

**BEATRIZ MARIA DA FONSECA**

**INFLUÊNCIA *IN VITRO* DA CLOREXIDINA E DO CHÁ  
VERDE NA LONGEVIDADE DE UNIÃO ADESIVA RESINA  
COMPOSTA – DENTINA**



**2012**

**BEATRIZ MARIA DA FONSECA**

**INFLUÊNCIA *IN VITRO* DA CLOREXIDINA E DO CHÁ VERDE NA  
LONGEVIDADE DE UNIÃO ADESIVA RESINA COMPOSTA - DENTINA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do Título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade em Dentística.

Orientador: Profa. Titular Maria Amélia Máximo de Araújo

Co-orientador: Prof. Dr. Cesar Rogério Pucci

São José dos Campos

2012

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos  
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

F733i Fonseca, Beatriz Maria da  
Influência in vitro da clorexidina e do chá verde na longevidade de união adesiva  
resina composta – dentina / Beatriz Maria da Fonseca. - São José dos Campos :  
[s.n.], 2012.  
112.f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de  
Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.  
Orientador: Profa. Titular Maria Amélia Máximo de Araújo  
Co-orientador: Prof. Dr. Cesar Rogério Pucci.

1. Chá verde. 2. Clorexidina. 3. Metaloproteinasas. 4. Microtração. I. Araújo,  
Maria Amélia Máximo de. II. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,  
UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista “Julio de  
Mesquita Filho”. IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD15

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

## 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, 30 de Novembro de 2012 .

Assinatura :

E-mail: beatrizmfonseca@bol.com.br

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Titular Maria Amélia Máximo de Araújo  
(Orientadora)**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

**Prof. Dr. George Miguel Spyrides**

Faculdade de Odontologia do Centro de Ciências de Saúde

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Profa. Adjunto Ana Paula Martins Gomes**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 23 de Novembro de 2012.

## DEDICATÓRIA

*A Deus por estar ao meu lado em todos os momentos, por me guiar quando tudo parecia perdido, por me dar forças as inúmeras vezes em que pensei em desistir e por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho.*

*Aos meus pais, Antonio Carlos e Maria Angelica por toda dedicação, apoio e confiança depositada em mim durante todos esses anos. A vocês que sempre me ensinaram que somente com muito estudo e esforço conseguiria alcançar tudo que almejo na vida. Por batalharem e abdicarem de muitas coisas para que eu chegasse até aqui.*

*A conquista é para vocês, com vocês e de vocês.*

*Mesmo que eu escrevesse infinitas páginas ainda não seriam suficientes às palavras de agradecimento por tudo que sempre fizeram e fazem por mim.*

*Meu sincero Muito Obrigado!*

*A minha irmã **Camila**, por todo apoio, incentivo e por ver em mim um exemplo de esforço e determinação a ser seguido. Por ter aguentado dias de mau-humor, por ter ouvido inúmeras vezes minhas aulas, sem ao menos entender metade do que eu estava falando. E principalmente por estar ao meu lado sempre.*

*Ao meu namorado **Ciro**, por ter entendido os dias de ausência, os excessos de trabalho, as dificuldades enfrentadas nesses dois anos de idas e vindas e da atenção merecida que muitas vezes não pude lhe dar. Por ter me apoiado acima de tudo.*

*Obrigada por me mostrar que nosso amor é forte o suficiente para superar os diversos obstáculos que nos foram impostos durante essa caminhada.*

*Foi muito importante ter você ao meu lado.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A minha querida Orientadora, **Profa. Maria Amélia**.  
Primeiramente por ter me aceitado como sua orientada, sem mesmo me conhecer, já que eu vim de outra instituição de ensino. Por ter sido muito mais que uma orientadora, ter sido uma mãe, uma amiga, sempre presente, mesmo que nem sempre fisicamente, quando precisei. Alguém que pude contar sempre.

Gostaria de agradecer por esses dois anos de convívio e troca de conhecimentos. Aprendi a admirá-la como profissional e acima de tudo como pessoa, por ser essa pessoa batalhadora, transparente e ética, que poucos tiveram o privilégio de conhecer. Obrigada por ter me dado liberdade para expressar minhas idéias e opiniões, por todo apoio recebido durante essa fase, e por todo ensinamento transmitido.

Guardarei com imenso carinho e admiração o privilégio do convívio e a sorte por ter sido sua orientada.

## **AGRADECIMENTOS**

A todos os professores da Faculdade de Odontologia da UFRJ, por terem me apoiado durante toda Graduação e Especialização em Dentística e por toda ajuda necessária durante a minha formação para que eu pudesse chegar até aqui. Em especial a Profa. Dra. Kátia Regina Cervantes Dias, por ter me incentivado a vir fazer o Mestrado na FOSJC – UNESP. Muito Obrigada.

Ao meu co-orientador Prof. César Rogério Pucci, por todo apoio, ajuda e incentivo para que fosse possível a realização deste trabalho em todas as suas etapas.

A toda minha família, que sempre torceu por mim.

A todos os meus amigos do DUPLAR, do Fundão e os que a vida me deu, em especial a Marcelle, Patricia e Juliane, por todos esses anos de amizade, apoio e incentivo em diferentes etapas da minha vida. Por toda a torcida mesmo de longe para que desse tudo certo. Vocês foram fundamentais mais uma vez.

A Rafaela, que foi uma grande amiga que ganhei durante o mestrado e que vou levar para o resto da vida. Por ter podido contar em momentos de alegria e também nas dificuldades, dúvidas e incertezas.

A Patrícia, Daphne, Graziela, Letícia, Natália, Maria Beatriz, Luciana e Heleine, obrigada pelo convívio diário durante esses dois anos. Por toda apoio e companheirismo nessa fase. Em especial, a



Priscila, Tânia e Ana Luísa, que foram mais que companheiras de mestrado, foram verdadeiras amigas.

À UNESP, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Estevão Tomomitsu Kimpara.

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

A todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora. Em especial aos professores de Dentística Filomena, Sérgio, Carlão, Alessandra, Taciana e Eduardo, pela troca de conhecimentos e por todo aprendizado durante essa etapa.

A Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, Profa. Titular do Departamento de Ciências Biológicas da FO-USP Bauru por ter concedido gentilmente o gel de EGCG para realização deste trabalho.

Ao professor Ivan, pelas análises estatísticas realizadas.

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.

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!

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

*(Arthur Schopenhauer)*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS.....</b>	<b>14</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>17</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Chá Verde.....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Uso do chá verde na odontologia.....	25
<b>2.2 Clorexidina.....</b>	<b>35</b>
<b>2.3 Teste de Adesão por Microtração.....</b>	<b>47</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Delineamento experimental.....</b>	<b>53</b>
4.1.1 Unidades Experimentais.....	53
4.1.2 Fatores em Estudo.....	53
4.1.3 Variável de Resposta.....	54
<b>4.2 Adequação e preparo dos dentes.....</b>	<b>54</b>
<b>4.3 Divisão dos grupos experimentais.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4 Preparo do Chá Verde e EGCG.....</b>	<b>60</b>
4.4.1 Solução aquosa de Chá Verde.....	60
4.4.2 Gel a base de Epigallocatequina-3-galato 10 µM.....	61
<b>4.5 Inserção e polimerização da Resina Composta.....</b>	<b>61</b>
<b>4.6 Preparo dos corpos-de-prova para o teste de microtração....</b>	<b>62</b>
<b>4.7 Teste de resistência a microtração.....</b>	<b>64</b>
<b>4.8 Análise ilustrativa por MEV.....</b>	<b>65</b>

<b>4.9 Planejamento estatístico.....</b>	<b>67</b>
<b>4.10 Planejamento experimental.....</b>	<b>67</b>
<b>4.11 Análise Estatística.....</b>	<b>68</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
<b>5.1 Estatística Descritiva.....</b>	<b>69</b>
<b>5.2 Estatística Inferencial.....</b>	<b>70</b>
<b>5.3 Análise dos Padrões de Fratura.....</b>	<b>75</b>
<b>5.4 Análise Complementar da Interface Adesiva em MEV.....</b>	<b>76</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>6.1 Da metodologia.....</b>	<b>81</b>
<b>6.2 Dos resultados.....</b>	<b>86</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>112</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Preparo dos espécimes: A) Dente bovino; B) Secção 2,0 mm além da junção amelocementária com disco de aço diamantado; C) Coroa bovina após secção da raiz; D) Abertura coronária na região do cíngulo para mensuração e padronização dentinária; E) Desgaste da superfície de esmalte para exposição de uma área plana de dentina; F) Superfície vestibular com área de dentina exposta; G) Mensuração do remanescente de dentina com espessímetro..... 55
- Figura 2 – Embutimento dos espécimes: A) Matriz de silicone para embutir os espécimes; B) Superfície vestibular desgastada sobre a base da matriz de silicone; C) Preenchimento total com resina acrílica quimicamente ativada; D) Polimerização completa da resina acrílica; E) Remoção dos espécimes após reação de presa; F) Polimento dos espécimes para planificação e padronização das superfícies..... 57
- Figura 3 – Distribuição dos grupos de acordo com as estratégias adesivas e o tempo de armazenamento das amostras..... 58
- Figura 4 – Inserção da RC: A) Matriz de silicone posicionada sobre a dentina; B) Inserção da RC em incrementos de 2,0 mm; C) Inserção da RC até completar toda a dimensão da matriz; D) Fotopolimerização por 20s; E) Vista proximal do dente restaurado; F) Vista por oclusal do dente restaurado..... 62

Figura 5 – A) Secções perpendiculares à interface adesiva nos sentidos MD e CI em cortadeira de precisão em baixa velocidade Labcut 1010; B) Corpos-de-prova na forma de paralelogramo de resina composta e estrutura dental; C) Obtenção de nove palitos por dente; D) Mensuração da área de cada palito com auxílio de um paquímetro digital.....	63
Figura 6 – 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) Momento da fratura; D) Corpo-de-prova fraturado.....	64
Figura 7 – Tipos de fratura dos espécimes após teste de microtração.....	65
Figura 8 – Gráfico de colunas (média±dp) dos valores de resistência (MPa) obtidos pelo ensaio de microtração, segundo as condições experimentais estabelecidas pelas estratégias adesivas SB; CLX; CV; e EGCG; Armazenamento Imediato (I) e após 6 meses (6 m).....	70
Figura 9 – Curva normal dos valores resíduos do modelo ANOVA para verificar a distribuição dos resíduos (normalidade).....	71
Figura 10 – Diagrama de dispersão dos valores resíduos do modelo ANOVA em relação aos valores ajustados pelo modelo para verificar a uniformidade dos resíduos (homocedasticidade).....	72
Figura 11 – Gráfico de médias - Inter-relação entre as estratégias adesivas e o tempo de armazenamento entre os grupos.....	73

Figura 12 – Gráfico de colunas – classificação do padrão de fratura dos grupos.....	76
Figura 13 – Fotomicrografias da interface de união entre dentina (DE) e resina composta (RC) do grupo SB nos períodos de tempo imediato com aumento de 2000 x (A) e 5000 x (B) e após 6 meses de armazenamento com aumento de 2000 x (C) e 5000 x (D). AD = adesivo; CH = Camada Híbrida.....	77
Figura 14 – Fotomicrografias da interface de união entre dentina (DE) e resina composta (RC) do grupo CLX nos períodos de tempo imediato com aumento de 2000 x (A) e 5000 x (B) e após 6 meses de armazenamento com aumento de 2000 x (C) e 5000 x (D). AD = adesivo; CH = Camada Híbrida.....	78
Figura 15 – Fotomicrografias da interface de união entre dentina (DE) e resina composta (RC) do grupo CV nos períodos de tempo imediato com aumento de 2000 x (A) e 5000 x (B) e após 6 meses de armazenamento com aumento de 2000 x (C) e 5000 x (D). AD = adesivo; CH = Camada Híbrida.....	79
Figura 16 – Fotomicrografias da interface de união entre dentina (DE) e resina composta (RC) do grupo EGCG nos períodos de tempo imediato com aumento de 2000 x (A) e 5000 x (B) e após 6 meses de armazenamento com aumento de 2000 x (C) e 5000 x (D). AD = adesivo; CH = Camada Híbrida.....	80

## LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1 – Materiais utilizados no estudo, fabricantes, suas composições e lotes.....	60
Tabela 1 – Análise Descritiva dos dados de microtração (MPa) segundo as estratégias adesivas e o tempo de armazenamento.....	69
Tabela 2 – ANOVA dois fatores para estratégias adesivas e armazenamento dos grupos.....	72
Tabela 3 – Teste de Tukey para múltiplas comparações.....	74
Tabela 4 – Classificação do padrão de fratura para os 90 palitos em cada grupo.....	75



Fonseca BM. Influência *in vitro* da clorexidina e do chá verde na longevidade de união adesiva resina composta – dentina [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2012.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a interface adesiva de amostras de dentina bovina / adesivo e resina variando as estratégias adesivas e o tempo de armazenamento. Foram selecionados 80 incisivos bovinos, limpos e seccionados 2,0 mm além da junção amelocementária, desgaste da superfície vestibular do esmalte, com exposição de uma área plana de dentina, a qual foi submetida a diferentes protocolos adesivos. Aleatoriamente, as amostras foram divididas em 4 grupos (n= 20), submetidos às estratégias adesivas: **SB** – controle: sistema adesivo Adper Single Bond 2 aplicado segundo instruções do fabricante; **CLX** – clorexidina: aplicação de solução de digluconato de clorexidina 0,2% previamente a aplicação do sistema adesivo semelhante ao SB; **EGCG** – EGCG10: aplicação da solução em gel de EGCG 10µM – principal componente ativo do chá verde – por 30 s previamente a aplicação do sistema adesivo semelhante ao SB; e **CV** – solução aquosa de chá verde: aplicação do chá verde – preparado após infusão da erva acondicionada em sachê – previamente a aplicação do sistema adesivo semelhante ao SB. Em todos os grupos foi aplicada resina composta (RC) Amelogen Plus com o auxílio de matriz de silicone, com fotopolimerização por 20 s cada incremento. Posteriormente, os grupos foram redivididos em dois subgrupos (n= 10) de acordo com o tempo de armazenamento em água destilada por 24 h e 6 meses, a 37°C em estufa bacteriológica. Em seguida, todos os corpos-de-prova foram seccionados no sentido méso-distal e cérico-incisal em cortes paralelos de espessura aproximada de 0,8 mm<sup>2</sup> em cortadeira Labcut (Extec Technologies – EUA) com refrigeração em baixa velocidade. Desta forma, foram obtidos em média 9 palitos por dente, sendo cada um deles fixado com cola de cianoacrilato, no dispositivo para microtração e submetidos ao ensaio em máquina de teste universal (DL-1000, EMIC, São José dos Pinhais- PR- Brasil), com carga de 10 kgf e velocidade de 1,0 mm/min, sendo os dados expressos em MPa. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA dois fatores e teste de Tukey (p < 0,05). Resultados: os valores de média (±dp) em MPa foram os seguintes:(i) imediato (24 h) – SB 40,81(8,20); CLX 41,76(6,28); CV 37,38(7,98); EGCG 35,91(13,43). (ii) armazenamento (6

meses) – SB 30,05(5,13); CLX 36,04(9,76); CV 31,95(10,63); EGCG 35,75(12,43). Pôde-se concluir que o uso da CLX 0,2% apresentou altos valores de resistência de união imediata; CV e EGCG não influenciaram a resistência adesiva imediata; após 6 meses de armazenamento houve redução dos valores de união para os grupos SB, CLX e CV; o EGCG não apresentou redução da resistência adesiva.

Palavras-chave: Chá verde. Clorexidina. Metaloproteinases. Microtração.

Fonseca BM. *In vitro* influence of chlorhexidine and green tea on the longevity of resin-dentin bond strength [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was evaluate the adhesive interface of bovine dentin samples / adhesive and resin varying adhesive strategies and time of storage. Eighty bovine incisors were selected, cleaned and sectioned 2.0 mm beyond the cemento-enamel junction; the labial surface of the enamel was worn to obtain a flat area of exposed dentin. The dentin was subjected to different adhesives protocols. Samples were randomly divided into 4 groups ( $n = 20$ ), according to the adhesive strategies: **SB** - control: Adper Single Bond 2 (**SB**) system was applied according to manufacturer's instructions; **CHX** - chlorhexidine: application of 0.2% chlorhexidine gluconate solution prior to adhesive system similar to SB; **EGCG** - EGCG10: application 10  $\mu$ M EGCG gel - the main active component of green tea - for 30 s prior to application of the adhesive system similar to SB; and **GT** - aqueous green tea: application of green tea - prepared after infusion of the herb sachet - prior to application of the adhesive system similar to SB. The composite resin Amelogen Plus was applied in all groups with aid of silicone matrix, and lightcured for 20 s. Subsequently, groups were re-divided into two subgroups ( $n = 10$ ) in accordance with the time of storage in distilled water, for 24h or 6 months at 37°. Specimens were sectioned to obtain parallel cuts and beams of approximately 0.8 mm<sup>2</sup>. Cut procedure was performed in Labcut cutting machine (Extec Technologies - USA) at low speed with cooling. Nine beams per tooth were obtained. Each beam was attached with cyanoacrylate glue to a device prepared for submission to the microtensile test, using a universal testing machine (DL-1000, EMIC, Pinhais-PR-Brazil) with 10 kgf load and speed of 1.0 mm / min. Results were expressed in MPa. Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's test. Results: Mean (SD) values (in MPa) were as follow: 24h – SB 40.81(8.20); CHX 41.76(6.28); CV 37.38(7.98); EGCG 35.91(13.43) 6-month period – SB 30.05(5.13); CHX 36.04(9.76); CV 31.95(10.63); EGCG 35.75(12.43). Conclusion: 0.2% CHX was effective to reduce the degradation of resin dentin bonds immediate; GT and EGCG did not influence the values of resin dentin bonds immediate; after 6 months of

*water storage decreased values for groups SB, CHX and CV; EGCG showed no reduction in resistance adhesive.*

*Keywords: Green tea. Chlorhexidine. Adhesion. Metalloproteinase*

# 1 INTRODUÇÃO

O uso clínico das resinas compostas (RC) tem se intensificado nos últimos anos, devido a uma busca constante pela estética e, também, pelo desenvolvimento de novas formulações e simplificações das técnicas adesivas, com menor desgaste de estrutura dental sadia (Yap et al., 2004; Baseren, 2004).

Desde que Buonocore (1955) introduziu o condicionamento ácido ao esmalte, grandes avanços ocorreram em relação aos procedimentos restauradores. Com o desenvolvimento dos sistemas adesivos dentais mudaram-se drasticamente os fundamentos do preparo cavitário e restauração, tornando-os essenciais a odontologia restauradora. A busca por uma adesão eficiente culminou com o desenvolvimento da técnica de hibridização, baseada no condicionamento ácido total, proposto por Nakabayashi et al. (1982).

Essa técnica baseia-se na desmineralização simultânea da parte inorgânica do esmalte e da dentina após aplicação de um gel condicionante de ácido fosfórico, criando microporosidades no esmalte e expondo a rede de fibras colágenas da dentina, as quais são impregnadas por monômeros resinosos essencialmente hidrófilos associados a solventes, gerando uma união micromecânica, com formação de prolongamentos resinosos no esmalte (tags resinosos) e formação da camada híbrida na dentina (Nakabayashi et al., 1982; Pashley, 1991).

Apesar da adesão imediata dos sistemas adesivos contemporâneos parecer efetiva (Gaston et al., 2001), em longo prazo

os valores de adesão na dentina sofrem uma drástica redução (Hashimoto et al., 2003a; Armstrong et al., 2004; Garcia-Godoy et al., 2007). Isso se deve em parte as características hidrófilas dos monômeros resinosos, e a variável permeabilidade e alterações fisiológicas que ocorrem na dentina (Pashley, Carvalho, 1997).

Desta forma, deficiências estão propícias a ocorrer, como falhas na formação da camada híbrida, selamento não efetivo dos túbulos dentinários expostos; polimerização incompleta; permeabilidade de alguns sistemas adesivos simplificados; difusão dos monômeros resinosos, com provável citotoxicidade, em direção à polpa através dos túbulos dentinários (Sengun et al., 2002). Além do colapso das fibras colágenas devido à secagem excessiva após condicionamento ácido, impedindo a impregnação dos monômeros resinosos (Nakaoki et al., 2002; Susin et al., 2007).

Shono et al. (1999b) demonstraram que com o tempo a interface adesiva resina-dentina é passível de degradação, com significativa redução dos valores de resistência adesiva. De modo que, a longevidade de união da RC ao substrato dentinário tem sido cada vez mais questionada. Além dos problemas relacionados ao sistema adesivo, esta também é afetada pela difusão de água na interface dente-restauração, referente a longos períodos em ambientes aquosos, como o meio bucal (Visse, Nagase, 2003; Hashimoto et al., 2006; Susin et al., 2007).

A lise estrutural das fibras colágenas expostas por falhas na formação da camada híbrida vem sendo aceita como principal fator no processo de degradação da interface adesiva (Nakabayashi et al., 1982; Pashley, 1991). No entanto, estudos têm relatado que essa deterioração pode ser acelerada por enzimas endopeptidases, cálcio e zinco-dependentes, denominadas metaloproteinases de matriz (MMP(s)) (Hashimoto et al., 2003b;

Pashley et al., 2004; Hebling et al., 2005; Tezvergil-Mutluay et al., 2010).

Essas MMPs estão presentes na saliva, substrato dentinário e matriz extracelular de células humanas (Visse, Nagase, 2003; Ferracane, 2006; Hashimoto et al., 2006), apresentam atividade metabólica de degradação e remodelação de vários tipos de fibras colágenas (Bourd-Boittin et al., 2005). Dentre as MMPs identificadas na matriz orgânica dentinária estão: MMP-2 (gelatinase-A), MMP-8 (colagenase-2), MMP-9 (gelatinase-B), MMP-20 (enamelinase) (Tjäderhane et al., 1998; Martin de las-Heras et al., 2000; Bourd-Boittin et al., 2005; Sulkala et al., 2006; Nishitani et al., 2006; Mazzoni et al., 2007), e outras ainda não identificadas (Martin de las-Heras et al., 2000). Acredita-se que estas MMPs estão relacionadas ao processo de degradação da interface adesiva.

Dentre elas, as gelatinases e colagenases mostraram-se capazes de degradar a matriz orgânica dentinária após a desmineralização, mesmo na ausência de enzimas bacterianas (Pashley et al., 2004). Durante a mineralização da dentina estas enzimas encontram-se retidas na matriz extracelular em estado latente (Tjäderhane et al., 1998) e podem ser ativadas pelo processo de desmineralização, queda do pH e presença de íons metálicos, como cálcio e zinco, degradando, assim, o colágeno exposto (Tjäderhane et al., 1998; Pashley et al., 2004). A presença de MMP-2 e -9 ativas em dentina desmineralizada foi confirmada através de ensaios de zimografia e *western blotting* (Mazzoni et al., 2007) Desta forma, acredita-se que a participação das MMPs no processo de degradação da interface adesiva parece ser consistente (Pashley et al., 2004).

Como a atividade colagenolítica dessas enzimas tende a aumentar de forma gradual, sugerindo uma auto ativação ou a ocorrência de falha progressiva dos seus agentes teciduais inibidores

(Sulkala et al., 2006; Nishitani et al., 2006), uma forma de inibir a ação das MMPs seria por meio do emprego de agentes inibidores. Estudos mostraram que a aplicação de inibidores de MMPs reduziu a progressão de lesões de cáries em ratos (Sulkala et al., 2001) e a solubilização da camada híbrida (Carrilho et al., 2009).

Por este motivo, alternativas de modificação dos protocolos adesivos na superfície dentinária têm sido investigadas visando reduzir a degradação dos componentes resinosos e do colágeno exposto. Substâncias como digluconato de clorexidina (CLX) (Carrilho et al., 2009; Chang et al., 2010) e polifenóis do chá verde (Neri et al., 2011, Santiago et al., 2011) têm sido usadas como alternativas para melhorar a resistência de união entre a dentina e os sistemas adesivos.

O chá verde é rico em polifenóis, em especial a epigallocatequina-3-galato (EGCG), que apresenta interações hidrófobas com colagenases e gelatinases e ligação de hidrogênio, sendo capazes de modificar a estrutura secundária das MMPs (Demeule et al., 2000), tendo demonstrado capacidade em inibir a atividade dessas MMPs (Demuele et al., 2000; Garbisa et al., 2001; Sartor et al., 2002; Chaussain-Miller et al., 2006) através de testes de cultura de células (Demuele et al., 2000; Sartor et al., 2002).

Recentemente, estudos *in vitro* mostraram que o chá verde reduziu de forma considerável o desgaste dentinário sob desafios erosivos / abrasivos pela inibição das MMPs (Magalhães et al., 2009; Kato et al., 2010). No entanto, sua influência na resistência adesiva ainda necessita de comprovações científicas, o que nos motivou a realizar a pesquisa do chá verde assim como da CLX através da modificação do protocolo clínico de aplicação de um sistema adesivo convencional de dois passos, largamente empregado na Odontologia.



## 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. Para tanto, a revisão de literatura será subdividida em tópicos: 2.1 Chá Verde; 2.2 Clorexidina; 2.3 Testes de adesão por microtração.

### 2.1 Chá Verde

Desde a Antiguidade, as plantas vêm sendo utilizadas como forma de medicamentos, na prevenção, no tratamento e na cura de certos distúrbios, disfunções ou doenças em homens e até em animais.

O chá é originário do continente Asiático e a segunda bebida não alcoólica, precedida pela água, mais consumida no mundo, sendo uma das fontes mais ricas em flavonóides (Duffy et al., 2001).

Os chás são substâncias obtidas a partir das folhas de *Camelia sinensis* L. O Kuntze., uma planta da família Theaceae, são classificados em três categorias de acordo com o processo de fabricação: fermentado (oxidação das folhas por contato com o ar – preto), não-fermentado (folhas secas apenas por vapor de água – verde) e o semi-fermentado (folhas parcialmente fermentadas antes da sua secagem – oolong) (Tanaka e Kouno, 2003). O chá verde é o mais rico em compostos com atividades funcionais (Cheng, 2006), consumido

principalmente nos países Asiáticos, onde significa muito mais que uma simples bebida é considerado sinônimo de prosperidade, harmonia e beleza e seu consumo torna-se um ritual de grande importância social e cultural. Por isso, tem sido cada vez mais estudado devido aos seus benefícios relacionados à prevenção e combate a diversas doenças (Liao *et al.*, 2001).

Diversos estudos têm mostrado os efeitos terapêuticos do consumo do chá verde (Arab *et al.*, 2011), como: prevenção de doenças crônico-degenerativas, como o câncer e doenças cardiovasculares (Higdon, Frei, 2003), ação anti-inflamatória (Dona *et al.*, 2003), antimicrobiana (Hamilton-Miller, 1995; Stapleton *et al.*, 2004a e 2004b) e antiviral (Kawai *et al.*, 2003), e manutenção da saúde bucal (Liao *et al.*, 2001). É rico em minerais e vitamina K (Manfredini *et al.*, 2004) e auxilia na perda de peso. Sendo bem descrita, ainda, a capacidade dos polifenóis do chá verde em inibir as MMPs da matriz extracelular, com consequente efeito antienvhecimento (Vayalil *et al.*, 2004; Annabi *et al.*, 2002; Demeule *et al.*, 2000).

Durante a fabricação do chá verde, suas folhas e brotos recebem tratamento térmico para inativação das enzimas pelo método de secagem, imediatamente após a colheita, inativando, assim, as enzimas polifenol-oxidases, o que contribui para que seus polifenóis, que são os componentes naturais, sejam preservados. Com isso, a composição dos polifenóis no chá verde tende a ser semelhante ao das folhas frescas (Tanaka e Kuono, 2003).

Reporta-se que o chá verde contenha cerca de 4000 componentes bioativos, em que 1/3 é constituído de polifenóis (Tariq *et al.*, 2010), os quais estão relacionados às suas propriedades funcionais. Dentre eles, encontram-se as catequinas, teaflavinas e os flavonóides, sendo este último o mais abundante (Sumpio *et al.*, 2006), são potentes

antioxidantes, sequestradores de radicais livres, quelantes de metais (o que reduziria sua absorção) e inibidores de lipoperoxidação.

As principais catequinas presentes no chá são (-)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina galato (ECG), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), cuja principal propriedade terapêutica é a de antioxidante (Henning *et al*, 2004). O EGCG é a catequina mais ativa e em maior quantidade (Wang *et al*, 2000).

A quantidade de polifenóis encontrada aproximadamente numa infusão de chá verde é de 60 mg/g de folhas de chá, variando de 9 até 117 mg/g dependendo da procedência (Dalluge *et al.*, 1998). Estudos prévios demonstram que a forma de acondicionamento da erva, o modo de preparo, a proporção erva/quantidade de água utilizada, a temperatura e o tempo de infusão tem grande influência sobre a quantidade dos compostos fenólicos extraídos e sua ação antioxidante (Zhu *et al.*, 1997; Astill *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001).

Além das catequinas, quantidades apreciáveis de flavonóides como quercetina e miricetina e seus glicosídeos estão presentes no chá verde (Saito, Miyata, 2000, Wang *et al.*, 2000). Em sua composição também são encontrados elementos minerais essenciais para a saúde humana, como K e Mg (Ferrara *et al.*, 2001), Mn, Ca, Zn, Cr e Ni (Xie *et al.*, 1998), além de Se (Zhu *et al.*, 2006) e F (Shu *et al.*, 2003). Destacando-se o flúor que pode ter efeito sobre a remineralização óssea e a saúde bucal (Hamilton-Miller, 2001), sendo benéfico na prevenção da cárie dentária.

### **2.1.1 Uso do Chá Verde na Odontologia**

Demeule et al. (2000) avaliaram o efeito de diferentes componentes biológicos de vários produtos naturais – polifenóis do chá verde, resveratrol, genisteína e componentes organossulfatos do alho – na atividade das MMPs -2, -9 e -12. Análise de fluorescência da atividade das MMPs-2 e -9 e da elastase pancreática foi realizada para determinar a quantidade mínima de enzimas e substratos usados. A taxa de proteólises na presença ou ausência dos polifenóis do chá verde foi mensurada pelo aumento na fluorescência. Tumores de cérebros humanos foram homogeneizados em cinco volumes em meio composto por 250 mM sacarose e 10 mM Herpes-Tris com politron a 4°C para determinação das proteínas. MMP-12 foi parcialmente purificada em um meio contendo linhas de células de ratos e macrófagos em elastase pancreática de porco e o conjunto resultante incubado por 2 h a 4°C para remoção das gelatinases, determinando a atividade específica somente para elastina. Após, foi realizada zimografia para determinação da atividade das MMPs e dos tecidos de tumores cerebrais e de ratos. A ativação da proMMP-2 induzida pela concanavalina A (Con A - lectina da *Canavalia ensiformis* indutora da ativação da proMMP-2) também foi mensurada por zimografia de gelatina. Análises de fluorescência mostraram uma maior inibição das 3 enzimas pelos polifenóis do chá verde, em uma relação dose-dependente, sem afetar a atividade da elastase pancreática. Estes resultados foram confirmados pela zimografia. 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 pela Con A foi inibida em 35 µg/ml de polifenóis do chá verde foram adicionados ao meio, mas somente a EGCG isolada foi capaz de inibir a ativação da MMP-2 em presença da Con A. 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.

Hamilton-Miller (2001) fez um levantamento bibliográfico dos estudos realizados até então relacionado às propriedades anti-cariogênicas do chá verde e preto na última década. Vários componentes ativos do chá verde e preto, quando preparados por um processo de infusão das folhas secas da *Camellia sinensis* apresentaram propriedades *in vitro* que sugeriram uma atividade anti-cariogênica, como efeito bactericida sobre *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, prevenção da aderência bacteriana ao dente, inibição da glicosiltransferase, e inibição da amilase salivar e bacteriana. Estudos *in vitro* com modelos de animais confirmaram que estas propriedades dos chás podem ter um efeito significativo na redução da cárie, no entanto ainda são poucos os estudos clínicos que confirmam que o consumo regular de chá pode reduzir a incidência e a severidade da cárie na população. Esta revisão de literatura sugere, portanto, que a atividade anti-cariogênica dos componentes ativos dos chás verde e preto, na prevenção da aderência bacteriana ao dente, poderiam levar a uma intervenção na saúde pública de maneira efetiva e econômica.

Hirasawa et al. (2006) avaliaram a capacidade de inibição pelo EGCG de ácidos produzidos na placa dental e por *Streptococcus sp.*, e o pH da placa. Para isso, 15 voluntários tiveram placa coletada da superfície vestibular dos molares e mensuração do pH através de um pHmetro digital após bochecho com solução aquosa de 2 mg/ml de EGCG e após intervalo de 30 min, bochecho com sacarose 10%. Para análise da inibição da fermentação da sacarose pela EGCG, as bactérias foram cultivadas a 37° C por 20 h em infusão de cérebro e coração (BHI) ou em BHI associado a 5% de sacarose e pré-incubadas com 0,4 ml de EGCG (2 mg/ml) em solução tampão. Alíquotas de 25 µl foram coletadas em intervalos de tempo e o pH mensurado usando pHmetro. As placas foram cultivadas em anaerobiose a 37° C por 2 dias com posterior contagem das unidades formadoras de colônias. Para análise da ação do EGCG sobre a aderência bacteriana sobre a hidroxiapatita, culturas

bacterianas foram centrifugadas e previamente suspensas em 1 ml de saliva humana por 60 min, após, discos de hidroxiapatita sintética ficaram em contato com essa saliva por 60 min a 37° C, removidos e lavados 3 vezes em solução tampão. As bactérias aderidas a hidroxiapatita foram então incubadas com ou sem EGCG por 30 min a 37° C, diluídas e novamente incubadas em ágar salivar por 48 h, então realizado a contagem das unidades formadoras de colônia. O estudo mostrou que a maior inibição da produção de ácidos na placa ocorreu após 30 min de lavagem, comparado as lavagens após os intervalos de 2 e 120 min, e o pH mínimo após 30 min foi de 6,5 comparado ao controle (pH 4,8). A concentração de EGCG mais efetiva foi de 5 mg/ml. O EGCG inibiu a queda do pH em ambas as culturas de *S. mutans* incubadas com sacarose. No entanto, o número de *S. mutans* e *S. sobrinus* em culturas contendo sacarose não foi reduzido pelo tratamento com EGCG. Em relação aos *S. sp* aderidos a hidroxiapatita, o tratamento com EGCG não teve efeito significativo sobre eles (90,4% de células vivas). O estudo sugere que o EGCG é efetivo na redução da produção de ácidos na placa dental e pelos *S. mutans*.

Em um estudo realizado por Madhan et al. (2007) sobre os efeitos dos polifenóis do chá verde, como C e EGCG na ação das collagenases sobre o colágeno, o colágeno tratado pelas C e EGCG apresentou 56% e 95% de resistência, respectivamente, em relação as hidrólises collagenolíticas pelas collagenases. Enquanto interações diretas entre as C e EGCG e as collagenases apresentaram 70% e 88%, respectivamente, de inibição em relação à atividade collagenolítica das collagenases sobre o colágeno, sendo uma concentração dose-dependente. A mudança na estrutura secundária das collagenases foi significativa quando tratadas com altas concentrações de C e EGCG. Esta estabilidade das C e EGCG às fibras colágenas tratadas contra as collagenases poderia ter sido provocada pela ligação de ambos os sítios ativos do colágeno que são reconhecidos pelas collagenases. No entanto,

a maior inibição pelo EGCG comparado a C pode ser atribuída a capacidade de o EGCG apresentar melhor adesão com as ligações de hidrogênio e interações hidrófobas com as collagenases.

Um estudo realizado por Kushiya et al. (2009) sobre a relação entre a quantidade de chá verde ingerido e a presença de doença periodontal (DP) avaliou 940 japoneses homens entre 49 e 59 anos. Foram usados como parâmetros do estudo a profundidade a sondagem, perda de inserção clínica e sangramento a sondagem, mensurados com sonda periodontal nos sítios mésio e médio-vestibular de todos os dentes remanescentes. Examinou-se a relação existente entre o consumo do chá verde e os parâmetros periodontais. Em que o consumo do chá verde foi definido pelo número de copos consumidos por dia assinalado em um questionário autoadministrado. Os resultados obtidos mostraram que o consumo do chá foi inversamente proporcional em relação a todos os parâmetros estudados. Modelos de regressão linear multivariado mostraram que cada aumento do consumo em um copo por dia de chá verde estava associado a uma redução média de 0,023 mm na profundidade de sondagem, 0,028 mm na perda de inserção clínica e redução de 0,63% de sangramento a sondagem. O consumo foi correlacionado com a frequência de escovação e o número de dentes, não havendo variação estatística significativa na média do chá consumido. Entretanto, o consumo do chá foi inversamente proporcional a todos os parâmetros estudados, independentemente de outras variáveis, mostrando que quanto maior a frequência de chá verde consumido, melhores foram as condições periodontais. O estudo sugere que existe uma associação inversa entre o consumo do chá verde e a doença periodontal, podendo ajudar na manutenção da saúde periodontal.

Magalhães et al. (2009) avaliaram a ação indireta de potenciais inibidores de MMP na progressão da erosão, pela redução do colapso da matriz orgânica pelo desgaste dentinário, provocado pela erosão e erosão associada à abrasão. Amostras de dentina radicular

bovina foram preparadas (n= 192, 4 x 4 x 2 mm), aplicado esmalte para unhas em metade da superfície de cada amostra para manter a superfície de referência para determinação do desgaste. Cada 4 amostras foram fixadas em um dispositivo de acrílico palatal que foram usados por 12 voluntários. Os dispositivos eram usados por 12 h antes dos protocolos erosivo e erosivo / abrasivo para formação de biofilme. A posição das amostras em fileiras para cada protocolo foi randomizada para cada voluntário, e os dispositivos eram usados dia e noite, só sendo removidos durante as refeições e higiene oral. Para o procedimento erosivo extra oral, o dispositivo era imerso em 150 ml de Coca-Cola por 5 min, 4 vezes ao dia, com intervalo de 4 h entre cada imersão, por 5 dias. Para o procedimento abrasivo as amostras submetidas à abrasão eram escovadas por 15 s com escova elétrica e pasta sem flúor 2 vezes ao dia entre o primeiro e terceiro procedimento erosivo. Após reinserção, a boca era imediatamente bochechada por 60 s com soluções de 10 ml de 250 ppm F, 0,12% CLX, 0,61% solução do extrato do chá verde ou água deionizada. Após 5 dias, as amostras foram removidas dos dispositivos, removido o esmalte de unha e a perda de dentina foi mensurada por perfilômetro. Os resultados mostraram que todas as soluções reduziram o desgaste dentinário comparado ao controle, em ambas as condições, e que este foi significativamente maior quando se associou abrasão a erosão comparada a erosão somente. Isso sugere que, apesar da não mensuração direta do colágeno degradado pelas MMPs, poderia ser possível o uso dos inibidores de MMP testados como forma de minimizar o processo erosivo.

Um estudo de Kato et al. (2009) avaliou o efeito protetor do chá verde na erosão e erosão associada à abrasão na dentina. Cento e doze espécimes de dentina bovina (4 x 4 x 3 mm) foram preparados e metade da superfície de cada amostra foi impermeabilizada com esmalte para unhas. Dez voluntários usaram, cada um, um dispositivo acrílico palatal individual com 6 amostras de dentina bovina organizadas em três



fileiras de dois espécimes. Nas primeiras 12 h o dispositivo ficou na cavidade intraoral para formação de biofilme, desafios erosivo e abrasivo foram realizados 4 vezes ao dia por 5 dias fora da boca após as principais refeições. Os voluntários removiam os dispositivos da boca e os imergiam em 150 ml de Coca-Cola por 5 min enquanto preparavam o chá verde segundo o fabricante (2 g da erva para 180 ml de água por 1 min a 100°C). A concentração de EGCG no chá verde foi de 0,185 mg/ml (400 µM) conforme mensuração por cromatografia líquida por alta performance. Passado o tempo, os voluntários tomavam um gole de chá, reinseriam o dispositivo e bochechavam com 10 ml de solução de chá verde ou água (controle) por 1 min. Após, o dispositivo era removido e submetido ao procedimento abrasivo por 30 s com escova elétrica e pasta sem flúor e retornava a boca que era então bochechada com 10 ml de água por 5 s. Após 30 min o procedimento abrasivo era repetido. Os dispositivos permaneceram na boca por 24 h sendo removidos somente durante as refeições. Os espécimes foram então removidos e avaliados por perfilometria. A solução de chá verde foi capaz de reduzir o desgaste dentinário em todas as condições comparadas ao controle, e para ambos os tratamentos o desgaste foi maior quando associado erosão e abrasão, mas sem diferença entre os grupos que sofreram abrasão imediata, e imediata e após 30 min. O estudo mostrou que o chá verde foi capaz de reduzir o desgaste dentinário em condições erosiva / abrasiva.

Kato et al. (2010) avaliaram a presença de erosão dental *in situ* com o uso de géis contendo inibidores de MMP (EGCG e clorexidina). Avaliou-se a capacidade desses géis em prevenir a erosão dental. Cem blocos de dentina (4 x 4 x 3 mm) foram preparados de incisivos bovinos e metade da superfície de cada amostra impermeabilizada com duas camadas de esmalte para unhas. Dispositivos acrílicos individuais com 5 amostras cada foram confeccionados para 10 voluntários que os usaram por 12 h antes dos desafios erosivos, para formação de uma película salivar. Os blocos de

dentina foram tratados por 1 min com géis de EGCG de 10 $\mu$ M e 40 $\mu$ M, clorexidina 0,012%, fluoreto de sódio (NaF) 1,23% (controle positivo) e um gel placebo (controle negativo) e os desafios erosivos iniciados 6 h após os tratamentos, 4 vezes ao dia em tempos determinados (8, 12, 16 e 20 h) por 5 dias. Para o procedimento erosivo os dispositivos eram retirados da cavidade oral e imersos em 150 ml de Coca-Cola por 5 min. Após, os voluntários tomavam um gole da bebida e reinseriam o dispositivo. A perda de estrutura dentinária pela erosão foi mensurada por perfilometria em relação às superfícies não tratadas. A redução da erosão foi significativa para os grupos EGCG 10  $\mu$ M, EGCG 40  $\mu$ M e clorexidina, quando comparados ao NaF e ao placebo. Não foram possíveis de identificar em MEV uma interface clara entre as áreas controle e de erosão nos grupos tratados com inibidores de MMP. Esta interface era visível no grupo tratado com NaF 1,23%. A observação das superfícies erosionadas mostrou que os inibidores de MMP também podem ter um efeito físico pela oclusão dos túbulos dentinários. Os resultados sugerem que o uso dos géis contendo inibidores de MMP pode prevenir a erosão.

Um estudo de Xu et al. (2010) avaliou a capacidade de redução da halitose causada por componentes sulfúricos voláteis e supressão do *mgl* (gene codificado pela L-metionila- $\alpha$ -deamina- $\gamma$ -mercaptanilase) responsável pela produção de metilmercaptana (CH<sub>3</sub>SH) produzida por bactérias anaeróbias orais. A concentração mínima inibitória e mínima bactericida do EGCG contra *Porfiromonas gingivalis* foi determinada pelo método de microdiluição. A CH<sub>3</sub>SH foi produzida por reação química e mensurada por espectrofotometria. Para determinar se a redução na produção de CH<sub>3</sub>SH ocorreu na concentração inibitória mínima do EGCG devido a supressão do crescimento, a viabilidade da *P gingivalis* foi calculada após 20 h de crescimento na presença de EGCG, por centrifugação e o RNAm total foi isolado e purificado. A concentração mínima inibitória do EGCG foi 97,5  $\mu$ g/ml e a concentração bactericida mínima de 187,5  $\mu$ g/ml. A produção *in vitro* da CH<sub>3</sub>SH foi

significativamente inibida na presença de EGCG abaixo da concentração mínima inibitória. Uma concentração de 31,25 µg/ml de EGCG inibiu a expressão de *mgl* em 56% comparado com o controle. EGCG, portanto, pode representar um agente natural e alternativo no controle químico antimicrobiano da halitose.

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 peptideoglicano (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 conseqüentemente 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 as CH<sub>3</sub>SH, 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.

Suyama et al. (2011) estudaram a capacidade de remineralização do esmalte e aquisição de ácido-resistência por mascar chiclete sem açúcar contendo flúor derivado do chá verde. Para isso foi realizado um estudo duplo-cego, cruzado, com 45 voluntários que não estavam fazendo uso de medicação que afetasse a taxa de salivação. Prepararam-se dispositivos removíveis mandibulares com dois blocos de esmalte (3 x 4 x 2 mm) de primeiros pré-molares humanos, extraídos por motivos ortodônticos, após desenvolverem lesões sub-superficiais usando uma solução tampão desmineralizadora por 72 h a 37° C. Antes de serem presos no dispositivo um terço de cada espécime de esmalte foi coberto com esmalte para unhas. O chiclete testado continha 1,17 % de extrato de chá verde (25 µg fluoreto / parte), mas idêntico ao chiclete placebo em todos os outros aspectos. Os voluntários foram instruídos a mascar dois pedaços de chiclete ao mesmo tempo por 20 min, duas vezes ao dia, por 4 semanas. Os dispositivos eram inseridos somente na boca somente antes da mastigação e permaneciam por mais 20 min. Quando removidos, eram guardados em um recipiente plástico úmido em temperatura ambiente. Após o tratamento, os espécimes foram removidos do dispositivo, e outro um terço de cada superfície de esmalte coberta com esmalte para unhas preservando a área remineralizada e o terço restante sofreu nova desmineralização para o teste do desafio ácido. Os

espécimes foram, então, seccionados em torno de 200  $\mu\text{m}$ , e a microrradiografia realizada. Cada imagem de uma lesão foi digitalizada três vezes em locais diferentes com medidor de densidade. Amostras de saliva foram colhidas para medição de fluoreto antes (saliva não estimulada), 0,5, 1, 3, 5, 10, 15 e 20 min após a mastigação. Para medição do teor de flúor no esmalte remineralizado, 10 espécimes de esmalte com área de remineralização suficiente restante foram selecionados e realizada análise das camadas superficiais e sub-superficiais. Os resultados mostraram que a concentração de flúor salivar atingiu um pico máximo de  $3,93 \pm 1,28$  ppm para 0,5-1 min e se manteve acima de  $0,18 \pm 0,20$  ppm durante a mastigação em 20 min. A elevada concentração de flúor na saliva resultou em uma alta concentração de flúor ( $656 \pm 95$  ppm) nas regiões remineralizadas comparada ao placebo ( $159 \pm 20$  ppm). Após remineralização o valor de mineral alterado foi maior para o grupo com fluoreto, enquanto que após novo desafio ácido esse valor se manteve reduzido comparado ao placebo. Os autores concluíram que o chiclete contendo fluoreto produziu um nível de remineralização e resistência ácida maiores que o placebo, indicando que o consumo regular do chiclete contendo fluoreto derivado do chá verde pode ser útil para propiciar o fluoreto tópico necessário a prevenção da cárie dentária.

## 2.2 Clorexidina

A clorexidina (CLX) é uma biguanida com propriedades catiônicas. Sua nomenclatura química é digluconato de clorexidina. Ela foi introduzida no mercado como antisséptico de largo espectro contra bactérias gram-positivas e negativas (Davies et al., 1954) além de ser um agente antibacteriano com propriedades inibidoras de MMPs (Gendron et

al., 1999). Devido as suas propriedades, vários estudos foram realizados utilizando a CLX como um pré-tratamento previamente a aplicação do sistema adesivo como forma de inibir as MMPs, e, conseqüentemente, manter a estabilidade da interface adesiva entre resina-dentina por um maior período de tempo.

Dessa forma, Gendron et al. (1999) avaliaram a capacidade de inibição das MMPs-2, -8 e -9 pela CLX. Foram usadas 1,5 U/ml MMP-2 em 50 mM NaCl –20mM Tris-HCl, e 20 µg/ml de MMP-9 em 5 mM Tris-HCl contendo 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, Brij 35 e glicerol 10%. Ambas gelatinases foram ativadas após incubação por 30 min a 37°C em 0,5 mM de *p*-aminofenil mercúrio acetato (APMA). As MMPs-2 (3 µl) e 9 (5 µl) ativadas foram incubadas com 10 µl de CLX e 5 µl de 50 mM Tris-HCl por 30 min em temperatura ambiente. As concentrações finais de CLX preparadas em água destilada testadas foram 0,03%, 0,015%, 0,008%, 0,004%, 0,002% e 0,0001%. EDTA 10 mM foi usado como controle na inibição da atividade das MMPs-2 e -9. Após a incubação, as amostras foram aquecidas por 30 min a 60°C na presença de solução tampão de eletroforese e as proteínas coradas. O efeito inibitório da CLX foi testado na presença de 0,75 mM CaCl<sub>2</sub>, misturado ao ensaio. A atividade da MMP-8 foi tratada ou não com 0,005; 0,01 ou 0,02% de CLX e incubada com 1,5 µM de colágeno tipo I a 3 mg/ml em 50 mM Tris-HCl –0,2 M NaCl –0,5 mM CaCl<sub>2</sub> por 12 h a 22°C. Produtos da clivagem do colágeno foram analisados por eletroforese e corados. Sendo avaliado na ausência ou presença de 1 mM APMA, ativador da MMP-8 latente. A concentração de CLX a 0,03% inibiu completamente a atividade das MMPs 2 e 9, sendo seu efeito inibidor dose-dependente. A concentração mínima capaz de inibir a atividade da MMP-9 foi 0,002%, a MMP-2 foi mais sensível sendo inibida por uma concentração de 0,0001%. A atividade da MMP-8 sem APMA foi completamente inibida pela CLX 0,02% e 0,01%, no entanto na presença de APMA somente uma parte foi inibida nas mesmas concentrações. Isto sugere que o uso da CLX como inibidor da atividade

das MMPs pode apresentar um efeito valioso na inibição direta das MMPs.

Hebling et al. (2005) avaliaram a degradação da interface adesiva usando um sistema adesivo convencional associado ou não a CLX após o condicionamento com ácido fosfórico. Para isso, 28 crianças com idade entre 8 – 12 anos com pares de molares decíduos contralaterais cariados sem cavitação que necessitavam de preparos de classe I com margem cavo-superficial em esmalte foram selecionadas. No entanto, somente 11 foram selecionadas pela expectativa destes dentes permanecerem na cavidade oral por 6 meses antes de serem extraídos. oito das 11 crianças tiveram pelo menos um dos dois dentes restaurados esfoliados naturalmente antes de 6 meses, sendo excluídas do estudo, permanecendo apenas 3 com ambas restaurações íntegras, assintomáticas, sem fratura ou cárie na reavaliação após 6 meses. Os controles receberam condicionamento com ácido fosfórico por 15 s, aplicação de sistema adesivo Single Bond de acordo com o fabricante e restauração com RC. Os dentes experimentais foram submetidos ao protocolo similar com aplicação de CLX 2% previamente ao sistema adesivo. Após 6 meses os dentes foram extraídos, e seccionados em 4 partes de 1,0 mm. Dois espécimes de cada dente foram selecionados aleatoriamente e imersos em solução de nitrato de prata a 50% por 24 h de acordo com o protocolo para microinfiltração e avaliados em microscópio eletrônico de transmissão sem desmineralização para análise. Os outros 2 espécimes de cada grupo foram completamente desmineralizados e todas as bases das interfaces adesivas avaliadas. Houve uma maior extensão dos depósitos de nitrato de prata nos espécimes dos controles não desmineralizados. Os grupos em que foram aplicados CLX e desmineralizados para análise, apresentaram uma camada híbrida normal com a rede de fibras colágenas íntegra, enquanto o controle desmineralizado apresentou evidências de degradação no interior da camada híbrida e destruição progressiva da rede de fibras

colágenas, mostrando que a auto-degradação da matriz colágena dentinária infiltrada por resina, *in vivo*, pode ser retardada com o uso da CLX.

Carrilho et al. (2007a) estudaram a capacidade de manutenção da interface adesiva resina-dentina com o uso de CLX 2%. Terceiros molares recém-extraídos receberam preparos de classe I que foram seccionados ao meio para realização dos protocolos adesivos. Todos os preparos foram condicionados com gel de ácido fosfórico a 35% por 15 s, lavados por 30 s e vigorosamente secos com jato de ar. O grupo controle (n= 7) foi reidratado com 1,5 µL de água destilada e o grupo experimental (n= 7) com 1,5 µL de solução de digluconato de CLX 2%. Após 60 s, foi removido o excesso da solução, em ambos os grupos, com papel absorvente. Aplicação de duas camadas consecutivas do sistema adesivo Single Bond, e restaurados com 5 ou 6 incrementos de RC Z-250. Os espécimes foram armazenados em água destilada a 37° C por uma semana, e então seccionados serialmente abaixo da interface adesiva obtendo 8 a 10 palitos de cerca de 0,9 mm<sup>2</sup> por espécime. Um terço desses palitos foi testado imediatamente, enquanto o restante foi dividido aleatoriamente e armazenados por 6 meses em saliva artificial (pH 7,1) contendo ou não enzimas inibidoras de proteases, com trocas semanais para manutenção da atividade inibitória. Após, cada corpo-de-prova foi fixado individualmente em um dispositivo com cianoacrilato e realizado o ensaio de microtração, até sua fratura. Todos os espécimes fraturados foram armazenados por 24 h em temperatura ambiente em um dissecador para remoção completa da umidade e sofreram processo de *sputter* com ouro-paládio para observação de ambas as superfícies de cada fratura por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As fraturas foram classificadas em: coesiva em RC, coesiva na camada adesiva, na superfície da camada híbrida, na base da camada híbrida e coesiva em dentina. Os resultados mostraram que o pré-tratamento com CLX não afetou a resistência adesiva *in vitro* dos espécimes testados



imediatamente após ( $p > 0,05$ ). Entretanto após 6 meses de armazenamento houve uma redução da resistência adesiva em ambos os grupos armazenados em saliva artificial sem a presença de inibidores de proteases (controle 45,3% e CLX 23,4%), sendo a resistência adesiva residual significativamente maior no grupo CLX ( $p < 0,05$ ). Armazenamento com inibidores de proteases não influenciaram na resistência adesiva quando comparado com o armazenamento sem ( $p > 0,05$ ). A avaliação do efeito dos tratamentos no modo de fratura em 24 h e 6 meses mostrou que 93,5% das fraturas foram mistas com padrão de fratura similar em ambos grupos no teste imediato. Após 6 meses houve um aumento da porcentagem de fraturas na superfície da camada híbrida no grupo controle, enquanto no grupo CLX esse tipo de fratura foi menos prevalente independente do tipo de armazenamento comparado com o imediato ( $p > 0,05$ ). O padrão de fratura mais prevalente no grupo controle independente do tempo e solução de armazenagem ocorreu dentro da camada híbrida na superfície ou base. Em contrapartida, no grupo CLX após 6 meses, as fraturas deixaram de ser na camada híbrida e passaram a ser predominantemente adesivas em RC ( $p < 0,05$ ). Os autores concluíram que em estudos *in vitro* a CLX poderia ser usada para a preservação da interface adesiva dentinária.

Carrilho et al. (2007b) também avaliaram a prevenção ou desaceleração da degradação da interface adesiva resina-dentina pela aplicação de CLX. Doze indivíduos com terceiros molares contralaterais hígidos parcialmente em oclusão e indicação para extração foram selecionados e receberam preparos de Classe I (3 x 3 x 4 mm) com cavo-superficial em esmalte. As cavidades controles foram condicionadas com ácido fosfórico 35% por 15 s, aplicação de Single Bond de acordo com o fabricante e restaurados com RC. As cavidades contralaterais receberam tratamento semelhante com aplicação de CLX 2% após o condicionamento ácido por 60 s e remoção do excesso. Três pares de dentes foram extraídos imediatamente após e os outros 9 pares

periodicamente monitorados por 14 meses. Os dentes foram seccionados com obtenção de 4 a 5 palitos cada, e estes submetidos ao teste de microtração e as fraturas avaliadas em MEV. O tipo de tratamento, o tempo de extração e a interação entre eles afetaram a adesão dentinária (controle imediato:  $29,3 \pm 9,2$  MPa; após 14 meses:  $19,0 \pm 5,2$ ; CLX imediato:  $32,7 \pm 7,6$ ; após 14 meses:  $32,2 \pm 7,2$ ). O uso da CLX não afetou a resistência adesiva imediata e manteve sua estabilidade por 14 meses. As fraturas mais observadas após 14 meses em função intraoral no controle foram coesivas na camada híbrida. Os grupos controle e CLX imediato e após 14 meses apresentaram camada híbrida intacta enquanto o controle após 14 meses degradação da camada híbrida com zonas progressivas de desintegração do colágeno. Os autores concluíram que se pode prevenir a auto-degradação da matriz colágena com aplicação de um inibidor de protease sintético como a CLX.

Um estudo sobre o efeito da CLX a 0,2% e 2% usado como um primer terapêutico na adesão de sistemas adesivos convencionais foi realizado por Breschi et al. (2009). Cento e oito terceiros molares hígidos tiveram o esmalte e dentina superficial oclusal removida com disco diamantado e padronização da smear layer com lixa d'água 180. Condicionamento da dentina com ácido fosfórico por 15 s, lavagem e secagem com leve jato de ar por 2s. Os espécimes foram randomizados em 6 grupos (n= 18) de acordo com o tratamento de superfície: CLX 0,2% aplicado antes do sistema adesivo Adper Scotchbond 1XT (SB1), CLX 2% aplicado antes do sistema adesivo SB1, aplicação do sistema adesivo sem pré-tratamento (controle), CLX 0,2% aplicado antes do sistema adesivo XP-Bond (XPB), CLX 2% aplicado antes do sistema adesivo XPB e aplicação do XPB sem tratamento prévio (controle). A CLX foi aplicada na superfície condicionada por 30 s e levemente seca. Aplicação dos sistemas adesivos segundo os fabricantes e restauração com RC. Secção dos espécimes para obtenção de palitos de  $0,9 \text{ mm}^2$  que foram aleatoriamente divididos em 3 grupos de armazenamento (por 24 h, 6

meses e 12 meses em saliva artificial a 37° C). Após cada período foi realizado teste de microtração. SB1 e XPB apresentaram valores imediatos de união semelhantes com ou sem pré-tratamento com CLX. Após 6 meses os controles sem CLX apresentaram redução da resistência adesiva. Após 12 meses os controles tiveram redução da resistência adesiva em 54% (SB1) e 65% (XPB), enquanto os grupos tratados com CLX reduziram em 21% e 32%, respectivamente. As concentrações de CLX não apresentaram diferença estatística em relação ao tempo de armazenagem ou sistema adesivo usado ( $p > 0,05$ ). Doze espécimes adicionais foram preparados para análise de nanoinfiltração, o qual mostrou que após 6 e 12 meses houve um aumento da nanoinfiltração nos grupos controles, os grupos tratados com CLX apresentaram pouca nanoinfiltração independente da concentração e sistema adesivo. Com isso, acredita-se que fatores endógenos responsáveis pela degradação da interface adesiva podem ser inibidos pela CLX.

Loguercio et al. (2009) avaliaram o efeito de diferentes concentrações e tempo de aplicação da CLX na preservação da interface adesiva resina-dentina usando os sistemas adesivos convencionais Adper Single Bond e Prime & Bond. Cento e vinte terceiros molares hígidos tiveram a dentina oclusal planificada, e para a primeira etapa 60 espécimes foram condicionados com ácido fosfórico 15 s, lavados por 15 s, secos e reidratados com água (controle) ou CLX a 0,002%, 0,02%, 0,2%, 2% e 4% por 60 s, aplicação dos sistemas adesivos de acordo com fabricante e restauração com RC. Após essa etapa foram selecionadas duas concentrações de CLX extremas que tiveram efeitos benéficos na preservação da interface adesiva após 6 meses. Na segunda etapa, 60 dentes foram divididos em 12 grupos ( $n= 5$ ), e após o condicionamento ácido, foram reidratados com água (controle), 0,002% e 2% de CLX por 15 s e 60 s, aplicação do sistema adesivo segundo o fabricante e restauração com RC. Os espécimes foram seccionados em palitos e

divididos aleatoriamente para o teste de microtração. Metade dos espécimes foram testados imediatamente após e a outra metade após 6 meses de armazenamento em água destilada 37°C, quanto ao tipo de fratura. Na primeira etapa, o grupo controle teve sua resistência adesiva reduzida após reidratação com água. Na segunda etapa, houve uma redução significativa na resistência adesiva em ambos os sistemas adesivos quando reidratados com água, independente do tempo de aplicação. No entanto, a reidratação com CLX em diferentes concentrações e tempo de armazenamento após 6 meses manteve a interface adesiva estável. A estabilidade adesiva pode ser mantida por um período de 6 meses em todas as condições de CLX testadas, independente da concentração e tempo de aplicação. O uso da CLX 0,002% por 15 s pode ser suficiente para preservar a interface adesiva dentinária por 6 meses.

Chang e Shin (2010) avaliaram a influência da CLX com diferentes métodos de aplicação na interface adesiva dentinária de cavidades Classe I. Cinquenta molares hígidos tiveram a superfície oclusal planificada para exposição da dentina para que toda a margem da restauração ficasse em dentina. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n= 10). Grupo 1: desinfecção da cavidade com CLX 2% por 20 s, lavagem com água por 20 s e condicionamento com ácido fosfórico 37% por 10 s, lavadas por 10 s, levemente seca por 10 s, aplicação do sistema adesivo Singe Bond 2 segundo o fabricante e restauração com RC; grupo 2: semelhante ao grupo 1, mas a CLX foi seca com jato de ar sem lavar; grupo 3: CLX 2% aplicado após o condicionamento ácido, por 20 s, e lavado por 20 s; grupo 4: CLX 2% aplicado semelhante ao grupo 3, mas seca com jato de ar sem lavar; grupo 5: grupo controle, sem uso de CLX. Metade dos espécimes de cada grupo foi armazenado em água por 24 h e a outra metade submetida a 10.000 ciclos de termociclagem. Os espécimes foram seccionados para obtenção de palitos para o teste de microtração, que mostraram que o

pré-tratamento com CLX não afetou a força adesiva *in vitro*, no entanto a termociclagem reduziu significativamente a força adesiva no grupo controle ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença quanto ao tratamento entre os grupos que aplicaram CLX após o condicionamento ácido (grupo 3= 0,074 e grupo 4= 0,055). Considerando a redução da resistência adesiva após termociclagem, o estudo mostrou que a CLX pode prolongar a adesão dentinária.

Um trabalho realizado por Breschi et al. (2010) avaliou o papel das MMPs dentinárias na auto-degradação das fibras colágenas na interface adesiva com ou sem pré-tratamento com CLX. Para isso, 10 molares hígidos foram selecionados, removidos o esmalte, raízes e remanescente pulpar, e a dentina pulverizada em nitrogênio líquido para obtenção do pó de dentina, obtendo-se 5 alíquotas com 1 g cada de dentina em pó que foram divididas em grupo 1: pó de dentina mineralizada sem tratamento; grupo 2: desmineralização por 10 min em 1% de ácido fosfórico; grupo 3: pó de dentina mineralizada tratada com 3 ml de Adper Scotchbond 1XT (SB1XT) por 24 h a 4<sup>o</sup> C; grupos 4 e 5: pó de dentina mineralizada tratada previamente com 0,2% e 2% de CLX (respectivamente), por 30 min a 4<sup>o</sup>C, lavada com 1 ml de água destilada e aplicação do sistema adesivo semelhante ao grupo 3. Após, os espécimes sofreram um processo de centrifugação e precipitação para extração das proteínas mineralizadas e parcialmente desmineralizadas do pó de dentina e a concentração dessas proteínas foi determinada. Elas sofreram eletroforese, com ativação por APMA e incubadas em solução tampão para zimografia. O controle foi incubado em EDTA e um inibidor de gelatinases. Adicionalmente 48 molares foram seccionados para exposição da dentina oclusal que foi condicionada com ácido fosfórico 35% e divididos em três grupos: 1) e 2) pré-tratamento após o condicionamento com CLX 0,2% e 2% respectivamente, por 30 s, secagem e aplicação do SB1XT e RC; 3) controle. Os espécimes foram subdivididos e submetidos ao teste de microtração imediato e após 2

anos armazenados em saliva artificial. A análise zimográfica não mostrou atividade de proteínas na dentina mineralizada, o grupo desmineralizado com ácido fosfórico apresentou formas ativas de MMP-2 e -9, assim como no grupo tratado com SB1XT. No entanto os grupos tratados com CLX 0,2% e 2% apresentaram completa inibição das MMP-s -2 e -9. Quanto a microtração, só houve diferença após 2 anos de armazenagem, com redução em 67% da estabilidade adesiva no controle, 16% com CLX 0,2% ( $32,6 \pm 8,3$  MPa) e 30% com CLX 2% ( $28,5 \pm 7,2$  MPa), demonstrando a eficácia de inibição das MMPs pela CLX em baixa concentração (0,2%).

Um estudo realizado por Osório et al. (2011), avaliou a capacidade de prevenção da degradação do colágeno pela CLX após desmineralização dentinária com ácido fosfórico, EDTA e monômeros ácidos (Clearfil SE Bond e Xeno V). Para isso, 10 terceiros molares hígidos foram seccionados obtendo discos de dentina que foram repartidos em 4 fatias e as 40 fatias obtidas divididas em 5 grupos: dentina mineralizada; dentina desmineralizada pelo ácido fosfórico por 12 h; desmineralização com EDTA 0,5 M por 6 dias; imersão da dentina mineralizada em Clearfil SE Bond por 12 h; e imersão da dentina mineralizada em Xeno V por 12 h. Após remoção dos espécimes dos adesivos auto-condicionantes realizou-se fotopolimerização por 40 s. Todos os espécimes foram então lavados com água deionizada por 72 h a 4°C e secos com sulfato de cálcio por 8 h. A massa seca de cada espécime foi mensurada e os espécimes reidratados e armazenados por 24 h, 1 ou 3 semanas em tubos eppendorf e incubados em saliva artificial com e sem CLX, com MMP-2 ativa em metade dos espécimes de cada grupo. Em cada tempo específico os meios eram agitados e os sobrenadantes removidos e determinada a concentração do produto da degradação do colágeno tipo I (teloepitédeo c-terminal - ICTP). A degradação do colágeno foi maior nos grupos desmineralizados pelo ácido fosfórico e EDTA ( $p < 0,001$ ). O total de ICTP liberado após

armazenamento da dentina desmineralizada pelo ácido fosfórico em saliva artificial aumentou de 70,01 µg/ml em 24 h para 178,23 µg/ml após 3 semanas, correspondendo a uma degradação do colágeno de 31% e 79%, respectivamente. Com adição de MMP-2, os valores de ICTP aumentaram de 210,12 µg/ml para 225,44 µg/ml após 3 semanas, correspondendo a uma degradação de 93% e 100% do colágeno, respectivamente. O uso da CLX reduziu significativamente a degradação na dentina desmineralizada com ácido fosfórico (ausência 19% e presença 26% de MMP-2). Para os sistemas adesivos usados, a presença de CLX reduziu a degradação do colágeno na presença ou ausência de MMP-2 em solução de saliva em 24 h mantendo-a estável em 3 semanas, mostrando que a inibição parcial da atividade das MMPs pela CLX em adesivos auto-condicionantes é mais prolongada que o tratamento somente com ácido fosfórico e EDTA.

Outro estudo realizado por Stanislawczuk et al. (2011) avaliou o efeito do gel de ácido fosfórico contendo CLX 2% e da solução aquosa de CLX 2% na adesão dentinária imediata e após 2 anos, de dois sistemas adesivos convencionais simplificados. Quarenta e dois terceiros molares tiveram a superfície dentinária exposta. Nos grupos controle as superfícies foram condicionadas com ácido fosfórico sem CLX, lavadas, secas e reidratadas com água, e aplicação dos sistemas adesivos Single Bond 2 (SB) e Prime&Bond (PB). Nos grupos condicionados com ácido fosfórico com CLX, os adesivos foram aplicados semelhantes aos controles. Nos grupos CLX, a reidratação após condicionamento ácido foi feita com CLX 2% por 60 s, e os adesivos aplicados segundo os grupos controles. Todos os espécimes foram restaurados com RC. Após os tempos de armazenagem em água destilada os espécimes foram submetidos ao teste de microtração e os modos de fratura avaliados em coesiva, adesiva ou mista. Após 2 anos, houve uma redução significativa nos valores de união adesiva nos grupos controles ( $p < 0,05$ ), enquanto tanto nos grupos condicionados com ácido fosfórico com CLX 2% quanto

nos reidratados com CLX 2% a interface adesiva permaneceu estável, sendo a adição de CLX uma forma de aumentar a longevidade da estabilização das fibras colágenas da camada híbrida sem a necessidade de passos adicionais no protocolo adesivo.

Lafuente (2012) avaliou o efeito da camada híbrida formada usando adesivos convencionais e auto-condicionantes em dentes humanos com ou sem aplicação de CLX 2% após armazenagem em água. Para isso 6 molares e 6 pré-molares receberam preparo cavitário do tipo MO e OD com 1,0 mm de parede de esmalte separando-as. Os grupos experimentais foram: adesivo; adper Single Bond 2 (SB2): as cavidades mesiais foram condicionadas com ácido fosfórico 37%, aplicação do sistema adesivo e restauração com RC, nas cavidades distais foi aplicado CLX 2% por 30 s após condicionamento ácido e remoção do excesso antes de aplicação do adesivo; adesivo Adper SE Plus (SEP): nas cavidades mesiais foi aplicado o sistema adesivo auto-condicionante e restauração com RC, nas cavidades distais a CLX 2% foi aplicada previamente ao sistema adesivo. Todos os espécimes foram seccionados mesio-distalmente e armazenados em água por 125 dias a 37°C. Após, os espécimes foram preparados para análise da interface adesiva em MEV em duas variáveis: imagem clara da camada híbrida em pelo menos 75% da extensão da interface adesiva e presença de tags resinosos nos túbulos dentinários. Os espécimes tratados com CLX apresentaram uma camada híbrida mais espessa na interface adesiva. SB2 apresentou uma camada híbrida mais uniforme que SEP. Ambos os sistemas adesivos não tratados com CLX apresentaram uma camada híbrida indefinida ao longo da interface em metade dos espécimes. Três espécimes do SB2 não tratados com CLX não apresentavam tags resinosos ou estes eram muito pequenos, o que não ocorreu com os espécimes tratados com CLX. Os autores concluíram que o uso da CLX 2% antes da aplicação do sistema adesivo reduziu a deterioração da



camada híbrida quando exposta a água, mas sem efeito na formação da interface adesiva ou dos tags resinosos nos túbulos dentinários.

### **2.3 Teste de adesão por microtração**

Uma nova metodologia para avaliação da adesão dentinária foi descrita por Sano et al. (1994a). 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 1,0mm / 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 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 confeccionados nas interfaces adesivas, com área entre 0,5 x 0,5 e 3,0 x 3,0mm. 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 diminuir o número de dentes usados.

Schreiner et al. (1998) compararam a adesão de 5 sistemas adesivos diferentes 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. (2005) 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  $1,0 \text{ mm}^2$ . 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. Single Bond 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  $37^\circ \text{ C}$  por 24 h, foram seccionados verticalmente em palitos de aproximadamente  $1 \text{ mm}^2$ , em que foram selecionados 3 palitos de cada dente com margens regulares e formato uniforme mensurando em e 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 foram selecionados de cada dente, desgastados na região da interface com broca diamantada de 1,15 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 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.

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* por meio do teste de microtração, em dentes bovinos, a resistência adesiva da interface de união resina-dentina imediata (24 h) e longitudinal (após 6 meses), incluindo ao protocolo preconizado pelo fabricante o uso de digluconato de clorexidina 0,2%, solução aquosa de chá verde e gel de epigallocatequina-3-galato (EGCG), seu principal componente ativo – EGCG 10 $\mu$ M – previamente a aplicação do sistema adesivo Adper Single Bond 2.

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

Este projeto de pesquisa foi submetido à aprovação do comitê de ética em pesquisa em animais da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, sob parecer de nº 02/2012/CEPa.

### **4.1. Delineamento Experimental**

#### **4.1.1. Unidades Experimentais**

80 incisivos bovinos

#### **4.1.2. Fatores em estudo**

Sistema adesivo em 1 nível (Adper Single Bond 2)

Técnicas de união úmida em 4 níveis (Controle, Clorexidina 0,2%, Solução aquosa de Chá Verde e solução em gel de EGCG 10 $\mu$ M)

Envelhecimento em 2 níveis (sem envelhecimento – imediato 24h; com envelhecimento – armazenamento por 6 meses em água destilada)

#### 4.1.3. Variável de Resposta

Resistência de União Adesiva (n= 10)

### 4.2 Adequação e preparo dos dentes

Foram utilizados 80 incisivos bovinos recém-extraídos e limpos (Figura 1A), obtidos de descarte de matadouro, estocados em solução fisiológica de timol 0,1% em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  (Titley, 1998), sua utilização não ultrapassou 28 dias (Tonami et al., 1996). As raízes foram removidas através de uma secção perpendicular ao longo eixo, 2,0 mm além da junção amelocementária, com disco diamantado (Dremel, Breda, Holanda) montado em mandril (Figura 1B) em torno de alta rotação (Nevoni, São Paulo, SP, Brasil). Somente as coroas foram utilizadas (Figura 1C).

Realizou-se uma abertura coronária na face lingual, na região do cíngulo, de cada incisivo (Figura 1D), através do emprego de uma ponta diamantada esférica 1016HL (KG Sorensen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), permitindo a mensuração e a padronização da espessura de dentina. Posteriormente foi realizado desgaste da superfície vestibular do esmalte, empregando 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 1E), criando uma superfície plana de dentina com exposição de uma área de aproximadamente  $8,0\text{ mm}^2$  (Figura 1F).



Devido à variação do diâmetro, padrões de densidade, e orientação dos túbulos dentinários em relação à profundidade da dentina, sua espessura remanescente foi padronizada em aproximadamente 2,0 mm, mensurada com um espessímetro (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) pela introdução de uma das pontas através do acesso na face lingual previamente realizado e a outra posicionada sobre a superfície dentinária (Figura 1G).

Após a padronização das superfícies dentinárias, e remoção da polpa com o auxílio de curetas e limas endodônticas através do orifício radicular criado, complementou-se a limpeza da câmara pulpar com lavagem e secagem com jatos de água/ar da seringa tríplice.

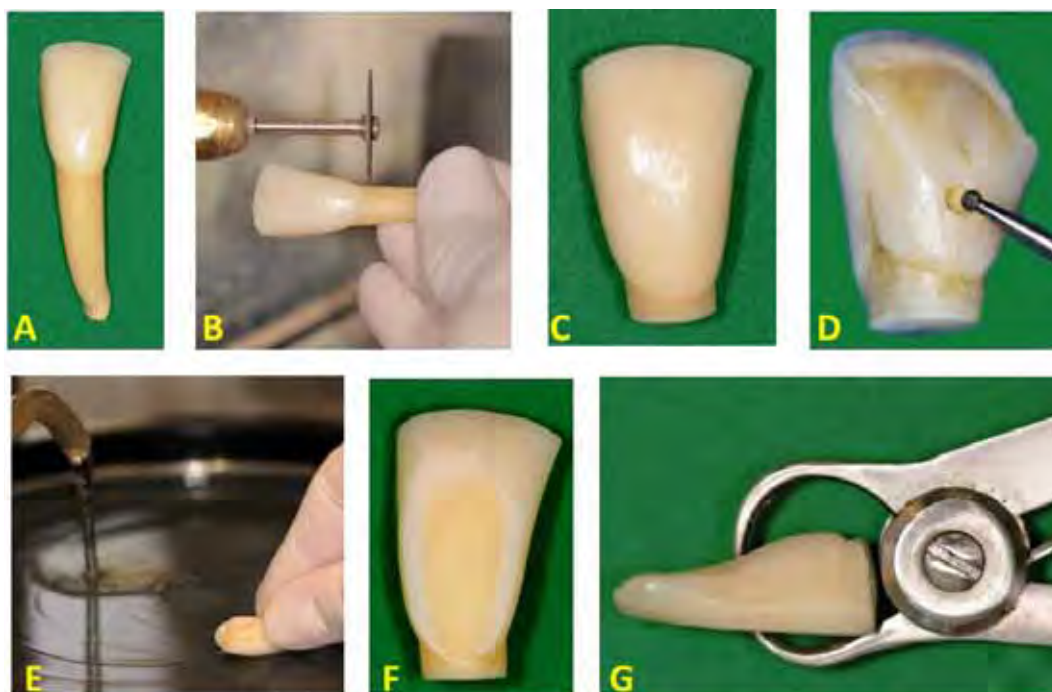


Figura 1 – Preparo dos espécimes: A) Dente bovino; B) Secção 2,0 mm além da junção amelocementária com disco de aço diamantado; C) Coroa bovina após secção da raiz; D) Abertura coronária na região do cíngulo para mensuração e padronização dentinária; E) Desgaste da superfície de esmalte para exposição de uma área plana de dentina; F) Superfície vestibular com área de dentina exposta; G) Mensuração do remanescente de dentina com espessímetro.

Após, foi inserida cera utilidade (Technew, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) na câmara pulpar e no orifício criado na superfície lingual, com a finalidade de impedir a penetração da resina acrílica aplicada para embutir as superfícies coronárias.

Em seguida, todos os espécimes foram posicionados em um molde 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 2A), para permitir um melhor paralelismo entre a superfície e a base do embutimento.

A superfície vestibular desgastada foi posicionada sobre a base da matriz de silicone (Figura 2B), e esta totalmente preenchida com resina acrílica quimicamente ativada incolor (Jet, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil) quando na sua fase pegajosa (Figura 2C). Sobre a resina acrílica foi colocada uma lâmina de vidro para microscopia a fim de se obter uma superfície plana, paralela à base, até o término da reação de polimerização. Após essa etapa, o conjunto foi imerso em água, para evitar elevação térmica da temperatura da resina devido à reação exotérmica, e dessa forma evitar alterações no substrato dental.

Concluída a polimerização (Figura 2D), os espécimes foram retirados do molde (Figura 2E). A parte superior do bloco, onde se encontra a superfície vestibular 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 e a parte inferior, só em resina, foi polida por

3 minutos com a lixa P400 (Fepa-P, Panambra, São Paulo, SP, Brasil), sob uma carga de 440 gramas, para planificação e padronização da textura de superfície (Figura 2F).

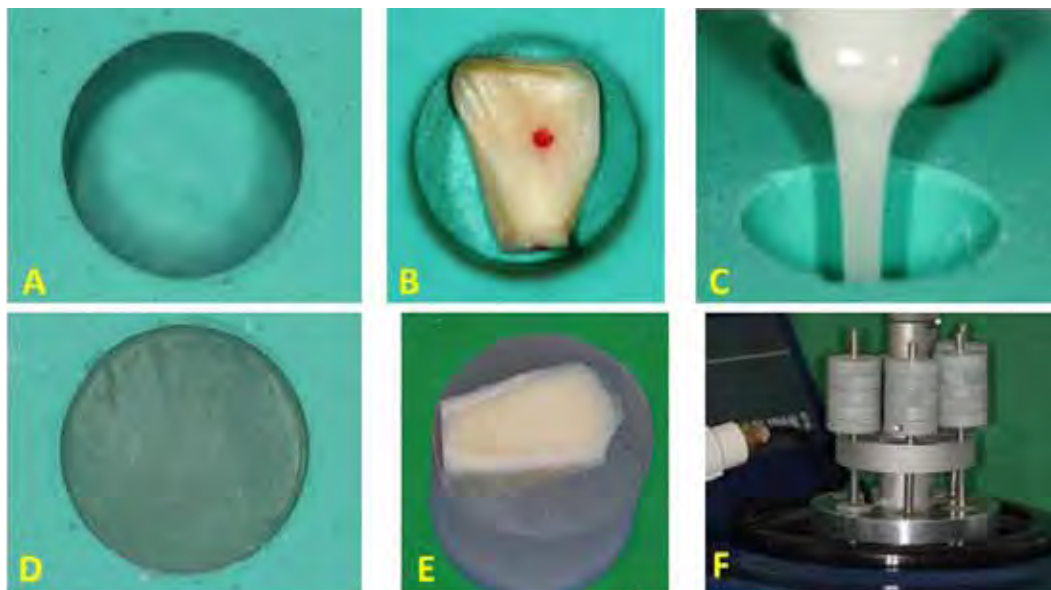


Figura 2 – Embutimento dos espécimes: A) Matriz de silicone para embutir os espécimes; B) Superfície vestibular desgastada sobre a base da matriz de silicone; C) Preenchimento total com resina acrílica quimicamente ativada; D) Polimerização completa da resina acrílica; E) Remoção dos espécimes após reação de presa; F) Polimento dos espécimes para planificação e padronização das superfícies.

### 4.3 Divisão dos Grupos Experimentais

Os 80 espécimes de dentina foram randomizados em 4 grupos experimentais (n= 20), de acordo com a estratégia adesiva empregada após o condicionamento dos espécimes com ácido fosfórico 37%: (i) aplicação do sistema adesivo Adper Single Bond 2 (3M / ESPE – St. Paul, EUA) segundo a recomendação do fabricante – controle; (ii) aplicação de solução aquosa de diglucotano de clorexidina 0,2%

(Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) por 30s; (iii) aplicação de solução aquosa de chá verde (Yamamotoyama; Midori Indústria de Chá Ltda, São Miguel Arcanjo, SP, Brasil) por 30s; (iv) aplicação ativamente por 30s de solução em gel de EGCG 10 $\mu$ M (Kato et al. 2010).

Posteriormente, os espécimes de cada grupo foram divididos em dois subgrupos (n= 10) que foram avaliados quanto à resistência de união resina-dentina após armazenamento imediato (após 24 h) e após 6 meses (Figura 3).

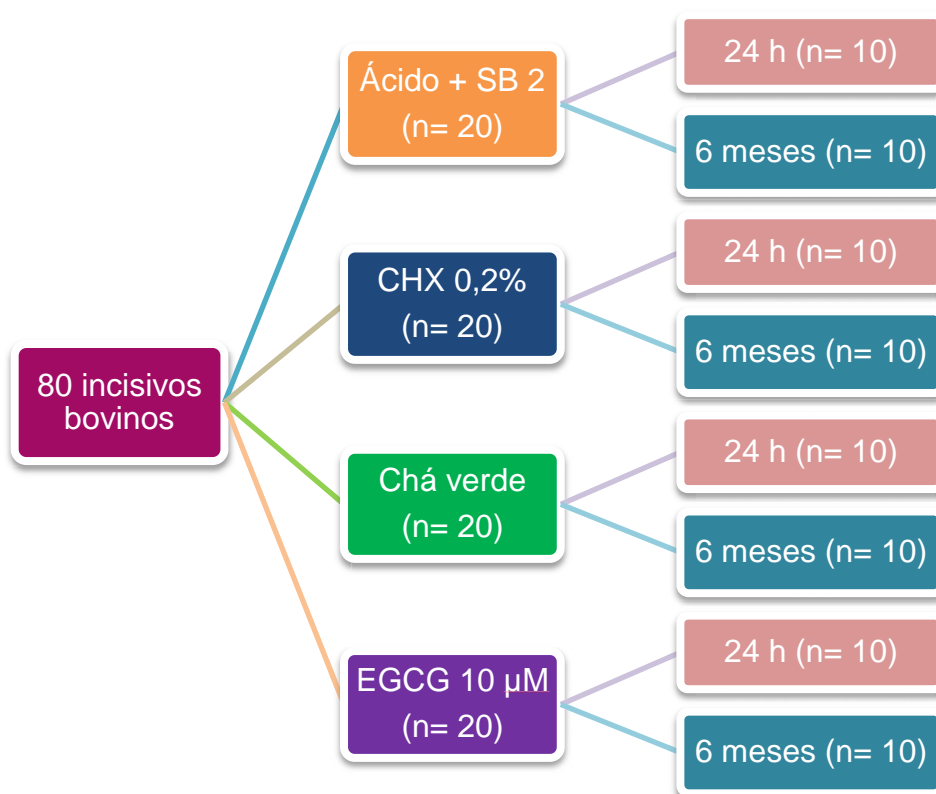


Figura 3 – Distribuição dos grupos de acordo com as estratégias adesivas e o tempo de armazenamento das amostras.

- **Grupo SB – Adper Single Bond 2 (Controle):** 20 espécimes serviram como controle. A superfície dentinária foi condicionada com ácido fosfórico a 37% por 15 s, seguida de lavagem da superfície com jato de ar/água por 30 s, remoção do excesso de umidade com papel absorvente sob suave pressão, e aplicação do sistema adesivo SB, segundo as recomendações do fabricante: aplicação de duas camadas consecutivas do adesivo, agitação do produto com pincel aplicador (Microbrush Interanational, WI, EUA) por 15 s, secagem suave com jato de ar para evaporação do solvente seguida de fotopolimerização por 10 s.
- **Grupo CLX - Adper Single Bond 2 + Clorexidina 0,2%:** 20 espécimes foram submetidos à aplicação de 1,5 µl de solução aquosa de digluconato de clorexidina 0,2% por 30s na região da dentina exposta, agitação do produto com pincel aplicador, remoção do excesso com papel absorvente sob suave pressão e aplicação do sistema adesivo seguindo o mesmo protocolo adesivo do grupo SB.
- **Grupo CV - Adper Single Bond 2 + Solução Aquosa de Chá Verde:** 20 espécimes foram submetidos à aplicação de 1,5 µl de solução aquosa de chá verde, ativamente por 30 s, na região da dentina exposta, com auxílio de um pincel aplicador, remoção do excesso de umidade com papel absorvente sob suave pressão e aplicação do sistema adesivo seguindo o mesmo protocolo adesivo do grupo SB.
- **Grupo EGCG - Adper Single Bond 2 + EGCG10:** 20 espécimes foram submetidos à aplicação de um gel a base de EGCG 10µM ativamente por 30 s na região da dentina exposta, com auxílio de um pincel aplicador, lavagem com jato de ar/água por mais 30 s, remoção do excesso de umidade com papel absorvente, sob suave pressão, e aplicação do sistema adesivo seguindo o mesmo protocolo adesivo do grupo SB.

Todos os materiais, fabricantes, suas composições e lotes estão listados no Quadro 1.

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

MATERIAL	FABRICANTE	COMPOSIÇÃO	LOTE
<b>Adper Single Bond 2</b>	3M ESPE / St. Paul / EUA	Álcool Etilico, BisGMA, Silano tratado com nanopartícula de sílica, HEMA, Glicerol 1,3 dimetacrilato, Copolímero de ácido acrílico e itacônico, Diuretano dimetacrilato, Água	9WH (2012-02)
<b>Condac 37</b>	FGM / SC / Brasil	Ácido fosfórico a 37%, Espessante, Corante, Água deionizada	140111 (2013-01)
<b>Amelogen Plus Cor A2</b>	Ultradent / Indaiatuba / SP / Brasil	Bis-GMA, TEGDMA, micropartículas de boro-aminosilicato de bário	B52NL (2013-03)

#### 4.4 Preparo do chá verde e EGCG

##### 4.4.1 Solução aquosa de Chá Verde

O chá verde foi preparado segundo as instruções do fabricante (Yamamotoyama; Midori Indústria de Chá Ltda, São Miguel Arcanjo, SP, Brasil) na proporção de 2 g da erva *Cammelia sinensis* exposta ao vapor, até secagem das folhas e acondicionados em saquinhos de papel de filtro – sachê, para 180 ml de água fervente (correspondente a uma xícara de chá), com tempo de fervura de 1 min a uma temperatura de 100° C.

Nessas mesmas proporções um estudo realizado por Kato et al. em 2009, mensurou a concentração de EGCG no chá verde preparado, através de cromatografia líquida por alta performance, encontrando valores de 0,185 mg/ml (400 µM), os quais nos baseamos para o presente estudo.

Após esse período, o sachê foi removido da infusão, esta resfriada em temperatura ambiente, devidamente tampada para evitar perda por evaporação. Após o período de resfriamento, de cerca de 4 min, a infusão encontrava-se pronta para o uso.

#### 4.4.2 Gel a base de *Epigallocatequina-3-galato* 10 $\mu$ M (EGCG10)

A formulação do gel é composta essencialmente por hidroxietilcelulose, propilenoglicol, metilparabeno, imidazolidinil uréia, água deionizada e 10  $\mu$ M do componente ativo EGCG (EGCG10), principal componente ativo do chá verde.

O gel é patenteado pela Universidade de São Paulo (USP-Bauru) e foi gentilmente cedido pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, Prof<sup>a</sup> Titular do Departamento de Ciências Biológicas da FO-USP Bauru.

#### 4.5 Inserção e polimerização da resina composta

Após a aplicação das diferentes estratégias adesivas, com o auxílio de uma matriz de silicone com dimensões de aproximadamente 4 x 4 x 4 mm (Figuras 4A) foi inserida a RC Amelogen Plus (Ultradent, Indaiatuba, SP, BR) em incrementos de 2,0 mm (Figura 4B e 4C). Cada incremento foi fotopolimerizado, por 20 s (Figura 4D), de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando um aparelho fotopolimerizador XL3000 (3M / ESPE, St. Paul, Mn, USA), com densidade de potência de 600 mW/cm<sup>2</sup>, que foi checada a cada 10

espécimes. Após a remoção da matriz de silicone foi realizada uma polimerização complementar por 40 s em todo bloco de RC.

Os dentes restaurados (Figura 4E e 4F) foram, então, armazenados em um recipiente contendo água destilada, em estufa bacteriológica a 37°C.

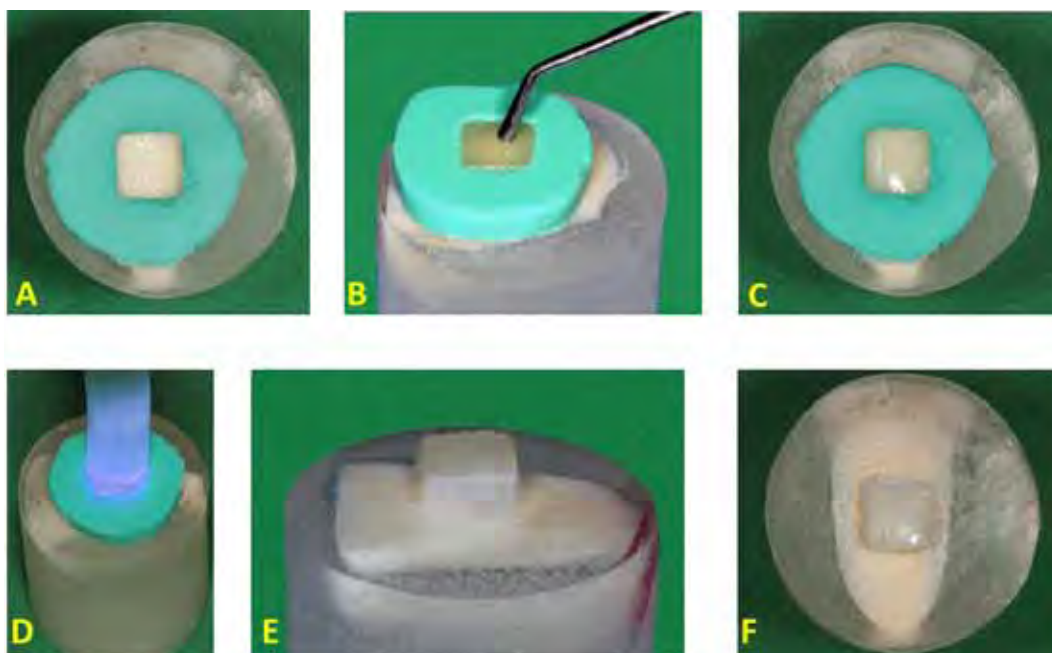


Figura 4 – Inserção da RC: A) Matriz de silicone posicionada sobre a dentina; B) Inserção da RC em incrementos de 2,0 mm; C) Inserção da RC até completar toda a dimensão da matriz; D) Fotopolimerização por 20s; E) Vista proximal do dente restaurado; F) Vista por oclusal do dente restaurado.

Após o período de 24 h, metade dos espécimes de cada grupo foi submetido 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.

#### 4.6 Preparo dos corpos-de-prova para o teste de microtração



Foram realizadas secções perpendiculares à interface adesiva nos sentidos méso-distal (MD) e cérvico-incisal (CI), com um disco diamantado em cortadeira de precisão em baixa velocidade Labcut 1010 (Extec, Enfield, CT, USA), sob refrigeração abundante (Figura 5A), a fim de se obter corpos-de-prova na forma de paralelogramo (palitos retangulares) de RC e estrutura dental com secções de aproximadamente  $0,8 \text{ mm}^2$  de área (Figura 5B).

Os palitos externos foram descartados por exibirem uma padronização imperfeita de todas as dimensões. Cada espécime deu origem a cerca de nove palitos inteiros (Figura 5C). Antes da execução do ensaio mecânico, a área de todos os palitos foi mensurada utilizando um paquímetro eletrônico digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., Itú, SP, Brasil) (Figura 5D).

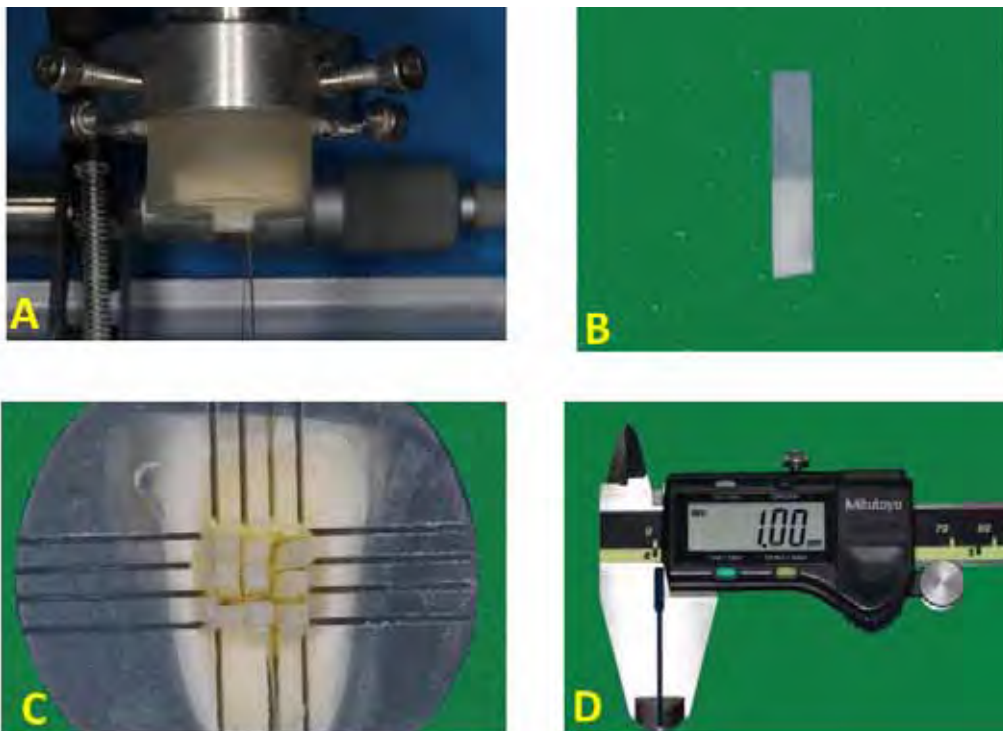


Figura 5 – A) Secções perpendiculares à interface adesiva nos sentidos MD e CI em cortadeira de precisão em baixa velocidade Labcut 1010; B) Corpos-de-prova na forma de paralelogramo de resina composta e estrutura dental; C) Obtenção de nove palitos por dente; D) Mensuração da área de cada palito com auxílio de um paquímetro digital.

O valor de carga para rompimento da união resina-dentina e a medida da área, serviram para calcular a resistência de união à tração, em megapascal (MPa), através da fórmula:  $R_m = F/A$ , onde: F é a força aplicada; A é a área de união; e Rm é a resistência à microtração.

#### 4.7 Teste de resistência a microtração

Cada corpo-de-prova foi fixado individualmente em um dispositivo para teste de microtração (Figura 6A), 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 6B) na 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, preconizada pela ISO/TR 11405:1994. No momento da fratura (Figura 6C), o movimento foi interrompido de forma automática, o corpo-de-prova removido da máquina (Figura 6D), e os valores referentes à resistência de união à microtração coletados e tabelados para a realização da análise estatística.

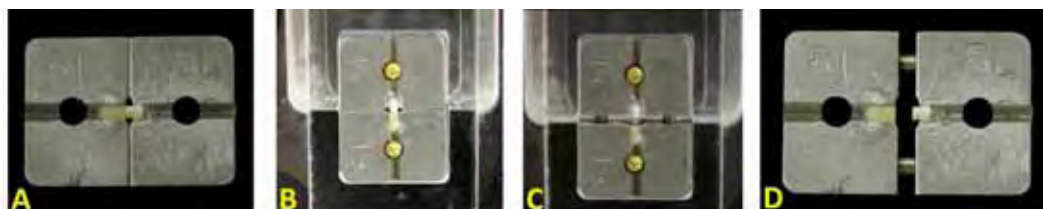


Figura 6 – Teste de microtração: A) Fixação individual do corpo-de-prova no dispositivo para teste de microtração; B) Corpo-de-prova posicionado na máquina EMIC para realização do ensaio de microtração; C) Momento da fratura; D) Corpo-de-prova fraturado.

Os espécimes fraturados foram corados em uma solução de hematoxilina a 7% (Hematoxilina de Harris, durante 3 min, de acordo com Ohkubo (Ohkubo et al., 1982), para evidenciação da estrutura dental, lavados e secos com jato de ar/água, e analisados em estereomicroscópio Stemi 2000 (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemanha) com aumento de 50 vezes, para determinar qual o tipo de fratura de acordo com a modificação dos métodos propostos por Sengün et al. (2002) e Baba et al. (2002) em quatro tipos (Figura 7):

- Fratura tipo 1: quando ocorre fratura da RC (coesiva em RC).
- Fratura tipo 2: quando ocorre fratura do substrato dentinário (coesiva em dentina).
- Fratura tipo 3: quando ocorre fratura da interface adesiva (adesiva).
- Fratura tipo 4: quando ocorre fratura parte na estrutura dentinária, parte na RC (fratura mista).

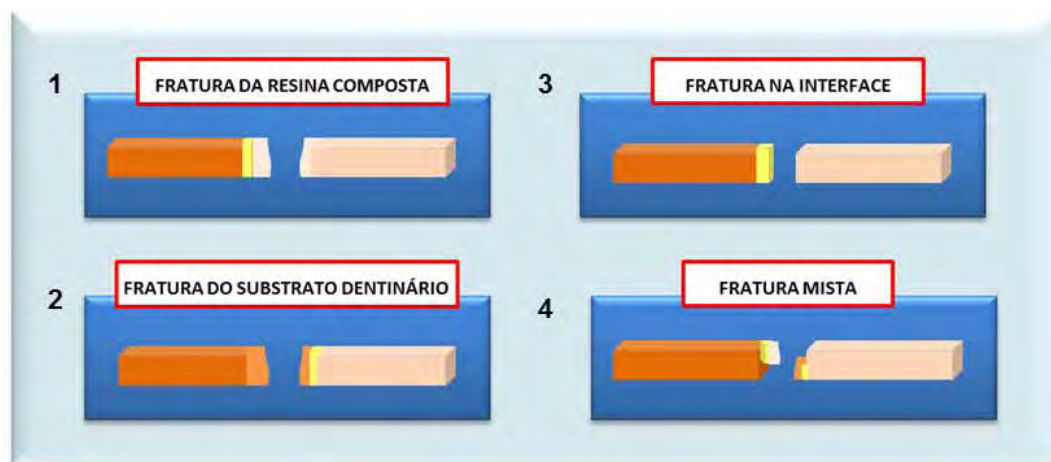


Figura 7 – Tipos de fratura dos espécimes após teste de microtração.

#### 4.8 Análise ilustrativa por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para fins ilustrativos dos diferentes tratamentos sobre a superfície dentinária, foram preparados dois espécimes adicionais de cada grupo para análise da interface adesiva em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Para isso, os incisivos bovinos foram preparados e restaurados de forma similar à técnica empregada para o ensaio mecânico por microtração. Após, os espécimes foram seccionados na máquina de cortes seriados Labcut, obtendo-se quatro corpos-de-prova de cada espécime. Os corpos-de-prova foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em 0,1 M de cacodilato de sódio solução tampão, a 4°C, por 12h, com três trocas, seguido por água destilada por 1 min. Posteriormente, 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 foram imersos, por 10 min, em hexamethyldisilazane (Fluka), em uma capela para exaustão de gases para completar a desidratação sobre um filtro de papel sob uma campânula de vidro para secar, por 30 min, em temperatura ambiente (Perdigão et al., 1995).

Para observar a interface resina-dentina, cada corpo-de-prova teve sua interface polida com lixas d'água de granulação crescente (600, 1200 e 4000) em politriz circular sob refrigeração constante, e foi imerso em etanol absoluto dentro de um aparelho de limpeza ultra-sônica (Ultrasonic Cleaner – Odontobrás – Ribeirão Preto, SP, BR) por 5 min. As superfícies polidas foram tratadas com HCl a 6% por 15 s, em seguida lavadas com jato de água por 10 s. Por fim, novamente imersas em etanol absoluto por 5 min e deixados secar completamente a temperatura ambiente. Após essa etapa, os corpos-de-prova foram montados em *stubs* de alumínio e metalizados com ouro-paládio pelo processo de sputter, por meio de um aparelho Desk II (Denton Vacuum) por 2 min.

Concluído todo o procedimento, os espécimes foram observados em MEV (JMS 5310 – Jeol Brasil Instrumentos Científicos Ltda. – SP, BR), empregando aumentos de 2000 e 5000 vezes.

#### **4.9 Planejamento Estatístico**

As hipóteses de nulidade testadas foram:

- a)  $H_{0a}$  - Não há influência da associação da clorexidina 0,2% sobre os valores de resistência de união para o sistema adesivo em estudo quando comparado ao grupo controle;
- b)  $H_{0b}$  - Não há influência da associação do chá verde sobre os valores de resistência de união para o sistema adesivo em estudo quando comparado ao grupo controle;
- c)  $H_{0c}$  - Não há influência da associação do EGCG 10  $\mu$ M sobre os valores de resistência de união para o sistema adesivo em estudo quando comparado ao grupo controle;
- d)  $H_{0d}$  - Não há influência do armazenamento sobre os valores de resistência de união da interface resina-dentina para os grupos estudados.

#### **4.10 Planejamento experimental**

O experimento seguiu um esquema fatorial do tipo 4 x 2. Para a variação de resistência adesiva, as variáveis experimentais, ou fatores em estudo, foram: Estratégias Adesivas (controle, clorexidina 0,2%, chá verde e EGCG 10  $\mu$ M) e Tempo de Armazenamento (24 h e 6 meses).

A variável resposta foi o valor de resistência adesiva (expresso em MPa) obtido pelo teste de microtração. A unidade experimental foi o dente bovino. As condições experimentais foram designadas aleatoriamente aos dentes preparados. Ou seja, oito condições experimentais sob dez repetições para o substrato estudado. Sendo então obtidos 80 dados (Médias de MPa) que foram submetidos à análise estatística por meio dos programas computacionais: Minitab (v.16.1.2010) e GraphPad PRISM (5.0, 2010).

#### **4.11 Análise Estatística**

A variável em análise foi o valor de resistência média do dente, calculada a partir dos valores obtidos com os palitos no ensaio de microtração. A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvios padrão. A estatística inferencial consistiu no teste de análise de variância (ANOVA) dois fatores, efeito fixo (estratégias adesivas e armazenamento), e 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.

O nível de significância escolhido foi o valor convencional de 5%.

## 5 RESULTADOS

Os dados obtidos serão apresentados em quatro partes. Na primeira será apresentada a estatística descritiva, na segunda será apresentada a estatística inferencial, na terceira será apresentada a análise dos padrões de fratura e na quarta parte serão apresentadas as imagens obtidas por MEV, para fins ilustrativos da camada híbrida formada para cada estratégia adesiva nos dois períodos de tempo de armazenamento.

### 5.1 Estatística Descritiva

A análise descritiva dos dados de resistência adesiva está apresentada na Tabela 1 com sua representação gráfica, via Gráfico de Colunas, na Figura 8.

Tabela 1 – Análise Descritiva dos dados de microtração (MPa) segundo as estratégias adesivas e o tempo de armazenamento

Condição experimental	n	Média (dp)	Coefvar (%)	Mínimo	Mediana	Máximo
SB-I	10	40,81 (3,35)	8,20	36,04	40,18	46,32
SB-6m	10	30,05 (1,54)	5,13	28,73	29,77	33,95
CLX-I	10	41,76 (2,62)	6,28	37,52	41,74	45,56
CLX-6m	10	36,04 (3,52)	9,76	30,08	37,30	40,46
CV-I	10	37,38 (2,98)	7,98	34,48	36,20	43,17
CV-6m	10	31,95 (3,40)	10,63	25,98	33,39	35,06
EGCG-I	10	35,91 (4,82)	13,43	28,17	37,53	42,08
EGCG-6m	10	35,75 (4,44)	12,43	28,56	35,86	42,92

Por meio das informações apresentadas na Tabela 1, pode-se notar (i) os valores médios de resistência adesiva estão na faixa de 30 a 42 MPa; (ii) os valores de dispersão (indicados pelo desvio padrão) são inferiores ao valor médio e, ainda, que os coeficientes de variação estão abaixo de 15 %, indicando assim, representatividade do valor médio. Para efeito de visualização, os valores de tendência central e de dispersão são representados pela Figura 8.

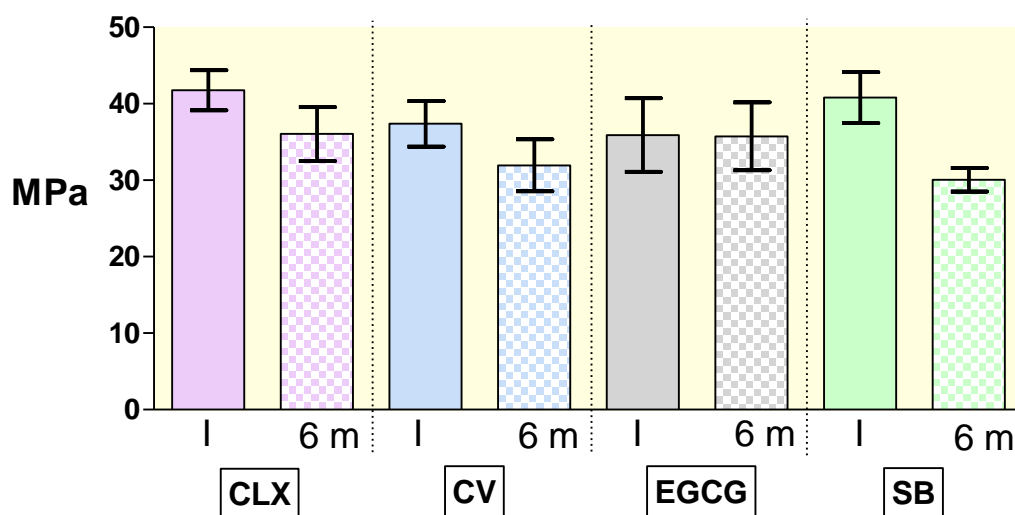


Figura 8 – Gráfico de Colunas (média±dp) dos valores de resistência (MPa) obtidos pelo ensaio de microtração, segundo as condições experimentais estabelecidas pelas estratégias adesivas SB CLX; CV; e EGCG; Armazenamento Imediato (I) e após 6 meses (6 m).

## 5.2 Estatística Inferencial

Para avaliar a inter-relação entre os períodos de tempo de armazenamento e as estratégias adesivas, os dados obtidos em nosso experimento foram submetidos ao modelo estatístico de análise de



variância dois fatores, elemento fixo, após ser considerada a distribuição dos resíduos.

Os valores dos resíduos, decorrentes do ajuste do modelo adotado, foram examinados para avaliar a adequabilidade do modelo para válidas inferências estatísticas e foi determinado que os dados originais propiciaram um adequado ajuste, porque se ajustam a uma distribuição normal de probabilidade (Figura 9).

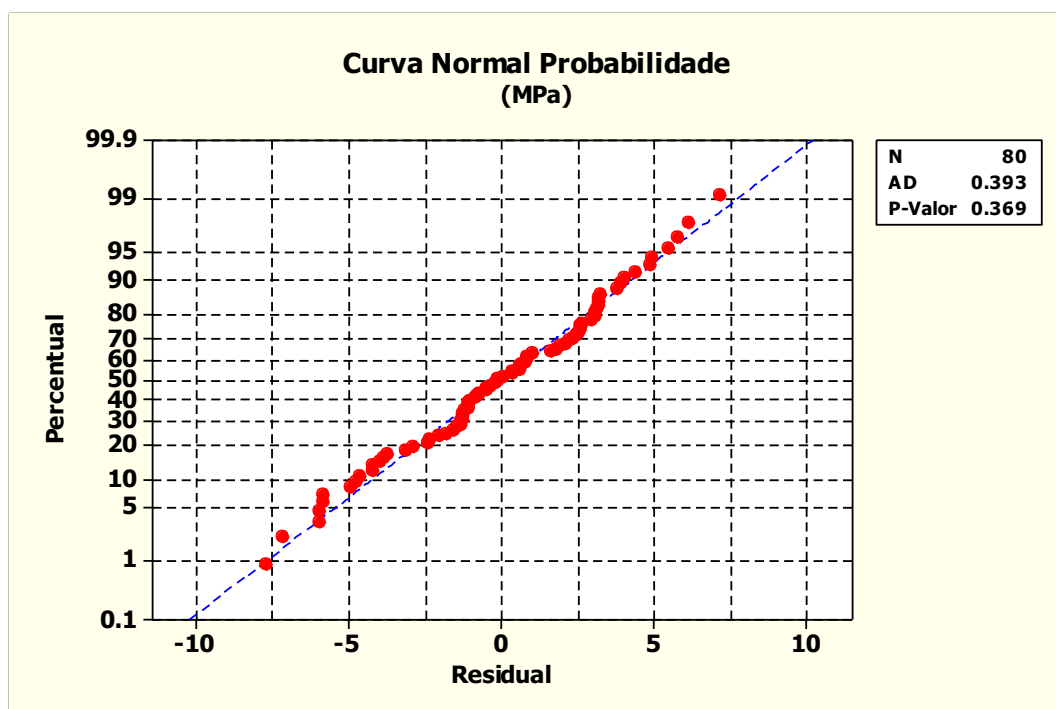


Figura 9 – Curva normal dos valores resíduos do modelo ANOVA para verificar a distribuição dos resíduos (normalidade).

Sendo ainda verificada a uniformidade dos resíduos (homocedasticidade) por meio do gráfico dos valores dos resíduos em relação aos valores ajustados (Figura 10).

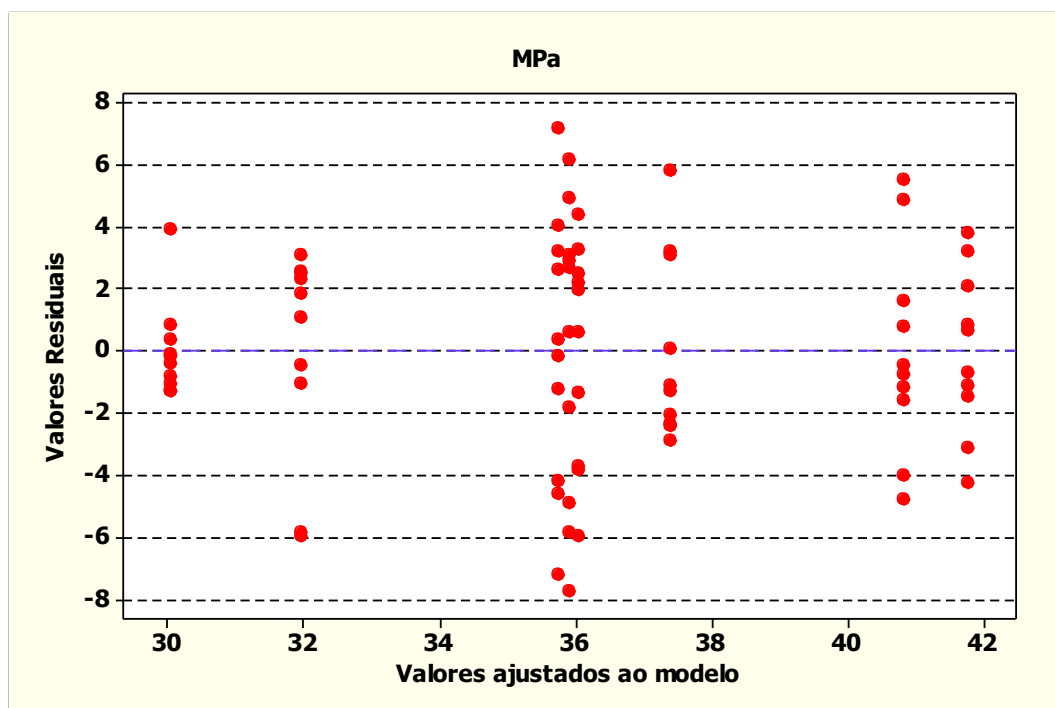


Figura 10 – Diagrama de dispersão dos valores resíduos do modelo ANOVA em relação aos valores ajustados pelo modelo para verificar a uniformidade dos resíduos (homocedasticidade).

Uma vez atendidas às suposições do modelo ANOVA, o teste foi efetuado e as proposições do estudo foram avaliadas. Pode-se verificar, na Tabela 2, que as hipóteses de nulidades foram rejeitadas.

Tabela 2 – ANOVA dois fatores para estratégias adesivas e armazenamento dos grupos

Source	DF	SS	MS	F	P*
Estratégias Adesivas (EA)	3	207,58	69,19	5,75	0,0010*
Armazenamento	1	609,35	609,35	50,65	0,0001*
Armazenamento*EA	3	280,97	93,66	7,78	0,0001*
Resíduo	72	866,25	12,03		
Total	79	1964,15			

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

O efeito interação foi estatisticamente significativo. Assim, como se pode observar, via gráfico de médias (Figura 11), o efeito Armazenamento não é o mesmo em cada tipo de Estratégia Adesiva. Isto é, a diferença entre os grupos de armazenamento imediato e após 6 meses para o EGCG é praticamente nula (I: 35,91 – 6 m: 35,75 = 0,16 MPa) e difere em relação às demais estratégias, por exemplo, para o SB (I: 40,81 – 6 m: 30,05 = 10,76 MPa) há uma redução após o armazenamento.

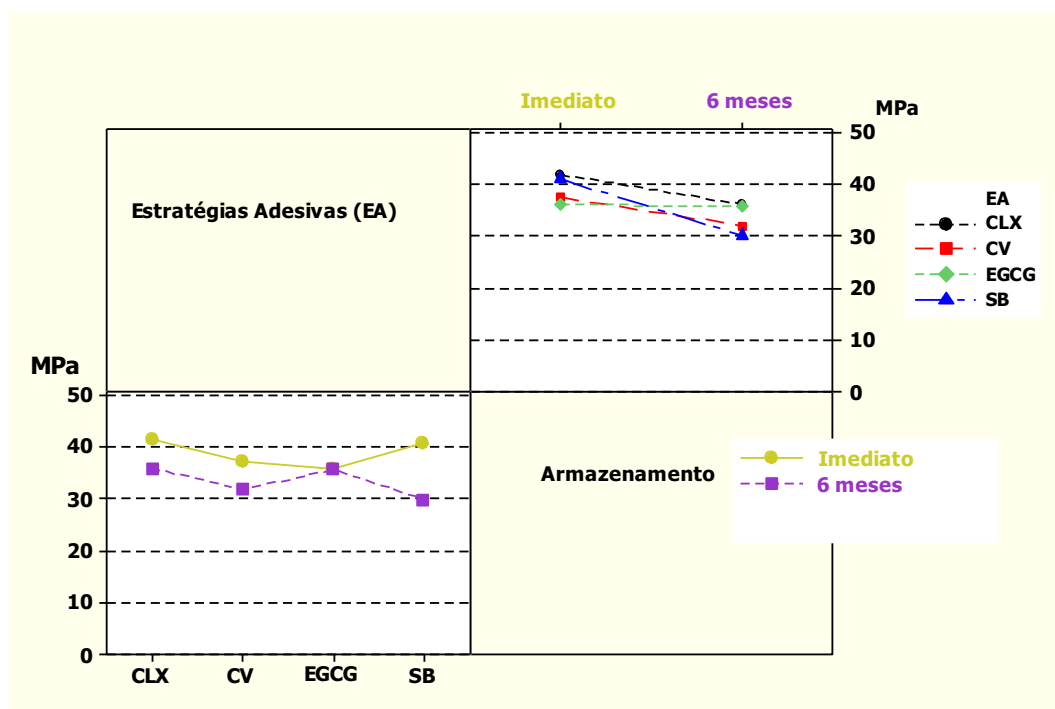


Figura 11 – Gráfico das médias - Inter-relação entre as estratégias adesivas e o tempo de armazenamento entre os grupos.

Por meio do gráfico de médias, nota-se que as linhas que unem os valores médios não seguem um padrão (paralelismo) e, neste caso, não é aconselhável uma interpretação dos efeitos Estratégia

Adesivas e Armazenamento de forma isolada. Contudo, observa-se que os grupos testados, com exceção do EGCG, apresentaram uma redução nos valores de resistência adesiva após 6 meses de armazenamento.

Quando se comparam os oito valores médios das condições experimentais (Tabela 3), por meio do teste de comparação múltipla de Tukey (5%), pode-se verificar que a condição de maior resistência foi obtida para a estratégia CLX sob armazenamento imediato e a de menor resistência para o CV sob 6 meses de armazenamento.

Tabela 3 – Teste de Tukey para múltiplas comparações

<b>Estratégias adesivas</b>	<b>Armazenamento</b>	<b>Média (MPa)</b>	<b>Grupos homogêneos</b>			
SB	Imediato	40,81	A	B		
CLX	Imediato	41,76	A			
CV	Imediato	37,38	A	B	C	
EGCG	Imediato	35,91			C	D
SB	6 meses	30,05				E
CLX	6 meses	36,04		B	C	D
CV	6 meses	31,95				D E
EGCG	6 meses	35,75			C	D

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

A partir da Tabela 3, fica estabelecido (i) não haver diferença estatisticamente significativa na resistência adesiva imediata entre os grupos SB, CLX e CV; (ii) sob armazenamento imediato, a EGCG apresentou o menor valor de resistência adesiva (35,91 MPa), que diferiu estatisticamente do CLX (41,76 MPa) grupo com maior valor de resistência adesiva imediata; (iii) após 6 meses, a CLX foi o grupo que

apresentou os maiores valores de resistência de união; enquanto os grupo SB (30,05 MPa) e CV (31,95 MPa) apresentaram os menores valores e não diferiram estatisticamente entre si.

### 5.3 Análise dos Padrões de Fratura

Para esta análise considerou-se as falhas pré-teste e os tipos de fratura dos corpos-de-prova avaliados em microscópio óptico, após a fratura. Os tipos de falha foram classificados conforme a região da fratura em quatro aspectos: adesiva; coesiva em dentina; coesiva em resina e mista.

O resultado para o total de palitos obtidos e perdidos em termos de frequência absoluta (n) e relativa (%) está apresentado na Tabela 4. Não houve perda pré-teste para nenhum grupo no tempo imediato. Após 6 meses de armazenamento todos os grupos apresentaram falhas na adesão e não obtenção do total de palitos.

Tabela 4 – Classificação do padrão de fratura para os 90 palitos em cada grupo

Grupos	Adesiva	Coesiva em resina	Coesiva em dentina	Mista	Perdidos	
SB	Imediato	46 (51%)	5 (5,5%)	3 (3,5%)	36 (40%)	0/0 (%)
	6 meses	49 (54%)	3 (3,5%)	1 (1,5%)	29 (32%)	8 (9%)
CLX	Imediato	47 (52%)	4 (4,5%)	3 (3,5%)	36 (40%)	0/0 (%)
	6 meses	28 (31%)	1 (1%)	2 (2%)	27 (30%)	32 (36%)
CV	Imediato	50 (54%)	1 (1,5%)	3 (3,5%)	36 (41%)	0/0 (%)
	6 meses	49 (43%)	2 (2,5%)	2 (2,5%)	16 (28%)	21 (24%)
EGCG	Imediato	43 (47%)	6 (7%)	3 (4%)	38 (42%)	0/0 (%)
	6 meses	45 (50%)	4 (4,5%)	2 (2,5%)	22 (24%)	17 (19%)

Tanto no tempo imediato quanto após armazenamento os houve uma variação na distribuição do padrão de fratura entre os grupos, com predominância de falhas do tipo mista e adesiva, independente da estratégia adesiva utilizada, o que mostra a efetividade do método de microtração utilizado para a avaliação da interface adesiva entre resina e dentina.

Na Figura 12, pode ser observado o padrão de fratura de cada grupo após o teste de microtração, classificado em adesiva, coesiva em resina, coesiva em dentina e mista.

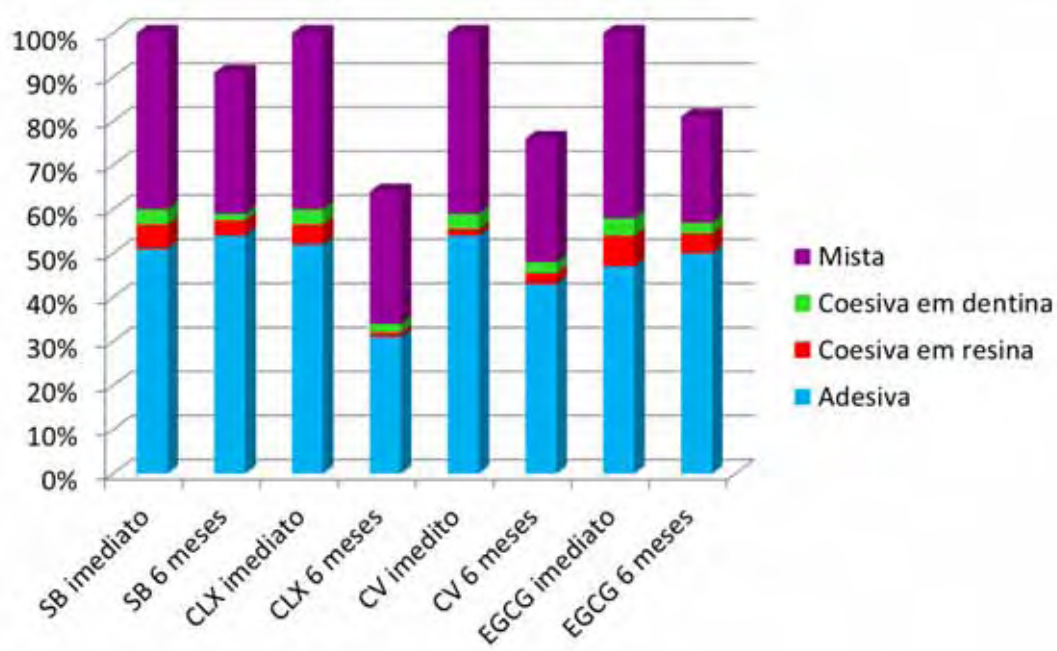


Figura 12 – Gráfico de colunas – classificação do padrão de fratura dos grupos.

#### 5.4 Análise Complementar da Interface adesiva em MEV

As fotomicrografias ilustrativas da interface de união entre resina e dentina para as diferentes estratégias adesivas, 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 e após 6 meses realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Às imagens ilustrativas apresentadas nas Figuras de 13 a 16, pode se observar que as estratégias adesivas não influenciaram negativamente a adesão pela a presença de camada híbrida formada em todos os grupos, em ambos os períodos de tempo de armazenamento.

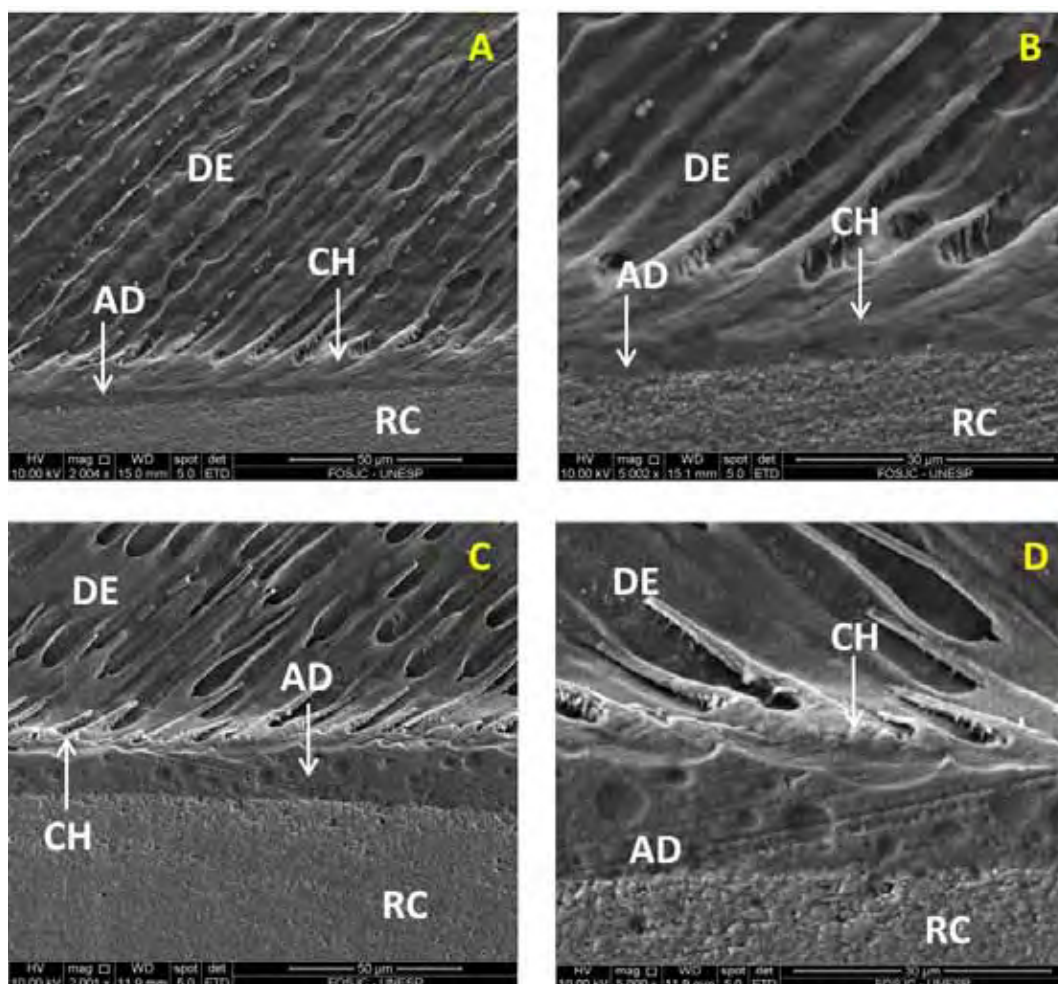


Figura 13 – Fotomicrografias da interface de união entre dentina (DE) e resina composta (RC) do grupo SB nos períodos de tempo imediato com aumento de 2000 x (A) e 5000 x (B) e após 6 meses de armazenamento com aumento de 2000 x (C) e 5000 x (D). AD = adesivo; CH = Camada Híbrida.

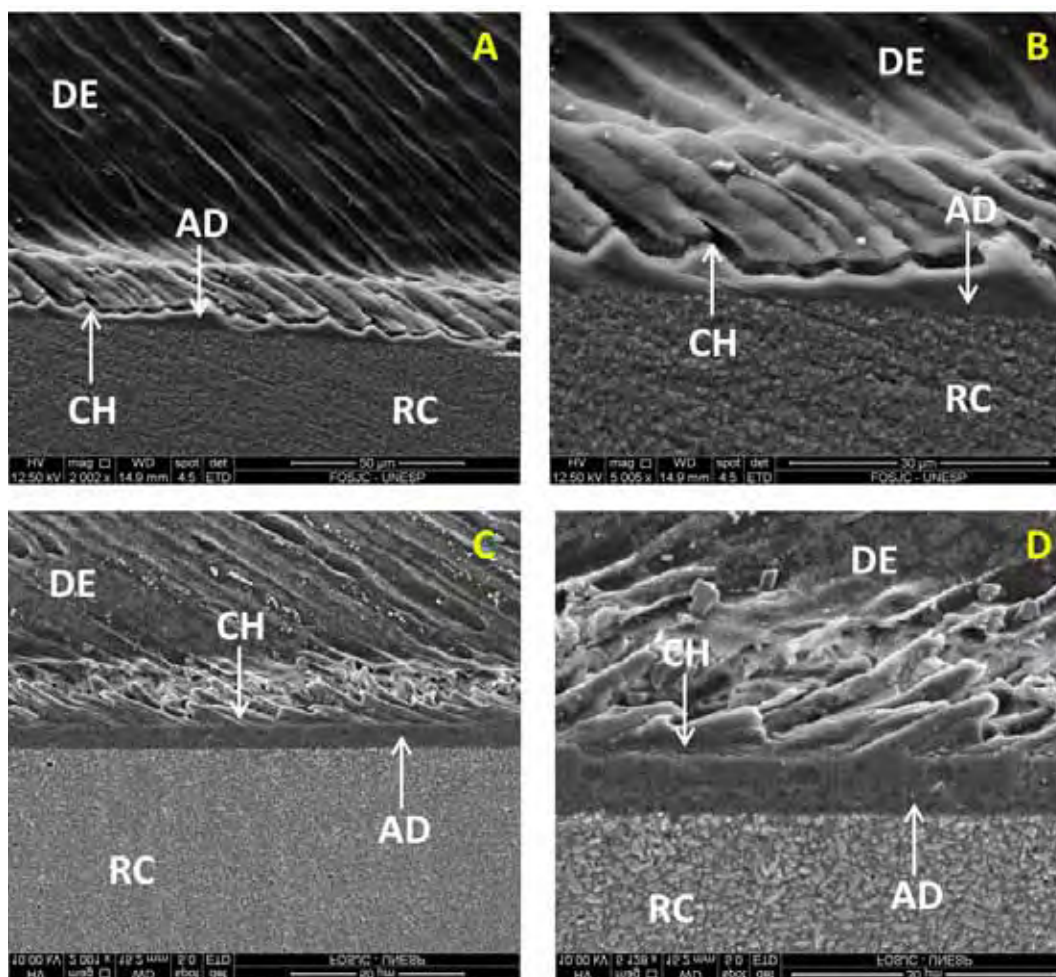


Figura 14 – Fotomicrografias da interface de união entre dentina (DE) e resina composta (RC) do grupo CLX nos períodos de tempo imediato com aumento de 2000 x (A) e 5000 x (B) e após 6 meses de armazenamento com aumento de 2000 x (C) e 5000 x (D). AD = adesivo; CH = Camada Híbrida.

Observa-se que o uso da CLX previamente ao sistema adesivo não interferiu negativamente na formação da camada híbrida (Figura 14A e 14B) no tempo imediato, e que após 6 meses de armazenamento a camada de adesivo continua íntegra e contínua, indicando uma manutenção da interface adesiva.



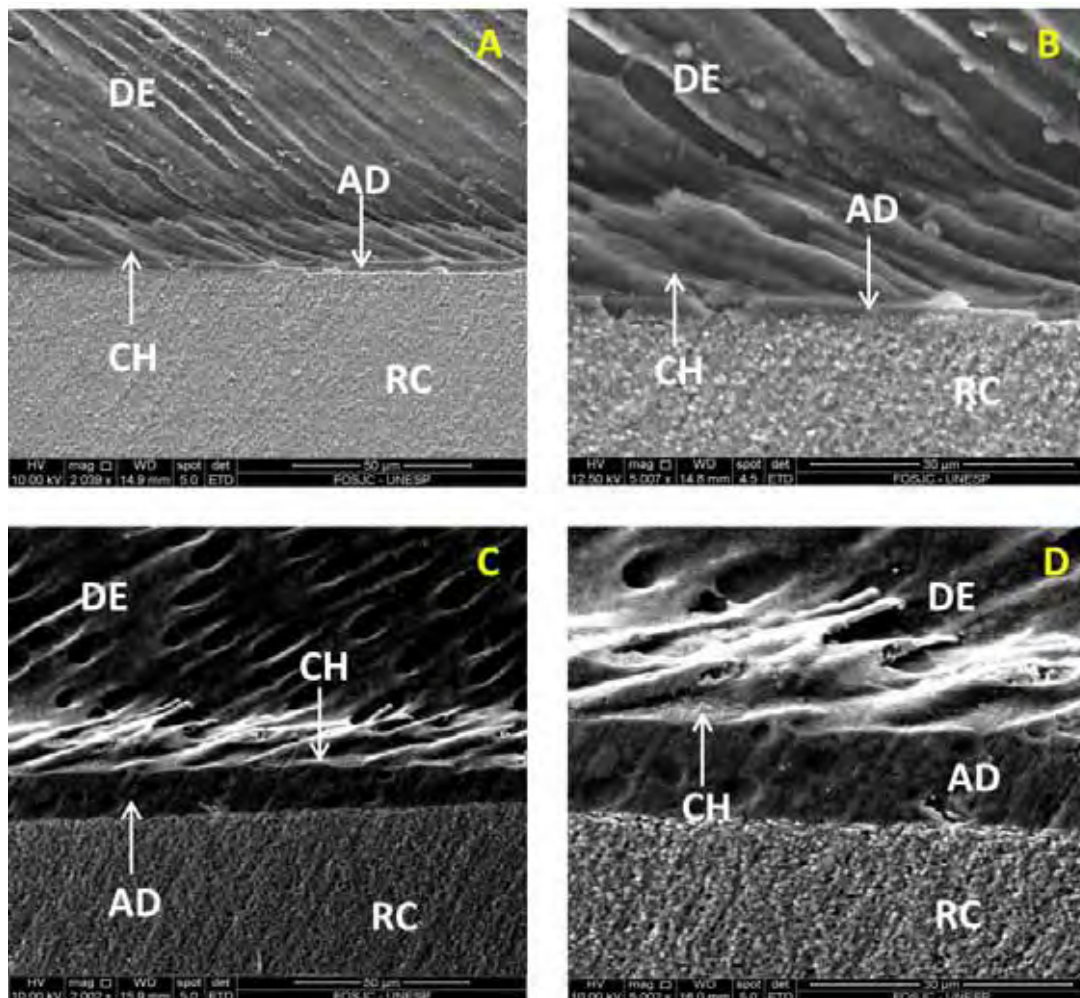


Figura 15 – Fotomicrografias da interface de união entre dentina (DE) e resina composta (RC) do grupo CV nos períodos de tempo imediato com aumento de 2000 x (A) e 5000 x (B) e após 6 meses de armazenamento com aumento de 2000 x (C) e 5000 x (D). AD = adesivo; CH = Camada Híbrida.

Observa-se após o armazenamento por 6 meses (Figuras 15C e 15D) a presença de bolhas na camada de adesivo que indicam uma degradação hidrolítica devido ao armazenamento, corroborando com os valores de resistência adesiva reduzidos, observados na Tabela 3.

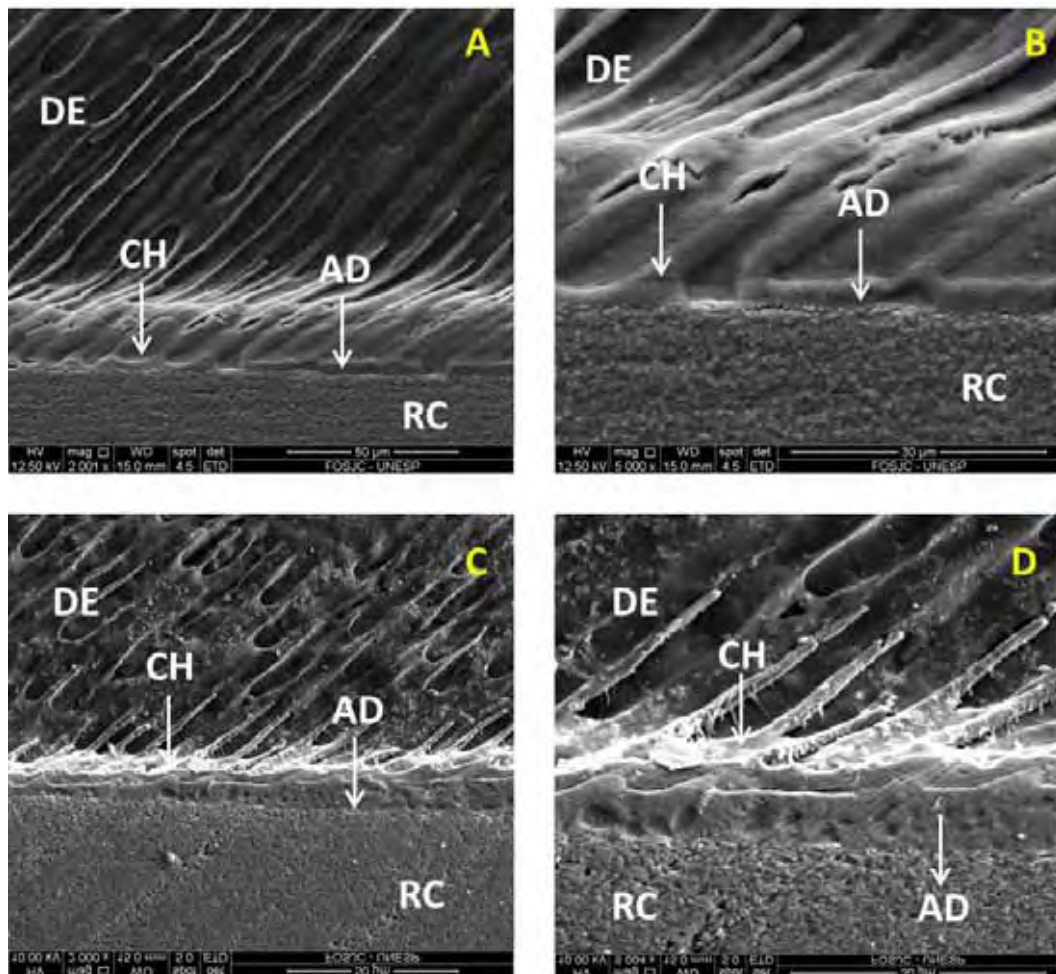


Figura 16 – Fotomicrografias da interface de união entre dentina (DE) e resina composta (RC) do grupo EGCG nos períodos de tempo imediato com aumento de 2000 x (A) e 5000 x (B) e após 6 meses de armazenamento com aumento de 2000 x (C) e 5000 x (D). AD = adesivo; CH = Camada Híbrida.

As alterações verificadas quando se comparam as imagens correlacionadas aos tempos imediato e após 6 meses de armazenamento, para cada grupo, mostram alterações na camada adesiva após 6 meses, apresentando um aspecto poroso, que podem sugerir uma degradação do adesivo pelo armazenamento em água destilada. Para confirmação dessa hipótese, mais pesquisas devem ser realizadas.

## **6 DISCUSSÃO**

### **6.1 Da metodologia**

Para o presente estudo foram utilizados dentes bovinos, uma vez que se torna cada vez mais difícil a obtenção de dentes humanos hígidos extraídos em quantidade adequada para as pesquisas. Diversos estudos têm mostrado que dentes humanos e bovinos apresentam características semelhantes (Nakamichi et al., 1983; Schilke et al., 2000; Hara et al., 2003), permitindo a utilização de dentes bovinos como substituto em vários estudos. Os dentes bovinos além de serem mais fáceis de obtenção em quantidade suficiente e de fácil manipulação (Mellberg, 1992), quando provenientes de linhagem genética e idade semelhante, crescerem em mesmo ambiente e com a mesma dieta, podem apresentar maior homogeneidade na composição mineral, ao contrário dos dentes humanos, que provêm de doadores diferentes com variação de idade, dieta e suplementação de flúor, por exemplo, (Wegehaupt et al., 2008).

Nakamichi et al. (1983) em um estudo comparando dentes humanos e bovinos em testes de adesão, não encontraram diferença significativa nos valores de adesão dentinária, sugerindo o uso desses dentes como substitutos aos dentes humanos. Já quando se comparou a força de adesão de diferentes agentes adesivos à dentina bovina em relação à humana em teste de resistência ao cisalhamento, foi demonstrado que a dentina bovina pode ser um substrato adequado para os testes de resistência ao cisalhamento, quando utilizados sistemas adesivos (Saunders, 1988). Outro estudo comparando a dentina

coronária, quanto ao número por  $\text{mm}^2$  e o diâmetro dos túbulos dentinários, de dentes decíduos, pré-molares e incisivos bovinos não encontrou diferença significativa entre eles, sugerindo o uso de dentes bovinos em estudos padronizados como um substituto adequado para testes de adesão (Schilke et al., 2000). Por estes motivos, optou-se pelo uso de dentes bovinos em substituição aos humanos.

Todos os dentes usados em nosso estudo tiveram a superfície vestibular desgastada de modo que a espessura da dentina ficasse em 2,0 mm com a finalidade de padronizar a espessura de dentina remanescente para realização do preparo e restauração. Alguns estudos acreditam que a dentina bovina superficial é mais maturada que a profunda (Sugiyama 1961; Fusayama et al. 1966). O que vai ao encontro dos resultados obtidos por Nakamichi et al. (1983) que obteve melhores valores de adesão na dentina bovina superficial (1,4 - 2,1 mm) comparada a profunda (0,2 - 0,9 mm) e a avaliação dos substratos dentinários em MEV demonstraram que a dentina superficial de humanos idosos, apresentou características semelhantes à dentina superficial bovina de animais idosos antes e após o condicionamento de superfície, configurando a semelhança entre os substratos.

A resistência de união resina-dentina imediata costuma atingir valores consideráveis de resistência adesiva em testes de microtração, entretanto, um dos desafios ainda enfrentados na Odontologia restauradora é manter constante estes valores em longo prazo (De Munck et al. 2003). Dessa forma, estudos de longevidade são considerados métodos ideais para verificar a real eficácia de sistemas adesivos na união adesiva a dentina (Nikaido et al., 2002; Loguercio et al., 2005). Para tal, diversas soluções de armazenamento podem ser utilizadas em estudos *in vitro*. Dentre elas, etanol (Lee et al., 1995), cloreto de sódio (NaOCl) (Yamauti et al., 2003; De Munck et al., 2006), óleo mineral (Tay et al., 2003; Pashley et al., 2004), saliva artificial (Lee, et al.,

1995; Tay et al., 2003; Pashley et al., 2004) e água destilada (Hashimoto et al., 2002; Sadek et al., 2003; Yamauti, et al., 2003; Castro et al., 2004; Reis et al., 2005; Salz et al., 2005), sendo esta última a mais comumente utilizada. Dessa forma, optou-se pelo uso da água destilada como forma de armazenamento dos espécimes para avaliação imediata e longitudinal.

A resistência adesiva pode ser avaliada por testes mecânicos de macrotração, cisalhamento ou microtração, dentre estes, selecionamos o teste de microtração, por considerar que este poderá oferecer maior fidelidade de resultados, uma vez que possibilita uma análise de várias áreas da mesma amostra (Sano et al., 1999; Garcia et al., 2002; De Munck et al., 2003; Castro et al., 2004).

Como a interface adesiva não é uniforme, irregularidades na superfície da camada adesiva, formação de bolhas e variações na espessura da camada formada pelas diferentes formas de aplicação dos sistemas adesivos podem ocorrer, influenciando os valores de resistência adesiva quando avaliado uma área maior, como ocorrem nos testes de cisalhamento (Garcia et al., 2002). Além disso, o teste de microtração permite a obtenção de vários espécimes por dente, reduzindo o coeficiente de variação do método em relação aos testes de tração e cisalhamento (Cardoso et al., 1998), o que favorece uma avaliação intra e entre dentes em diferentes áreas, redução do número de espécimes por grupo, além de auxiliar na análise das superfícies por Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão (Sano et al., 1994b). Entretanto, a técnica exige mais trabalho para sua execução e segundo alguns autores pode levar a resultados semelhantes aos testes de cisalhamento e tração (Braga et al., 2010; Van Meerbeek et al., 2010).

Pashley et al. (1995) ao avaliar a interface adesiva por teste de microtração verificaram um maior número de fraturas na interface adesiva, mostrando que o método foi efetivo para uma avaliação mais precisa da resistência de união entre a estrutura dentária e o material

restaurador, o que corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho, e apresentados na Tabela 4.

Dentre os materiais testados como estratégias adesivas foram utilizadas CLX 0,2%, solução aquosa do chá verde e gel a base de EGCG 10  $\mu$ M. A CLX foi escolhida já que diversos trabalhos tem demonstrado sua eficácia na manutenção da interface adesiva dentinária quando aplicada previamente ao sistema adesivo (Hebling et al., 2005, Carrilho et al., 2007a,b; Breschi et al., 2009; Staneslawczuk et al., 2011), além da capacidade de inibição das MMPs (Gendron et al., 1999, Breschi et al., 2010) e prevenção da degradação do colágeno (Osório et al., 2011). A concentração em 0,2% foi a de escolha já que estudos que avaliaram a capacidade de manutenção da interface adesiva por diferentes concentrações de CLX concluíram que mesmo em baixas concentrações a CLX foi eficaz na inibição das MMPs e manutenção da estabilidade de união resina-dentina (Gendron et al., 1999; Breschi et al., 2009; Loguercio et al., 2009; Breschi et al., 2010). O chá verde foi utilizado para avaliar sua capacidade de manutenção da interface de união resina-dentina porque apesar de não se saber ao certo como ele atua sobre a adesão dentinária, na área médica o chá verde já vem sendo utilizado há muitos anos devido aos seus benefícios para a saúde (Hamilton-Miller, 1995; Liao et al., 2001; Higdon, Frei, 2003; Arab et al., 2011).

Na Odontologia ainda necessitamos de mais estudos para verificar seus reais benefícios, mas já se sabe que ele pode auxiliar na manutenção da saúde bucal (Liao et al., 2001), tem ação antimicrobiana (Hamilton-Miller, 1995), reduz a progressão da erosão (Magalhães et al., 2009; kato et al., 2009), atua na saúde periodontal (Kushiya et al., 2009), apresenta flúor em sua composição (Shu et al., 2003), e sobretudo tem capacidade de inibição das MMPs (Demeule et al., 2000), o que poderia contribuir na estabilidade de união adesiva. O chá verde é composto por cerca de 4000 compostos bioativos, sendo destes 1/3 de

polifenóis (Tariq et al., 2010) que estão relacionados com as propriedades funcionais. Durante o preparo do chá a quantidade de polifenóis liberados é de cerca de 60 mg/g de folha de chá (Dalluge et al., 1998), e por isso para nosso estudo foi preparado o chá verde em forma de infusão, semelhante ao utilizado para consumo.

Dentre os componentes ativos do chá verde, a EGCG é a catequina mais ativa e abundante (Wang et al., 2000). Alguns estudos mostraram sua efetividade na redução da produção de ácido na placa dental pelos *S. mutans* (Hirasawa et al., 2006), ação sobre as collagenases que degradam o colágeno (Madhan et al., 2007), redução da erosão dental (Kato et al., 2010) e capacidade de redução da halitose causada por componentes sulfúricos voláteis (Xu et al., 2010). Desse modo, além da infusão de chá verde, avaliamos também o desempenho da EGCG aplicada no pré-tratamento da dentina antes da aplicação do sistema adesivo.

Como os polifenóis do chá verde tem capacidade em inibir as MMPs da matriz extracelular, com conseqüente efeito sobre o envelhecimento (Vayalil et al., 2004; Annabi et al., 2002; Demeule et al., 2000), acreditou-se que o EGCG por ser o principal componente ativo do chá verde, também seria capaz de inibir as MMPs presentes na matriz colágena da dentina, quando utilizado isoladamente. Para tal, utilizou-se o mesmo gel inibidor de MMP contendo EGCG 10 µM, que o utilizado por Kato et al. (2010) por apresentar uma redução significativa da erosão dentinária pela possível inibição das MMPs.

Para avaliação da resistência adesiva foram utilizados dois tempos períodos de tempo de armazenamento em água destilada após execução do procedimento adesivo, imediato (24 h) e após 6 meses. Segundo De Munck et al. (2005), a resistência adesiva imediata pouco se relaciona com a longevidade das restaurações, já que a degradação da camada dentinária da interface adesiva ocorre rapidamente, e os materiais restauradores se deterioram por meio de absorção de água com

o passar do tempo, e também porque durante a formação da camada híbrida, sabe-se que as fibras colágenas expostas após o condicionamento ácido não são completamente infiltradas pelos monômeros do sistema adesivo (Wang e Spencer, 2003) ficando susceptíveis a ação dos fluídos orais e das MMPs, o que compromete a longevidade da restauração.

Dessa forma, um estudo realizado por Shirai et al. (2005) que avaliou *in vivo* e *in vitro* a interface adesiva resina-dentina concluiu que a fibra colágena exposta é degradada, particularmente, quando exposta aos fluídos orais ou a água por períodos de tempos que variam de meses a anos. O que corrobora com outro estudo que mostrou que o armazenamento *in vitro* em água ao longo do tempo faz aumentar o número de falhas nas interfaces adesivas (De Munck et al., 2005). Por isso, o presente estudo avaliou a ação dos inibidores de MMP após armazenamento em água destilada em dois diferentes períodos de tempo (24 h e 6 meses), simulando *in vitro* a condição oral de exposição constante da restauração aos fluídos orais, como modo de avaliar a capacidade de manutenção da união dentinária pelos diferentes materiais utilizados.

## **6.2 Dos Resultados**

Apesar dos consideráveis avanços obtidos nos sistemas adesivos presentes hoje no mercado, a interface de união adesiva continua sendo o elo fraco em uma restauração adesiva. No interior da camada híbrida, duas formas de degradação podem ser observadas: incompleta incorporação dos monômeros resinosos do sistema adesivo



entre os espaços interfibrilares e presença de fibras colágenas desprotegidas (Breschi et al., 2007).

Dentro deste contexto, com a descoberta que as MMPs presentes na matriz dentinária, quando liberadas e ativadas, apresentam importante papel na degradação das fibras colágenas expostas abaixo da camada híbrida, pela incompleta penetração dos monômeros resinosos após o condicionamento ácido (Hashimoto et al., 2003b; Pashley et al., 2004), vários estudos *in vitro* e *in vivo* tem sido realizados com o intuito de melhorar a força de união adesiva através da incorporação de substâncias, no protocolo adesivo, capazes de inibir essas MMPs (Chang et al., 2010; Osório et al., 2011; Lafuente et al., 2012).

Dentre as substâncias estudadas como potenciais inibidores de MMPs, favorecendo a manutenção da interface de união resina-dentina, uma das principais é a CLX, que vem sendo introduzida em diversos estudos como etapa complementar do protocolo adesivo, e conseguindo, assim, bons resultados em estudos *in vitro* (Hebling et al., 2005; Carrilho et al., 2007a; Breschi et al., 2009; Loguercio et al., 2009; Breschi et al., 2010; Osório et al., 2011; Lafuente et al., 2012).

A CLX é um antisséptico com efeito antimicrobiano (Davies et al., 1954; Ercan et al., 2002), que inibe a adesão bacteriana em superfícies através da competição com o cálcio ou sítios de retenção e, portanto, pode evitar a formação de pontes de cálcio entre as bactérias e as superfícies orais ou entre bactérias (Gjerme, 1989). O que pode ser efetivo também na inibição das MMPs, já que estas são cálcio e zinco-dependentes (Pashley et al., 2004), e a utilização da CLX poderia de alguma forma competir pelos sítios de cálcio, impedindo a ação das MMPs sobre a degradação da matriz dentinária quando ativadas pela queda do pH (Tjäderhane et al., 1998; Pashley et al., 2004).

Estudos recentes demonstraram que o uso da CLX previamente ao sistema adesivo, sem posterior enxágue, inibiu de

maneira significativa a atividade de degradação da camada híbrida pelas MMPs (Hebling et al., 2005; Loguercio et al., 2009; Lafuente et al., 2012), mesmo em baixas concentrações (Gendron et al., 1999), o que vai ao encontro com os valores de resistência de união para a CLX encontrado em nosso estudo.

Pode se observar na Tabela 3, que o grupo CLX apresentou os maiores valores imediato de resistência de união, semelhante aos resultados obtidos em estudos que utilizaram a mesma concentração de 0,2% de solução aquosa de CLX (Breschi et al., 2009; Loguercio et al., 2009; Breschi et al., 2010).

Quando a CLX é utilizada como etapa adjuvante à adesão dentinária para inibição das MMPs, ela não deve interferir negativamente na adesão imediata com materiais resinosos. Em nosso estudo, semelhantes valores de união imediatos foram alcançados quando utilizadas diferentes estratégias adesivas antes da aplicação do sistema adesivo Single Bond 2 quando comparado ao controle. Com relação a CLX, estes resultados demonstraram que apesar da CLX ser uma molécula grande (massa molecular =  $897,8 \text{ g mol}^{-1}$ ) comparada com alguns monômeros de sistemas adesivos, como o bisfenol glicidil metacrilato (Bis-GMA) (massa molecular =  $512,0 \text{ g mol}^{-1}$ ) e o hidroxietil dimetacrilato (massa molecular =  $130,0 \text{ g mol}^{-1}$ ) (Ricci et al., 2010), a CLX não influenciou negativamente a infiltração dos monômeros resinosos na dentina após o condicionamento ácido, assim como em outros estudos (Brackett et al., 2007; Carrilho et al., 2007b; Campos et al., 2009; Komori et al., 2009).

Os resultados apontam valores de resistência adesiva dentinária após 24 h de imersão em água destilada superiores aos valores obtidos após um período de armazenamento de 6 meses. Isto porque a literatura consultada demonstra que após algum tempo a resistência adesiva diminui, devido à deterioração da interface adesiva (De Munck et al., 2005; Shirai et al., 2005). Essa deterioração pode

ocorrer com o passar do tempo devido a fatores intrínsecos, principalmente pela ação das MMPs presentes na dentina, embora a ação da água sobre os componentes da interface adesiva também possa influenciar na redução dos valores de união, após determinado tempo devido à degradação hidrolítica, assim como a presença de falhas na margem da restauração pode permitir a penetração de MMPs salivares, contribuindo de certa forma com a aceleração do processo de degradação da interface adesiva (Ricci et al., 2010).

Dessa forma, após o armazenamento, foi observada uma redução nos valores de resistência adesiva para todos os grupos, no entanto o grupo controle SB foi o que apresentou maior redução (Tabela 3). Mesmo a CLX tendo apresentado uma redução significativa dos valores de resistência de união estatisticamente comparado ao grupo CLX imediato, esta se manteve maior que os demais grupos.

Portanto podemos considerar que a CLX apresenta um considerável potencial na manutenção da estabilidade de união dentinária após 6 meses de armazenamento, corroborando com vários estudos que indicam um real potencial da CLX em inibir, mesmo que de forma indireta, a ação das MMPs e, com isso, aumentar o tempo de durabilidade das restaurações adesivas (Hebling et al., 2005; Carrilho et al., 2007b; Breschi et al., 2009; Osório et al., 2011).

No entanto, apesar dos resultados promissores mostrados em trabalhos *in vitro* sobre a capacidade de manutenção da resistência adesiva pela CLX em longo prazo, mais estudos *in vivo* precisariam ser realizados para comprovar sua efetividade, assim como estudos para avaliar o efeito do manchamento das restaurações após determinado período de tempo, já que alguns efeitos colaterais quando do uso da CLX como enxaguatório bucal, ainda limitam sua aceitação como elemento complementar no protocolo adesivo, como por exemplo, o aumento dos depósitos de cálculo, a dificuldade de mascarar seu sabor e coloração acastanhada dos dentes após determinado tempo de uso (Bishara et al.,

1998). Entretanto para a finalidade empregada em nosso trabalho, aplicou-se uma pequena quantidade do produto delimitada a cavidade dental, por um período de tempo curto (30 s), por isso acredita-se que os aspectos negativos do seu uso como enxaguatório bucal, não influenciariam quando associado ao protocolo adesivo.

Segundo Carrilho et al. (2007b) e Brackett et al (2007), o tempo de ação prolongado da CLX após um período de armazenamento de 14 e 12 meses, respectivamente, poderia ser explicado pelo confinamento da CLX na interface adesiva, sendo sua eventual remoção minimizada pela formação dos tags resinosos que obliteram os túbulos dentinários, e pelos monômeros resinosos que envolvem as fibras colágenas previamente tratadas pela CLX, e a camada adesiva presente sobre a camada híbrida poderiam contribuir para a preservação da CLX na interface adesiva, e assim prolongar sua ação sobre as MMPs.

Além da CLX, inibidores de MMPs à base de substâncias naturais vêm sendo pesquisados, assim como alguns polifenóis encontrados em algumas plantas e frutos (Strek et al., 2007; Lin et al, 2009; Sen et al., 2009; Zhang et al., 2010). Dessa forma, optou-se pelo uso da solução aquosa de chá verde e do gel a base de EGCG, seu principal componente ativo, no pré-tratamento dentinário antes do procedimento adesivo, visando à manutenção da resistência de união resina-dentina pela inibição das MMPs.

O consumo de chá verde tem mostrado ter efeitos terapêuticos sobre a saúde geral (Arab et al., 2011), ação anti-inflamatória (Dona et al., 2003), antimicrobiana com efeito sobre *S. mutans* (Hamilton-Miller, 2001), sobre a doença periodontal (Kushiyama et al., 2009) e redução na progressão da erosão dental pela inibição das MMPs (Magalhães et al., 2009, Kato et al., 2009), auxiliando na prevenção da saúde bucal (Liao et al., 2001), além de baixa toxicidade em estudos *in vitro* em culturas de hepatócitos de ratos (Schmitz et al., 2005). No entanto, até o presente momento, a utilização do extrato do chá verde em

solução aquosa, preparado como infusão, no pré-tratamento dentinário previamente a aplicação de sistemas adesivos, como agente inibidor das MMPs, semelhante ao procedimento utilizado em nosso estudo, não foi encontrado na literatura consultada.

Os valores imediatos de resistência adesiva obtidos com o chá verde, aplicado após o condicionamento ácido, foram semelhantes ao grupo controle SB, mostrando que o grupo CV não interferiu negativamente na resistência de união imediata (Tabela 3). Pode-se, então, considerar a possibilidade de ter havido uma inibição imediata sobre as MMPs. Todavia, após 6 meses de armazenamento houve uma diminuição desses valores, se assemelhando ao grupo SB 6 meses que apresentou os menores valores de resistência de adesiva. Esse fato pode ter ocorrido pela menor quantidade de polifenóis presentes na solução aquosa do chá verde, responsáveis pela inibição das MMPs, quando comparado com a utilização de seu componente ativo, a EGCG, em que pode ser observado que quando aplicado o gel contendo EGCG, apesar de os valores de resistência adesiva imediata terem sido menores que a dos demais grupos, após 6 meses de armazenamento foi o único grupo que permaneceu com os valores constantes, mantendo a estabilidade de união adesiva. O que corrobora com os resultados encontrados em estudos que utilizaram concentrações de EGCG na manutenção *in vitro* da resistência adesiva após armazenamento por 6 meses, para o mesmo sistema adesivo usado em nossa metodologia (Santiago et al., 2011; Neri et al., 2011).

A quantidade de polifenóis presentes na solução aquosa do chá verde preparado foi de 0,185 mg/ml, o que corresponde a 400  $\mu$ M (Kato et al., 2009). Quando o chá verde foi preparado nessas mesmas proporções, em um estudo para avaliar sua efetividade na redução da erosão, com bochechos de 10 ml por 60 s, este apresentou inibição das MMPs (Kato et al., 2009). Entretanto, o volume de solução aplicada sobre a dentina, previamente condicionada, foi de 1,5  $\mu$ l, o que correspondeu a

uma menor quantidade de polifenóis atuando sobre as MMPs. Além disso, não se sabe ao certo por quanto tempo os polifenóis presentes após o preparo do chá verde ficam ativos, já que após certo tempo após o preparo do chá, estes começam a sofrer um processo de oxidação, que pode levar a perda das suas propriedades, justificando, assim, os resultados encontrados em nosso estudo em relação ao grupo CV, que sofreu uma redução significativa nos seus valores de resistência adesiva após armazenamento por 6 meses quando comparado com seus valores imediatos (Tabela 3).

Outro fator que também deve ser levado em consideração quando do uso do chá verde é a sua coloração amarelo-acastanhada que pode influenciar na coloração das restaurações com RC, principalmente em dentes anteriores, sendo necessários estudos mais aprofundados para verificar sua efetiva capacidade de inibição das MMPs, com conseqüente influência na estabilidade adesiva, sem interferência nas propriedades ópticas das restaurações.

Devido à instabilidade do chá verde na forma de solução aquosa com o passar do tempo, que pode influenciar negativamente em suas propriedades, uma alternativa que parece viável na manutenção da estabilidade de união resina-dentina em longo prazo é o uso de seus componentes ativos de maneira isolada, devido às suas propriedades. Estudos prévios mostraram que os polifenóis do chá verde podem ser capazes de inibir a atividade das colagenases que atuam sobre a degradação do colágeno, em especial a EGCG (Demeule et al., 2000; Madhan et al., 2007; Magalhães et al., 2009).

A EGCG apresenta dentre suas características, ação antimicrobiana, antioxidante, antimutagênica, anti-inflamatória e anticancerígena, além da sua baixa toxicidade mesmo que usada em altas concentrações (Kaneko et al., 2001; Hirasawa et al., 2006; Isbrucker et al., 2006; Ostersburg et al., 2009; Rasheed et al., 2009). Madhan et al. (2007) especulam que uma maior inibição das colagenases pela EGCG

pode ser atribuída a interações hidrófobas e a adesão aos sítios ativos da EGCG pelas colagenases, através das ligações de hidrogênio. Além disso, a EGCG apresenta capacidade em inibir a ação e expressão das MMPs -2 e -9, sendo essa inibição não competitiva, tempo e dose dependente, sem quelação dos íons cálcio e zinco (Garbisa et al., 2001), essenciais para a atividade das MMPs (Yun et al., 2004; Sen et al., 2009).

Isso poderia de certa forma explicar os resultados encontrados no presente estudo com relação ao grupo EGCG (Tabela 3), que manteve seus valores de resistência de união constantes, sem diferença estatística, quando comparado os períodos de tempo imediato e após 6 meses de armazenamento. Quando comparado aos demais grupos, a EGCG apresentou os menores valores de união imediatos, no entanto após 6 meses de armazenamento todos os outros grupos tiveram uma redução significativa nos valores obtidos, enquanto a EGCG permaneceu estável, sugerindo que devido às suas propriedades, esta foi capaz de inibir a ação das MMPs e manter a resistência de união resina-dentina estável mesmo após armazenamento.

Em nosso estudo foi utilizada a EGCG em forma de gel, associada a outros componentes. Talvez se esta fosse utilizada em outra forma de aplicação, ou sem associação a outros componentes, que de alguma forma podem vir a interferir na adesão ou não inibição das MMPs dentinárias previamente condicionada, poderia então haver uma maior resistência de união imediata com manutenção da adesão por um período de tempo maior.

Um estudo recente comparando diferentes concentrações de EGCG (0,02%, 0,1% e 0,5%) sobre a interface adesiva dentinária, imediata e após 6 meses de armazenamento por teste de microtração, após o condicionamento ácido e previamente a aplicação do sistema adesivo Single Bond 2 (3M / ESPE) observou que todas as concentrações usadas foram capazes de manter a resistência de união após o período de 6 meses, sendo a concentração de 0,1% a que apresentou os maiores

valores após armazenamento (Santiago et al., 2011). Outro estudo comparando o efeito da EGCG 0,1% e da CLX 2% sobre a resistência de união adesiva dentinária imediata e após 6 meses de armazenamento mostrou que o grupo que utilizou EGCG apresentou os maiores valores de união após 6 meses, mas estatisticamente semelhantes ao da CLX (Neri et al., 2011).

Pouco se sabe a respeito dos reais benefícios da aplicação da EGCG sobre a dentina previamente condicionada e sua capacidade de inibição das MMPs, necessitando de estudos *in vitro* e *in vivo* mais aprofundados para melhor compreender seu mecanismo de ação e reais benefícios na preservação da resistência de união resina-dentina. Além disso, a EGCG apresenta como vantagem da sua utilização baixa toxicidade mesmo em altas concentrações e ação anti-inflamatória podendo ser usado em cavidades de qualquer profundidade, mesmo que profundas e com alto risco de microexposição pulpar (Isbrucker et al., 2006). Portanto, a EGCG pode vir a ser uma substância com potencial efeito sobre a manutenção da resistência adesiva em longo prazo.

Dessa forma, mais pesquisas *in vivo* e *in vitro* devem ser realizadas para que se encontre uma maneira realmente eficaz de garantir uma perfeita infiltração dos monômeros resinosos em meio às fibras colágenas com consequente manutenção da interface de união adesiva em longo prazo e efetiva inibição dos fatores responsáveis pela degradação da camada híbrida, como a água, as enzimas proteolíticas (MMPs) e as enzimas salivares, alcançando, assim, a longevidade clínica das restaurações adesivas. É necessária, então, a realização de outras pesquisas que solidifiquem as hipóteses testadas nesse estudo.



## 7 CONCLUSÕES

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

- a) O uso da clorexidina 0,2% apresentou os maiores valores de resistência de união imediatos e manutenção da interface adesiva após 6 meses de armazenamento;
- b) O uso do chá verde não influenciou a resistência adesiva imediata. Após 6 meses de armazenamento ocorreu redução nos valores de resistência de união;
- c) O uso da epigallocatequina-3-galato apresentou menor valor de resistência adesiva imediata, porém manteve os valores constantes de resistência de união após 6 meses de armazenamento;
- d) O armazenamento influenciou os valores de resistência de união resina-dentina, com redução da resistência adesiva após o período de 6 meses.

## 8 REFERÊNCIAS\*

Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, Beliveau R. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1542(1-3):209-20.

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

Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffon JE, et al. Resin-Dentin interfacial ultra-structure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. *Oper Dent*. 2004;29(6):705-12.

Astill C, Birch MR, Dacombe C, Humphrey PG, Martin PT. Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *J Agric Food Chem*. 2001;49(11):5340-7.

Baba N, Taira Y, Matsumura H, Atsuta M. Effect of disinfectants containing glutaraldehyde on bonding of a tri-n-butylborane initiated resin to dentine. *J Oral Rehabil*. 2002;29(5):478-83.

Baseren M. Surface roughness of nanofill and nanohybrid composite resin and ormocer-based tooth-colored restorative materials after several finishing and polishing procedures. *J Biomater*. 2004;19(3):121-34.

---

\*Baseado em:

Internacional Comitê de Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referents [homepage na Internet]. Bethesda: US National Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

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

Bishara SE, Vonwald BA, Zamtua J, Damon PL. Effects of various methods of chlorhexidine application on shear bond strength. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 1998;20(2):150-3.

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.

Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH, Tjäderhane L. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers *in vivo*. *Oper Dent*. 2007;32:107-11.

Braga RR, Meira JB, Boaro LC, Xavier TA. Adhesion to tooth structure: a critical review of "macro" test methods. *Dent Mater*. 2010;26(2):38-49.

Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano. Dental Adhesion review: aging and stability of bonded interface. *Dental Mater*. 2007;24:90-101.

Breshi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month *in vitro* study. *J Adhes Dent*. 2009;11(3):191-8.

Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year *in vitro* study. *Den Mat*. 2010;26:320-5.

Buonocore MA. Simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Research*. 1955;34(6):849-53.

Campos EA, Correr GM, Leonarde DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time

under simulated pulpar pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent*. 2009;37:108-14.

Cardoso PEC, Braga RR, Carrilho MRO. Evaluation of micro-tensile, shear and tensile tests determining the bond strength of three adhesive systems. *Dent Mater*. 1998;14(6):394-8.

Carrilho MRO, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*. *J Dent Res*. 2007a;86(1):90-4.

Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Tjäderhane L, Reis AF, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res*. 2007b;86(6):529-33.

Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjaderhane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;90:373-80.

Castro AKBB, Amaral CM, Ambrosano GMB, Pimenta LAF. Effect of sodium hypochlorite gel on shear bond strength of one-bottle adhesive systems. *Bras J Oral Sci*. 2004;3(9):465-9.

Chang YE, Shin DH. Effect of Chlorhexidine Application Methods on Microtensile Bond Strength to Dentin in Class I Cavities. *Oper Dent*. 2010;35(6):618-23.

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

Chen Z, Zhu QY, Tsang D, Huang Y. Degradation of green tea catechins in tea drinks. *J Agric Food Chem*. 2001;49(1):477-82.

Cheng TO. All teas are not created equal: the chinese green tea and cardiovascular health. *Int J Cardiol*. 2006;108(3):301-8.

Dalluge JJ, Nelson BC, Brown Thomas J, Sander LC. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1998;793(2):265-74.

Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. Laboratory investigation of a new anti-bacterial agent of high potency. *British J Pharmacol*. 1954;9:192-6.

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.

De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*. 2003;82(2):136-40.

De Munck J, Shirai K, Yoshida Y, Inoue S, Van Landuyt K, et al., A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*. 2005;84(2):118-32.

De Munck J, Shirai K, Yoshida Y, Inoue S, Van Landuyt K, Lambrechts P, et al. Effect of water storage on the bonding effectiveness of 6 adhesives to Class I cavity dentin. *Oper Dent*. 2006;31(4):456-65.

Dona M, Dell'Aica I, Calabrese F, Benelli R, Morini M, Albini A, Garbisa S. Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *J Immunol*. 2003;170(8):4335-41.

Duffy SJ, Keaney Jr. JF, 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.

Ercan E, Özekinci T, Atakul F, Gül Kadri. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: *In vivo* study. *J Endod*. 2002;30(2):84-7.

Ferrara L, Montesano D, Senatore A. The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (*Camellia sinensis*). *Il Farmaco*. 2001;56(5-7):397-401.

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

Fusayama T, Okuse K, Hosoda H. Relationship between hardness, discoloration, and microbial invasion in carious dentin. *J Dent Res*. 1966;45(4):1033-46.

Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, Albini A. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer*. 2001;91(4):822-32.

Garcia FCP, D'Alpino PHP, Tereda RSS, Carvalho RM. Testes mecânicos para avaliação laboratorial da união resina/dentina. *Rev Fac Odontol Bauru*. 2002;10(3):118-27.

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 surface. *J Endod*. 2001;27(5):321-4.

Gendron R, Greiner D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8 and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6:437-9.

Gjermeo P. Chlorhexidine and related compounds. *J Dent Res*. 1989;68(Special Issue):1602-8.

Hamilton-Miller JMT. Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(11):2375-7.

Hamilton-Miller JMT. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol.* 2001;50:299-302.

Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serrab MC, Curya JA. Caries Progression and Inhibition in Human and Bovine Root Dentine in situ. *Caries Res.* 2003;37:339-44.

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y, et al. Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(3):306-11.

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

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. Degradation patterns of different adhesives and bonding procedures. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003b;66(1):324-30.

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;22:560-8.

Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005;84(8):741-6.

Henning SM, Niu Y, Lee NH. 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.

Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003;43(1):89-143.

Hirasawa M, Takada K, Otake S. Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by green tea catechins. *Caries Res.* 2006;40:265-70.

Isbrucker RA, Bauschi J, Edwards JA, Wolz E. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparation. Part 1: genotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2006;44(5):626-35.

Kaneko T, Baba N, Matsuo M. Structure-activity relationship of antioxidants for inhibitors of linoleic acid hydroperoxide-induced toxicity in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Cytotechnology.* 2001;35(1):43-55.

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

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MAR. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res.* 2010; 89(5):468-472.

Kawai K, Tsuno NH, Kitayama J, Okaji Y, Yazawa K, Asakage M, et al. Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding. *J. Allergy Clin Immunol.* 2003;112(5):951-7.

Komori PC, Pashley DH, Tjaderhane L, Breschi L, Mazzoni A, De Goes MF, et al. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2009;34:379-83.

Kushiyama M, Shimazaki Y, Murakami M, Yamashita Y. Relationship between intake of green tea and periodontal disease. *J Periodontol.* 2009;80(3):372-7.

Lafuente D. SEM Analysis of hybrid layer and bonding interface after chlorhexidine use. *Oper Den.* 2012;87(2):172-80.

Lee SY, GreenerEH, Mueller HJ. Effect of food and oral simulating fluids on structure of adhesive composite systems. *J Dent.* 1995;23(1):27-35.

Liao S, Kao YH, Hiipakka RA. Green tea: biochemical and biological basis for health benefits. *Vitam Horm.* 2001;62:(1):94.



Lin SS, Lai KC, Hsu SC, Yang JS, Kuo CL, Lin JP, et al. Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Cancer Lett.* 2009;285(2):127-33.

Loguercio AD, Uceda-Gomez, Carrilho MRO, Reis A. Influence of specimen size and regional variation on long-term resin-dentin bond strength. *Dent Mater.* 2005;21(3):224-231.

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;117:587-96.

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

Magalhães AN, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MAR. Chlorhexidine and Green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent.* 2009;37:994-8.

Manfredini V, Martins VD, Benfato MS. Chá verde: benefícios para a saúde humana. *Infarma.* 2004;16(9-10):68-70.

Martin de las-Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2000;45:757-65.

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. Erratum in: *J Dent Res.* 2007;86(8):792.

Mellberg JR Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res.* 1992;71:913-9.

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

Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res.* 1983;62:1076-81.

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;118:145-50.

Nakaoki Y, Nikaido T, Burrow MF, Tagami J. Effect of residual water on dentin bond strength and hybridization of a one-bottle adhesive system *Oper Dent.* 2002;27(6):563-8.

Neri JR, Osorio R, Santiago SL, Fernandes CADO, Mendonça RM, Carvalho RM, et al. Effects of dentin pretreatment on the preservation of resin-dentin bonds [abst 2469]. In: *Proceedings of the 89th IADR Mar; San Diego, USA; 2011* [acesso 20 set 2012]. Disponível em: <http://iadr.confex.com/iadr/2011sandiego/webprogramschedule/Paper150183.html>

Nikaido T, Kunzelmann KH, Chen H, Ogata M, Harada N, Yamaguchi S, et al. Evaluation of thermal cycling and mechanical loading on bond strength of a self-etching primer system to dentin. *Dent Mater.* 2002;18(3):269-75.

Nishitani Y, Yoshiama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:160-6.

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.

Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruíz-Requena ME, Pashley D, Tay F, et al. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on

metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci.* 2011;119:79-85.

Osterburg A, Gardner J, Hyon SH, Neely A, Babcock G. Highly antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates are killed by green tea polyphenol (-)epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Clin Microbiol Infect.* 2009;13(4):341-6.

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

Pashley DH, Sano H, Cicchi B, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents: a review. *Dent Mater.* 1995;11(2):117-25.

Pashley DH, Carvalho RM. Dentin permeability and dentin adhesion. *J Dent.* 1997;25:355-72.

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, 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.

Perdigão 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.

Rasheed Z, Anbazhagan NA, Akhtar N, Ramamurthy N, Voss FR, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits advanced glycation end products-induced expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and matrixmetalloproteinase-13 in human chondrocytes. *Arthritis Res Therapy.* 2009;11(3):1-13.

Reis A, Grandi V, Carlotto L, Bortoli G, Patzlaff R, et al. Effect of smear layer thickness and acidity of self-etching solutions on early and long-term bond strength to dentin. *J Dent*. 2005;33:549-59.

Ricci HA, Sanabe ME, Costa CAS, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of *in vitro* resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci*. 2010;118:411-6.

Saito T, Miyata G. The nutraceutical benefit. Part I: green tea. *Nutrition*. 2000;16(5):315-7.

Sadek FT, Moura SK, Ballester RY, Muench A, Cardoso PE. The effect of long-term storage on the microleakage of composite resin restorations: quantitative evaluation. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17(3):261-6.

Salz U, Zimmermann J, Zeuner F, Moszner N. Hydrolytic stability of self-etching adhesive systems. *J Adhes Dent*. 2005;1:107-16.

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

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;10:236-40.

Sano H, Yoshikawa T, Pereira PNR, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, et al. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, *in vivo*. *J Dent Res*. 1999;78(4):906-11.

Santiago SL, Osorio R, Neri JR, Mendonça J, Carvalho RM, Fernandes CADO, et al. Effect of epigallocatechin-3-galate on the preservation of resin-dentin bond strength [abst 1916]. In: Proceedings of the 89th IADR Mar; San Diego, USA; 2011 [acesso 20 set 2012]. Disponível em: <http://iadr.confex.com/iadr/2011sandiego/webprogram/Paper149989.html>

Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(2):229-37.

Saunders WP. The shear impact retentive strengths of four dentine bonding agents to human and bovine dentine. *J Dent.* 1988;16:223-38.  
Schilke R, Lisson JA, Bauß O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch of Oral Biol.* 2000;45:355-61.

Schmitz W, Saito AY, Estevão D, Saridakis HO. Green tea as a chemoprotector. *Semina* 2005;26(2):119-30.

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

Sen T, Moulik S, Dutta A, Choudhury PR, Banerji A, Das S, Roy M, Chatterjee A. Multifunctional effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in downregulation of gelatinase-A (MMP-2) in human breast cancer cell line MCF-7. *Life Sci.* 2009;84(7):194-204.

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

Shirai K, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Lambrechts P, Suzuki K, et al. Effect of cavity configuration and aging on bonding effectiveness of six adhesives to dentin. *Dent Mater.* 2005;21:110-24.

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, Russel CM, et al. Durability of resin-dentin bonds. *J Adhes Dent.* 1999b;1(3):211-8.

Shu WS, Zhang ZQ, Lan CY, Wong MH. Fluoride and aluminium concentrations of tea products from Sichuan Province, PR China. *Chemosphere*. 2003;52(9):1475-82.

Stanislawczuk R, Loguercio AD, Reis A. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *J Dent*. 2011;39:40-7.

Stapleton PD, Shah S, Anderson JC, Hara Y, Hamilton-Miller JMT, Taylor PW. Modulation of  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *Int J Antimicrob Agents*. 2004a;23:462-7.

Stapleton PD, Shah S, Hamilton-Miller JMT, Hara Y, Nagaoka Y, Kumagai A, et al. Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins. *Int J Antimicrob Agents*. 2004b;24:374-80.

Strek M, Gorlach S, Podsedek A, Sosnowska D, Koziolkiewicz M, Hrabec Z, Hrabec E. Procyanidin oligomers from Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) fruit inhibit activity of MMP-2 and MMP-9 metalloproteinases. *J Agric Food Chem*. 2007;55(16):6447-52.

Sugiyama T. A Study on mammalian teeth. *Yokohama Med J*. 1961;12:85-109.

Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res*. 2001;80:1545-9.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T, et al. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2006;52(2):121-7.

Sumpio BE, Cordova AC, Berke-Schlessel DW, Qin F, Chen QH. Green tea, the "Asian Paradox", and cardiovascular disease. *J Am Coll Surg*. 2006;202:813-20.

Susin AH, Vasconcellos WA, Saad JR, Oliveira Jr OB. Tensile bond strength of self-etching versus total-etching adhesive systems under different dentinal substrate conditions. *Braz Oral Res.* 2007;21(1):81-6.

Suyama E, Tamura T, Ozawa T, Suzuki A, Iijima Y, Saito T. Remineralization and acid resistance of enamel lesions after chewing gum containing fluoride extracted from green tea. *Aust Dent J.* 2011;56:394-400.

Tanaka T, Kouno I. Oxidation of tea catechins: chemical structures and reaction mechanism. *Food Sci Technol Res.* 2003;9(2):128-33.

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

Tay FR, Hashimoto M, Pashley DH, Peters MC, Lai SC, Yiu CK, et al. Aging affects two models of nanoleakage expression in bonded dentin. *J Dent Res.* 2003;82(7):537-41.

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. The effect of various storage methods and media on shear bond strengths of dental composite resin to bovine dentin. *Arch Oral Biol.* 1998;43(4):305-11.

Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Saxlo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998;77(8):1622-9.

Tonami K, Takahashi H, Nishimura F. Effect of frozen storage and boiling on tensile strength of bovine dentin. *Dent Mater J.* 1996;15(2):205-11.

Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mine A, Van Ende A, Neves A, et al. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dent Mater.* 2010;26e:100-22.

Vayalil PK, Mittal A, Hara Y, Elmets CA, Katiyar SK. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *Soc Invest Dermatol.* 2004;122(6):1480-7.

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

Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. *Trends Food Sci Technol.* 2000;11(4-5):152-60.

Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesives/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res.* 2003;82:141-5.

Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T. Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion /abrasion tests? *J of Oral Rehabil.* 2008;35:390-4.

Xie M, von Bohlen A, Klockenkämper R, Jian X, Günther K. Multielement analysis of Chinese tea (*Camellia sinensis*) by total-reflection X-ray fluorescence. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A.* 1998;207(1):31-8.

Xu X, Zhou XD, Wu CD. Tea Catechin EGCg suppresses the *mgl* gene associated with halitosis. *J Dent Res.* 2010;89(1):1304-8.

Yap AU, Yap SH, Teo CK. Finishing and polishing of composite and compomer restoratives. Effectiveness of one-step systems. *Oper Dent.* 2004;29(3):275-9.



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.* 2005;20:1-6.

Yamauti M, Hashimoto M, Sano H, Ohno H, Carvalho RM, Kaga M, et al. Degradation of resin-dentin bonds using NaOCl storage. *Dent Mater.* 2003;19(5):399-405.

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

Zhang C, Li Y, Shi X, Kim SK. Inhibition of the expression on MMP-2, 9 and morphological changes via human fibrosarcoma cell line by 6,6'-bieckol from marine alga *Ecklonia cava*. *Korean Biochem Mol Biol.* 2010;43(1):62-8.

Zhu QY, Zhang A, Tsang D, Huang Y, Chen Z. Stability of green tea catechins. *J Agric Food Chem.* 1997;45(12):4624-8.

Zhu Y, Huang H, Tu Y. A review of recent studies in china on the possible beneficial health effects of tea. *International journal of food science and technology.* 2006;41(4):333-40.

## ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Dir. Francisco José dos Santos, 777 - Rê São Diniz  
CEP: 12261-900 - F: (12) 3947-9028 / 9086  
Fax: (12) 3947-9010 - guedes@foajc.unesp.br / yasmin@foajc.unesp.br

---

 **Comitê de Ética em Pesquisa-Local  
Envolvendo animais**

São José dos Campos, 13 de abril de 2012

Ofício nº 02/2012/CEPa

Prezada Senhora

Esclarecemos que não há necessidade do projeto intitulado **"Influência do chá verde e da clorexidina na resistência de união e durabilidade adesiva"** de sua responsabilidade, ser analisado por este Comitê, porque a pesquisa em tela não envolve a utilização de vertebrados e sim o uso de dentes bovinos como substrato comercialmente disponível, de acordo com a Lei nº 11.794 de 08/10/2008 – Lei "Arouca".

Atenciosamente,  
  
Prof.Assist.Dr. RUBENS NISIE TANGO  
Coordenador

Sra. BEATRIZ MARIA DA FONSECA  
Depart.de Odontologia Restauradora  
Programa de Pós-Graduação Odontologia Restauradora  
UNESP-Campus de São José dos Campos  
Faculdade de Odontologia