

EFEITO DOS AGENTES DE CROSS-LINKING NA DURABILIDADE DA INTERFACE ADESIVA

EFFECT OF CROSS-LINKING AGENTS ON THE DURABILITY OF THE ADHESIVE INTERFACE

Caroliny Mello Barboza¹, Eduardo Victor Maroun²

Resumo

As metaloproteinases (MMPs) são enzimas colagenolíticas endógenas, capazes de degradar as fibrilas de colágeno presentes na dentina, gerando falhas da interface adesiva. Foram propostos agentes de *cross-linking* para diminuir essa degradação. O objetivo desta revisão de literatura foi analisar a ação de diferentes agentes de *cross-linking* sobre as MMPs. A seleção dos artigos foi realizada por meio de uma busca na base de dados PubMed/MEDLINE. A amostra final foi composta por 40 estudos publicados entre 2018 e 2010. Os estudos atuais apresentaram os agentes de *cross-linking* (cabordiimida, glutaraldeído, proantocianidina, riboflavina/UV-A e quitosana) com vantagens como inespecificidade em relação aos tipos de MMPs, aumento da resistência da fibra colágena e possibilidade de bloquear o sítio de clivagem da enzima. Observou-se que a cabordiimida, riboflavina/UV-A, o glutaraldeído, a proantocianidina e a quitosana apresentaram resultados positivos na diminuição da degradação da interface adesiva. A carbodiimida e riboflavina/UV-A não são citotóxicas, diferentemente do glutaraldeído. A proantocianidina, quando incorporada no adesivo, apesar de interferir na polimerização dos monômeros adesivos, pode ser efetiva quando utilizada incorporada ao condicionamento ácido. A quitosana é capaz de reforçar as fibrilas de colágeno. Assim, foi possível conhecer mais sobre a ação dos agentes de *cross-linking* disponíveis. No entanto, há necessidade de mais pesquisas sobre esses agentes.

Palavras-chave: Metaloproteinases. Dentina e reagentes para ligações cruzadas.

Abstract

Metalloproteases are endogenous collagenolytic enzymes, capable of degrading the collagen fibrils present in the dentin, producing adhesive interface failures. Cross-linking agents has been proposed to reduce this degradation. The aim of this literature review was to analyze the action of different cross-linking agents on MMPs. The search was conducted in the PubMed database. The final sample consisted of 40 studies published between 2018 and 2010. Current studies have shown cross-linking agents (carbodiimide, glutaraldehyde, proanthocyanidin, riboflavin / UV-A and chitosan) present some advantages as non-specificity to type of MMPs, collagen fiber's toughness development and prevent bonding to the cleavage site of the enzyme. For this reason, it is necessary to know the action of the available cross-linking agents. It was observed that Carbodiimide, riboflavin / UV-A, glutaraldehyde, proanthocyanidin and chitosan presented positive results in reducing degradation of the adhesive interface. Carbodiimide and riboflavin / UV-A are non-cytotoxic, unlike glutaraldehyde. Proanthocyanidin incorporated into the adhesive interferes with the polymerization of the adhesive monomers. Chitosan is able to reinforce collagen fibrils. Thus, it was possible to know more about the action of the available cross-linking agents. However, there is a need for more research on these agents.

Keywords: Metalloproteases. Dentin. Cross-linking reagent.

1 Cirurgiã-dentista; Especialista em Dentística, Mestranda em Dentística Departamento de Dentística, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil.

2 Cirurgião-dentista; Especialista e Mestre em Dentística - Clínica de Dentística, Odontoclínica Central da Marinha, Rio de Janeiro, Brasil.

Como citar este artigo:

Barboza CM, Maroun EV. Efeito dos agentes de *cross-linking* na durabilidade da interface adesiva. Rev Nav Odontol. 2019; 46(1): 69-74

Submetido em 18/06/2019

Aceito em 20/08/2019

INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, as restaurações de resina composta sofreram diversos avanços tecnológicos. Contudo, a estabilidade da interface dentina/resina ainda é questionável em longo prazo (1,2,3). Vários fatores têm sido atribuídos à degradação da interface dentina-resina, tais como: monômeros hidrofílicos incorporados em adesivos simplificados, concentração de água em adesivos autocondicionantes, inadequada penetração/molhamento dos monômeros resinosos na camada híbrida, degradação proteolítica das fibrilas colágenas expostas por enzimas colagenolíticas endógenas ativadas (metaloproteinases-MMPs), alta permeabilidade da interface adesiva, separação de fases dentro da camada híbrida e polimerização inadequada do adesivo (3,4).

Para a realização da restauração de resina composta, torna-se necessário o tratamento da estrutura dentária. Desse modo, realiza-se o condicionamento com ácido fosfórico a 37% por 15 segundos em dentina, o que solubiliza toda a fase mineral da *smear layer* e 5µm de dentina mineralizada subjacente, expondo uma rede de fibrilas de colágeno tipo I. Os espaços entre as fibrilas colágenas (espaços interfibrilares) servem como canais para a difusão dos monômeros adesivos, formando a camada híbrida (4).

Contudo, a cobertura completa das superfícies das fibrilas de colágeno por meio da penetração passiva do monômero é imperfeita. As fibrilas que não foram envolvidas tornam-se vulneráveis à degradação hidrolítica e enzimática por MMPs (4,5,6).

As MMPs desempenham um papel importante em processos biológicos e patológicos pela sua habilidade em degradar quase todos os tipos de componentes da matriz extracelular, como, por exemplo, ocorre na atividade cáries e na doença periodontal (1,4). Para inibir a ação das MMPs e prolongar a durabilidade da interface resina-dentina, tem sido recomendado o uso de inibidores como a clorexidina, tetraciclina, componentes de quaternário de amônio, entre outros. Contudo, estudos recentes têm apresentado um novo mecanismo para inibir a degradação da interface adesiva: os agentes de *cross-linking*. Estes agentes possuem vantagens sobre os inibidores de MMPs, pois são inespecíficos em relação aos tipos de MMPs, aumentam a resistência da fibra colágena e poderiam bloquear o sítio de clivagem da enzima (1-5).

Agentes de *cross-linking* podem ser divididos em sintéticos (glutaraldeído, carbodiimides, etc.) e naturais (semente de uva, cacau, grãos, etc.). Em

virtude da grande variedade de agentes de *cross-linking* torna-se necessária uma melhor compreensão da interação desses agentes em relação à atividade das MMPs. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi apresentar a ação de diferentes agentes de *cross-linking* sobre as proteases dentinárias por meio de uma revisão de literatura (7-11).

Foi realizado um levantamento bibliográfico a partir de uma busca eletrônica na base de dados Pubmed/MEDLINE. Os termos utilizados para a busca segundo o Medical Subject Headings (MeSH) foram: *metaloproteases*, *dentin* e *cross-linking reagents*. A pesquisa restringiu-se em estudo publicados entre 2010 e 2018. Foram obtidos no total 60 artigos e, após a leitura, foram excluídos 20 artigos, pois não apresentavam relação com o tema deste trabalho e/ou não estavam dentro dos idiomas restringidos.

REVISÃO DE LITERATURA/ DISCUSSÃO

O colágeno e a degradação da interface adesiva

O colágeno, principalmente do tipo I, constitui 90% da matriz orgânica da dentina e, junto com o componente mineral, contribui para as propriedades biomecânicas e integridade funcional desse tecido (12). Cada molécula de colágeno possui uma estrutura em tripla hélice, que é composta por duas cadeias polipeptídicas idênticas, denominadas cadeias $\alpha 1$, e uma terceira cadeia ligeiramente diferente, denominada cadeia $\alpha 2$. Além da região helicoidal, existem, nas extremidades, sequências denominadas telopeptídeo-N e telopeptídeo-C (13).

As ligações cruzadas intermoleculares são a base para a estabilidade, resistência à tração e viscoelasticidade das fibrilas de colágeno (13).

Uma análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou que quase 70% do colágeno presente na interface adesiva foi perdido após 44 meses (14). Proteases como as MMPs são consideradas as principais responsáveis por essa degradação enzimática das fibrilas de colágeno (14).

As MMPs fazem parte de uma classe de endopeptidases zinco e cálcio dependentes, estando presente na dentina com, pelo menos, quatro tipos: estromelisinina-I (MMP-3), colagenase (MMP-8) a gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9, respectivamente) (4,15,16).

Inicialmente, o processo de desmineralização, com o condicionamento ácido, foi tido como principal ativador pró-MMPs, presentes na dentina mineralizada. Todavia, o pH extremamente baixo (pH 0.7) do ácido fosfórico, utilizado na técnica convencional, desnatura as MMPs. Os componentes resinosos incorporados em adesivos convencionais

e autocondicionantes possuem características levemente ácidas. Ao se elevar o pH, observou-se um aumento das atividades colagenolíticas e gelatinolíticas na matriz de colágeno total ou parcialmente desmineralizada (1).

Na degradação do colágeno, as MMPs mudam a disposição helicoidal da molécula de colágeno, expondo a ligação peptídica de glicina-isoleucina presentes nas cadeias para a reação com o local ativo da enzima (5,14). Esta degradação resulta na perda de resistência da interface dente/resina (9).

AGENTES DE CROSS-LINKING

Carbodiimida

A 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimida (EDC) é um agente de *cross-linking* de baixa citotoxicidade, com resultados promissores na redução da degradação do colágeno e na preservação da resistência de união (4,8,9). A EDC é um isômero de cianamida estável, com um grupo funcional (RN=C=NR) capaz de ativar o grupo carboxila dos ácidos glutâmico e aspártico presentes nas moléculas de colágeno e no sítio catalítico de proteases (3). A EDC liga-se ao radical carboxila formando um intermediário O-acilisouréia muito reativo que, após reagir com um grupo amina livre, origina uma nova ligação peptídica e libera como subproduto da reação ureia, solúvel em água (4,8).

De acordo com SINGH et al. (3), em 2016, o tempo de aplicação de EDC foi de 30 minutos a 4 horas, o que torna o procedimento inviável por uma visão clínica. Contudo, TEZVERGIL-MUTLUAY et al. (17), em 2012, avaliaram os efeitos inibitórios de 5 concentrações de EDC (0,01M, 0,02M, 0,05M, 0,1M, 0,3M) em 5 tempos de aplicação (1, 5, 10, 20, 30 minutos). Todas as concentrações inativaram MMP-9, independentemente do tempo de aplicação. Sendo assim, a aplicação de 1 minuto pode ser clinicamente relevante. Outros autores relataram que concentrações de EDC entre 0,5M e 2M, por apenas 30 segundos, aumentaram significativamente a dureza do colágeno. Entretanto, quando o tempo de reação foi de 60 segundos de tratamento, a EDC elevou o módulo de elasticidade nas concentrações de 1M ou 2M. Todos esses tempos de tratamentos e concentrações foram suficientes para reduzir atividade da MMP.

MAZZONI et al. (7), em 2014, detectaram um aumento da expressão de MMP-2 e -9 na dentina depois da aplicação de sistema adesivo convencional. Na análise zimográfica, o uso de 0,3M EDC como primer por 30 min demonstrou inativar a atividade gelatinolítica. Outros estudos detectaram que a mesma concentração por 1 minuto foi capaz de promover estabilidade na resistência de união após um ano de acompanhamento, independente do tipo de sistema adesivo utilizado (18,19).

SCHEFFEL et al. (14), em 2013, avaliaram que a concentração de 0,5M de EDC pode ser misturada sem redução de sua habilidade de inativar todas as MMPs na dentina. Todavia, não foi avaliado se o EDC influencia na polimerização do adesivo.

Glutaraldeído

Glutaraldeído (GA) é um agente de *cross-linking* sintético e fixador tecidual (20,21). Em sua estrutura possui uma molécula alifática de cinco carbonos com um aldeído em cada extremidade da cadeia, tornando-o bifuncional (5). O grupo aldeído é capaz de interagir quimicamente com os grupos amino do colágeno, formando ligações cruzadas, aumentando a resistência do colágeno frente à degradação da interface adesiva (6,15,21).

A desvantagem deste agente é alta citotoxicidade, e a rápida formação de ligações no tecido, gerando uma barreira que impede sua maior difusão em todo volume tecidual, não sendo capaz de inibir completamente a atividade de MMPs na região mais profunda da camada híbrida (6,11,21,22,23).

Foi demonstrado que o uso de uma solução que contém 2, 5 ou 10% de GA, não exerce efeitos negativos às células odontoblastóides MDPC-23, e são capazes de diminuir atividade das MMPs; enquanto que os produtos dentários contendo uma combinação de glutaraldeído, hidroxietil metacrilato (HEMA) e outros monômeros eram altamente prejudiciais ao metabolismo dessas células (21).

Proantocianidinas

Proantocianidinas (PA) são compostos polifenólicos naturais usados amplamente como suplementos alimentares (24). Esta substância atua como agente de *cross-linking* e inibidor enzimático cuja ação, comparada à clorexidina, apresenta maior eficiência em enzimas endógenas como MMP-2, MMP-8 e MMP-9 (25,26). Fontes específicas para esses agentes são extratos de plantas ricos em proantocianidinas, como o chá verde e branco, semente de uva, canela, semente de cacau, entre outras (10,27).

A utilização destes compostos provenientes da semente de uva na dentina mostrou aumentar as propriedades mecânicas e reduzir as taxas de biodegradação da dentina desmineralizada (2,28,29).

A estabilização da adesão dentinária pode ser explicada por 4 mecanismos de interação: formação de ligação covalente, iônica, de hidrogênio e as interações hidrofóbicas (6,14,30,31). Esta interação ocorre, principalmente, por meio da união de hidrogênio entre a carbonila presente no grupo amida do colágeno com a hidroxila presente no

grupo fenólico do agente de *cross-linking* (6).

O efeito potente da inativação enzimática da semente de uva é baseado no conceito de que os agentes de *cross-linking* de colágeno, como PAs, podem inativar diretamente as enzimas por mudanças irreversíveis no domínio catalítico ou ocultar os locais de clivagem no colágeno (1,2).

A grande afinidade de PA na matriz orgânica de colágeno pode levar à ação efetiva sem a produção de moléculas residuais citotóxicas, tornando-a um produto seguro para uso (6).

A dentina desmineralizada tratada com PA por 30 minutos foi capaz de inibir 90% das MMPs (30). Investigou-se a resistência do colágeno dentinário frente a degradação biológica depois de ser tratado com uma solução de PA por 10s e foi demonstrado que o PA é um efetivo agente de *cross-linking* e aumenta a estabilidade da interface adesiva (32).

A incorporação de PA em sistemas adesivos é complexa, pois interfere adversamente na polimerização dos monômeros adesivos (32,33). No entanto, o uso de um ácido fosfórico 10% contendo 2% de PA não comprometeu a resistência de união à dentina, apresentando estabilidade após 6 meses de acompanhamento (24).

Riboflavina

A riboflavina (vitamina B2) é um agente conhecido na indústria alimentícia e na Medicina na área oftalmológica. Na Odontologia, tem sido utilizada como uma proposta para aumentar as propriedades mecânicas da matriz de dentina. Esta tem propriedades fotossensibilizadoras biocompatíveis, que podem ser utilizadas para formar radicais livres quando ativado por raios ultravioletas (UV-A), com picos de absorção de 270, 366, 445 nm (12, 34,35). A irradiação de riboflavina induzida pela luz UV-A libera radicais de oxigênio livres, que reagem com o grupo amina presente na molécula de colágeno formando ligações covalentes (6,12,34).

SESEOGULLARI-DIRIHAN et al. (34), em 2015, sugeriram que o uso de riboflavina com irradiação com UV-A por 1-5 min foi suficiente para bloquear a ação das MMPs.

Os efeitos dos agentes de *cross-linking* na estabilização da matriz de dentina frente à degradação tem sido atribuído a sua capacidade de aumentar a força do colágeno dentinário. Observou-se também que 0,1% riboflavina/UV-A usado como um pré-tratamento pode inativar MMPs, em principal a MMP -9 (12).

Segundo SESEOGULLARI-DIRIHANA et al. (36), em 2016, concentrações de 0,1% e 0,5% de riboflavina/UV-A inativaram 46% e 52% de MMPs,

respectivamente, num período de 5 minutos. O uso de 0,1% riboflavina 5'-fosfatado, como agente de *cross-linking*, pode inativar 55% das MMPs totais, enquanto que, no grupo sem tratamento, a atividade das MMPs aumentou em 84%. A atividade de uma solução de 1% de riboflavina/UV-A por 1 min em dentina radicular desmineralizada com EDTA 17% provocou um aumento na resistência à degradação colagenolítica (37).

Quitossana

Quitossana é um polímero biocompatível natural que exibe atração eletrostática para o colágeno e é capaz de formar uma rede micro e nano-fibrilar com propriedades mecânicas superiores. Pode ser utilizado em combinação com terapia fotodinâmica, podendo aumentar a reticulação de fibrilas de colágeno na matriz dentinária e, assim, melhorar a estabilidade (38).

KISHEN et al. (39), em 2016, utilizaram uma solução de 0,3mg/ml de nanopartículas de quitossana associada à carbodiimida em dentina radicular condicionada com EDTA 17%, e observaram a formação de um complexo espesso com o colágeno dentinário, influenciando na redução da degradação colagenolítica induzida por MMPs e bactérias.

A combinação de quitossana com riboflavina/UV-A numa relação de volume de 20% (1:4) resultou, pela sua ação sinérgica, num efeito positivo significativo na resistência de união imediata e após 6 meses em água destilada (40).

CONCLUSÃO

Diante do estudo realizado, concluiu-se que, dentre os agentes de *cross-linking* sintéticos, o glutaraldeído não é um produto de primeira escolha devido sua alta citotoxicidade; enquanto que a carbodiimida é capaz de responder em tempos clinicamente viáveis e pode ser utilizada como um primer ou misturada a uma solução de HEMA 35%. Entre os agentes naturais, a proantocianidina é capaz de inativar a ação das MMPs e reforçar a estrutura de colágeno, porém, quando incorporada no adesivo, interfere adversamente na polimerização dos monômeros adesivos; a riboflavina/UV-A apresentou resultados positivos frente à ação das proteases e é biocompatível; a quitossana apresenta bons resultados reforçando a rede de fibrilas de colágeno da dentina e, quando utilizada associada a riboflavina/UV-A, pode interferir positivamente na resistência de união de sistemas adesivos convencionais. No entanto, há necessidade de mais pesquisas sobre esses agentes.

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Autor de correspondência: Eduardo Víctor Maroun, Odontoclínica Central da Marinha, Primeiro Distrito Naval, Praça Barão de Ladário, I, Centro, CEP 20091-000 email: marouneduardo01@gmail.com

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liu Y, Tjäderhane 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 Aug;90(8): 953-968.
2. Silva Sousa AB, Vidal CM, Leme-Kraus AA, Pires-de-Souza FC, Bedran-Russo AK. Experimental primers containing synthetic and natural compounds reduce enzymatic activity at the dentin-adhesive interface under cyclic loading. *Dent Mater.* 2016;32:1248-1255.
3. Singh P, Nagpal R, Singh UP, Manuja N. Effect of carbodiimide on the structural stability of resin/dentin interface. *J Conserv Dent.* 2016;19: 501-9.
4. Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability: a literature review. *Dent Mater.* 2016;32: e41-53.
5. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee KA, Cadenaro M, Turco G, et al. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. *Dent Mater.* 2014 Feb;30(2): 227-233.
6. Hass V, Luque-Martinez IV, Gutierrez MF, Moreira CG, Gotti VB, Feitosa VP, et al. Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dent Mater.* 2016 Jun;32(6): 732-741.
7. Mazzoni A, Apolonio FM, Saboia VP, Santi S, Angeloni V, Checchi V, et al. Carbodiimide inactivation of MMPs and effect on dentin bonding. *J Dent Res.* 2014;93: 263-268.
8. Ekambaram M, Yiu CK, Matinlinna JP. Effect of Solvents on Dentin Collagen Cross-linking Potential of Carbodiimide. *J Adhes Dent.* 2015 Jun;17(3): 219-26.
9. Turco G, Frassetto A, Fontanive L, Mazzoni A, Cadenaro M, Di Lenarda R, et al. Occlusal loading and cross-linking effects on dentin collagen degradation in physiological conditions. *Dent Mater.* 2016 Feb;32(2): 192-199.
10. Shrestha A, Friedman S, Kishen A. Photodynamically crosslinked and chitosan-incorporated dentin collagen. *J Dent Res.* 2011 Nov;90(11): 1346-1351.
11. Seseogullari-Dirihan R, Mutluay MM, Vallittu P, Pashley DH, Tezvergil- Mutluay A. Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. *Dent Mater.* 2015 Aug; 31(8): 941-947.
12. Cova A, Breschi L, Nato F, Ruggeri A Jr, Carrilho M, Tjäderhane L, et al. Effect of UVA-activated riboflavin on dentin bonding. *J Dent Res.* 2011 Dec;90(12): 1439-1445.
13. Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, Cadenaro M, Tjäderhane L, et al. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dent Mater.* 2018;34(1): 78-96.
14. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee K, Turco G, de Souza Costa CA, et al. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin. *Oper Dent.* 2014 Mar-Apr;39(2): 152-158.
15. Xu C, Wang Y. Cross-linked demineralized dentin maintains its mechanical stability when challenged by bacterial collagenase. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011 Feb; 96(2): 242-248.
16. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldini S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer - A review. *Dent Mater.* 2013 Oct;29(10): 999-1011.
17. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Agee KA, Seseogullari-Dirihan R, Hoshika T, Cadenaro M, et al. Carbodiimide cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, in vitro. *J Dent Res.* 2012 Feb;91(2): 192-196.
18. Mazzoni A, Angeloni V, Apolonio FM, Scotti N, Tjäderhane L, Tezvergil- Mutluay A, et al. Effect of carbodiimide (EDC) on the bond stability of etch- and-rinse adhesive systems. *Dent Mater.* 2013 Oct;29(10): 1040-1047.
19. Mazzoni A, Angeloni V, Comba A, Maravic T, Cadenaro M, Tezvergil-Mutluay A, et al. Cross-linking effect on dentin bond strength and MMPs activity. *Dent Mater.* 2018;34(2): 288-295.
20. Xu C, Wang Y. Collagen cross linking increases its biodegradation resistance in wet dentin bonding. *J Adhes Dent.* 2012 Feb;14(1): 11-18.
21. Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, de Souza Costa CA, Pashley D, Hebling J. Transdental cytotoxicity of glutaraldehyde on odontoblast-like cells. *J Dent.* 2015 Aug;43(8): 997-1006.
22. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 2011 Jan;27(1): 1-16.
23. Sabatini C, Scheffel DL, Scheffel RH, Agee KA, Rouch K, Takahashi M, et al. Inhibition of endogenous human dentin MMPs by Gluma. *Dent Mater.* 2014 Jul;30(7): 752-758.
24. Hass V, Luque-Martinez I, Muñoz MA, Reyes MF, Abuna G, Sinhorette MA, et al. The effect of proanthocyanidin-containing 10% phosphoric acid on bonding properties and MMP inhibition. *Dent Mater.* 2016;32(3): 468-475.
25. Balalaie A, Rezvani MB, Mohammadi Basir M. Dual function of proanthocyanidins as both MMP inhibitor and crosslinker in dentin biomodification: A literature review. *Dent Mater J.* 2018 Mar;30(2): 173-182.
26. Liu Y, Dusevich V, Wang Y. Addition of Grape Seed Extract Renders Phosphoric Acid a Collagen-stabilizing Etchant. *J Dent Res.* 2014 Aug;93(8): 821-827.16.
27. Vidal CM, Aguiar TR, Phansalkar R, McAlpine JB, Napolitano JG, Chen SN, et al. moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta Biomater.* 2014 Jul;

10(7): 3288-3294.

28. Aguiar TR, Vidal CM, Phansalkar RS, Todorova I, Napolitano JG, McAlpine JB, et al. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *J Dent Res.* 2014 Apr;93(4): 417-422.
29. Green B, Yao X, Ganguly A, Xu C, Dusevich V, Walker MP, et al. Grape seed proanthocyanidins increase collagen biodegradation resistance in the dentin/adhesive interface when included in an adhesive. *J Dent.* 2010 Nov;38(11): 908-915.
30. Epasinghe DJ, Yiu CK, Burrow MF, Hiraishi N, Tay FR. The inhibitory effect of proanthocyanidin on soluble and collagen-bound proteases. *J Dent.* 2013 Sep;41(9): 832-839.
31. Kalra M, Iqbal K, Nitisusanta LI, Daood U, Sum CP, Fawzy AS. The effect of proanthocyanidins on the bond strength and durability of resin sealer to root dentine. *Int Endod J.* 2013 Feb; 46(2): 169-178.
32. Liu Y, Chen M, Yao X, Xu C, Zhang Y, Wang Y. Enhancement in dentin collagen's biological stability after proanthocyanidins treatment in clinically relevant time periods. *Dent Mater.* 2013 Apr;29(4): 485-492.
33. Liu Y, Dusevich V, Wang Y. Proanthocyanidins rapidly stabilize the demineralized dentin layer. *J Dent Res.* 2013 Aug;92(8): 746-752.
34. Seseogullari-Dirihan R, Tjäderhane L, Pashley DH, Tezvergil-

Mutluay A. Effect of ultraviolet A-induced crosslinking on dentin collagen matrix. *Dent Mater.* 2015 Oct;31(10): 1225-1231.

35. Fawzy AS, Nitisusanta LI, Iqbal K, Daood U, Neo J. Riboflavin as a dentin crosslinking agent: ultraviolet A versus blue light. *Dent Mater.* 2012 Dec;28(12): 1284-1291.
36. Seseogullari-Dirihan R, Apollonio F, Mazzone A, Tjäderhane L, Pashley D, Breschi L, et al. Use of crosslinkers to inactivate dentin MMPs. *Dent Mater.* 2016 Mar;32(3): 423-432.
37. Priyadarshini, BM, Lu, TB., & Fawzy, AS Effect of photoactivated riboflavin on the biodegradation-resistance of root-dentin collagen. *J Photochem Photobiol B.* 2017;177: 18-23.
38. Persadmehr A, Torneck CD, Cvitkovitch DG, Pinto V, Talior I, Kazembe M, et al. Bioactive chitosan nanoparticles and photodynamic therapy inhibit collagen degradation in vitro. *J Endod.* 2014 May;40(5): 703-709.
39. Kishen, A, Shrestha, S, Shrestha, A, Cheng, C, & Goh, C Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. *Dent Mater.* 2016;32(8): 968-977.
40. Fawzy AS, Nitisusanta LI, Iqbal K, Daood U, Beng LT, Neo J. Chitosan/Riboflavin-modified demineralized dentin as a potential substrate for bonding. *J MechBehav Biomed Mater.* 2013 Jan;17: 278-289.