espécimes ($n = 6$) em forma de disco com dimensões de 7 mm de diâmetro x 2 mm altura usando uma matriz de Teflon. Esse diâmetro foi confeccionado de modo que ocorresse uma padronização de polimerização das amostras em relação ao diâmetro da ponta do fotopolimerizador. O adesivo foi inserido na matriz de Teflon, auxílio

de uma micropipeta (Figura 5A), coberto com uma tira de matriz de poliéster e fotopolimerizado por 40 s (Figura 5B).

Os corpos-de-prova foram, então, armazenados secos individualmente em ependorffs e colocados em um dissecador contendo gel de sílica a 37 °C por 24 h. Após esse período, cada corpo-de-prova foi retirado do dissecador por meio de uma pinça clínica para evitar contato com qualquer outra superfície, e pesados repetidas vezes, após ciclos de 24 h, usando uma balança analítica eletrônica de precisão de 0,0001 g (Mettler, Toledo, OH, USA). Esta sequência de pesagem foi repetida até que uma massa constante (**mi**) fosse alcançada, de modo que a diferença entre as pesagens entre os ciclos não fosse maior que 0,1 mg (ISO 4049:2000).

As medidas do diâmetro e da espessura de cada espécime foram obtidas por meio de um paquímetro eletrônico digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., Itú, SP, Brasil). Através das médias do diâmetro e da espessura calculou-se a área (**A**) do espécime em mm², e o volume (**V**) em mm³ ($V = \pi r^2 h$; onde **r** corresponde ao raio e **h** à espessura do espécime).

Os discos foram então imersos individualmente em ependorffs contendo 1 ml de água destilada (Figura 5C) e armazenados em estufa a 37 °C, por um total de 28 dias (Hiraishi et al., 2008). Após o 28º dia, os ependorffs foram removidos da estufa e mantidos em temperatura ambiente (23 ± 1 °C) por 2 h. Os espécimes foram, então, retirados da água, lavados em água destilada, cuidadosamente limpos com papel absorvente por 15 s, sendo

novamente pesados após 1 min (**ms**). Em seguida, as amostras foram novamente colocadas em ependorffs individuais sem água contendo géis de sílica (Figura 5D), e armazenados por 24 h em estufa a 37 °C para desidratação. Passado esse período, cada espécime foi novamente pesado (Figura 5E) após ciclos de 24 h até se obter uma massa constante (**md**), de forma que a diferença das pesagens entre os ciclos não fosse maior que 0,1 mg.

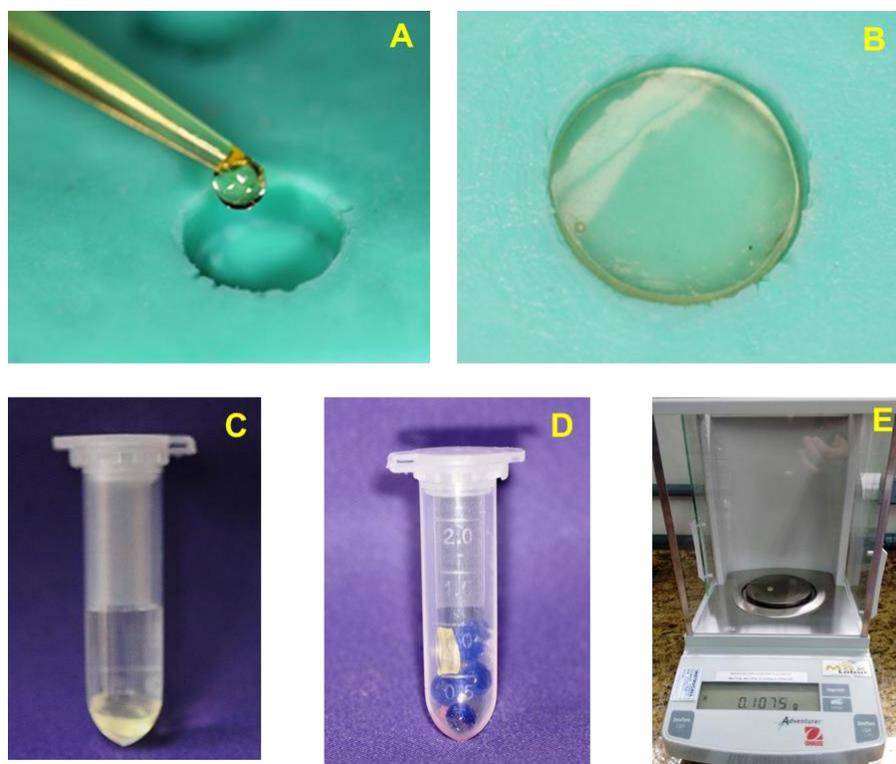


Figura 5 – A) Inserção do adesivo com auxílio de uma micropipeta na matriz de Teflon para confecção dos espécimes; B) Espécime de adesivo em forma de disco; C) Disco de adesivo imerso individualmente em 1 ml de água destilada dentro do ependorff; D) Espécime em ependorff sem água contendo géis de sílica para desidratação; E) Espécime pesado individualmente em balança analítica eletrônica de precisão.

A porcentagem de sorção em água e de solubilidade, em $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ foi calculada usando as seguintes equações (Kalachandra, Turner, 1987):

$$A\% = 100 (m_s - m_i / V); S\% = 100 (m_i - m_d / V)$$

4.3.2 Contração de Polimerização (CP)

Para mensuração da contração de polimerização dos adesivos experimentais foi utilizado o aparelho de vídeo-imagem Acuvol™ (Bisco, Inc.), que captura e analisa imagens da amostra, e permite o cálculo da porcentagem da alteração de volume após a polimerização (Figura 6A e 6B). Para isso, uma gota de adesivo de cerca de 2 μl foi gotejada com auxílio de uma micropipeta (Pipetman Stater Kit – Gilson S.A.S. – Villiers-le-Bel, Fr), aguardou-se 15 s para acomodação da gota na base do equipamento (Figuras 6C), realizou-se a leitura da gota previamente a fotopolimerização, polimerizou por 10 s (Figura 6D) e uma nova leitura foi realizada (Figura 6E). O teste foi repetido dez vezes para cada grupo de adesivo experimental.

Os resultados são dados em porcentagem pelo próprio equipamento, e depois realizada a média dos grupos.

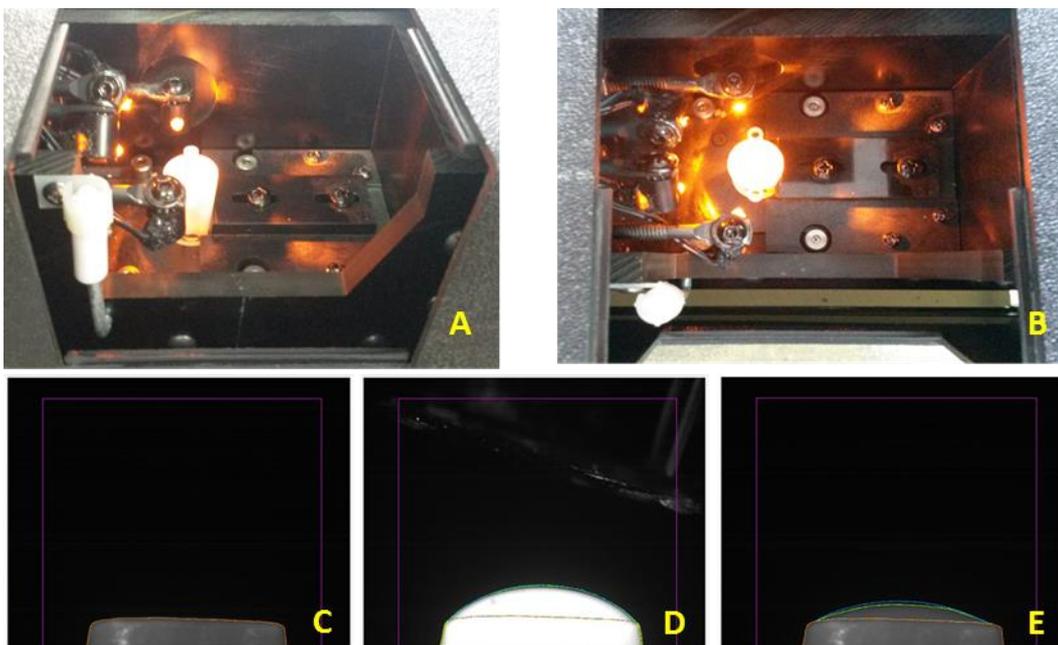


Figura 6 – A e B) Aparelho de vídeo-imagem Acuvol™; C) Base do equipamento onde é gotejado o adesivo; D) Fotopolimerização da gota de adesivo após acomodação; E) Leitura da gota de adesivo polimerizada.

4.4 Teste de resistência adesiva

4.4.1 Seleção dos dentes

Foram utilizados terceiros molares humanos hígidos, extraídos por razões terapêuticas não relacionadas a esta pesquisa (doença periodontal e/ou indicação ortodôntica), na clínica do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia do Instituto de Ciência e Tecnologia – Campos de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista. Os dentes foram limpos com curetas periodontais e pasta de pedra pomes e água, aplicada com escovas de Robinson, e

conservados em solução de timol a 0,1% a 9 °C até o início da pesquisa (Titley et al., 1998).

4.4.2 Seleção e Preparo dos Espécimes

Oitenta molares humanos hígidos (Figura 7A) recém-extraídos e armazenados por até 30 dias em freezer a 7 °C foram preparados realizando-se desgaste da superfície oclusal com o emprego de lixa d'água de granulação P400 (Fepa-P, Panambra, São Paulo, SP, Brasil), acoplados a uma politriz circular (DP-10, Panambra, São Paulo, SP, Brasil) a 300 rpm, sob refrigeração permanente com água (Figura 7B), criando uma superfície plana de dentina (Figura 7C). Para padronização da *smear layer* utilizou-se discos de lixa de carboneto de silício (Extec Corp. Enfield, CT, EUA) de granulação 600, sob refrigeração abundante, por 10 s, a 300 rpm (Figura 7D). Em seguida, foram usados moldes de silicone industrial Rhodorsil (Artigos Odontológicos Clássico, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil) de formato cilíndrico com medidas internas de 1,5 cm de altura e 2,0 cm de diâmetro (Figura 7E), que foram preenchidos com resina acrílica quimicamente ativada incolor (Jet, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil) quando na sua fase pegajosa (Figura 7F). Os dentes foram então inseridos pelas raízes, até 1 mm abaixo da junção cimento-esmalte, de forma que a superfície oclusal ficasse paralela a base da matriz de silicone. Concluída a

polimerização, os espécimes foram retirados do molde (Figura 7G). A parte superior do bloco, onde se encontra o dente embutido com a superfície oclusal desgastada foi novamente polida por 1 min, sob refrigeração constante, com discos de lixa d'água P600 (Fepa-P, Panambra, São Paulo, SP, Brasil), utilizando o dispositivo de polimento automático Autopol - 2 (Panambra, São Paulo, SP, Brasil) acoplado a politriz circular, que garante que a superfície polida fique exatamente perpendicular ao longo eixo do cilindro, para remoção de resíduos e padronização da *smear layer*. A parte inferior do cilindro, só em resina, foi polida por 3 min com a lixa P400 (Fepa-P, Panambra, São Paulo, SP, Brasil), sob uma carga de 440 gr, para planificação e padronização da textura de superfície (Figura 7H). Concluída essa etapa, todos os espécimes ficaram imersos em água destilada até o momento da realização dos procedimentos adesivos.

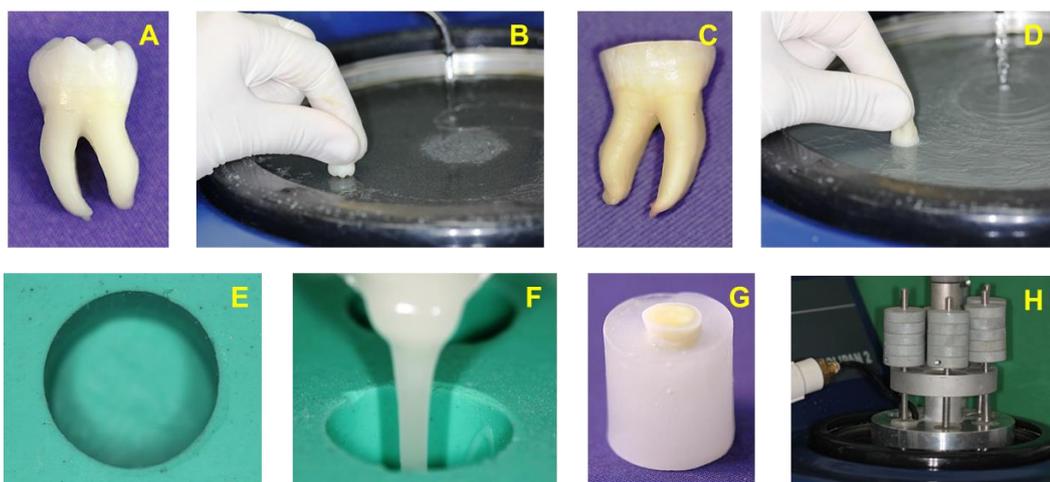


Figura 7 – Preparo e embutimento dos espécimes. A) Molar humano hígido; B) Desgaste da superfície de esmalte para exposição de uma área de dentina oclusal plana; C) Dente com a superfície oclusal plana; D) Padronização da *smear layer*; E) Matriz de silicone para embutir os espécimes; F) Preenchimento com resina acrílica quimicamente ativada; G) Remoção do espécime após reação de presa; H) Polimento dos espécimes para planificação e padronização das superfícies.

4.4.3 Procedimento Adesivo

Os adesivos experimentais foram aplicados sobre a dentina exposta, após condicionamento ácido prévio, sendo classificados como sistema adesivo de condicionamento ácido prévio simplificado de 2 passos. Para isso, foi adicionado aos adesivos experimentais 30% vol. em álcool etílico absoluto 99,5% (Sigma Aldrich, Alemanha) como solvente e deixado sobre agitação por 24 h para homogeneização dos adesivos com o álcool etílico antes da realização dos procedimentos adesivos. A seguir, descreve-se detalhadamente a sequência de aplicação para cada grupo:

Grupo Controle – ácido fosfórico a 37% por 15 s (Figura 8A); lavagem com spray ar-água por 30 s; remoção do excesso de umidade com papel absorvente (Figura 8B); aplicação de duas camadas consecutivas do adesivo experimental controle, agitação do produto com pincel aplicador (Microbrush Interanational, WI, EUA) por 15 s (Figura 8C), secagem suave com jato de ar por 5 s para evaporação do solvente, seguida de fotopolimerização por 20 s.

Grupo EGCG – dividido em três subgrupos, de acordo com a concentração de EGCG presente em cada adesivo:

- a) **EGCG 0.5** – ácido fosfórico a 37% por 15 s; lavagem com spray ar-água por 30s; remoção do excesso de umidade com papel absorvente; aplicação de duas camadas consecutivas do adesivo experimental contendo EGCG

(concentração 0.5 mg/ml), agitação do produto com pincel aplicador (Microbrush Interanational, WI, EUA) por 15 s, secagem suave com jato de ar para evaporação do solvente por 5 s, seguida de fotopolimerização por 20 s;

- b) EGCG 1.0** – procedimento semelhante ao realizado pelo EGCG 0.5, alterando-se apenas a concentração do EGCG (concentração 1.0 mg/ml);
- c) EGCG 1.5** – procedimento semelhante ao realizado pelo grupo EGCG 0.5, alterando-se apenas a concentração do EGCG (concentração 1.5 mg/ml).

4.4.4 Procedimento Restaurador

Realizado o procedimento adesivo, todos os corpos-de-prova foram restaurados com a resina composta Z-350XT (3M ESPE, St. Paul, MN, USA), em 3 incrementos de 2,0 mm de espessura (Figura 8D).

Cada incremento foi fotopolimerizado por 20 s, a uma distância padronizada, com aparelho de luz LED, comprimento de onda que varia entre 440 nm a 480 nm e densidade de potência de

1100 mW/cm² de intensidade (Demi Plus, Kerr, Joinville, Brasil). Uma fotoativação complementar foi realizada por 40 s em cada lado da restauração.

Todas as amostras foram, então, armazenadas em água destilada. Após o período de 24 h, metade dos espécimes de cada grupo foi submetida ao teste de microtração.

Os espécimes restantes permaneceram armazenados em água destilada, em estufa bacteriológica, a 37 °C por um período de 6 meses, com troca de água semanal, até a realização do teste de microtração após armazenamento.

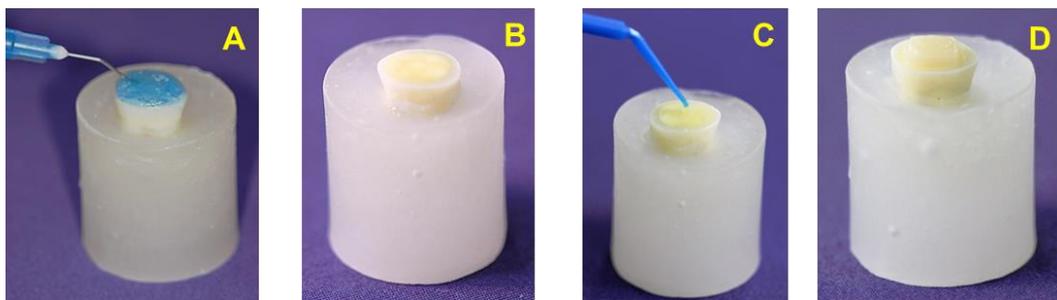


Figura 8 – Procedimento adesivo e restaurador. A) Condicionamento da superfície oclusal com ácido fosfórico 37% por 15 s; B) Superfície oclusal após remoção do excesso de umidade com papel absorvente; C) Aplicação do adesivo experimental; D) Dente restaurado com resina composta.

Os materiais, fabricantes, suas composições e lotes usados nesse estudo estão listados no Quadro 1.

Quadro 1 – Materiais usados no estudo, fabricantes, suas composições e lotes

MATERIAL	FABRICANTE	COMPOSIÇÃO	LOTE
Ácido Fosfórico 37%	Fusion Duralink / Angelus	Ácido fosfórico a 37%, Espessante, Corante, Água deionizada.	26824
Filtek^{MR} Z350 XT Cor A3 Esmalte	3M ESPE	Cerâmica tratada com silano, BisGMA, bisfenol A polietileno glicol diéter dimetacrilato (BisEMA), sílica tratada com silano, sílica-óxido de zircônia tratado com silano, diuretano dimetacrilato, dimetacrilato polietilenoglicol, dimetacrilato de trietileno glicol (TEGDMA), 2,6-di-terc-butil-p-cresol (BHT) e pigmentos.	881383

4.4.5 Teste de resistência adesiva à microtração (RA)

Vinte dentes restaurados de cada grupo experimental foram preparados para o teste de resistência adesiva. Após 24 h da confecção dos procedimentos adesivos e restauradores, metade dos dentes armazenados (n = 10) foram randomizados e realizadas secções paralelas ao longo eixo dos dentes nos sentidos méso-distal (MD) e vestibulo-lingual (VL), com espessura aproximada de 1.0 mm, em uma máquina de cortes seriados Labcut 1010 (Extec Technologies Inc., Enfield, CT, EUA) utilizando-se um disco de diamante (Figura 9A) em baixa velocidade, sob refrigeração abundante, obtendo-se palitos de resina composta e estrutura dental (Figura 9B). Cada dente

originou cerca de seis a nove palitos internos (Figura 9C). Os palitos selecionados para o ensaio de microtração foram aqueles em que a área de união permaneceu preservada após as secções, e as estruturas adjacentes à interface adesiva ofereceram extensão mínima de 2.0 mm e nenhum defeito superficial. A outra metade dos dentes de cada dente permaneceu armazenada pelo tempo determinado para posterior obtenção dos palitos para o teste de microtração.

Cada grupo foi dividido em 2 subgrupos (n=10), de acordo com o tempo de armazenagem:

- a) **Imediato:** 24 h de armazenagem em água destilada a 37 °C;
- b) **6 meses:** 6 meses de armazenagem em água destilada a 37 °C, sendo a água destilada trocada semanalmente (Kitasako et al., 2000; Hashimoto et al., 2003; Abdalla et al., 2007).

A área dos palitos foi mensurada previamente à execução do ensaio mecânico (Figura 9D) com um paquímetro eletrônico digital (Starrett indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

O valor da área e o valor de carga para rompimento da união serviu para calcular a resistência de união à tração em Mega Pascal (MPa) através da seguinte fórmula:

$$R_m = F/A$$

Onde: **R_m** é a resistência à microtração; **F** é a força aplicada em Kgf; e **A** é a área de união em mm.

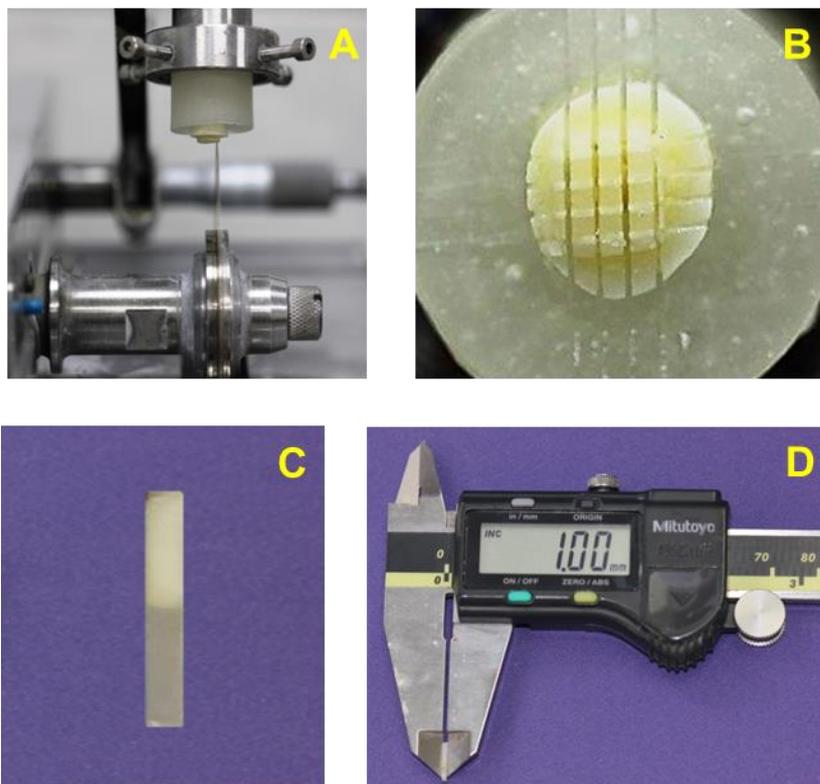


Figura 9 – Secções perpendiculares à interface adesiva nos sentidos MD e VL em cortadeira de precisão Labcut 1010; B) Obtenção de nove palitos por dente; C) Corpo-de-prova na forma de paralelogramo de resina composta e estrutura dental; D) Mensuração da área de cada palito com auxílio de um paquímetro digital.

Cada corpo-de-prova foi, então, fixado individualmente em um dispositivo para teste de microtração (Figura 10A), pelas suas extremidades, com um adesivo instantâneo gel a base de cianoacrilato (Loctite 454 gel, Henkel, Itapevi, SP, Brasil), de modo a posicionar a área adesiva perpendicularmente ao longo eixo da

força de tração (Perdigão et al., 2002), para realização do ensaio de microtração (Figura 10B) em máquina de testes universais EMIC (DL-1000, Equipamentos e Sistemas Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil). Foi utilizada uma célula de carga de 10 Kgf, a uma velocidade de 0,5 mm/min (ISO/TR 11405:1994). No momento da fratura, o movimento foi interrompido de forma automática, o corpo-de-prova removido da máquina (Figura 10C), e os valores referentes à resistência de união em MPa coletados e tabelados para a realização da análise estatística.

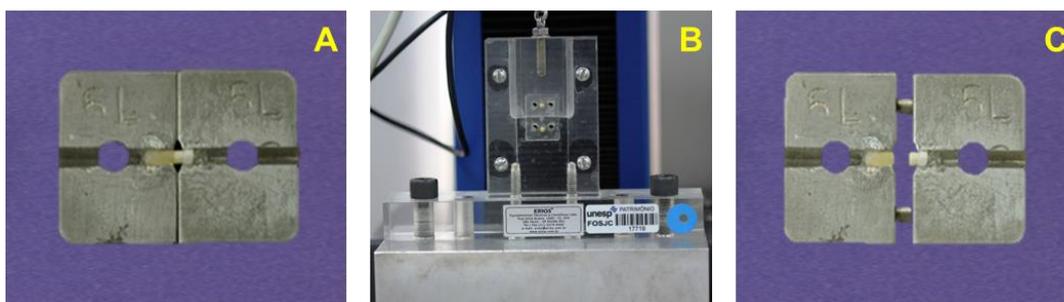


Figura 11 – Teste de microtração: A) Fixação individual do corpo-de-prova no dispositivo para teste de microtração; B) Corpo-de-prova posicionado na máquina EMIC para realização do ensaio de microtração; C) Corpo-de-prova fraturado.

Os palitos fraturados após a realização do teste de microtração foram analisados em estereomicroscópio X20 (Stemi 2000 – Karl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemanha) com aumento de 50 vezes, para determinar qual o tipo de fratura (Ohkubo et al., 1982; Sengun et al., 2002) (Figura 11):

Coesiva em RC: Fratura predominantemente (cerca de 75%) no interior da resina composta;

Coesiva em Dentina: Fratura predominantemente (cerca de 75%) no interior da dentina;

Adesiva: Fratura na interface adesivo / dentina ou na interface adesivo / resina composta, em mais de 75% da área analisada;

Mista: Fraturas sem predominância maior que 75% de qualquer tipo de falha.

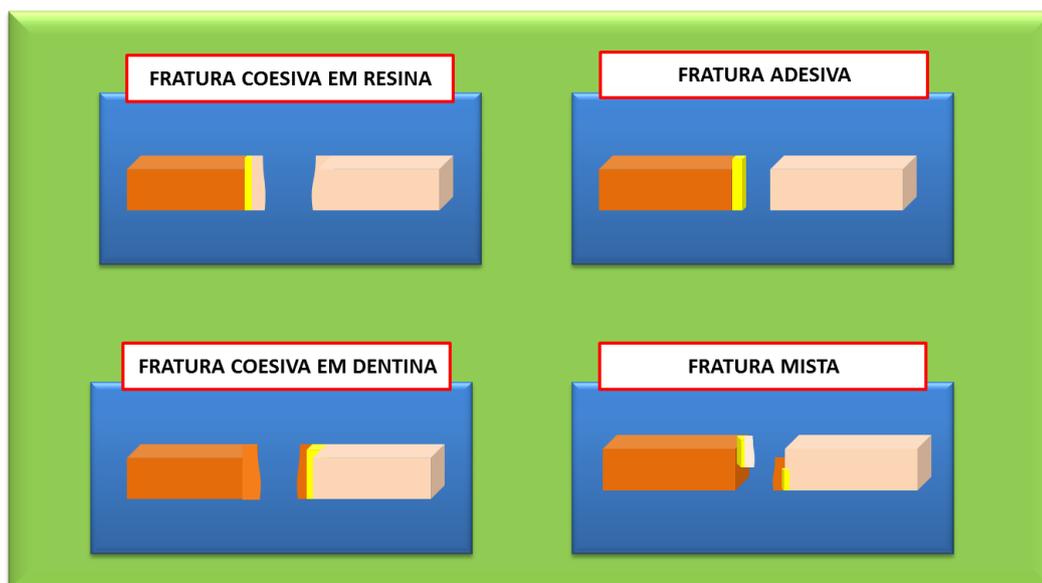


Figura 11 – Tipos de fratura dos espécimes após teste de microtração.

Os dados resultantes de fraturas coesivas foram desprezados, sendo utilizados apenas os dados das fraturas adesivas e mistas. Para efeito de análise estatística, uma média calculada com os palitos testados foi realizada para cada dente preparado.

4.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise da interface adesiva frente aos diferentes tratamentos, prepararam-se dois espécimes adicionais de cada grupo que foram observados em MEV. Para isso, os espécimes foram preparados e restaurados de forma similar à técnica empregada para o ensaio mecânico por microtração. Seccionados no sentido MD e VL em máquina de cortes seriados Labcut, obtendo-se quatro corpos-de-prova de cada espécime.

Para observação da interface adesiva, cada corpo-de-prova teve sua interface polida com lixas d'água de granulação crescente (600, 1200 e 4000) em politriz circular sob refrigeração, e posteriormente fixados em glutaraldeído a 2,5% em 0,1 M de cacodilato de sódio solução tampão, a 4 °C, por 12 h, com três trocas, seguido por água destilada por 1 min, e desidratados numa série ascendente de etanol (25% por 20 min, 50% por 20 min, 75% por 20 min, 95% por 30 min e 100% por 60 min). Após essa etapa, os espécimes ficaram imersos, por 10 min, em hexamethyldisilazane (Fluka), em uma capela para exaustão de gases sobre um filtro de papel sob uma campânula de vidro, por 30 min, em temperatura ambiente para completar a desidratação (Perdigao et al., 1995).

Após essa etapa os corpos-de-prova foram montados em stubs de alumínio e observados em MEV (Phenom World Pro X – Anacom Científica, SP, BR) em baixo vácuo com ampliação de 2000 vezes, não sendo necessário, portanto, sua metalização.

4.5 Análise biológica

4.5.1 Ensaio de citotoxicidade (CI)

Para o teste de citotoxicidade os extratos originais (adesivos manipulados) e suas diluições foram colocados em contato com fibroblastos de polpa dentária humana.

4.5.1.1 Descongelamento

Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar (Grupo Veco, Campinas, Brasil). Em um frasco médio para cultura celular (garrafa 75 cm³ – 270 ml) foram pipetados 10 ml de meio de cultura. Este meio tem como função nutrição celular e neutralização do DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma Aldrich Co., Germany), substância em que a célula é congelada e em temperatura ambiente torna-se tóxica para as mesmas. O puxador e a caixa do tambor de nitrogênio (Thermo Fisher Scientific Inc, United States) (Figura 12A), que continham as células fibroblastos de polpa dentária humana, foram selecionados de acordo com o livro de registros do banco de células do laboratório de cultura de células do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/SP –

UNESP. Um tubo criogênico foi, então, removido e levado a banho-maria (Quimis, Aparelhos Científicos, Brasil) até o descongelamento (Figura 12B). Após, o conteúdo descongelado foi despejado no frasco de cultura celular contendo meio de cultura (Figura 12C).

O frasco foi levado ao microscópio de luz invertida (Leica Leitz, Germany) para constatar a presença das células. Após, o frasco foi levado à estufa atmosférica a 37 °C com tensão de CO₂ 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, United States).



Figura 12 – A) Tambor de nitrogênio e puxador com as caixas contendo as células congeladas; B) Coleta das células fibroblastos de polpa dentária humana do tubo criogênico; C) Passagem das células para a garrafa de cultivo celular.

4.5.1.2 Preparo dos meios condicionados

Fibroblastos da polpa dentária humana foram cultivados em DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica (Penicilina / Streptomina – Sigma Aldrich, Alemanha).

Para o plaqueamento utilizou-se uma quantidade de 3000 células por poço, numa placa de 96 poços. Todas as placas foram incubadas por 24 h em estufa 37 °C (5% de CO₂). Para obter um meio condicionado, tubos de ensaio contendo 0,4 g de adesivo foram preenchidos com 1 ml de DMEM fresco para cada grupo.

Estes meios foram colocados em contato com os adesivos não polimerizados (Figura 13A) e agitados em aparelho Vortex (TS-2000A VDRL Shaker – Biomixer, Curitiba, Br) por 1 min para homogeneização.

Passados 24 h do plaqueamento, o meio antigo foi removido (Figura 13B) e as culturas celulares expostas a 100 µl de diluições seriadas (10%, 1%, 0,1%, e 0,01%) e 100 µl dos extratos originais dos materiais (100%); para controle negativo foram usados 100 µl de meio de cultura sem células (branco) e para controle positivo 100 µl de meio de cultura com células.

As placas foram incubadas em estufa em 5% de CO₂ a 37 °C por 24 h, 48 h e 72 h. Para cada diluição dos extratos originais e para os controles foram plaqueados 6 poços por placa (Figura 13C). Desse modo, obtivemos 36 amostras para cada adesivo.

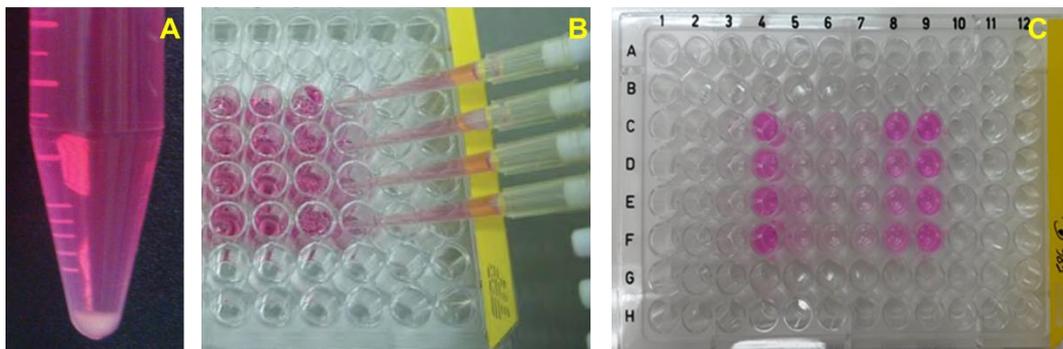


Figura 13 – A) Meio contendo adesivo não polimerizado antes da agitação no Vortex; B) Remoção do meio antigo; C) Placa de 96 poços com o plaqueamento de seis poços por diluição dos extratos originais e os controles.

4.5.1.3 Teste de viabilidade celular por SRB

O teste de citotoxicidade adotado baseia-se na coloração de proteínas pelo corante SRB (sulforodamina B). Este corante apresenta dois grupos sulfônicos que se ligam as proteínas das células fixadas na placa. Estas proteínas foram previamente precipitadas pelo ácido tricloroacético (TCA). Após 24 h das células em contato com os extratos, removeu-se o meio e os poços foram lavados com 100 μ l de solução de PBS (solução salina tamponada), e substituídos por 100 μ l de TCA a 10% em cada poço. As placas foram incubadas por 1 h em geladeira a 4 °C. Após esse período, removeu-se a solução TCA e a placa foi lavada em água corrente. Aguardou-se 24 h para completa secagem das placas em temperatura ambiente, então se adicionou 50 μ l de SRB 0,1% (diluída em ácido acético 1%) em cada poço. Aguardou-se 1 h em temperatura ambiente.

Após remoção da solução de SRB as placas foram lavadas quatro vezes com ácido acético 1%, aguardaram-se 24 h para

secagem em temperatura ambiente. As proteínas foram solubilizadas pela ação de 100 μ l de solução Tris-base 10 mM/l, por 1 h em cada poço (Figura 14A).

As placas foram, então, levadas ao espectrofotômetro para mensuração utilizando um comprimento de onda de 570 nm (Cavalcanti et al., 2005) (Figura 14B). Dessa forma, os valores de absorvância foram normalizados pelo controle sem tratamento e submetidos à análise estatística. A absorvância encontrada para o controle positivo (células crescidas na ausência dos compostos testes, somente no meio DMEM) corresponde ao valor de 100% de sobrevivência.



Figura 14 – A) Placa de 96 poços após ação de solução Tris-base 10 mM/l; B) Espectrofotômetro com a placa acoplada para leitura da absorvância.

4.6 Planejamento estatístico

As hipóteses de nulidade testadas foram:

H0a – Não há influência da associação do EGCG nas diferentes concentrações sobre as propriedades mecânicas, físico-químicas e biológica do adesivo em estudo quando comparado ao grupo controle;

H0b – Não há influência da associação do EGCG nas diferentes concentrações sobre os valores de resistência de união para o sistema adesivo em estudo quando comparado ao grupo controle;

H0c – Não há influência do armazenamento sobre os valores de união da interface adesiva para os grupos estudados.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do programa computacional Statistix 8.0.

4.7.1 Análises mecânicas

Para os testes de Resistência flexural em três pontos, Módulo de elasticidade, Módulo de resiliência e Resistência a compressão a variável em análise foram os valores de média de cada

grupo, sendo realizada a Análise de variância (ANOVA) um fator e o Teste de múltiplas comparações de Tukey ($\alpha = 0,05$).

4.7.2 Análises físico-químicas

Para os testes de Absorção e Solubilidade em água e Contração de Polimerização a variável em análise foi a média de cada grupo, sendo realizada a Análise de variância (ANOVA) um fator e o Teste de múltiplas comparações de Tukey ($\alpha = 0,05$).

4.7.3 Teste de resistência à microtração

Para o teste de Resistência adesiva a microtração a variável em análise foi o valor de resistência média de cada dente, calculada a partir a média dos valores obtidos por palito no ensaio de microtração. A estatística descritiva consistiu no cálculo de média e desvio padrão.

A estatística inferencial consistiu no teste de Análise de variância (ANOVA) dois fatores, efeito fixo (estratégias adesivas e armazenamento), que considera três possíveis efeitos: a existência de diferença estatisticamente significativa entre as Estratégias Adesivas;

entre o Armazenamento 24 h e 6 meses e, ainda, a interação entre os dois fatores, e o Teste de múltiplas comparações de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Para a Microscopia eletrônica de varredura realizou-se uma análise complementar da interface adesiva com caráter ilustrativo da interface de união entre resina e dentina para os diferentes grupos.

4.7.4 Análise Biológica

O Ensaio de Citotoxicidade foi submetido ao teste de Kruskal-Wallis e Teste de múltiplas comparações de Dunn ($\alpha = 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análises mecânicas

5.1.1 Resistência flexural em três pontos, Módulo de elasticidade e Módulo de resiliência

O teste ANOVA um fator para Resistência Flexural em três pontos mostrou que não houve diferença entre os grupos ($p = 0,194$), sendo confirmado pelo teste de múltipla comparação Tukey (5%) (Tabela 2).

Tabela 2 – Teste de Tukey para Resistência Flexural (valores de média em MPa)

Grupos	Média (\pm DP)	Grupos homogêneos
EGCG 0.5	97,54 (\pm 4,94)	A
EGCG 1.0	95,80 (\pm 5,18)	A
CONTROLE	89,37 (\pm 5,18)	A
EGCG 1.5	83,15 (\pm 5,18)	A

*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%.

Para comparação do Módulo de elasticidade entre os grupos também foi realizado o teste ANOVA um fator que mostrou não haver diferença entre os grupos ($p = 0,836$). A Tabela 3 confirma

que não houve diferença entre os grupos pelo teste de Tukey (5%).

Tabela 3 – Teste de Tukey para Módulo de elasticidade (valores de média em MPa)

Grupos	Média (± DP)	Grupos homogêneos
EGCG 0.5	0,87 (± 0,043)	A
EGCG 1.0	0,88 (± 0,045)	A
EGCG 1.5	0,85 (± 0,045)	A
CONTROLE	0,82 (± 0,045)	A

*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%.

Para o Módulo de Resiliência foi realizado o teste ANOVA um fator onde não foi encontrada diferença entre os grupos ($p=0,222$). O que pode ser verificado pelo teste de múltipla comparação Tukey (5%) (Tabela 4).

Tabela 4 – Teste de Tukey para Módulo de Resiliência (valores de média em MPa)

Grupos	Média (± DP)	Grupos homogêneos
EGCG 0.5	5,31 (± 1,18)	A
EGCG 1.0	5,23 (± 1,01)	A
CONTROLE	4,89 (± 0,87)	A
EGCG 1.5	4,25 (± 1,68)	A

*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%.

5.1.2 Resistência à compressão

O teste de Análise de variância um fator para a Resistência à Compressão mostrou não haver diferença entre os grupos ($p = 0,7204$), sendo confirmado pelo teste de múltipla comparação de Tukey (5%) (Tabela 5).

Tabela 5 – Teste de Tukey para Resistência a Compressão (valores de média em MPa)

Grupos	Média (\pm DP)	Grupos homogêneos
CONTROLE	275,21 (\pm 19,12)	A
EGCG 0.5	257,46 (\pm 17,10)	A
EGCG 1.5	251,23 (\pm 17,10)	A
EGCG 1.0	247,14 (\pm 17,10)	A

*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%.

5.2 Análises Físico-Químicas

5.2.1 Absorção e Solubilidade em Água

Realizou-se o teste ANOVA um fator para o teste de Absorção em água. Houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,010$). A Tabela 6 descreve o teste de múltipla comparação de Tukey (5%).

Tabela 6 – Teste de Tukey para o teste de Absorção (valores de média em gramas)

Grupos	Média (± DP)	Grupos homogêneos	
CONTROLE	0,0096 (± 0,0006)	A	
EGCG 1.5	0,0096 (± 0,0005)	A	
EGCG 1.0	0,0091 (± 0,0005)	A	B
EGCG 0.5	0,0083 (± 0,0006)		B

*Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ao nível de significância de 5%.

Pode-se verificar que o grupo EGCG 0.5 apresentou os menores valores estatisticamente significantes de absorção quando comparado aos grupos Controle e EGCG 1.5, mas estatisticamente semelhante ao grupo EGCG 1.0.

Para o teste de Solubilidade em água realizou-se o teste ANOVA um fator que apresentou diferença entre os grupos ($p = 0,001$).

O teste de múltiplas comparações de Tukey (5%) mostrou que o grupo EGCG 0.5 apresentou menor solubilidade estatisticamente significativa comparado ao grupo Controle e EGCG 1.5, mas estatisticamente semelhante ao grupo EGCG 1.0. Este apresentou menor solubilidade comparada ao grupo Controle (Tabela 7).

Tabela 7 – Teste de Tukey para o teste de Solubilidade (valores de média em gramas)

Grupos	Média (± DP)	Grupos homogêneos		
CONTROLE	0,0023 (± 0,0003)	A		
EGCG 1.5	0,0018 (± 0,0004)	A	B	
EGCG 1.0	0,0013 (± 0,0003)	B		C
EGCG 0.5	0,0010 (± 0,0002)	C		

*Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ao nível de significância de 5%.

5.2.2 Contração de Polimerização

Para comparação da Contração de Polimerização entre os grupos realizou-se o teste ANOVA um fator para os adesivos testados. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,214$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Teste de Tukey para Contração de Polimerização (valores de média de perda de volume em porcentagem)

Grupos	Média (± DP)	Grupos homogêneos
EGCG 1.5	24,34 (± 2,27)	A
CONTROLE	21,07 (± 2,07)	A
EGCG 1.0	18,82 (± 2,07)	A
EGCG 0.5	18,09 (± 2,27)	A

*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%.

5.3 Teste de resistência adesiva

5.3.1 Resistência adesiva à microtração

Para avaliar a inter-relação entre os períodos de tempo de armazenamento e os adesivos experimentais, os dados obtidos em nosso experimento foram submetidos ao modelo estatístico de Análise de variância (ANOVA) dois fatores, elemento fixo após ser considerada a distribuição de normalidade. Verifica-se na Tabela 9 que houve diferença significativa entre os adesivos estudados, bem como entre os períodos de armazenamento e a interação entre os adesivos estudados e os períodos de tempo ($p < 0,05$).

Tabela 9 – ANOVA dois fatores para estratégias adesivas e armazenamento dos grupos

Source	DF	SS	MS	F	P*
Adesivos Experimentais (AE)	3	160,34	53,44	3,20	0,0284
Armazenamento	1	582,93	582,92	34,91	0,0000
Armazenamento*AE	3	355,72	118,57	7,10	0,0003
Resíduo	71	1185,65	16,69		
Total	78				

* Nível de significância ($p < 0.05$).

A comparação entre os grupos pelo teste de Tukey para Múltiplas Comparações (5%) (Tabela 10) mostrou que houve

diferença estatisticamente significativa para o grupo EGCG 0.5 em relação ao grupo EGCG 1.5. Os grupos Controle e EGCG 1.0 não diferiram entre si.

Tabela 10 – Teste de Tukey para interação entre os adesivos experimentais (valores de média em MPa)

Armazenamento	Média (\pm DP)	Grupos homogêneos	
EGCG 0.5	24,09 (\pm 5,95)	A	
CONTROLE	22,39 (\pm 4,26)	A	B
EGCG 1.0	22,24 (\pm 4,23)	A	B
EGCG 1.5	19,96 (\pm 6,32)		B

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%.

O teste de Tukey para Múltiplas Comparações (5%) entre os tempos imediato e seis meses de armazenamento mostrou que para o tempo imediato os valores de resistência adesiva foram estatisticamente maiores, indicando uma queda nos valores de resistência de união após o armazenamento (Tabela 11).

Tabela 11 – Teste de Tukey para interação entre os tempos de armazenamento (valores de média em MPa)

Armazenamento	Média (\pm DP)	Grupos homogêneos	
Imediato	24,92 (\pm 4,63)	A	
6 meses	19,43 (\pm 4,66)		B

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%.

Quando se comparam os oito valores médios das condições experimentais (Tabela 12), por meio do teste de Tukey (5%), pode-se verificar que para o tempo imediato, todos os grupos obtiveram valores de resistência de união estatisticamente semelhantes. Entretanto, após seis meses de armazenamento o grupo EGCG 1.5 apresentou os piores valores de resistência de união, mas estatisticamente semelhante ao grupo Controle. Os grupos EGCG 0.5 e EGCG 1.0 mantiveram os valores de resistência de união após o armazenamento.

Tabela 12 – Teste de Tukey para interação entre os adesivos e os tempos de armazenamento (valores de média em MPa)

Estratégias adesivas	Armazenamento	Média (\pm DP)	Grupos homogêneos	
CONTROLE	Imediato	27,15 (\pm 4,20)	A	
EGCG 0.5	Imediato	27,03 (\pm 2,72)	A	
EGCG 1.5	Imediato	24,93 (\pm 4,55)	A	
EGCG 0.5	6 meses	23,00 (\pm 3,84)	A	B
EGCG 1.0	Imediato	22,41 (\pm 4,17)	A	B
EGCG 1.0	6 meses	22,07 (\pm 4,34)	A	B
CONTROLE	6 meses	17,63 (\pm 2,51)	B	C
EGCG 1.5	6 meses	15,00 (\pm 2,91)		C

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%.

5.3.2 Análise do Padrão de Fratura

Para a análise do padrão de fratura considerou-se as falhas pré-teste e os tipos de fratura dos corpos-de-prova avaliados em microscópio óptico, após a fratura dos palitos no teste de microtração. Padronizou-se o número mínimo de palitos obtidos por dente em cinco. Abaixo desse valor foi considerado que houve falha pré-teste por espécime. Os tipos de falha foram classificados conforme a região da fratura em quatro aspectos: coesiva em dentina, coesiva em resina, adesiva ou mista. Somente as falhas adesivas e mistas foram usadas para análise estatística. As fraturas coesivas foram desprezadas.

O resultado para o total de palitos obtidos e perdidos por falha pré-teste em termos de porcentagem está apresentado na Figura 15. Houve uma maior porcentagem de falhas pré-teste após o armazenamento para todos os grupos, quando comparado ao tempo imediato.

Pode-se observar que para o tempo imediato, assim como, para o tempo de seis meses houve uma variação na distribuição do padrão de fratura entre os grupos, com predominância de falhas do tipo mista e adesiva em comparação as fraturas do tipo coesiva, independente do adesivo utilizado. O que efetiva o método de microtração utilizado para a avaliação da interface adesiva entre resina e dentina.

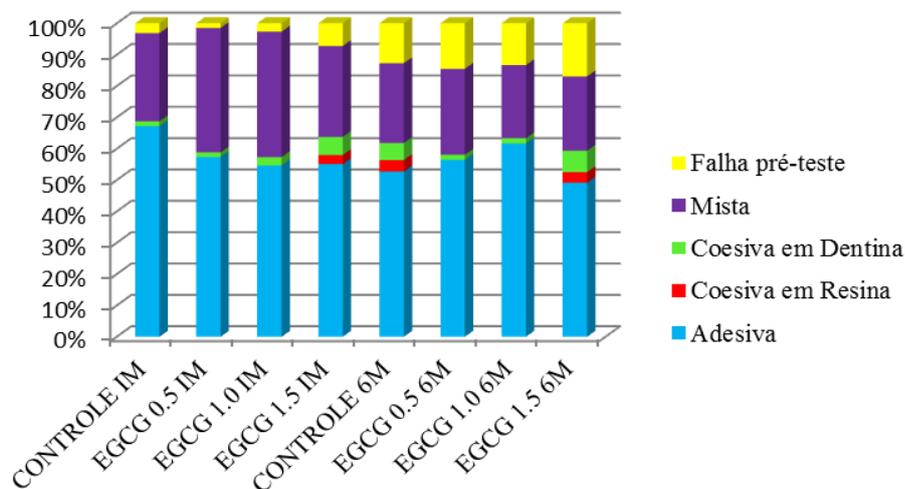


Figura 15 – Gráfico de colunas – classificação do padrão de fratura dos grupos em porcentagem.

5.3.3 Microscopia eletrônica de Varredura

As fotomicrografias ilustrativas da interface de união entre resina e dentina para os diferentes adesivos experimentais, a seguir, representam a camada de adesivo formada, a camada híbrida, os túbulos dentinários e parte da RC para os períodos de tempo de armazenamento imediato (Figura 16) e após seis meses (Figura 17) realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em baixo vácuo.

Para o tempo imediato (Figura 16), verifica-se que para todos os grupos houve formação de camada híbrida com presença de tags resinosos no interior dos túbulos dentinários. Além de uma camada de adesivo contínua e delgada.

Após seis meses de armazenamento em água destilada (Figura 17), pode-se verificar que para o grupo Controle há presença de fenda com rompimento de alguns túbulos dentinários.

Assim como, para o grupo EGCG 1.5 há presença de fenda entre a camada de adesivo e a camada híbrida. Os grupos EGCG 0.5 e EGCG 1.0 mantiveram a integridade da camada híbrida com manutenção dos tags resinosos e camada de adesivo contínua, sem presença de fendas.

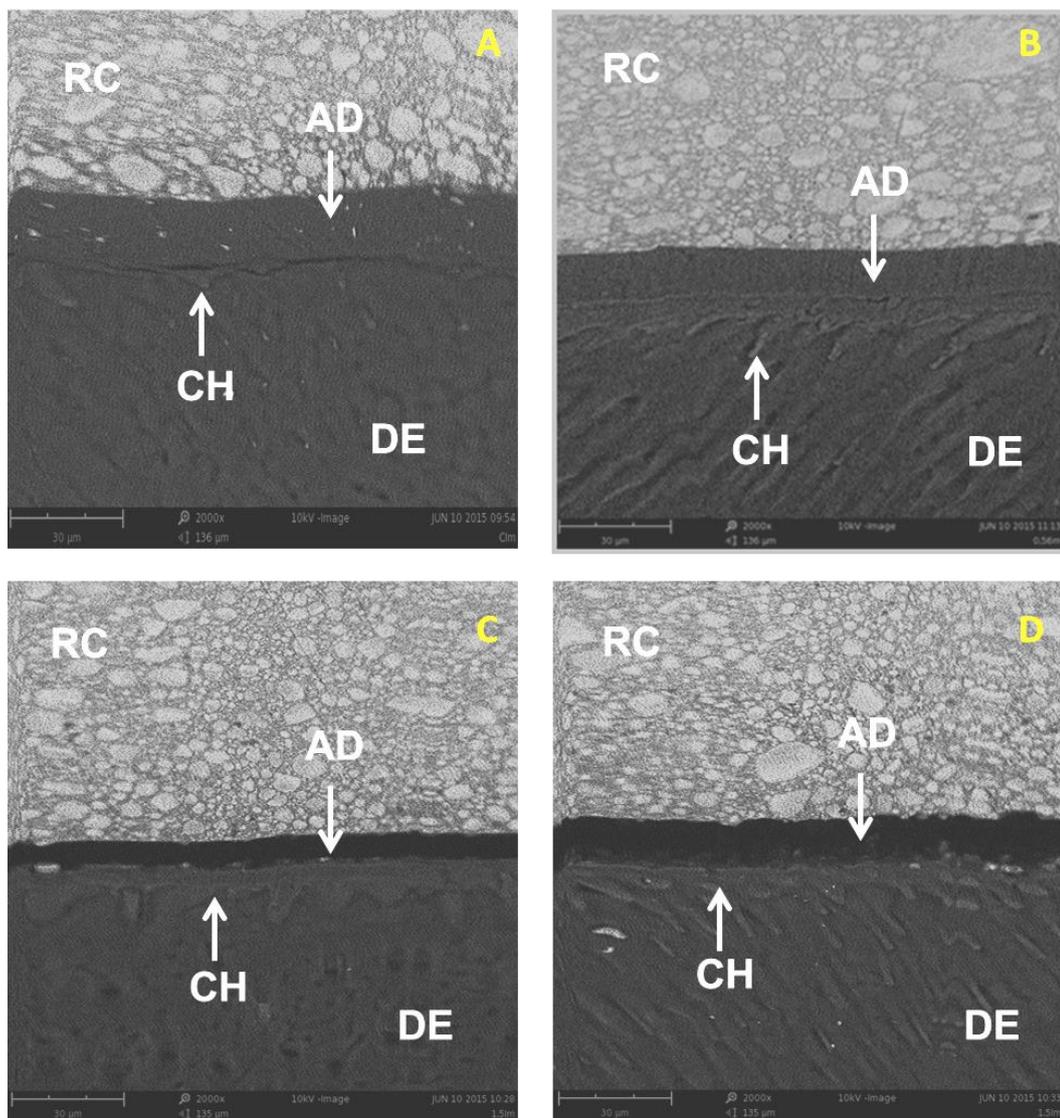


Figura 16 – Fotomicrografias da interface de união entre dentina (DE) e resina composta (RC) no período de tempo imediato com o aumento de 2000 x. AD = adesivo; CH = camada híbrida. A) Grupo Controle; B) EGCG 0.5; C) EGCG 1.0; D) EGCG 1.5.

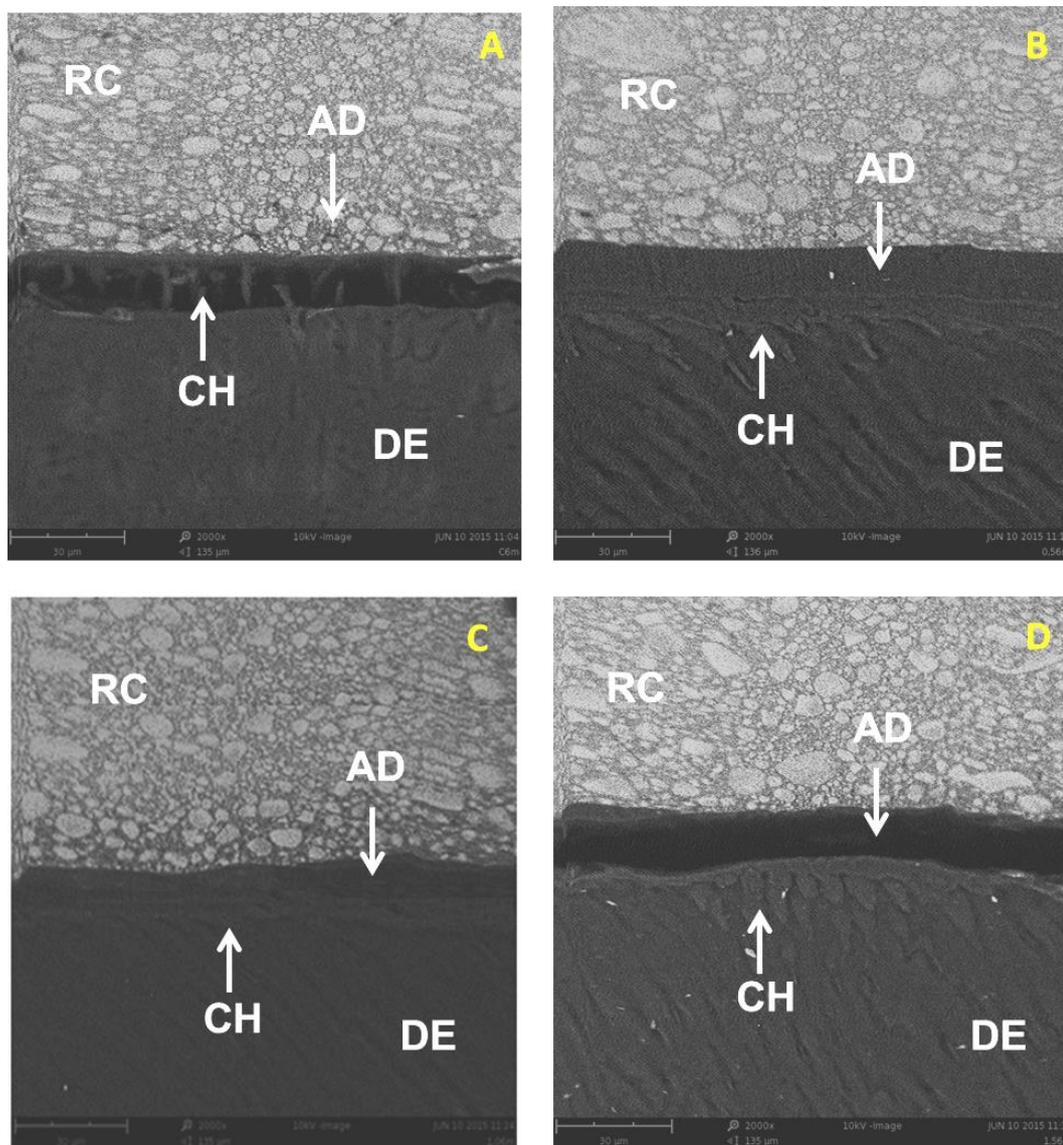


Figura 17 – Fotomicrografias da interface de união entre dentina (DE) e resina composta (RC) no período de tempo de seis meses de armazenamento com o aumento de 2000 x. AD = adesivo; CH = camada híbrida. A) Grupo Controle; B) EGCG 0.5; C) EGCG 1.0; D) EGCG 1.5.

5.4 Análise Biológica

5.4.1 Ensaio de Citotoxicidade

Os resultados do teste de Citotoxicidade quanto à sobrevivência celular pelo teste de Kruskal-Wallis e Teste de Múltiplas Comparações de Dunn ($p = 0,05$) para as diluições dos adesivos testados estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 – Efeito da citotoxicidade dos adesivos diluídos expresso em porcentagem de células viáveis

DILUIÇÃO	CONTROLE	EGCG 0.5	EGCG 1.0	EGCG 1.5
1:1	9,58 (1,64 - 19,33)	22,10 (14,24 - 26,97)	7,25 (4,32 - 9,67)	14,07 (11,13 - 22,96)
1:10	5,52 (3,15 - 7,64)	4,31 (2,93 - 4,66)	7,85 (5,95 - 9,75)	9,32 (9,10 - 9,92)
1:100	7,42 (5,56 - 7,98)	57,74 (44,71 - 81,78)	70,60 (51,09 - 80,53)	28,14 (25,33 - 29,78)
1:1000	51,9 (43,2 - 87,0)	89,76 (79,97 - 99,82)	70,34 (64,39 - 82,25)	69,65 (59,12 - 77,20)
1:10000	99,81 (94,5 - 129,2)	118,59 (110,09 - 120,75)	90,02 (86,44 - 98,00)	94,34 (83,63 - 101,02)

% de sobrevivência celular: Mediana (25% - 75% percentil).

Para o efeito de visualização, os valores de sobrevivência celular em porcentagem para as diferentes diluições e os extratos originais para os quatro grupos experimentais estão representados na Figura 18.

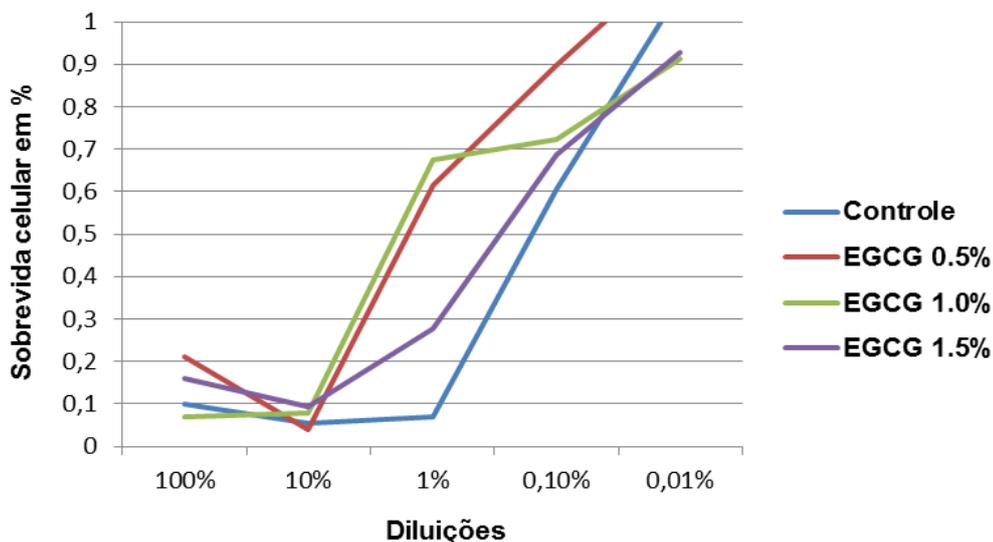


Figura 18 – Gráfico representativo da sobrevivência celular em % nas diferentes diluições e extratos originais para os quatro grupos de adesivos experimentais.

Para o Ensaio de Citotoxicidade às diluições de 1:1 (100%) e 1:10 (10%), todos os adesivos foram citotóxicos, enquanto a diluição 1:10000 (0,01%) praticamente não causou morte celular. Para a diluição de 1:1000 (0,1%) houve diferença estatística entre os adesivos testados ($kw = 12,79$; $p = 0,005$). Assim como para a diluição de 1:100 (1,0%), que também apresentou diferença significativa entre os grupos para o teste de Kruskal-Wallis um fator ($kw = 12,79$; $p = 0,005$).

Para a diluição do meio com 0,1% de adesivo (Tabela 14) podemos observar que todos os grupos apresentaram viabilidade celular acima de 50%, no entanto, os grupos EGCG 0.5 e EGCG 1.0 foram estatisticamente menos citotóxicos que o grupo Controle. Quando se compara os adesivos na concentração 1,0% por meio do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn (Tabela 15), verifica-se que

apenas os adesivos EGCG 0.5 e EGCG 1.0 apresentaram viabilidade celular acima de 50%, mas sem diferença estatística em relação ao grupo EGCG 1.5. O grupo Controle apresentou uma sobrevivência celular menor que 10%.

Tabela 14 – Teste de Dunn para comparação dos adesivos na concentração 0,1% em porcentagem de células sobreviventes

Grupos	Mediana (25°-75°)	Grupos homogêneos	
EGCG 0.5	89,7 (79 - 99)	A	
EGCG 1.0	70,3 (64 - 82)	A	
EGCG 1.5	69,6 (59 - 77)	A	B
CONTROLE	51,9 (43 - 87)	B	

*Medianas seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%.

Tabela 15 – Teste de Dunn para comparação dos adesivos na concentração 1,0% em porcentagem de células sobreviventes

Grupos	Mediana (25°-75°)	Grupos homogêneos	
EGCG 0.5	57,7 (44 - 81)	A	
EGCG 1.0	70,6 (51 - 80)	A	
EGCG 1.5	28,1 (25 - 29)	A	B
CONTROLE	7,4 (5 - 0,7)	B	

*Medianas seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%.

6 DISCUSSÃO

Os sistemas adesivos atuais, apesar de proporcionar adequada adesão imediata, sofrem uma deterioração longitudinal progressiva da camada híbrida formada (Spencer et al., 2012) em parte pela ação das enzimas proteolíticas intrínsecas da matriz dentinária, as metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs).

Essa deterioração pode ser acelerada por diversos fatores, dentre eles: a saliva que também possui enzimas proteolíticas capazes de degradar as fibras colágenas desprotegidas da matriz orgânica dentinária; a água presente no fluido dentinário (Park et al., 2010) capaz de solubilizar os polímeros resinosos; e o substrato dental que por sua permeabilidade dentinária permite a passagem do fluido dentinário, capaz de promover a separação de fases do adesivo (Eliades et al., 2001).

A ativação das MMPs ocorre pela redução no pH durante a desmineralização da dentina nos procedimentos adesivos (Mazzoni et al., 2009), que ligam-se ao colágeno desnaturado e não infiltrado, degradando-o (Tezvergil-Mutluay et al., 2010).

Toda modificação na composição química de materiais dentários envolve potenciais falhas mecânicas e físico-químicas nos mesmos, principalmente o acréscimo de substâncias em altas concentrações nos sistemas adesivos. O sucesso e longevidade de um

material restaurador depende do conhecimento de suas propriedades mecânicas e estruturais, bem como de sua composição química. Dessa forma, o conhecimento da composição dos adesivos dentais é de suma importância, permitindo uma melhor estimativa de suas propriedades.

Diversos fatores podem conduzir a diferentes interações entre os monômeros resinosos dos sistemas adesivos e as substâncias usadas, tais como a flexibilidade monomérica, o grau de conversão, a quantidade de ligações cruzadas, a hidrofobicidade, os tipos de iniciadores, bem como a proporção da droga acrescentada (Pallan et al., 2012).

Além disso, outro fator que devemos levar em consideração é a dentina e sua composição química. Esta é composta por uma matriz extracelular formada principalmente por colágeno tipo I infiltrada em um componente inorgânico mineral. Após a síntese do colágeno, ligações cruzadas do tipo lisil-oxidase estabilizam as fibrilas colágenas por ligações covalentes intra e extracelulares (Butler, 1995).

As ligações cruzadas endógenas formadas no interior da dentina melhoram as propriedades mecânicas da matriz colágena e fornece resistência contra a degradação enzimática. Todavia, a indução de ligações cruzadas exógenas com o colágeno é capaz de melhorar ainda mais a resistência mecânica e enzimática da matriz colágena (Bedran-Russo et al., 2007).

No entanto, o uso de agentes seletivos de ligação cruzada com colágeno durante os procedimentos adesivos restauradores são capazes de modificar a estrutura do colágeno,

aumentando a resistência à microtração e o módulo de elasticidade da dentina desmineralizada (Al-Ammar et al., 2009). Um desses agentes que vem sendo usado é o EGCG.

Como os adesivos comerciais tem formulação única, a incorporação de outras substâncias como o EGCG poderia causar efeitos negativos nas propriedades mecânicas e estruturais, e reduzir a resistência de união ao substrato dental. Assim, como não sabemos com precisão as proporções de cada componente presente nos adesivos comerciais para que pudéssemos justificar os resultados obtidos na pesquisa optamos pela manipulação de um adesivo experimental de condicionamento ácido prévio permitindo saber de maneira mais precisa a composição e proporção de cada componente.

O EGCG se liga à fibra colágena impedindo o livre acesso das colagenases aos seus sítios ativos nas cadeias colágenas (Jackson et al., 2010). Tem sido sugerido que a inibição das MMPs pelo EGCG ocorre por ligações aos sítios catalíticos ou alostéricos das enzimas, alterando sua conformação (Cheng et al., 2003) ou por um efeito quelante de Zn (Quesada et al., 2011). Além disso, a formação de ligações cruzadas entre o EGCG e as fibras colágenas poderiam bloquear os sítios de clivagem das enzimas, sendo esse efeito inibidor concentração dependente (Bras et al., 2010).

O mecanismo molecular do EGCG apresenta interação com as proteínas (Haslam, 1996; Frazier et al., 2010). O componente fenólico contém um anel fenil contendo um grupo hidroxila (-OH) e possui uma função fenol que constitui uma porção anfifílica. Essa

propriedade é a combinação do caráter hidrófobo do seu núcleo aromático plano com o caráter hidrófilo do seu substituinte hidroxila polar.

A porção hidrófoba dos anéis aromáticos induz a ligações do tipo Van der Waals com homólogos hidrófobos de outras moléculas, enquanto a porção hidrófila polarizada faz ligações por pontes de hidrogênio. Desse modo, um composto químico que possui características anfílicas, pode atuar tanto como doador quanto como receptor de ligações de hidrogênio. Essa característica bi-funcional é responsável pela interação física dos compostos fenólicos com as proteínas (Frazier et al., 2010).

A dentina quando desmineralizada apresenta as MMPs do tipo -2, -3, -8, -9 e -20 que podem ser ativadas pela redução do pH até mesmo pelo próprio condicionamento ácido iniciando o processo de degradação das fibras colágenas expostas (Zhang, Kern, 2009). Como o EGCG apresenta interações hidrófobas e hidrófilas com as colagenases, causa uma mudança na estrutura secundária das MMPs inibindo sua ação (Yun et al., 2004; Du et al., 2012).

A eficácia do EGCG na inibição das MMPs foi avaliada em um estudo prévio calculando metade da sua concentração máxima inibitória (IC-50). Os valores de IC-50 para as MMPs -2 e -9 foram de 10 µg/ml e 0,6 µg/ml, respectivamente (Demeule et al., 2000) e essa inibição pode aumentar a durabilidade da interface de união (Mazzoni et al., 2007). Em nosso estudo as concentrações de

EGCG usadas foram maiores que sua IC-50. O que pode ter colaborado para os resultados obtidos.

Hiraishi et al., 2013 mostrou que o EGCG na concentração de 0,5% foi efetivo na estabilização do colágeno dentinário pelo aumento das propriedades mecânicas e no aumento da resistência a degradação proteolítica. Entretanto, segundo Du et al., 2012 a incorporação de EGCG em altas concentrações poderia levar a formação de cadeias poliméricas lineares inadequadas, resultando na polimerização incompleta do adesivo.

Desse modo, para observar se a adição de EGCG poderia alterar as propriedades mecânicas, físico-químicas; a resistência de união à microtração imediato (24 h) e longitudinal (6 meses); e a citotoxicidade, diversos testes foram realizados. Sendo previamente realizado um estudo piloto para avaliação do grau de conversão dos adesivos manipulados.

O grau de conversão (GC) permite avaliar as propriedade físico-químicas básicas dos adesivos dentais. Para avaliação do GC, foi realizado um estudo piloto inserindo EGCG em modelos de adesivos experimentais nas proporções de 0,5% (100 µg/ml), 1,0% (200 µg/ml) e 1,5% (300 µg/ml) em peso.

Durante a polimerização do adesivo, cadeias poliméricas lineares são formadas (Nunes et al., 2005). O EGCG incorporado ao adesivo nas concentrações estudadas poderia ter ficado preso em meio as cadeias após a polimerização. No entanto, a adição de concentrações mais elevadas de EGCG poderia perturbar a

formação dessas cadeias lineares, o que resultaria em uma polimerização inadequada (Du et al., 2012).

Em nosso estudo observou-se que nenhuma das concentrações acima alterou negativamente o GC dos adesivos quando comparado ao adesivo controle experimental. Du et al., 2012 também observaram que a inserção de EGCG nas concentrações de 5 mg/ml, 10 mg/ml e 15 mg/ml ao adesivo Single Bond 2 não alterou o GC do adesivo. Assim como no estudo realizado por Neri et al., 2014 que acrescentou 0,01% e 0,1% de EGCG ao adesivo Adper Easy One.

Um estudo realizado por Vidal et al., 2014 observou que as catequinas monoméricas com partes galato, como o EGCG, são mais eficazes no aumento do módulo de elasticidade e redução da taxa de biodegradação do colágeno, assim como na redução da atividade da MMP-9, independente das concentrações testadas. O que indica uma correlação entre o aumento da estabilidade do colágeno e as estruturas químicas específicas presentes nos compostos monoméricos.

Liu et al., 2015 mostrou que a relação direta entre componentes fenólicos do ECG e EGCG e o colágeno dentinário leva a alterações espectrais do colágeno. O colágeno é capaz de interagir e imobilizar os polifenóis em um tempo clínico relevante através da interação química com o componente galato presente nestes polifenóis. Essa interação acontece de maneira semelhante a interação do galato com os monômeros resinosos do adesivo.

A presença de radicais livres podem aumentar o processo de degradação da matriz colágena desmineralizada, estando

associado a formas graves de danos teciduais e envelhecimento. Esses oxidantes, como o radical hidroxila, contém elétrons despareados altamente reativos e prejudiciais a estrutura das proteínas ao nível molecular (Yiu et al., 2002).

Antioxidantes são capazes de neutralizar o efeito dos radicais livres protegendo a estrutura das proteínas. As catequinas são polímeros antioxidantes de alto peso molecular e que atuam como terminais de radicais livres através da desprotonação dos grupos hidroxila em suas moléculas (Bravo, 1998).

Dessa forma, podemos presumir que o EGCG como agente antioxidante poderia reagir com os ésteres desprotegidos dos monômeros, sendo capaz de neutralizar o potencial destruidor dos radicais livres através de ligações por pontes de hidrogênio, formando ligações cruzadas em uma estrutura altamente reticulada, bem como neutralizar a ação do condicionamento ácido sobre a dentina, evitando, assim, a ativação das MMPs e, com isso, a degradação da interface adesiva em longo prazo (Du et al., 2012).

Além disso, temperaturas de transição vítrea e viscosidades mais elevadas dos monômeros análogos de BisGMA alcança sua vitrificação em fases mais baixas de conversão, reduzindo a difusão dos prótons durante a polimerização. O que colabora com a não alteração dos valores de GC (Bravo, 1998).

Observamos ainda que houve dissolução de todas as concentrações de EGCG inseridas no adesivo experimental, não havendo, visualmente, alteração de cor e precipitação do EGCG. Isso

pode ter ocorrido pela presença do grupo funcional hidroxila no EGCG que é capaz de copolimerizar com os monômeros adesivos presentes nos sistemas adesivos, bem como o BisGMA e o HEMA (Vidal et al., 2014; Liu et al., 2015).

Como as restaurações em resina composta estão sendo constantemente submetidas a um stress flexural, um dos pré-requisitos indispensáveis é que os sistemas adesivos apresentem resistência mecânica a fraturas, que pode ser avaliada utilizando o teste de resistência flexural (RF) e análise do módulo de elasticidade (ME) (Borges et al., 2012).

O teste de RF detecta alterações estruturais tênues dos materiais restauradores, sendo uma condição mecânica conceituada para avaliar a resistência a uma falha provocada pela tensão do material resinoso, medida pela sua curvatura (ISO 4049).

Já o ME é um parâmetro mecânico que proporciona a medida da rigidez de um material sólido, dependente da composição química do material testado. O mesmo é alcançado a partir dos dados obtidos pelo teste de RF, sendo os valores de GPa diretamente proporcionais aos valores de MPa (Borges et al., 2009, 2012).

Pode-se observar, de acordo com os resultados obtidos, que a RF e o ME encontrados para os adesivos com incorporação de EGCG não diferiram estatisticamente do grupo Controle. A estrutura do BisGMA é rígida e viscosa, e a inclusão da droga nas diferentes concentrações na formulação dos adesivos não foi capaz de afetar sua RF e ME dos adesivos.

Todavia, polímeros com semelhantes GC podem mesmo assim apresentar diferentes densidades de ligações cruzadas que podem alterar os valores de RF. No presente estudo assim com o de Neri et al., 2014, a incorporação de EGCG não afetou os valores de RF, o que nos permite considerar que a reticulação polimérica dos adesivos testados é semelhante.

A difusão de EGCG por entre as cadeias de polímero (Pallan et al., 2012) pode ter ocorrido devido a sua estrutura molecular ramificada e uma possível ligação de hidrogênio por meio dos grupos hidroxila nas extremidades do BisGMA. Demonstrando que a adição de EGCG nas diferentes concentrações não alterou tais propriedades mecânicas dos adesivos testados. Dessa forma, para os testes de RF e ME a primeira hipótese de nulidade foi aceita.

A partir dos valores de RF e ME calculou-se o módulo de resiliência (RE) dos adesivos experimentais. Por definição resiliência é a propriedade física do material do qual este é capaz de acumular energia, quando exigido ou submetido a um stress sem que ocorra sua ruptura.

A alta resiliência de um material restaurador é um fator que auxilia na preservação da ligação adesiva entre o dente e restauração, pois o material é capaz de deformar ou flexionar dissipando as tensões recebidas (Peutzfeldt, Asmussen, 1992). Essa dissipação preserva a interface de união entre o dente a restauração e consegue suportar microdistorções que ocorrem devido a

movimentações microscópicas dos substratos dentais (O'Brien et al., 2014), fazendo com que eles se comportem como um corpo único.

Para o presente estudo, a primeira hipótese de nulidade para RE foi aceita, já que os valores obtidos para os adesivos com incorporação de EGCG não diferiram estatisticamente do adesivo Controle experimental, mostrando que a incorporação de EGCG não interferiu na capacidade do material em se flexionar ou se deformar, não reduzindo, por subsequente, a capacidade de dissipar possíveis tensões que ocorrem na interface adesiva.

Já o teste de resistência à compressão (RCo) consiste na aplicação de forças verticais sobre o longo eixo do material, onde duas forças são aplicadas em direções opostas, aproximando-se sua estrutura molecular (Wang et al., 2003).

O objetivo de se realizar esse tipo de teste em adesivos dentários é observar o desempenho desses materiais restauradores durante a mastigação, pois esse ensaio simula as forças transmitidas às restaurações durante os movimentos mastigatórios, podendo causar fraturas no material restaurador e/ou estrutura dental dependendo da quantidade de força aplicada (Baharav et al., 1988; Roulet, 1988).

No presente estudo, o teste de RCo mostrou que houve similaridade entre os adesivos testados com incorporação de EGCG comparados ao grupos Controle, e que a incorporação de EGCG não alterou essa propriedade nos adesivos testados, aceitando a primeira hipótese de nulidade para o teste de RCo.

Outra característica que influencia as propriedades do adesivo é a sua contração de polimerização (CP). Os adesivos podem ser classificados como resinas fluidas que apresentam uma matriz orgânica polimérica com ou sem a incorporação de partículas de carga inorgânica. Para que o processo de CP ocorra na matriz orgânica, os monômeros reagem entre si formando ligações covalentes e, conseqüentemente, polímeros (Condon, Ferracane, 1998; Rueggeberg, 1999).

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, observamos que não houve influência da associação de EGCG no aumento da CP dos adesivos experimentais com EGCG comparado ao grupo controle. Dessa forma, a primeira hipótese de nulidade para a CP foi aceita.

Entretanto, mesmo sendo realizada uma efetiva polimerização dos sistemas adesivos e estes apresentarem baixos valores de CP, pode haver uma instabilidade quando expostos ao meio úmido. Isso ocorre porque os sistemas adesivos são capazes de absorver e liberar água e substâncias químicas, devido à sua capacidade de absorção e adsorção de moléculas de água pelos monômeros hidrófilos que compõe os sistemas adesivos.

Os sistemas adesivos a base de metacrilato são compostos em sua maioria por BisGMA (fase orgânica resinosa) e HEMA (fase aquosa). O BisGMA é caracterizado por ser monômero altamente hidrófobo e polimerizável, constituído por uma molécula ramificada, e fornece as propriedades mecânicas ao sistema adesivo.

O HEMA é altamente hidrófilo, responsável por aumentar a compatibilidade com a água, e a infiltração do adesivo por entre a rede de fibras colágenas (Wang et al., 2003; Ye et al., 2009).

Quando ocorre associação de partículas solúveis em água na composição dos polímeros cria gotículas no interior da amostra e essa difusão aquosa se expande ao longo do gradiente osmótico. O equilíbrio só é novamente alcançado quando o stress osmótico e elástico do polímero se estabiliza (Riggs et al., 2000; Pallan et al., 2012).

Dessa forma, os fenômenos de absorção (A) e solubilidade (S) dos sistemas adesivos podem promover modificações indesejáveis na estrutura e interferir na função dos adesivos. Espera-se que os adesivos apresentem baixa A e baixa S em água, para que se atinja características finais mais próximas de um adesivo do ideal (Porto et al., 2013).

Estudos que avaliaram o aumento da A em água de metacrilatos com quantidades elevadas de CLX (Riggs et al., 2000; Anusavice et al., 2006) atribuíram o aumento da absorção à formação dessas gotículas. Entretanto, a incorporação de baixas concentrações de EGCG, em peso, não tem efeito sobre a S.

Um estudo prévio realizado por Hiraishi et al., 2008 mostrou que a A de água de diferentes resinas é proporcional as suas características hidrófilas, e não a presença de outros compostos na composição química.

De modo que a absorção de água pelos polímeros pode estar diretamente relacionada a hidrofília de seus componentes (Ito et al., 2005; Malacarne et al., 2006). Os monômeros a base de metacrilato, bem como os fotoiniciadores contém polaridades (ésteres e hidroxilas) (Ferracane, 2006) que influenciam em sua afinidade pelas moléculas da água (Ito et al., 2005).

Apesar do EGCG ser uma molécula polar devido aos vários grupamentos hidroxila (Lambert et al., 2006; Kim et al., 2008), este não apresentou aumento dos valores de A para os grupos EGCG 1.0 e EGCG 1.5 comparado ao grupo Controle. Já o grupo EGCG 0.5 apresentou redução dos valores de A, semelhante ao estudo realizado por Neri et al., 2014.

Segundo Pallan et al., 2012, essa A está relacionada a hidrofília dos monômeros resinosos e não a presença de EGCG na formulação. Em seu estudo, foram testadas as concentrações de 0,2%, 1,0% e 2,0% de EGCG incorporado a resinas compostas experimentais. As concentrações de EGCG usadas em nosso estudo não foram capazes de aumentar a hidrofília dos adesivos ao ponto de gerar um aumento significativo na A.

Adesivos simplificados costumam apresentar alta S (Ito et al., 2010). A adição de EGCG à formulação adesiva poderá contribuir para esse aumento devido a sua liberação junto aos monômeros residuais. Entretanto, em nosso estudo houve uma redução desses valores, para os grupos EGCG 0.5 e EGCG 1.0 comparado ao Controle.

Esses resultados podem ter sido alcançados pela realização de uma mistura homogênea entre o EGCG (catequina ramificada) e a rede molecular do polímero. Além disso, pontes de hidrogênio formadas entre os radicais hidroxila do EGCG, HEMA e BisGMA formam ligações estáveis que poderiam dificultar a liberação de tais componentes em meio aquoso.

Para os valores de A e S a primeira hipótese de nulidade foi rejeitada, visto que para o teste de A o grupo EGCG 0.5 apresentou uma menor A em água quando comparado ao grupo Controle, já os grupos EGCG 1.0 e EGCG 1.5 não diferiram do Controle. Para o teste S, tanto o grupo EGCG 0.5 quanto o EGCG 1.0 apresentaram menores valores de S comparado ao grupo Controle, já o grupo EGCG 1.5 não diferiu do controle. Isso mostra que a adição de EGCG em baixas concentrações é capaz reduzir a A e S, melhorando as propriedades do material.

Com isso, a redução nos valores de A e S podem influenciar de maneira direta na manutenção da camada híbrida e resistência adesiva dentinária em longo prazo.

A resistência adesiva (RA) pode ser analisada através do teste de resistência à microtração. Esta é definida como a força por unidade de área necessária para romper a interface de união adesiva, e tem como objetivo avaliar quantitativamente a força de união entre dois substratos (Perdigao et al., 2002).

Grande parte das falhas dos materiais restauradores se deve clinicamente aos baixos valores de resistência à tração. A RA

resina composta / substratos dentais é determinada pelo sistema adesivo que faz essa união transformando-os em um corpo único.

Quando se observa a interação entre os fatores, verifica-se que a introdução de EGCG nas diferentes concentrações não alterou a RA imediata (24 h) quando comparada ao grupo Controle experimental, o que demonstra que tais substâncias não interferiram na união imediata entre sistema adesivo e substrato dentinário, aceitando a segunda hipótese de nulidade testada.

Todavia, a terceira hipótese de nulidade testada foi rejeitada, pois se observou uma redução nos valores de RA para o tempo de 6 meses comparado ao tempo de 24 h.

Quando se observa a interação entre os fatores, somente os grupos Controle e EGCG 1.5 apresentaram redução dos valores de RA após 6 meses quando comparado ao tempo de 24 h. Os grupos EGCG 0.5 e EGCG 1.0 mantiveram os valores de RA após 6 meses de armazenamento.

O adesivo Controle apresentou redução dos valores de RA após 6 meses de armazenamento quando comparado ao tempo imediato (24 h). A degradação longitudinal da interface adesiva foi demonstrada por diversos autores, e a mesma não ocorre por um único fator, mas por um conjunto de fatores que reduzem a resistência de união da interface adesivo / dentina (Pashley, Carvalho, 1997; Tay et al., 2004; Garcia-Godoy et al., 2007; Loguercio et al., 2009).

Observou-se nas análises em MEV (Figuras 16A e 17A) pode ter havido um aumento das tensões na região de interface adesiva, promovendo fendas que poderiam ser mais facilmente degradadas em longo prazo, e conseqüentemente, reduzir a manutenção da interface adesiva.

A redução dos valores de RA para o grupo ECGG 1.5 pode estar relacionada ao volume de EGCG em peso adicionado ao adesivo experimental. O aumento na quantidade de EGCG pode ter interferido na interação química entre os monômeros resinosos e as fibras colágenas prejudicando a formação da camada híbrida.

Uma maior quantidade de EGCG incorporado ao adesivo pode ter causado uma maior interação química com os monômeros resinosos, influenciando na formação da camada híbrida e na presença de fibras colágenas desprotegidas.

Associado a isso, o procedimento adesivo de sistemas adesivos de condicionamento ácido prévio simplificados tem capacidade de reativar colagenases e gelatinases endógenas (Khamverdi et al., 2015) levando a destruição dessas fibras colágenas desprotegidas na presença de água que é absorvida pelos adesivos devido ao seu caráter hidrófilos.

Proteínas presentes na superfície dentinária podem se ligar ou até mesmo precipitar as catequinas, sugerindo interações em locais específicos da estrutura molecular do colágeno (Du et al., 2012; Mankovskaia et al., 2013).

O EGCG tem capacidade de inibir a ativação de pro MMP- 2, e das MMPs -2 e -9 (Demeule et al., 2000; Zhan, Kern, 2009). Um estudo prévio realizado por Yun et al., 2004 mostrou que a concentração de 20 μM de EGCG foi capaz de inibir a atividade das MMPs. Entretanto, a adição de diferentes concentrações de EGCG pode ter efeitos diversos sobre a RA.

O estudo de Khamverdi et al., 2015 mostrou resultados semelhantes ao do presente estudo em relação à não influência da adição de diferentes concentrações EGCG (25 μM , 50 μM e 100 μM) na RA comparado ao grupo controle após 24 h. Todavia, o fator tempo de armazenamento por 6 meses reduziu significativamente os valores de RA para os grupos sem EGCG.

A incorporação de EGCG em proporções relativamente altas em metacrilatos poderia, dessa forma, dificultar o processo de polimerização, resultando em uma maior quantidade de monômeros residuais, mesmo não havendo influência no GC pela incorporação do EGCG. Assim, uma maior quantidade de EGCG na formulação adesiva poderia ter levado a redução do número de reticulações formadas entre os monômeros na conversão destes em polímeros, reduzindo, assim os valores de RA.

Podemos observar nas imagens de MEV (Figura 16D e 17D) que houve a formação de uma fenda entre a interface adesiva e a camada híbrida formada no grupo EGCG 1.5. O que pode ter acelerado a degradação hidrolítica da interface adesiva durante o armazenamento, reduzindo os valores de RA.

Dessa forma, seria interessante calcular a concentração máxima de EGCG capaz de interagir com os monômeros resinosos sem interferir na formação da camada híbrida e sua manutenção em longo prazo.

Contudo, além dos adesivos dentinários apresentarem propriedades mecânicas e físico-químicas satisfatórias, estes também devem ser biocompatíveis aos tecidos vivos. Biocompatibilidade é a capacidade de um biomaterial realizar funções específicas nos tecidos vivos, sem, no entanto, causar danos ou prejuízo a estes ou a seu hospedeiro (Costa et al., 2000a; Huang, Chang, 2002).

Os adesivos dentais, por ficarem em contato com os substratos dentais por longos períodos de tempo, devem apresentar boa biocompatibilidade para não causar reações à polpa. Quanto menor a quantidade de dentina remanescente maior a chance de ocorrer reações pulpares reversíveis ou irreversíveis, devido a difusão de alguns componentes do sistema adesivo através dos túbulos dentinários (Costa et al., 1999; 2000b).

A presença de efeito citotóxico *in vitro* não garante que o material seja tóxico *in vivo*. Entretanto, a ausência desse efeito indica uma boa resposta clínica (Pizzoferrato et al., 1994). Dessa forma, o estudo da viabilidade celular através de testes de citotoxicidade torna-se importante para avaliar a compatibilidade celular aos sistemas adesivos (Demirci et al., 2008).

O ensaio de citotoxicidade (CI) tem capacidade de avaliar em nível molecular a citotoxicidade de biomateriais sobre

diferentes culturas celulares (Cao et al., 2005) e este pode ser realizado por diferentes estudos.

No presente estudo realizou-se um estudo *in vitro* com cultivo de células fibroblastos de polpa humana e, posterior, avaliação da viabilidade celular pelo teste SRB, o qual quantifica as células viáveis após o contato direto por determinado período de tempo com os extratos dos adesivos experimentais testados em diferentes diluições.

Apesar do caráter hidrófobo do BisGMA, que limita sua liberação em meio aquoso, este pode ser considerado citotóxico mesmo em baixas concentrações. O HEMA, além de hidrófilo, possui baixo peso molecular que possibilita sua difusão em grandes quantidades pelo interior da dentina podendo atingir a polpa (Bianchi et al., 2013).

Estudos prévios *in vitro* mostraram que o BisGMA é altamente citotóxico e o HEMA é moderadamente citotóxico aos fibroblastos (Bouillaguet et al., 1998; Geurtsen et al., 1998; Chen et al., 2003). Em um teste em culturas de fibroblastos gengivais o BisGMA e o HEMA apresentaram efeito citotóxico e genotóxico por causarem rupturas da dupla cadeia de DNA das células (Urcan et al., 2010).

Os resultados do teste SRB para os adesivos experimentais testados mostraram que os adesivos não polimerizados nas diluições do meio em 100% e 10% de adesivo foram altamente

citotóxicos após 72 h em contato com as células, pois estas apresentaram uma viabilidade celular menor que 50% (Tabela 13).

Para a diluição do meio condicionado em 0,1% de adesivo os grupos EGCG 0.5 (89,7%)^a, EGCG 1.0 (70,3%)^a e EGCG 1.5 (69,6%)^{ab} apresentaram valores de viabilidade celular maiores que 50%, assim como o grupo Controle (51,9%)^b (Tabela 14).

Esses resultados vão de acordo com relatos na literatura que reportam a ação do EGCG em células normais na proteção contra efeitos genotóxicos e na eliminação de células cancerosas mutagênicas através da apoptose (Roy et al., 2003).

As catequinas têm se mostrado capazes de exercer atividade preventiva em baixas concentrações sem ocorrência de efeitos colaterais (Beliveau & Gingras, 2004). Um estudo com células de polpa humana pré-tratadas com EGCG e ECG mostrou que a presença das catequinas reduziram significativamente a expressão de interleucina (IL) -6 e -8 nas células pulpares expostas as citosinas (Nakanishi et al., 2010). O que sugere que a presença do EGCG pode prevenir a exacerbação de pulpites e interferir em baixa escala na porcentagem de morte celular em contato com sistemas adesivos.

Os altos valores de viabilidade celular para o grupo EGCG 0.5 (57,7%)^a e EGCG 1.0 (70,6%)^a comparado ao grupo Controle (7,4%)^b para a diluição do meio em 1,0% de adesivo poderia ser explicado pela interação química com a molécula do BisGMA, modificando a estrutura molecular do BisGMA, e reduzindo a quantidade de monômeros de BisGMA livres altamente tóxicos aos

fibroblastos presentes no meio. Associado a capacidade do EGCG em se ligar as fibras colágenas modificando sua estrutura, fazendo com que essas fiquem menos suscetíveis a ação das MMPs (Liu et al., 2015).

Além disso, a viabilidade celular menor que 10% para o grupo Controle indica que o uso desse adesivo em cavidades profundas poderia levar a reações reversíveis, até mesmo irreversíveis à polpa.

Dessa forma, os resultados obtidos demonstram que a adição de EGCG apresenta potencial em reduzir a CI dos adesivos experimentais e aumentar a viabilidade celular, o que reduziria reações pulpares e conseqüentemente a sensibilidade pós-operatória causada pelos sistemas adesivos potencialmente tóxicos a polpa. Rejeitando, assim, a primeira hipótese de nulidade para o teste de CI.

Como não existe um teste clínico ou laboratorial que consiga avaliar todas as propriedades necessárias para o sucesso de um material restaurador, estudos *in vitro* se fazem necessário para avaliação de novos materiais, como os sistemas adesivos, quanto às suas propriedades mecânicas, físico-químicas e biológicas.

Apesar dos avanços em pesquisa com EGCG em Odontologia Restauradora, ainda pouco se sabe sobre os reais benefícios da aplicação do EGCG sobre a dentina desmineralizada na inibição da atividade das MMPs e sua interação com as fibras colágenas com modificação da sua estrutura conformacional e proteção contra o processo de degradação pelas enzimas proteolíticas.

Assim como a longevidade da manutenção da integridade da camada híbrida.

Mais estudos *in vitro* e *in vivo* se tornam necessários, principalmente em relação as interações químicas que ocorrem em nível molecular, de modo a compreender melhor o mecanismo de ação e os reais benefícios da introdução do EGCG nos protocolos adesivos-restauradores. O EGCG pode vir a ser a substância natural com potencial efeito na manutenção da resistência adesiva entre os sistemas adesivos e resinas compostas com efeitos em longo prazo.

Dessa forma, novas pesquisas com EGCG que solidifiquem as hipóteses testadas no presente estudo devem ser conduzidas no sentido de promover a inibição das enzimas proteolíticas que atuam na degradação das fibras colágenas, a baixa citotoxicidade em relação às células do complexo dentina-polpa, e a manutenção da interface de união entre os procedimentos restauradores adesivos e os substratos dentais, alcançando assim a longevidade clínica.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, podemos verificar que:

- a) A incorporação de EGCG nas diferentes concentrações não influenciou a resistência flexural, o módulo de elasticidade, o módulo de resiliência, a resistência a compressão e a contração de polimerização dos adesivos experimentais estudados;
- b) A incorporação de EGCG 0.5 e EGCG 1.0 reduziram os valores de absorção e solubilidade dos adesivos experimentais comparado ao grupo Controle;
- c) A incorporação de EGCG 0.5 e EGCG 1.0 permitiu uma redução da citotoxicidade comparado ao grupo Controle;
- d) A incorporação de EGCG nas três diferentes concentrações não influenciou a resistência adesiva imediata;

- e) A incorporação de EGCG 0.5 e EGCG 1.0 mantiveram os valores de resistência adesiva após 6 meses de armazenamento comparado ao tempo imediato.

8 REFERÊNCIAS*

Abdalla AI, El Eraki M, Feilzer AJ. The effect of direct and indirect water storage on the microtensile dentin bond strength of a total-etch and two self-etching adhesives. *Am J Dent*. 2007;20(6):370-4.

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

Anusavice KJ, Zhang NZ, Shen C. Controlled release of chlorhexidine from UDMA-TEGDMA resin. *J Dent Res*. 2006;85(10):950-4.

Arab H, Maroofian A, Golestani S, Shafae H, Sohrabi K, Forouzanfar A. Review of The therapeutic effects of *Camellia sinensis* (green tea) on oral and periodontal health. *J Med Plants Res*. 2011;5(23):5465-9.

Arcis RW, Lopez-Macipe A, Toledano M, Osorio E, Rodriguez-Clemente R, Murtra J, et al. Mechanical properties of visible light-cured resins reinforced with hydroxyapatite for dental restoration. *Dent Mater*. 2002;18(1):49-57.

Atai M, Ahmadi M, Babanzadeh S, Watts DC. Synthesis, characterization, shrinkage and curing kinetics of a new low-shrinkage urethane dimethacrylate monomer for dental applications. *Dent Mater*. 2007;23(8):1030-41.

Baharav H, Abraham D, Cardash HS, Helft M. Effect of exposure time on the depth of polymerization of a visible light-cured composite resin. *J Oral Rehabil*. 1988;15(2):167-72.

*Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2004]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;80(1):268-72.

Beliveau R, Gingras D. Green tea: prevention and treatment of cancer by nutraceuticals. *Lancet.* 2004;364(9439):1021-2.

Betamar N, Cardew G, Van Noort R. Influence of specimen designs on the microtensile bond strength to dentin. *J Adhes Dent.* 2007;9(2):159-68.

Bianchi L, Ribeiro AP, Carrilho MR, Pashley DH, de Souza Costa CA, Hebling J. Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(8):1498-507.

Borges ALS, Borges AB, Barcellos DC, Saavedra Gde S, Paes Junior TJA, Rode SM. Assessment of flexural strength and elastic modulus of different indirect composite resins. *RPG Rev Pós-Grad.* 2012;19(2):50-6.

Borges ALS, Borges AB, Barcellos DC, Torres CR, Paes Junior TJA, Kimpara ET. Evaluation of flexural strength and flexural modulus of different composites. *RPG Rev Pós-Grad.* 2009;16(1):26-32.

Bouillaguet S, Virgillito M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, in vitro. *J Oral Rehabil.* 1998;25(1):45-51.

Bourd-Boittin K, Fridman R, Fanchon S, Septier D, Goldberg M, Menashi S. Matrix metalloproteinase inhibition impairs the processing, formation and mineralization of dental tissues during mouse molar development. *Exp Cell Res.* 2005;304(2):493-505.

Bras NF, Goncalves R, Mateus N, Fernandes PA, Ramos MJ, de Freitas V. Inhibition of pancreatic elastase by polyphenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2010;58(19):10668-76.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998;56(11):317-33.

Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater.* 2008;24(1):90-101.

Butler WT. Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res.* 1995;33(1-3):59-65.

Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AU, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol.* 2005;25(2):101-8.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J.* 2005;38(8):505-9.

Chandra GK, Tripathy DR, Dasgupta S, Roy A. Interaction of (-)-epigallocatechin gallate with lysozyme-conjugated silver nanoparticles. *Appl Spectrosc.* 2012;66(7):744-9.

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

Chen RS, Liu CC, Tseng WY, Jeng JH, Lin CP. Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent.* 2003;31(3):223-9.

Cheng XW, Kuzuya M, Kanda S, Maeda K, Sasaki T, Wang QL, et al. Epigallocatechin-3-gallate binding to MMP-2 inhibits gelatinolytic activity without influencing the attachment to extracellular matrix proteins but enhances MMP-2 binding to TIMP-2. *Arch Biochem Biophys.* 2003;415(1):126-32.

Cilli R, Prakki A, de Araujo PA, Pereira JC. Influence of glutaraldehyde priming on bond strength of an experimental adhesive system applied to wet and dry dentine. *J Dent.* 2009;37(3):212-8.

Condon JR, Ferracane JL. Evaluation of composite wear with a new multi-mode oral wear simulator. *Dent Mater.* 1996;12(4):218-26.

Condon JR, Ferracane JL. Reduction of composite contraction stress through non-bonded microfiller particles. *Dent Mater.* 1998;14(4):256-60.

Costa CA, Hebling J, Hanks CT. Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dent Mater.* 2000a;16(3):188-97.

Costa CA, Teixeira HM, do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of two current adhesive resins. *J Endod.* 2000b;26(9):512-6.

Costa CA, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater.* 1999;15(6):434-41.

de Assis JS, Lima RA, Marques Lima JP, Azevedo Rodrigues LK, Santiago SL. Effect of epigallocatechin-3-gallate application for remaining carious dentin disinfection. *J Conserv Dent.* 2015;18(1):51-5.

De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(5):494-501.

Demeule M, Brossard M, Page M, Gingras D, Beliveau R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1478(1):51-60.

Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater.* 2008;24(3):362-71.

Du X, Huang X, Huang C, Wang Y, Zhang Y. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive. *J Dent.* 2012;40(6):485-92.

Duffy SJ, Keaney JF Jr, Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B, et al. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104(2):151-6.

Eliades G, Vougiouklakis G, Palaghias G. Heterogeneous distribution of single-bottle adhesive monomers in the resin-dentin interdiffusion zone. *Dent Mater*. 2001;17(4):277-83.

Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater*. 2006;22(3):211-22.

Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*. 2011;16(2):1486-507.

Frazier RA, Deaville ER, Green RJ, Stringano E, Willoughby I, Plant J, et al. Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;51(2):490-5.

Garcia-Godoy F, Tay FR, Pashley DH, Feilzer A, Tjaderhane L, Pashley EL. Degradation of resin-bonded human dentin after 3 years of storage. *Am J Dent*. 2007;20(2):109-13.

Gaston BA, West LA, Liewehr FR, Fernandes C, Pashley DH. Evaluation of regional bond strength of resin cement to endodontic surfaces. *J Endod*. 2001;27(5):321-4.

Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res*. 1998;41(3):474-80.

Guo X, Wang Y, Spencer P, Ye Q, Yao X. Effects of water content and initiator composition on photopolymerization of a model BisGMA/HEMA resin. *Dent Mater*. 2008;24(6):824-31.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007;65(1):1-13.

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

Hashimoto M, Tay FR, Svizero NR, de Gee AJ, Feilzer AJ, Sano H, et al. The effects of common errors on sealing ability of total-etch adhesives. *Dent Mater.* 2006;22(6):560-8.

Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod.* 1996;59(2):205-15.

Henning SM, Niu Y, Lee NH, Thames GD, Minutti RR, Wang H, et al. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6):1558-64.

Hiraishi N, Sono R, Sofiqul I, Yiu C, Nakamura H, Otsuki M, et al. In vitro evaluation of plant-derived agents to preserve dentin collagen. *Dent Mater.* 2013;29(10):1048-54.

Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine release and water sorption characteristics of chlorhexidine-incorporated hydrophobic/hydrophilic resins. *Dent Mater.* 2008;24(10):1391-9.

Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells in vitro. *Int Endod J.* 2002;35(11):905-9.

International Standardization Organization. ISO/TR 11405:1994: dental materials - guidance on testing of adhesion to tooth structure. Geneva: Switzerland: ISO; 1994:1-14.

International Standardization Organization. ISO 4049:2000: dentistry - polymer-based filling, restorative and luting materials. Geneva Switzerland: ISO; 2000.

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

Ito S, Hoshino T, Iijima M, Tsukamoto N, Pashley DH, Saito T. Water sorption/solubility of self-etching dentin bonding agents. *Dent Mater*. 2010;26(7):617-26.

Jackson JK, Zhao J, Wong W, Burt HM. The inhibition of collagenase induced degradation of collagen by the galloyl-containing polyphenols tannic acid, epigallocatechin gallate and epicatechin gallate. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(5):1435-43.

Kalachandra S, Turner DT. Water sorption of polymethacrylate networks: bis-GMA/TEGDM copolymers. *J Biomed Mater Res*. 1987;21(3):329-38.

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

Khamverdi Z, Rezaei-Soufi L, Rostamzadeh T. The Effect of Epigallocatechin Gallate on the Dentin Bond Durability of Two Self-etch Adhesives. *J Dent (Shiraz)*. 2015;16(2):68-74.

Kim JW, Kim JD, Kim J, Oh SG, Lee YW. Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. *J Food Eng*. 2008;89(3):303-9.

Kitasako Y, Burrow MF, Nikaido T, Tagami J. The influence of storage solution on dentin bond durability of resin cement. *Dent Mater*. 2000;16(1):1-6.

Kostoryz EL, Dharmala K, Ye Q, Wang Y, Huber J, Park JG, et al. Enzymatic biodegradation of HEMA/bisGMA adhesives formulated

with different water content. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;88(2):394-401.

Lambert JD, Sang S, Hong J, Kwon SJ, Lee MJ, Ho CT, et al. Peracetylation as a means of enhancing in vitro bioactivity and bioavailability of epigallocatechin-3-gallate. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(12):2111-6.

Liu Y, Bai X, Li S, Keightley A, Wang Y. Molecular weight and galloylation affect grape seed extract constituents' ability to cross-link dentin collagen in clinically relevant time. *Dent Mater.* 2015;31(7):814-21.

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

Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci.* 2009;117(5):587-96.

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

Madhan B, Krishnamoorthy G, Rao JR, Nair BU. Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *Int J Biol Macromol.* 2007;41(1):16-22.

Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater.* 2006;22(10):973-80.

Mankovskaia A, Levesque CM, Prakki A. Catechin-incorporated dental copolymers inhibit growth of *Streptococcus mutans*. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(2):203-7.

Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res*. 2007;86(5):436-40.

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

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

Nakanishi T, Mukai K, Yumoto H, Hirao K, Hosokawa Y, Matsuo T. Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. *Eur J Oral Sci*. 2010;118(2):145-50.

Neri JR, Yamauti M, Feitosa VP, Pires AP, Araujo Rdos S, Santiago SL. Physicochemical properties of a methacrylate-based dental adhesive incorporated with epigallocatechin-3-gallate. *Braz Dent J*. 2014;25(6):528-31.

Nunes TG, Ceballos L, Osorio R, Toledano M. Spatially resolved photopolymerization kinetics and oxygen inhibition in dental adhesives. *Biomaterials*. 2005;26(14):1809-17.

O'Brien S, Shaw J, Zhao X, Abbott PV, Munroe P, Xu J, et al. Size dependent elastic modulus and mechanical resilience of dental enamel. *J Biomech*. 2014;47(5):1060-6.

Ohkubo N, Iwata S, Chikada K, Kuriyama S, Narita M, Ishikawa T, et al. A retention comparison of two sealants. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1982;23(4):201-19.

Pallan S, Furtado Araujo MV, Cilli R, Prakki A. Mechanical properties and characteristics of developmental copolymers incorporating catechin or chlorhexidine. *Dent Mater*. 2012;28(6):687-94.

Park J, Ye Q, Topp EM, Misra A, Kieweg SL, Spencer P. Effect of photoinitiator system and water content on dynamic mechanical properties of a light-cured bisGMA/HEMA dental resin. *J Biomed Mater Res A*. 2010;93(4):1245-51.

Park JG, Ye Q, Topp EM, Misra A, Spencer P. Water sorption and dynamic mechanical properties of dentin adhesives with a urethane-based multifunctional methacrylate monomer. *Dent Mater*. 2009a;25(12):1569-75.

Park JG, Ye Q, Topp EM, Spencer P. Enzyme-catalyzed hydrolysis of dentin adhesives containing a new urethane-based trimethacrylate monomer. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009b;91(2):562-71.

Pashley DH. Dentin bonding: overview of the substrate with respect to adhesive material. *J Esthet Dent*. 1991;3(2):46-50.

Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent*. 1997;25(5):355-72.

Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int*. 1993;24(9):618-31.

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

Perdigao J, Geraldeli S, Carmo AR, Dutra HR. In vivo influence of residual moisture on microtensile bond strengths of one-bottle adhesives. *J Esthet Restor Dent*. 2002;14(1):31-8.

Perdigao J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G, Lopes AL. Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. *J Biomed Mater Res*. 1995;29(9):1111-20.

Peutzfeldt A, Asmussen E. Modulus of resilience as predictor for clinical wear of restorative resins. *Dent Mater*. 1992;8(3):146-8.

Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, et al. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater.* 1994;15(3):173-90.

Porto IC, de Aguiar FH, Brandt WC, Liporoni PC. Mechanical and physical properties of silorane and methacrylate-based composites. *J Dent.* 2013;41(8):732-9.

Prakki A, Pereira PN, Kalachandra S. Effect of propionaldehyde or 2,3-butanedione additives on the mechanical properties of Bis-GMA analog-based composites. *Dent Mater.* 2009;25(1):26-32.

Quesada IM, Bustos M, Blay M, Pujadas G, Ardevol A, Salvado MJ, et al. Dietary catechins and procyanidins modulate zinc homeostasis in human HepG2 cells. *J Nutr Biochem.* 2011;22(2):153-63.

Riggs PD, Braden M, Patel M. Chlorhexidine release from room temperature polymerising methacrylate systems. *Biomaterials.* 2000;21(4):345-51.

Roulet JF. The problems associated with substituting composite resins for amalgam: a status report on posterior composites. *J Dent.* 1988;16(3):101-13.

Roy M, Chakrabarty S, Sinha D, Bhattacharya RK, Siddiqi M. Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutat Res.* 2003;523-524:33-41.

Rueggeberg F. Contemporary issues in photocuring. *Compend Contin Educ Dent Suppl.* 1999(25):S4-15; quiz S73.

Sano H, Ciucchi B, Matthews WG, Pashley DH. Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. *J Dent Res.* 1994a;73(6):1205-11.

Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, et al. Relationship between surface-area for adhesion and tensile bond

strength - evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater.* 1994b;10(4):236-40.

Santiago SL, Osorio R, Neri JR, Carvalho RM, Toledano M. Effect of the flavonoid epigallocatechin-3-gallate on resin-dentin bond strength. *J Adhes Dent.* 2013;15(6):535-40.

Schreiner RF, Chappell RP, Glaros AG, Eick JD. Microtensile testing of dentin adhesives. *Dent Mater.* 1998;14(3):194-201.

Sengun A, Unlu N, Ozer F, Ozturk B. Bond strength of five current adhesives to caries-affected dentin. *J Oral Rehabil.* 2002;29(8):777-81.

Shono Y, Ogawa T, Terashita M, Carvalho RM, Pashley EL, Pashley DH. Regional measurement of resin-dentin bonding as an array. *J Dent Res.* 1999a;78(2):699-705.

Shono Y, Terashita M, Shimada J, Kozono Y, Carvalho RM, Russell CM, et al. Durability of resin-dentin bonds. *J Adhes Dent.* 1999b;1(3):211-8.

Spencer P, Ye Q, Park J, Misra A, Bohaty BS, Singh V, et al. Durable bonds at the adhesive/dentin interface: an impossible mission or simply a moving target? *Braz Dent Sci.* 2012;15(1):4-18.

Sumpio BE, Cordova AC, Berke-Schlessel DW, Qin F, Chen QH. Green tea, the "Asian paradox," and cardiovascular disease. *J Am Coll Surg.* 2006;202(5):813-25.

Tariq M, Naveed A, Barkat Ali K. The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Camellia sinensis*' tea. *J Med Plant Res.* 2010;4(19):2028-33.

Tay FR, Pashley DH, Garcia-Godoy F, Yiu CK. Single-step, self-etch adhesives behave as permeable membranes after polymerization. Part II. Silver tracer penetration evidence. *Am J Dent.* 2004;17(5):315-22.

Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Carrilho M, Breschi L, Tjaderhane L, et al. The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. *Dent Mater.* 2010;26(11):1059-67.

Titley KC, Chernecky R, Rossouw PE, Kulkarni GV. The effect of various storage methods and media on shear-bond strengths of dental composite resin to bovine dentine. *Arch Oral Biol.* 1998;43(4):305-11.

Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater.* 2013;29(1):116-35.

Toledano M, Yamauti M, Ruiz-Requena ME, Osorio R. A ZnO-doped adhesive reduced collagen degradation favouring dentine remineralization. *J Dent.* 2012;40(9):756-65.

Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials.* 2010;31(8):2010-4.

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

Vidal CM, Aguiar TR, Phansalkar R, McAlpine JB, Napolitano JG, Chen SN, et al. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta Biomater.* 2014;10(7):3288-94.

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

Wang HF, Provan CJ, Helliwell K. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends Food Sci Tech.* 2000;11(4-5):152-60.

Wang L, D'Alpino PH, Lopes LG, Pereira JC. Mechanical properties of dental restorative materials: relative contribution of laboratory tests. *J Appl Oral Sci.* 2003;11(3):162-7.

Wendt SL Jr. The effect of heat used as secondary cure upon the physical properties of three composite resins. II. Wear, hardness, and color stability. *Quintessence Int.* 1987;18(5):351-6.

Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, Tsubota K, Rikuta A. Influence of crosshead speed on micro-tensile bond strength of two-step adhesive systems. *Dent Mater.* 2006;22(5):420-5.

Ye Q, Park J, Topp E, Spencer P. Effect of photoinitiators on the in vitro performance of a dentin adhesive exposed to simulated oral environment. *Dent Mater.* 2009;25(4):452-8.

Yiu CK, Garcia-Godoy F, Tay FR, Pashley DH, Imazato S, King NM, et al. A nanoleakage perspective on bonding to oxidized dentin. *J Dent Res.* 2002;81(9):628-32.

Yun JH, Pang EK, Kim CS, Yoo YJ, Cho KS, Chai JK, et al. Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. *J Periodontal Res.* 2004;39(5):300-7.

Zhang SC, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci.* 2009;1(4):163-76.

Zou Y, Jessop JL, Armstrong SR. In vitro enzymatic biodegradation of adhesive resin in the hybrid layer. *J Biomed Mater Res A.* 2010;94(1):187-92.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA CAMPUS SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP</p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>																
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP																
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA																
Título da Pesquisa: PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESTRUTURAIS DE UM ADESIVO EXPERIMENTAL COM INCORPORAÇÃO DE EGCG (EPIGALLOCATEQUINA-3-GALATO)																
Pesquisador: Beatriz Maria da Fonseca																
Área Temática:																
Versão: 2																
CAAE: 25724214.7.0000.0077																
Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP																
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio																
DADOS DO PARECER																
Número do Parecer: 532.725																
Data da Relatoria: 11/02/2014																
Apresentação do Projeto:																
<p>O objetivo deste trabalho <i>in vitro</i> será avaliar as propriedades mecânicas e estruturais de um adesivo experimental de condicionamento ácido total com incorporação de EGCG (componente ativo derivado do chá verde) na resistência de união resina-dentina imediata e após armazenamento por 6 meses em água destilada. A primeira fase envolverá a manipulação de modelos adesivos com incorporação de diferentes concentrações de EGCG na relação de massa BisGMA 55% / HEMA 45%. Após mistura e vibração por 24h será incorporada água (D2O) para propiciar a separação de fases do adesivo (vibração por 1 min e centrifugação por 60 min). As fases aquosa e resinosa, e a resina pura serão avaliadas em FT-IR (espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier). Uma gota do líquido a ser analisado será depositada sobre a superfície do cristal ATR que coletará espectros, permitindo acompanhar o grau de conversão durante e após a fotoativação por LED de 1100mW/cm² de intensidade (20 min de medição). Após essa etapa, serão verificadas absorção e solubilidade em água, resistência flexural e módulo de elasticidade, módulo de resiliência e</p>																
<table border="0" style="width: 100%; font-size: small;"> <tr> <td colspan="4">Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Jardim São Dimas</td> <td>CEP: 12.245-000</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (12)3947-9078</td> <td>Fax: (12)3947-9010</td> <td colspan="2">E-mail: cep@focj.unesp.br</td> </tr> </table>	Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777				Bairro: Jardim São Dimas	CEP: 12.245-000			UF: SP	Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS			Telefone: (12)3947-9078	Fax: (12)3947-9010	E-mail: cep@focj.unesp.br	
Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777																
Bairro: Jardim São Dimas	CEP: 12.245-000															
UF: SP	Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS															
Telefone: (12)3947-9078	Fax: (12)3947-9010	E-mail: cep@focj.unesp.br														
Página 01 de 02																

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Projeto: 532.725

resistência a tração diametral, espectrometria de ressonância magnética nuclear, mensuração do ângulo de contato e contração de polimerização dos adesivos experimentais, determinando três concentrações ideais de adesivo experimentais. Os adesivos manipulados serão aplicados sobre a dentina condicionada de molares humanos hígidos ($n = 10$), extraídos por indicação ortodôntica e/ou periodontal, e serão avaliados quanto à resistência de união imediata e após armazenamento dos espécimes por 6 meses em água destilada, por teste de resistência à microtração em máquina de teste universal (DL-1000, EMIC, São José dos Pinhais- PR- Brasil), com carga de 10 kgf e velocidade de 0,5 mm/min, sendo os dados expressos em MPa. Para fins ilustrativos dos diferentes tratamentos sobre a superfície dentinária será realizado MEV para verificação da interface adesiva formada. Constatada a normalidade dos resultados obtidos, será aplicado o modelo estatístico mais apropriado.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O presente estudo tem como objetivo inicial desenvolver um adesivo experimental contendo em sua composição a catequina EGCG (epigalocatequina-3-galato) com propriedades mecânicas e estruturais semelhantes aos adesivos convencionais de dois passos presentes no mercado.

Objetivo Secundário:

Quanto aos objetivos do estudo, espera-se que o adesivo experimental mantenha a integridade da camada híbrida e os valores de resistência de união dentinária após o envelhecimento de molares humanos hígidos, ao mesmo tempo em que seja capaz de inibir a ação das MMPs dentinárias devido à ação da EGCG presente em sua composição.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Incapacidade do adesivo experimental desenvolvido de manter a estabilidade da camada híbrida em longo prazo e os valores de resistência de união após o envelhecimento das restaurações. Porém não há risco pois serão utilizados dentes já extraídos.

Benefícios:

Endereço: Av Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-6076 Fax: (12)3947-6010 E-mail: cep@focjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 532.725

Desenvolvimento de um adesivo experimental visando a redução da degradação dos componentes resinosos do adesivo, assim como do colágeno exposto, pela incorporação do EGCG, que é um componente natural extraído do chá verde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Interessante no aspecto de ser uma nova alternativa num tratamento pré-existente utilizando um fitoterápico

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado o termo de doação do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Recomendações:

Nd

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

Nd

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado confirma o parecer do relator que aprovou o projeto apresentado pela pesquisadora.

SAO JOSE DOS CAMPOS, 18 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
Denise Nicodemo
(Coordenador)

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep@foajc.unesp.br