

LETÍCIA CARVALHO COUTINHO COSTA PEROTE

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS
DE METALOPROTEINASES E DE TIPOS DE
ENVELHECIMENTO NA RESISTÊNCIA DE UNIÃO ENTRE
DENTINA E RESINA COMPOSTA**



2012

LETÍCIA CARVALHO COUTINHO COSTA PEROTE

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS DE
METALOPROTEINASES E DE TIPOS DE ENVELHECIMENTO NA
RESISTÊNCIA DE UNIÃO ENTRE DENTINA E RESINA COMPOSTA**

Dissertação apresentado à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Dentística.

Orientador: Prof. Assist. 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.

P424e Perote, Leticia Carvalho Coutinho Costa

Efeito da utilização de substâncias inibidoras de metaloproteinasas e de tipos de envelhecimento na resistência de união entre dentina e resina composta / Leticia Carvalho Coutinho Costa Perote. - São José dos Campos : [s.n.], 2012.
78 .f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.
Orientador: Prof. Dr. Cesar Rogério Pucci.

1. Resina composta. 2. Metaloproteinasas da matriz. 3. Envelhecimento. 4. Resistência à tração I. Pucci, Cesar Rogério. 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, 14 de Agosto de 2012 .

Assinatura :

E-mail: leticiaccc@gmail.com

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. César Rogério Pucci (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP- Univ Estadual Paulista

Prof. Dr. Carlos Rocha Gomes Torres

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP- Univ Estadual Paulista

Prof. Dr. Ricardo Amore

Instituto de Ciências da Saúde da UNIBAN

São José dos Campos, 04 de julho de 2012

DEDICATÓRIA

A Deus, único que é digno de receber toda glória. Se sou ou fiz alguma coisa, foi por Sua graça e misericórdia. É maravilhoso poder descansar nisso.

Ao meu melhor amigo, meu grande amor e meu marido, José A. Perote Filho. Sua companhia faz cada dia valer a pena.

A memória do meu pai, Linoel Coutinho Costa. Entre tantas outras coisas, me ensinou que as mais duras batalhas podem ser enfrentadas com um sorriso no rosto. Sinto sua falta todos os dias.

À minha mãe, Vania B. C. C. Costa. Ninguém tem um sorriso maior pelas minhas conquistas. Palavras não são suficientes para agradecer.

À minha vó, Maria D'Ajuda, pelo amor e torcida diários.

Aos meus irmãos André Luiz, Larissa e Camila C. C. Costa, por existirem. Isso muda tudo.

Aos meus irmãos por tabela, Ana Luiza, Lícia e Guilherme, pela amizade e por também serem família.

Aos meus sogros Linda e Perote, por todo o apoio e por apostarem no meu sucesso.

Aos meus queridos tios, por me ajudarem a entender o sentido de ser família.

Aos pequenos Rafael e Miguel, queridos sobrinhos. Por toda alegria que trazem.

Aos queridos amigos, por ora denominados "Masters". Por me ajudarem a carregar meu fardo.

Às amigas Érica, Isabela e Paulina, pela amizade de todas as horas e pelas orações.

Às queridas amigas Adele, Alline, Érika, Katy, Paula e Vivian, pela amizade fiel. Os corredores da FOSJC nunca mais foram os mesmos.

À querida amiga Graziela Ribeiro Batista. Seus conselhos e ajudas foram incontáveis. Sua amizade, indispensável.

À querida amiga Maria Beatriz Beber Kamosaki, companheira de aventuras. Estávamos exatamente no mesmo barco. Sua companhia foi um bálsamo.

À querida amiga Natália Cortez Gutierrez, por ter adicionado tanta alegria em cada dia. Brilha muito!

Amo-os demais! Já dizia Tom Jobim, "É impossível ser feliz sozinho".

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Cesar Rogério Pucci, por toda a ajuda, orientação, paciência e convivência amigável.

A Daphne, Heleine, Luciana, Beatriz, Ana Luiza, Tânia e Priscila. Por toda a ajuda e amizade.

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 Prof^a. Márcia Carneiro Valera Garakis e também da coordenadora da especialidade de Dentística, Prof^a. Maria Amélia Máximo de Araújo.

Aos docentes do programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, pela disposição em colaborar e orientar.

A secretária Rosângela, técnicas Fernanda e Josiana, e funcionária Marinete do departamento de Odontologia Restauradora pela solicitude, auxílio e amizade.

À equipe da secção técnica de Pós-Graduação Rosemary, Bruno e Erena, pelas informações indispensáveis em todo este período.

Ao professor Ivan Balducci, pela valiosa ajuda com o tratamento estatístico dos dados.

À professora Symone Cristina Teixeira e ao professor Lafayette Nogueira Jr, por todo o conhecimento compartilhado e incentivo.

À CAPES pela concessão de bolsa.

*“O saber ensoberbece, mas o amor edifica. Se alguém julga saber alguma coisa,
com efeito, não aprendeu ainda como convém saber.”*

I Co 8: 1b e 2

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	08
LISTA DE TABELAS.....	11
RESUMO.....	12
<i>ABSTRACT</i>	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Degradação da interface adesiva.....	18
2.2 Ação colagenolítica das metaloproteinases.....	22
2.3 Simulação de pressão pulpar.....	27
2.4 Própolis.....	31
2.5 Clorexidina como inibidor de MMP.....	34
3 PROPOSIÇÃO.....	38
4 MATERIAL E MÉTODO.....	39
4.1 Delineamento Experimental.....	39
4.2 Preparo dos Espécimes.....	40
4.3 Divisão dos Grupos Experimentais.....	41
4.4 Simulação de Pressão Pulpar.....	44
4.5 Técnica Restauradora.....	45
4.6 Envelhecimento.....	47
4.7 Teste de Microtração.....	49
4.8 Análise Ilustrativa por MEV.....	50
4.9 Análise do pH das Soluções.....	51
4.10 Planejamento Estatístico.....	51
5 RESULTADOS.....	53
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÃO.....	67
8 REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO A.....	77
ANEXO B.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A) Molar humano; B) Corte do dente em cortadeira de precisão; C) Segmento obtido após corte; D) Vista inferior do molar após remoção da polpa; E) Criação substrato padrão; F) Aferição da espessura de dentina com espessímetro.....	41
Figura 1 – Divisão dos grupos experimentais.....	42
Figura 3 – Dispositivo para simulação de pressão pulpar.....	45
Figura 4 – A) Condicionamento ácido; B) Aplicação de solução correspondente; C) Remoção do excesso com papel absorvente; D) Aplicação do adesivo; E) Fotopolimerização; F) Restauração finalizada.....	46
Figura 5 – A) Máquina de Desgaste Termomecânico; B) Espécime posicionado na máquina.....	48
Figura 6 – Potes contendo saliva artificial e espécime.....	48
Figura 7 – A) Amostra fixada sobre resina acrílica; B) Corte longitudinal da amostra; C) Corte transversal da amostra; D) Paquímetro medindo palito; E) Palito colado no dispositivo de metal; F) Dispositivo na máquina de testes universais; G) Palito fraturado.....	49

Figura 8 – A) Máquina de Testes Universais; B) Estereomicroscópio optico.....	50
Figura 9 – Médias de resistência de união(MPa) para os diferentes grupos.....	55
Figura 10- Porcentagem de tipos de fratura após teste de microtração para cada subgrupo, sendo A – Adesiva; CD – Coesiva em dentina; CR – Coesiva em resina; M – Mista.....	55
Figura 11 - Fotomicrografia de MEV da superfície dentinária de palitos após fratura avaliada como adesiva para o grupo GC. Aumento de 5000X. A) GC. I; B) GC. A; C) GC.C.....	56
Figura 12 - Fotomicrografia de MEV da superfície dentinária de palitos após fratura avaliada como adesiva para o grupo CLX. Aumento de 5000X. A) CLX. I; B) CLX. A; C) CLX. C.....	57
Figura 13 - Fotomicrografia de MEV da superfície dentinária de palitos após fratura avaliada como adesiva para o grupo EPE. Aumento de 5000X. A) EPE. I; B) EPE. A; C) EPE. C.....	57
Figura 14 - Fotomicrografia de MEV da superfície dentinária de palitos após fratura avaliada como adesiva para o grupo PA. Aumento de 5000X. A) PA. I; B) PA. A; C) PA. C.....	58
Figura 15 - Fotomicrografia de MEV da superfície dentinária de palitos após fratura avaliada como adesiva para o grupo AE. Aumento de 5000X. A) AE. I; B) AE. A; C) AE. C	58

Figura 16 - Fotomicrografia de MEV da superfície dentinária de palito após fratura. Bolhas na superfície causadas pela simulação de pressão pulpar. Aumento de 1000X..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Materiais utilizados, fabricantes e suas composições.....	43
Tabela 2 – pH das soluções.....	51
Tabela 3 – Resultado da ANOVA 2 fatores.....	53
Tabela 4 – Resultados do teste de Tukey para o fator envelhecimento.....	53
Tabela 5 – Valores de média e desvio-padrão de resistência de união (MPa) para cada subgrupo.....	54

Perote LCCC. Efeito da utilização de substâncias inibidoras de metaloproteinases e de tipos de envelhecimento na resistência de união entre dentina e resina composta [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 influência de soluções inibidoras de metaloproteinases e de tipos de envelhecimento na resistência de união entre resina e dentina. Para isto, foram obtidos segmentos coronários de 105 molares humanos. As amostras foram conectadas a um dispositivo de simulação de pressão pulpar, ajustado para 20 cm H₂O. Foi realizado condicionamento com ácido fosfórico 37% por 15s, lavagem e secagem com papel absorvente. Em seguida, foram divididas em 5 grupos, de acordo com a solução aplicada por 1min: **GC**(Grupo Controle – nenhuma solução), **CLX** (Digluconato de Clorexidina 0,2%), **EPE** (Extrato de própolis etílico 10%), **PA** (Extrato de própolis aquoso) e **AE** (Álcool etílico 70%). Aplicou-se o adesivo (Adper Single Bond 2) e resina composta (Filtek Z350XT) em todas as amostras. Os grupos foram subdivididos de acordo com o tipo de envelhecimento: **I** (Corte Imediato), **A** (Armazenamento em saliva artificial por 6 meses) e **C** (Ciclagem termomecânica, 240.000 ciclos térmicos e 1000 ciclos mecânicos). As amostras foram cortadas em palitos e submetidas ao teste de microtração. Os dados de resistência de união (MPa) foram submetidos à ANOVA dois fatores. Para o fator soluções, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,32$). Para o fator envelhecimento, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,00$). Foi realizado então o teste de Tukey para o fator envelhecimento, cujos resultados foram **I**: 31,09a; **A**: 24,44b; **C**: 26,78b. Concluiu-se que as soluções inibidoras de metaloproteinases utilizadas não interferiram na resistência de união e que o armazenamento em saliva artificial por 6 meses e a ciclagem termomecânica diminuíram a resistência de união entre dentina e resina composta.

Palavras-Chave: Resina Composta. Metaloproteinases da matriz. Envelhecimento. Resistência à tração.

Perote LCCC. Effect of metalloproteinase inhibiting substances and aging processes on the bond strength between dentin and composite resin [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

*This study aimed to assess the influence of metalloproteinase inhibiting solutions and aging processes on the bond strength between resin and dentine. To do so, crown segments of 105 human molars were obtained. Samples were connected to a pulp pressure simulation device, adjusted to 20 cm H₂O. Conditioning was accomplished with 37% phosphoric acid for 15 seconds, washing and drying with absorbing paper. Then, samples were split into 5 groups, according to the solution applied for 1min: **GC** (Control group – no solution), **CLX** (Chlorhexidine digluconate 0.2%), **EPE** (Ethanollic propolis extract 10%), **PA** (Aqueous propolis extract) e **AE** (Ethanol 70%). Adper Single Bond 2 and composite resin (Filtek Z350XT) were applied in all samples. Groups were subdivided according to the aging process: **I** (Immediate cut), **A** (Storage in artificial saliva for 6 months) and **C** (Thermomechanical cycling, 240,000 thermal cycles and 1,000 mechanical cycles). Samples were cut in beams and went through microtraction tests. Bond strength data (MPa) were analyzed by two-factor ANOVA. For the factor Solutions, there was no statistically significant difference among the groups ($p = 0.32$). For the fator Aging, statistically significant difference was found among the groups ($p=0,00$). Tukey test was performed for Aging factor: **I**: 31,09a; **A**: 24,44b; **C**: 26,78b. It was concluded that the utilized metalloproteinase inhibiting solutions have not interfered in the bond strength, and storage in artificial saliva for 6 months and thermomechanical cycling reduced the bond strength between dentin and composite resin.*

Keywords: Composite resin. Matrix metalloproteinase. Aging. Tensile strength.

1 INTRODUÇÃO

As resinas compostas demonstraram uma grande melhora nos últimos anos. Atualmente, elas são mais duráveis, estéticas e previsíveis. Usadas em conjunto com os sistemas adesivos, as resinas compostas podem ser unidas ao esmalte de modo durável e confiável (Murchison et al., 2006). Durante as duas últimas décadas, avanços químicos e técnicos contribuíram para o aumento da qualidade dos sistemas adesivos e, com isso, também o aumento da resistência de união da resina à dentina, embora esta ainda não seja tão confiável quanto ao esmalte. (Murchison et al., 2006; Carvalho et al., 2012).

A diferença entre a adesão ao esmalte e à dentina ocorre em virtude das diferenças na constituição destes tecidos. Enquanto o esmalte é composto principalmente por material inorgânico (96% em peso e 86% em volume de hidroxiapatita), a dentina é composta, em volume, por 45 a 50% de cristais inorgânicos de hidroxiapatita, 35% de matriz orgânica e 25% de água (Nicholson, 2006). Portanto, um dos desafios da união à dentina se dá pelo maior conteúdo de água e matriz orgânica.

A perda prematura da resistência de união é um dos problemas que ainda afeta as restaurações adesivas (Mjör et al., 2000) e diminui acentuadamente sua durabilidade (De Munck et al., 2005).

As metaloproteinases (MMPs) constituem uma família de mais de 20 enzimas, dependentes de zinco e cálcio, que degradam uma variedade de componentes da matriz extracelular (Cawe et al., 2007; Clark et al 2008.; Overall, López-Otín, 2002). São tradicionalmente divididas em collagenases, gelatinases, estromelinas e MMPs tipo membrana (Brinckerhoff & Matrisian, 2002). Na dentina, podem ser

encontradas diversas metaloproteinases, como MMP-2 e MMP-9 (gelatinases), MMP-20 (enamelinase), MMP-3 (estromelinase-1), MT1-MMP (tipo membrana) e MMP-8 (colagenase-2) (Niu et al., 2011; Mazzoni et al., 2011; Caron et al., 1998; Sulkala et al., 2007).

Na dentina mineralizada, as metaloproteinases estão imóveis e não funcionais. O condicionamento ácido necessário para a realização dos procedimentos adesivos desmineraliza a porção superficial da dentina, deixando fibras colágenas expostas e ativando as metaloproteinases (Tezvergil-Mutluay et al., 2011). Porém, se os monômeros resinosos não conseguem penetrar completamente a camada desmineralizada, esta região fica sujeita à degradação hidrolítica, o que tem um efeito adverso na resistência de união (Armstrong et al., 2001; Frankemberger et al., 2005; Wang, Spencer, 2003; Hashimoto et al., 2000). Se não há água na camada híbrida, as metaloproteinases permanecem inativas (Pashley et al., 2004).

Estudos têm sido realizados com diversas substâncias na tentativa de se inibir as metaloproteinases, para que a interface adesiva possa ter maior durabilidade e, conseqüentemente, as restaurações. Grande parte destes estudos tem utilizado a clorexidina para este fim. Nos sistemas adesivos convencionais, a solução de digluconato de clorexidina tem sido utilizada após o condicionamento ácido e antes da aplicação do primer e adesivo (Carrilho et al., 2007a; Carrilho et al., 2007b; Hebling et al., 2005; Pashley et al., 2005; Brackett et al., 2011). Alguns tipos de álcool também foram testados quanto ao efeito inibitório da atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 (Fiotti et al., 2008; Tezvergil-Mutluay et al., 2011).

Desde o uso da clorexidina como inibidor das metaloproteinases, muitas outras substâncias têm sido utilizadas no mundo todo, entre as quais destaca-se a própolis, que é uma substância

resinosa fortemente adesiva, coletada, transformada e utilizada pelas abelhas para selar a sua colmeia, alisar as paredes internas e proteger a entrada de intrusos (Burdock,1998). Este produto é um potente antimicrobiano e agente anti-inflamatório. As principais classes de produtos químicos presentes na própolis são os flavonoides, compostos fenólicos, e vários compostos aromáticos. Os flavonoides são compostos de plantas conhecidos, que têm propriedades antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiviral e anti-inflamatória (Al-Shaher et al., 2004). Jin et al., em 2005, observaram que extratos etílicos de própolis mostraram um forte efeito inibitório da atividade da MMP-9, que é dado pelo ácido caféico fenil éster.

Recentemente, alguns estudos têm sido feitos na endodontia com o objetivo de testar a própolis como medicação intracanal, com resultados satisfatórios (Ferreira et al., 2007; Valera et al., 2010). A própolis também se mostrou no mínimo 10 vezes menos citotóxica para os fibroblastos da polpa e do ligamento periodontal do que o hidróxido de cálcio (Al-Saher et al., 2004).

Os dentes são continuamente submetidos a estresse durante a mastigação e deglutição (Osorio et al., 2005). Alterações na interface adesiva de dentes restaurados in vivo podem ser causadas por estresses oclusais, pela degradação mecânica e química através e dentro do sistema restaurador quando unido ao esmalte e à dentina (Sano et al., 1999).

A pesquisa clínica é a etapa final para se avaliar novas técnicas. Porém, fatores como operador, diferenças nos substratos, colaboração do paciente e controle pós-operatório a tornam complicada e demorada (Nikaido et al., 2002). Portanto, testes in vitro realizados sob condições clinicamente relevantes podem prever o comportamento das restaurações no meio bucal (Reis et al., 2003).

A técnica mais utilizada para envelhecimento artificial é o armazenamento por longos períodos em água, que pode ser substituída por saliva. A diminuição da efetividade da adesão nestes estudos é primeiramente pela degradação hidrolítica. Outra técnica usada é a termociclagem, que leva a estresses pela contração e expansão, e assim acelera a degradação química. Envelhecimento por ciclagem mecânica também pode ser realizado, pois cargas oclusais podem afetar a adesão da resina ao dente (De Munck et al., 2005).

Apesar de vários estudos mostrarem o efeito inibitório da atividade de metaloproteinases presentes na dentina humana por algumas substâncias, apenas alguns estudos com clorexidina (Breschi et al., 2009; Breschi et al., 2010; Campos et al., 2009; Carrilho et al., 2007a; Carrilho et al., 2007b) correlacionam esta inibição com resistência de união. Do mesmo modo, a maioria dos estudos utiliza apenas um tipo de envelhecimento (De Munck et al., 2003; Hashimoto et al., 2003; Frankemberger et al., 2005; Breschi et al., 2009), e não há correlação entre os métodos. Portanto, faz-se necessário estudar o efeito da aplicação de diferentes soluções inibidoras de metaloproteinases e de tipos de envelhecimento na dentina humana na resistência de união entre dentina e resina.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Degradação da interface adesiva

Em 2003, Frankenberger et al. realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a resistência de união dentinária e a adaptação marginal de restaurações de resina composta após diferentes períodos de armazenamento. Trezentos e sessenta terceiros molares humanos hígidos foram utilizados. De cada um deles foi obtido um disco de dentina média de 2 mm de espessura. Em cada disco realizou-se na porção central um preparo com broca cilíndrica que foi posteriormente restaurado com sistema adesivo convencional de dois ou três passos e resina composta. Os dentes foram armazenados em água destilada por 1, 90 ou 2190 dias, submetidos a 1150 ciclos térmicos e finalmente ao teste de push-out. Os espécimes que ficaram armazenados por 6 anos foram moldados e réplicas produzidas após 1 e 90 dias, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 anos. As réplicas foram impregnadas por ouro e observadas em microscopia eletrônica de varredura. Os autores concluíram que a resistência de união dentinária diminuiu significativamente após 6 anos de armazenamento. Em relação à adaptação marginal, sistemas adesivos convencionais de três passos provaram ser significativamente mais estáveis à degradação pela água e devem ser preferidos em cavidades sem margens em esmalte.

Em 2003, Hashimoto et al. investigaram a degradação da adesão da dentina à resina depois de um ano de imersão em água. Vinte e quatro pré-molares humanos hígidos foram extraídos e a porção oclusal

removida para expor a dentina. Os dentes foram submetidos ao ataque ácido e depois à aplicação do sistema adesivo convencional Scotch-Bond Multi-Purpose (3M, ESPE) e de resina composta Z100 (3M, ESPE) pela técnica incremental. Os dentes foram então armazenados em água destilada a 37 °C por 24 h e então cortados em palitos de 1 mm de largura. Parte dos espécimes foi imediatamente submetida ao teste de microtração e parte após 1 ano de armazenamento em água com cloramina T 0,5%. As partes fraturadas dos espécimes foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão. Os autores concluíram que foram observados dois padrões de degradação da camada híbrida após um ano de armazenamento em água: a degradação das fibrilas colágenas e a perda de resina dos espaços interfibrilares dentro da camada híbrida, e que a degradação da resina e do colágeno pode aumentar o conteúdo de água na interface adesiva, levando a um maior efeito negativo sobre a longevidade da adesão.

Em 2003, De Munck et al. avaliaram a influência de variáveis como a efetividade da hibridização e a difusão/eluição de componentes da interface na degradação da interface entre resina e dentina ao longo do tempo. Vinte e oito terceiros molares humanos hígidos tiveram o terço oclusal removido para expor a dentina, que teve a smear layer padronizada com lixa de granulação 600. Os dentes foram divididos em 4 grupos e em cada um deles aplicado um sistema adesivo de acordo com as instruções dos fabricantes: dois sistemas convencionais de dois passos, Optibond Solo (Kerr) e Single Bond (3M ESPE) e dois sistemas convencionais de três passos, Optibond Dual-Cure (Kerr) e Scotchbond Multi-Purpose (3M ESPE). Em seguida aplicou-se resina composta Z100 (3M ESPE) pela técnica incremental em todos os dentes. Três dentes de cada grupo foram seccionados e submetidos ao teste de microtração após 24 h de armazenamento em água a 37 °C, enquanto os quatro dentes restantes foram armazenados por 4 anos e

então submetidos aos testes. As partes fraturadas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo. Os autores concluíram que: a interface adesiva entre resina e dentina formada por sistemas adesivos convencionais é propensa à degradação pela água; sistemas adesivos convencionais de dois passos são mais suscetíveis à degradação do que os de 3 passos; e que a interface resina/esmalte ao redor da interface resina/dentina protege esta ligação, retardando a degradação.

Em 2003, Wang e Spencer realizaram um estudo cujo objetivo foi determinar a qualidade e a estrutura molecular de interfaces entre dentina/adesivo formadas sob umidade comparadas com dentina desmineralizada infiltrada por adesivo produzida sob condições controladas. A partir de 6 terceiros molares humanos hígidos, foram obtidas fatias de dentina de 10 mm x 2 mm x 1,5 mm. O dente adjacente foi reservado para os espécimes para interface dentina/adesivo. As fatias de dentina foram desmineralizadas, desidratadas e imersas em Single Bond (3M ESPE), colocadas no escuro por 72 h, sendo metade fotopolimerizada imediatamente após e metade fotopolimerizada após 24 h de dissecação sob vácuo. Os espécimes interface dentina/adesivo tiveram a smear layer padronizada com lixa de granulação 600, aplicou-se 2 camadas de Single Bond e foram armazenados em água a 25° C por no mínimo 24h. Os espécimes foram seccionados perpendicularmente e paralelamente à superfície de adesão. Espécimes dos dois grupos foram seccionados em fatias de 3 µm de espessura. O restante dos espécimes sofreu análise espectroscópica micro-Raman e as fatias foram coradas com tricrômio de Goldner e analisado sob microscópio de luz. Os autores concluíram que, sob adesão úmida, a interface dentina/adesivo não é uma rede impermeável de colágeno/polímero, sendo a composição principal da rede colágeno e HEMA, e em menor quantidade BisGMA.

Sadek et al., em 2010, realizaram um estudo cujo objetivo foi avaliar a estabilidade *in vitro* da união entre dentina e resina criada por um sistema adesivo experimental de 3 passos hidrofóbico com BisGMA/TEGDMA ou por sistema adesivo hidrofílico de três passos, após um ano de envelhecimento acelerado em saliva artificial. Para isto, foram obtidos 45 discos de dentina média de molares humanos, posteriormente divididos em três grupos: o adesivo experimental de três passos hidrofóbico com BisGMA/TEGDMA aplicado sobre dentina saturada em água (GI) ou etanol (GII) e outro com Adper Scotchbond Multi-Purpose aplicado sobre dentina saturada com água (GIII). Sobre o adesivo, foi aplicada e fotopolimerizada resina composta, até 5mm de altura. Os espécimes foram armazenados em saliva artificial a 37 °C por 24 h, cortados em palitos e submetidos ao teste de microtração e à microscopia eletrônica de transmissão metade imediatamente e metade após um ano. O grupo tratado com Adper Scotchbond Multi-Purpose mostrou redução significativa da resistência de união após envelhecimento e foi observada degradação da camada híbrida em todos os espécimes examinados por microscopia eletrônica de transmissão. O grupo tratado com o adesivo experimental e álcool manteve a resistência de união e a integridade da camada híbrida. Os autores concluíram que a utilização de resina hidrofóbica em dentina após condicionamento ácido e saturada em álcool preservou a integridade da ligação entre dentina e resina.

Liu et al., em 2011, realizaram uma revisão que examinou os dados gerados nos últimos 3 anos por cinco estratégias experimentais desenvolvidas por diferentes grupos de pesquisadores na tentativa de aumentar a longevidade da adesão entre resina e dentina. As estratégias eram: aumentar o grau de conversão e resistência à esterase de adesivos hidrofílicos; uso de inibidores de enzimas colagenolíticas; inibição de MMPs e catepsina através do uso de agentes de reticulação; adesão úmida com etanol com resinas hidrofóbicas; remineralização biomimética

da interface entre resina e dentina. Os autores concluíram que a adesão dentinária não é tão durável como foi assumido previamente, sendo dois mecanismos os principais envolvidos na degradação da interface entre resina e dentina através do tempo. Um mecanismo é a hidrólise lenta dos componentes da resina, causados pela sorção de água ou esterases. Outro é a degradação da zona rica em água e pobre em fibras de colágeno dentro da camada híbrida, através da ativação de MMPs e catepsinas durante os procedimentos adesivos. Também concluíram que embora cada estratégia tenha vantagens e limitações, possivelmente a fusão delas num único tratamento poderia superar as barreiras da adesão da dentina à resina.

2.2 Ação colagenolítica das metaloproteinases

Pashley et al., em 2004, realizaram um estudo com o objetivo de verificar se matrizes dentinárias que sofreram ataque ácido podem ser degradadas por enzimas proteolíticas derivadas da dentina, na ausência de colonização bacteriana ao longo do tempo. Para isto, 27 terceiros molares humanos hígidos tiveram o esmalte oclusal e as raízes removidas. As superfícies dentinárias sofreram ataque ácido com gel de ácido fosfórico a 32% (Bisco Inc) a fim de criar uma camada de matriz colágena desmineralizada com espessura de 5-6 μm . Os dentes foram divididos em três grupos, sendo que no primeiro os dentes ficaram armazenados cada um em um recipiente contendo saliva artificial. No segundo grupo, os potes continham óleo mineral. No terceiro, saliva artificial com inibidores de enzimas proteolíticas. Três dentes de cada grupo ficaram armazenados por 24 h, por 90 dias e por 250 dias e depois retirados para análise da espessura da dentina desmineralizada remanescente e do estado das fibrilas colágenas através de microscopia

eletrônica de transmissão. A atividade funcional colagenolítica foi medida através do teste para colagenase EnzCheck (Molecular Porbes, Eugene) com o pó de dentina não tratado, pré-incubado com inibidores de proteases, pré-incubado com clorexidina 0,2% e após ataque ácido. As matrizes colágenas parcialmente desmineralizadas estavam quase completamente destruídas após 250 dias nos espécimes armazenados em saliva, mas não nos espécimes armazenados em óleo mineral ou inibidores de proteases. A análise funcional das enzimas do pó de dentina mostrou baixo nível de atividade colagenolítica que foi inibida por inibidores de proteases ou clorexidina 0,2%. Os autores concluíram que a degradação do colágeno ocorre através do tempo, através de metaloproteinases contidas na matriz que são liberadas com o tempo.

Mazzoni et al., em 2007, testaram a hipótese nula de que não haveria MMP-9 na matriz dentinária. Para isto, foram obtidos discos de 1mm de dentina a partir oito terceiros molares humanos hígidos, que tiveram o esmalte removido. Os discos foram reduzidos a pó de dentina, que foi dividido em quatro grupos de acordo com o agente desmineralizador: ácido acético, ácido cítrico, EDTA e EGTA. Utilizou-se zimografia para extrair e isolar todas as formas moleculares de metaloproteinases, que foram posteriormente caracterizadas e identificadas. Os autores concluíram que há a presença de MMP-2 e MMP-9 na dentina e que como foram identificados efeitos adversos causados pelas MMPs, fazem-se necessários estudos que identifiquem inibidores atóxicos de MMPs como potenciais agentes terapêuticos que possam ser incorporados aos materiais restauradores.

Em 2008, Boushell et al. realizaram um estudo com o objetivo de caracterizar a distribuição de MMP-2 na dentina coronária humana. Quinze molares e pré-molares humanos hígidos foram cortados e desmineralizados, e novamente cortados em fatias de 5 µm de espessura. As fatias foram analisadas imunohistoquimicamente usando-

se um anticorpo específico anti-MMP-2 monoclonal. Imunoreatividade foi observada em microscopia de luz e um software foi utilizado para calcular a quantia e a distribuição de MMP-2. Os autores concluíram que a MMP-2 está presente em toda a dentina coronária humana, com áreas de maior concentração junto à pré-dentina e ao limite amelo-dentinário.

Breschi et al., em 2010, avaliaram a eficácia de galardin (um inibidor sintético de MMPs) na preservação morfológica e mecânica de camadas híbridas submetidas a envelhecimento. A partir de 20 molares humanos hígidos obteve-se pó de dentina, que foi dividido em 5 grupos de 1 g, sendo: grupo controle, grupo parcialmente desmineralizado, grupo parcialmente desmineralizado seguido pela incubação com solução de galardin, grupos parcialmente desmineralizados seguidos pela incubação com clorexidina a 0,2 ou a 2%. Seguiram-se os procedimentos para análise zimográfica. Superfícies planas de dentina foram obtidas a partir de 28 molares humanos hígidos, que sofreram ataque ácido e seguiu-se o procedimento adesivo, sendo que em metade dos dentes foi aplicada solução aquosa de galardin, e a aplicação de resina composta pela técnica incremental. Estes dentes foram seccionados, sendo metade armazenada por 24h e metade armazenada por 1 ano e submetidos ao teste de microtração. Doze molares humanos hígidos foram preparados conforme descritos, armazenados por 24 h ou 1 ano e avaliados quanto à nanoinfiltração. Os autores concluíram que galardin, como inibidor de MMPs, pode ser uma maneira clinicamente relevante de aumentar a estabilidade da camada híbrida ao longo do tempo. E que inibidores específicos de MMP podem aumentar a resistência de união ao longo do tempo.

Osorio et al., em 2011, testaram a hipótese-nula de que a atividade colagenolítica das metaloproteinases na dentina não seria alterada por diferentes tipos de condicionamento da dentina e nem pela aplicação de clorexidina. Para isto, foram obtidos discos de dentina a

partir do corte de dez terceiros molares humanos hígidos e posteriormente palitos. Os palitos de dentina foram divididos em cinco grupos: dentina mineralizada, dentina desmineralizada com ácido fosfórico, dentina desmineralizada com EDTA, imersão de dentina mineralizada em primer do Clearfil SE Bond (Kuraray) e imersão de dentina mineralizada em Xeno IV (Dentsply). As barras de dentina foram então polimerizadas, lavadas, secas e colocadas em ependorfes em dois tipos de meio: saliva artificial + MMP-2 ou clorexidina + MMP-2. Os espécimes foram incubados a 37 °C por 1 dia, 1 ou 3 semanas. Nos tempos determinados, os meios foram agitados e os produtos sobrenadantes foram removidos e analisados para determinar a concentração do produto de degradação do colágeno, através de um kit de radioimunoensaio. Os autores concluíram que: as metaloproteinases mostram atividade colagenolítica quando a dentina está desmineralizada; que a clivagem do colágeno pelas MMPs é maior quando a dentina é desmineralizada pelo ácido fosfórico ou pelo EDTA do que pelos sistemas adesivos auto-condicionantes; a presença de monômeros hidrofílicos (como o HEMA) nos sistemas adesivos auto-condicionantes pode ter inibido a degradação do colágeno; a ação inibitória de MMP pela clorexidina foi mais prolongada nos grupos submetidos aos sistemas adesivos auto-condicionantes do que nos grupos desmineralizados pelo ácido fosfórico ou pelo EDTA.

Mazzoni et al., em 2011, testaram a presença e a distribuição da MMP-3 em dentina humana hígida usando testes bioquímicos, imunohistoquímicos e zimografia. Dezoito terceiros molares humanos hígidos foram utilizados. A partir de 12 deles, obteve-se pó da dentina. Parte do pó foi dividido em dois grupos: controle e parcialmente desmineralizado, onde posteriormente foi quantificada a MMP-3. Parte do pó, também dividido em grupo controle e grupo parcialmente desmineralizado, foi submetido à análise zimográfica. Discos de dentina

foram obtidos a partir de 6 dentes, os quais foram submetidos à análise imunohistoquímica para identificação de MMP-3. Os autores concluíram que o estudo mostrou a presença e a distribuição de MMP-3 na dentina humana, que é predominantemente na rede inter-tubular de fibrilas de colágeno e não nos túbulos dentinários.

Também em 2011, Mazzoni et al. realizaram um estudo cujo objetivo foi analisar a presença de MMP-2 na camada híbrida criada por um sistema adesivo convencional de 2 passos *in vitro*. O pó dentinário foi obtido a partir de 20 terceiros molares humanos hígidos e foi dividido em quatro grupos: controle (mineralizado); parcialmente desmineralizado; parcialmente desmineralizado seguindo-se a aplicação do sistema adesivo Adper Scotchbond 1 XT (3M ESPE); e parcialmente desmineralizado, seguindo-se a aplicação de clorexidina 0,2% e aplicação do sistema adesivo. Para quantificar a presença de MMP-2, foi utilizado o teste QuantiSir para análise de gene. Foram obtidos discos de dentina de 1mm de espessura a partir de doze terceiros molares humanos hígidos. Os discos de dentina sofreram ataque ácido com gel de ácido fosfórico a 35%, foram lavados e em seguida divididos em dois grupos, com e sem aplicação de clorexidina a 0,2%, sendo posteriormente aplicado o sistema adesivo e resina composta flow. Os dentes foram seccionados em palitos, que foram armazenados por 1 ano em saliva artificial. Os espécimes foram então processados para análise imunohistoquímica. Os autores concluíram que a MMP-2 tem um papel na degradação *in vitro* das fibrilas de colágeno na camada híbrida. Por isso, o uso de inibidores atóxicos de MMP, como a clorexidina, deve ser considerado como um passo adicional nos procedimentos adesivos. Os inibidores de MMP podem contribuir para a estabilidade da camada híbrida ao longo do tempo, o que pode aumentar a duração das restaurações adesivas.

2.3 Simulação de pressão pulpar

Hosaka et al., em 2007, avaliaram a durabilidade de sistemas adesivos de passo único aderidos à dentina com e sem a simulação de pressão pulpar. Foram obtidos segmentos coronários a partir de 48 terceiros molares humanos hígidos, que foram conectados a dispositivos para simulação de pressão pulpar. Em metade deles, a pressão foi ajustada para 0 cm de H₂O, e na outra metade, em 15 cm de H₂O. Cada um dos grupos foi subdividido e em metade deles aplicou-se o sistema adesivo One-Up Bond (Tokuyama) e na outra metade Fluoro Bond Shake (Shofu Co), de acordo com as instruções dos fabricantes. Seguiu-se a aplicação de resina composta (Clearfil AP-X, Kuraray) pela técnica incremental e fotopolimerização. Após remoção das margens de esmalte, os dentes foram armazenados em água a 37°C por 24h, 1 ou 3 meses. Os dentes foram então seccionados para obtenção de palitos para teste de microtração. A análise do modo de fratura foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura. Concluiu-se que quando a pressão pulpar foi aplicada por 1 ou 3 meses, a resistência de união do grupo Fluoro Bond Shake caiu quando comparada aos grupos controles sem pressão pulpar. Os espécimes do grupo One-Up Bond mostraram significativa diminuição na resistência de união com o tempo, que foram ainda maiores nos grupos com simulação de pressão pulpar. Os padrões de fratura variaram de acordo com o tempo, o material e o tipo de pressão. Na ausência de pressão pulpar, a maioria das fraturas foi coesiva em resina. Com a simulação de pressão pulpar, a maioria das fraturas foi no adesivo.

Em 2007, Sauro et al. realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a permeabilidade dentinária e a resistência de união de dentina profunda aderida com diferentes sistemas adesivos auto-condicionantes e posteriormente submetidas a simulação de pressão

pulpar. Quarenta segmentos coronários foram obtidos a partir do corte da porção oclusal e das raízes de molares humanos hígidos. Cada espécime foi conectado a um dispositivo para simulação de pressão pulpar. Os espécimes foram divididos em 4 grupos e em cada um deles foi aplicado um sistema adesivo, de acordo com as instruções dos fabricantes, sendo eles: um sistema auto-condicionante de dois passos, Clearfil Protect Bond (Kuraray), e três sistemas auto-condicionantes de passo único, G-Bond (GC Corp), One Up Bond F Plus (Tokuyama Corp) e Clearfil S3- Bond (Kuraray). Durante os procedimentos adesivos, a pressão pulpar foi mantida em 0cm de H₂O. A mensuração da permeabilidade foi realizada antes e depois dos procedimentos adesivos. Antes da mensuração do fluxo de fluido na interface adesiva entre resina e dentina, foram obtidas moldagens de referência antes e depois da perfusão dentinária a 20 cm de H₂O. As moldagens foram utilizadas para fabricação de réplicas para observação em microscopia eletrônica de varredura. Quarenta terceiros molares humanos foram usados para o teste de microtração. Divididos em dois grupos principais, com (20 cm de H₂O) e sem simulação de pressão e subdivididos de acordo com os sistemas adesivos descritos anteriormente. Seguiu-se a aplicação dos sistemas adesivo, a aplicação de resina composta flow (GradiaDirect LoFlo, GC Corp) pela técnica incremental e corte para obtenção de palitos. Os autores concluíram que a camada híbrida e a película de adesivo polimerizado de alguns adesivos de passo único aplicados em dentina profunda são extremamente permeáveis depois da polimerização quanto submetidos à pressão pulpar. Isto resulta em baixa resistência de união. Sistemas convencionais de três passos devem ser preferidos para dentina profunda, ao invés de sistemas auto-condicionantes de passo único.

Em 2009, Hiraishi et al. realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito da pressão pulpar na resistência de união de cimentos resinosos à dentina humana e na permeabilidade de superfícies

dentinárias pré-tratadas com um adesivo e um primer auto-condicionante. Segmentos coronários de dentina exposta foram obtidos a partir de dois cortes perpendiculares ao eixo longitudinal de 45 terceiros molares humanos, um retirando o esmalte oclusal e outro retirando a raiz. Os espécimes foram conectados a um dispositivo para simular a pressão pulpar de 20 cm de água. Foram confeccionados blocos de resina composta híbrida, que em seguida sofreram condicionamento ácido com gel de ácido fosfórico a 32%, e a aplicação de Clearfil SE Primer e Porcelain Bond Activator (Kuraray). Três cimentos resinosos foram utilizados neste estudo, RelyX ARC, Panavia F 2.0 e RelyX Unicem, sendo aplicados nos discos de dentina de acordo com as instruções dos fabricantes, inclusive nos tratamentos requeridos para a dentina, com ou sem simulação de pressão pulpar. Seguiu-se a cimentação dos blocos de resina indireta e a fotopolimerização. Depois do armazenamento em água a 37 °C por 24 h, os dentes foram seccionados em palitos para o teste de microtração. Em 15 espécimes realizou-se a medida do fluxo de fluido, após a realização de condicionamento ácido com gel de ácido fosfórico a 32% e após o tratamento dentinário requerido por cada um dos cimentos resinosos. Os autores concluíram que o uso de simulação de pressão pulpar durante a aplicação dos cimentos resinosos afetou adversamente a resistência de união para os cimentos RelyX ARC e Panavia F 2.0, mas não para o RelyX Unicem.

Em 2010, Belli et al. avaliaram a durabilidade da adesão dentinária de vários sistemas adesivos após um ano de armazenamento em água e sob pressão pulpar de 15 cm de H₂O. Preparos de classe I foram realizados em sessenta terceiros molares humanos com a parede pulpar localizada em dentina média. Foram utilizados um sistema adesivo convencional de dois passos (Single Bond 2 – 3M, ESPE), um sistema adesivo auto-condicionante de dois passos (Clearfil SE Bond- Kuraray), um sistema auto-condicionante de três passos (Adper Scotchbond SE -

3M, ESPE) e três sistemas adesivos auto-condicionantes de passo único (Adper Easy Bond SE – 3M/ ESPE, Clearfil S³ Bond – Kuraray, e Adhese One- Ivoclar Vivadent). Após a aplicação dos sistemas adesivos, foram colocadas de quatro a cinco incrementos de resina composta (Z250, 3M, ESPE), fotopolimerizados individualmente. Logo após, metade dos dentes foram submetidos a pressão pulpar por 1 dia e a outra metade 1 ano. Os dentes foram seccionados e submetidos ao teste de microtração. Foram analisados a resistência de união, o tipo de fratura e alguns espécimes submetidos a microscopia eletrônica de varredura. Os autores concluíram que a interface adesiva mostrou uma degradação lenta após um ano de armazenamento. A resistência de união não foi afetada após um ano, mas sinais de degradação foram detectados pela análise fractográfica. A pressão pulpar pareceu não acelerar a degradação da interface adesiva.

Em 2010, Lin et al. investigaram a durabilidade de quatro sistemas de cimentos resinosos aderidos à dentina com ou sem simulação de pressão pulpar. Setenta e dois terceiros molares humanos hígidos tiveram a porção oclusal e as raízes removidas, para expor a superfície dentinária e serem conectados a um dispositivo para simulação de pressão pulpar. Foram confeccionados blocos de resina flow de 10 mm x 10 mm x 20 mm, que posteriormente sofreram condicionamento ácido. Antes de começar os procedimentos adesivos, foi aplicado e fotopolimerizado um agente de união (Heliobond, Ivoclar Vivadent) para ativar a superfície adesiva. Um sistema de cimentação foi aplicado para cada grupo de 18 dentes, de acordo com as instruções dos fabricantes: um sistema auto-condicionante de passo único, Multilink Sprint (Ivoclar Vivadent), dois sistemas auto-condicionantes de dois passos, Multilink Automix (Ivoclar Vivadent) e Clearfil Esthetic cement (Kuraray) e um sistema convencional de três passos, RelyX ARC (3M ESPE). Nove dentes de cada grupo foram cimentados com pressão pulpar de 15 cm de H₂O e sem pressão pulpar. Os blocos de resina foram cimentados a uma

carga constante de 7,5N por 10 min. Após os procedimentos adesivos, os dentes foram armazenados em água a 37 °C por 3, 30 ou 30 dias, com adicional de 5000 ou 15000 ciclos térmicos. Os dentes foram então seccionados em palitos para teste de microtração. Após a realização do teste, as partes fraturadas foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura. Os autores concluíram que a simulação de pressão pulpar e o envelhecimento artificial afetam a resistência de união. Sendo assim, devem ser usados para testes de adesão in vitro para simular função clínica.

2.4 Própolis

Em 2004, Al-Shaher et al. investigaram a tolerância de fibroblastos humanos do ligamento periodontal e da polpa dental à própolis e a compararam com a do hidróxido de cálcio. Para isto, células de ligamento periodontal e de polpa dental foram obtidas a partir de terceiros molares hígidos erupcionados. Estas foram submetidas a várias concentrações de própolis e de hidróxido de cálcio e posteriormente analisada sua viabilidade. Os autores concluíram que o hidróxido de cálcio em mesma concentração que a própolis é pelo menos 10 vezes mais citotóxico para as células do ligamento periodontal e da polpa dental. E que a própolis, com suas conhecidas propriedades antifúngicas, antivirais e antibacterianas e habilidade de melhorar a resposta imune pode ser uma opção viável para medicação intracanal, devido a sua menor citotoxicidade.

Sforcin et al. realizaram um estudo em 2005 cujo objetivo foi avaliar o efeito das variações sazonais na ação imunomoduladora da própolis. Própolis foi produzida por abelhas africanizadas em Botucatu, SP, Brasil, durante todo o ano. As amostras foram separadas por período,

moídas e a própolis extraída (30 g de própolis completando 100 ml de etanol 70%). Depois de uma semana, os extratos foram filtrados e a concentração final foi calculada (120 mg/ml). Própolis búlgaro foi obtido da mesma forma, sendo a concentração final peso seco 170 mg/ml. Quarenta e dois ratos foram divididos em 6 grupos. Quatro grupos receberam soluções de extrato de própolis brasileiro a 10% das diferentes estações (primavera, verão, outono e inverno). Um grupo recebeu uma solução hidroalcoólica a 10% e o último grupo recebeu solução salina. Os animais receberam as soluções duas vezes por dia, durante três dias. Após o último tratamento, os ratos foram imunizados após 15 e 30 dias. O efeito da própolis búlgaro e do brasileiro foi analisado para a produção de anticorpos. Ratos receberam extrato de própolis a 10% e foram imunizados. Amostras de sangue foram coletadas após 15 e 30 dias após a última imunização. Os autores concluíram que a própolis estimula a produção de anticorpos, independentes da época e da origem geográfica.

Em 2005, Hayacibara et al. realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a influência de dois tipos de própolis brasileiro na viabilidade do *Streptococcus mutans*, na atividade das glicosiltransferases e no desenvolvimento de cárie em ratos. Os extratos etanólicos de própolis foram fracionados em hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol. A capacidade das quatro frações para inibir o crescimento e adesão a uma superfície de vidro de *Streptococcus mutans* e *sobrinus* foi examinada. Para analisar o efeito sobre a cárie, 60 ratos infectados com *Streptococcus sobrinus* foram divididos em quatro grupos, e tratados topicamente duas vezes ao dia com os dois tipos de extratos de própolis e os dois tipos de hexano. Os autores concluíram que o hexano de ambos os tipos de própolis apresentaram maior atividade antibacteriana e de inibição das glicosiltransferases. Ambos os extratos de própolis e os hexanos foram igualmente eficazes na redução da cárie dentária em ratos.

Em 2005, Jin et al. realizaram um estudo que avaliou a atividade inibitória de própolis sobre MMP-9 e o ácido caféico fenil éster foi isolado e teve sua estrutura molecular determinada. Extratos etílicos de própolis mostraram um forte efeito inibitório da atividade da MMP-9. O ácido caféico fenil éster foi apontado como o componente da própolis responsável pela atividade inibitória da MMP-9.

Em 2010, Valera et al. realizaram um estudo que avaliou a ação antimicrobiana do extrato glicólico de própolis usado como solução irrigadora durante o preparo biomecânico e como medicação intracanal contra *Escherichia coli* e suas endotoxinas nos canais radiculares. Quarenta e oito dentes unirradiculares humanos tiveram a coroa removida e os canais instrumentados. A região apical de cada dente foi selada com resina composta e a região externa da raiz selada com resina epóxi. As raízes foram então contaminadas com uma suspensão de *E. coli*. Realizou-se a instrumentação com solução irrigadora de extrato glicólico de própolis a 12% e após os dentes foram divididos em quatro grupos, de acordo com a medicação intracanal que receberam: pasta de hidróxido de cálcio, solução de polimixina B, associação de pó de hidróxido de cálcio com gel de clorexidina a 2% e sem medicação. A medicação permaneceu por 14 dias e foi removida com solução salina. Após isto, foi coletada uma amostra e os dentes foram armazenados a 37 °C com solução salina por 7 dias e foi coletada nova amostra. Foi realizada a quantificação das endotoxinas. Os autores concluíram que a própolis é efetivo contra *E. coli* depois do preparo biomecânico, porém não conseguiu eliminar as endotoxinas presentes no canal radicular.

Em 2011, Kayaoglu et al. investigaram a atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* de 2 amostras de própolis num bloco de dentina, e a efetividade foi comparada com a do hidróxido de cálcio e da clorexidina. Blocos de dentina foram produzidos a partir de dentes humanos unirradiculares e foram contaminados por *E. faecalis*. Os

canais radiculares foram preenchidos com extratos etanólicos de própolis, hidróxido de cálcio, clorexidina a 2%, etanol ou solução tampão de fosfato. Os dentes foram incubados por 1 ou 7 dias a 37°C. Os canais radiculares foram lavados com água destilada e foi recolhido com broca Gates-Glidden pó de dentina. Os autores concluíram que as amostras de própolis não foram superiores à clorexidina em termos de eliminação de bactérias, embora conseguiram uma grande redução no número de bactérias .

Em 2011, Sforcin e Bankova realizaram uma revisão com o objetivo de discutir o potencial da própolis para o desenvolvimento de novas drogas. Realizaram isto através da comparação de dados da literatura que sugeriam áreas candidatas para o estabelecimento de drogas contra tumores, infecções, alergias, diabetes, úlceras e modulação da resposta imune. Os autores concluíram que as propriedades biológicas da própolis têm sido intensamente investigadas nos últimos anos, atraindo o interesse de muitos consumidores para produtos contendo própolis. Embora uma padronização universal da própolis seja impossível, as propriedades biológicas da própolis podem ser ligadas à sua composição química e à fonte botânica. Existe o potencial para o desenvolvimento de novas drogas, porém baseadas em um tipo específico de própolis. Se existir uma padronização baseada nos principais constituintes ativos, pode ser submetida a testes clínicos e registrada.

2.5 Clorexidina como inibidor de MMP

Hebling et al., em 2005, testaram a hipótese nula de que não haveria diferença na degradação da dentina aderida à resina usando-se um sistema adesivo convencional e aderida ao mesmo sistema

adesivo associado ao uso da clorexidina, um inibidor de MMP. Onze pacientes, de 8 a 12 anos, com dois primeiros molares decíduos, todos com um contralateral cariado, que poderiam ser restaurados com uma restauração classe I, foram selecionados. Foram realizadas as restaurações em um dente com o sistema adesivo Single Bond (3M, ESPE) e no outro com o Single Bond associado ao Digluconato de Clorexidina 2%. Após a aplicação do sistema adesivo, realizou-se a colocação de resina pela técnica incremental. Os dentes seriam extraídos após 6 meses de função intra-oral. Após este tempo, 8 pacientes já tinham esfoliado naturalmente um dos dentes restaurados, ficando apenas 3 pacientes. Os dentes foram extraídos e seccionados no sentido vestibulo-lingual em 4 fatias de 1 mm de espessura. Duas fatias de cada dente foram colocadas em solução de 50% de nitrato de prata amoniacal por 24 h, para ver nanoinfiltração. As outras 2 fatias foram desmineralizadas e coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Todas as fatias foram preparadas para leitura em microscopia eletrônica de transmissão. O estudo concluiu que a degradação do colágeno pode ser controlada pelo uso da clorexidina, pois nos dentes em que ela foi utilizada, a camada híbrida apresentou integridade da rede de colágeno, ao contrário dos dentes em que ela não foi utilizada.

Em 2007, Carrilho et al. realizaram um estudo cujo objetivo foi avaliar o efeito da inibição de proteases na resistência de união entre dentina e resina após 6 meses de envelhecimento. Sete terceiros molares humanos não erupcionados foram extraídos e sofreram preparo classe I profundo. Os dentes foram cortados em 2 metades no sentido vestibulo-lingual e divididos em dois grupos. Todos os dentes sofreram ataque ácido, foram lavados e secos. O grupo controle foi reumidecido com água destilada, enquanto que o grupo experimental foi reumidecido com solução de digluconato de clorexidina a 2%. Seguiu-se a aplicação de primer e bond (Single Bond- 3M, ESPE), e resina composta (Z250, 3M, ESPE) pela técnica incremental. Os dentes foram

armazenados em água destilada a 37 °C por uma semana e cortados em palitos para ensaio de microtração. Um terço dos espécimes foi imediatamente testado. Os palitos restantes foram armazenados por 6 meses em solução de saliva artificial com ou sem inibidores de enzima proteolítica e então submetidos ao teste. Ambas as partes dos palitos foram observadas em microscópio eletrônico de varredura e classificados quanto ao tipo de fratura. Os autores concluíram que a aplicação de clorexidina conservou a durabilidade da camada híbrida e a resistência de união.

Campos et al., em 2009, estudaram o efeito do digluconato de clorexidina a 0,2% e a 2% na durabilidade da adesão dentinária de um sistema adesivo convencional de dois passos (Single Bond - 3M/ ESPE) e um sistema auto-condicionante de passo único (Clearfil Tri S Bond - Kuraray). Foram usados 24 terceiros molares humanos hígidos. A superfície oclusal foi removida para expor a dentina, e seguiu-se a aplicação dos sistemas adesivos de acordo com as instruções dos fabricantes, associados ou não ao uso da clorexidina. Em seguida, aplicou-se resina composta (Z250 – 3M/ ESPE) pela técnica incremental. Todos os procedimentos foram realizados sob simulação de pressão pulpar a 22.07 mmHg. Para cada condição, metade dos espécimes foi imediatamente submetida ao teste de microtração. A outra metade foi armazenada por 6 meses sob simulação de pressão intrapulpar e ciclagem termomecânica e após isto submetida ao teste de microtração. O estudo concluiu que a clorexidina diminuiu a perda de resistência de união ao longo do tempo associada aos dois sistemas adesivos utilizados. O digluconato de clorexidina a 0,2% não conseguiu diminuir a perda da resistência de união quando associada ao adesivo auto-condicionante. Porém, nenhuma das concentrações de clorexidina conseguiu prevenir completamente a diminuição da resistência de união ao longo do tempo.

Breschi et al., em 2010, avaliaram o papel das metaloproteínases endógenas da dentina na auto-degradação de fibrilas colágenas na interface adesiva. A hipótese de nulidade testada foi que a aplicação de adesivos ou clorexidina não modifica a atividade das metaloproteínases da dentina e que clorexidina usada como primer terapêutico não aumenta a estabilidade da interface adesiva ao longo do tempo. Foram realizados zimogramas de extratos proteicos de pó de dentina humana incubada com Adper Scotchbond 1XT apenas, ou com tratamento prévio com clorexidina 0,2% ou 2% , para testar a atividade das metaloproteínases dentinárias. Testes de microtração e de nanoinfiltração foram realizados em interfaces tratadas com Adper Scotchbond 1XT (previamente tratadas ou não com 0,2% ou 2% de clorexidina) imediatamente ou após 2 anos de armazenamento em saliva artificial. Zimogramas mostraram que a aplicação do referido adesivo em pó de dentina aumenta a atividade da MMP-2, enquanto que o pré-tratamento com clorexidina inibe toda a atividade gelatinolítica. A clorexidina diminuiu significativamente a perda da resistência de união e a nanoinfiltração em interface adesiva artificialmente envelhecida por 2 anos.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi verificar a influência da aplicação de soluções inibidoras de metaloproteinases na dentina previamente à aplicação de um sistema adesivo convencional de 2 passos, na resistência de união entre resina e dentina. Além disso, verificou-se a influência dos tipos de envelhecimento sobre a resistência de união entre dentina e resina.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Delineamento Experimental

4.1.1 Unidades Experimentais

Cento e cinco molares humanos.

4.1.2 Fatores em Estudo

Solução aplicada em 5 níveis: Grupo Controle, Clorexidina, Extrato de Própolis Etilico, Extrato de Própolis Aquoso, Etanol.

Envelhecimento em 3 níveis: Armazenamento em água deionizada por 24 h, Após ciclagem termomecânica e Armazenamento por 6 meses.

4.1.3 Variável de Resposta

Resistência de união.

4.2 Preparo dos espécimes

Este estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, protocolo no 076/2011-PH/CEP, conforme ANEXO A.

Neste estudo foram utilizados 105 molares humanos, armazenados em solução de cloreto de sódio a 0,9% a 4 °C, até o momento do uso. Os dentes foram doados pela Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, conforme a Declaração presente no ANEXO B.

Os dentes foram fixados a uma placa de resina acrílica com cera pegajosa, com o longo eixo paralelo à superfície da placa. Foram obtidos segmentos das coroas, a partir do corte aproximadamente 2mm abaixo da junção amelo-cementária com um disco diamantado acoplado à cortadeira de precisão (Labcut, Extec, Enfield, CT, EUA), sob refrigeração a água; logo em seguida, o esmalte oclusal foi removido em um corte paralelo aproximadamente 4mm acima da junção amelo-cementária para expor a dentina (Figura 1 A, B e C).

A dentina exposta foi polida para criar um substrato para união padrão na dentina, com lixa d'água de granulação P600 (Fepa-P, Panambra, São Paulo, SP, Brasil) em uma politriz (Pantec Polipan 2, Panambra, São Paulo, SP, BR)(Figura 1 E). O tecido pulpar foi removido da câmara pulpar com cureta sem alterar a superfície da pré-dentina (Figura 1 D). Um espessímetro foi utilizado para a medição da dentina remanescente, que tinha espessura mínima de 2 mm no corno pulpar (Figura 1 F). A partir desta espessura mínima, as amostras foram separadas de acordo com a espessura e divididas entre os grupos.

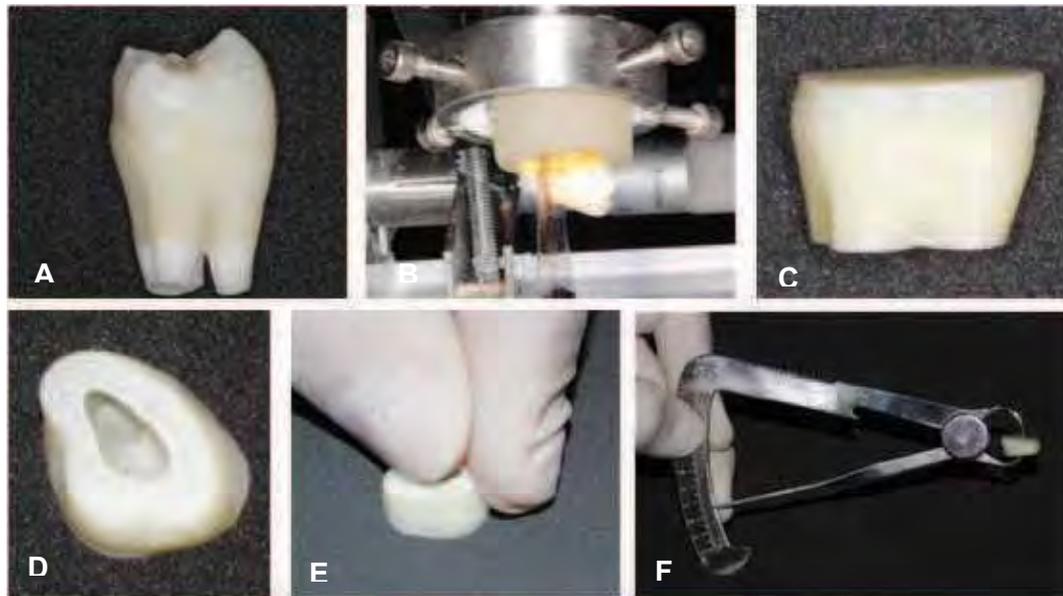


Figura 1 – A) Molar humano; B) Corte do dente em cortadeira de precisão; C) Segmento obtido após corte; D) Vista inferior do molar após remoção da polpa; E) Criação substrato padrão; F) Aferição da espessura de dentina com espessímetro.

4.3 Divisão dos grupos experimentais

Para a realização das restaurações, os dentes foram divididos em cinco grupos de acordo com a solução a ser aplicada:

- **GC:** Nenhuma solução aplicada (Controle)
- **CLX:** Solução de digluconato de clorexidina 0,2%
- **EPE:** Extrato de própolis etílico 10%
- **PA:** Solução de própolis aquosa (Propomax)
- **AE:** Álcool etílico 70

Cada subgrupo foi dividido em três outros subgrupos:

- **I:** Corte imediato
- **A:** Armazenamento por 6 meses
- **C:** Ciclagem termomecânica

Foram obtidos 15 subgrupos, com 7 espécimes cada. A figura 2 mostra a divisão experimental dos grupos.

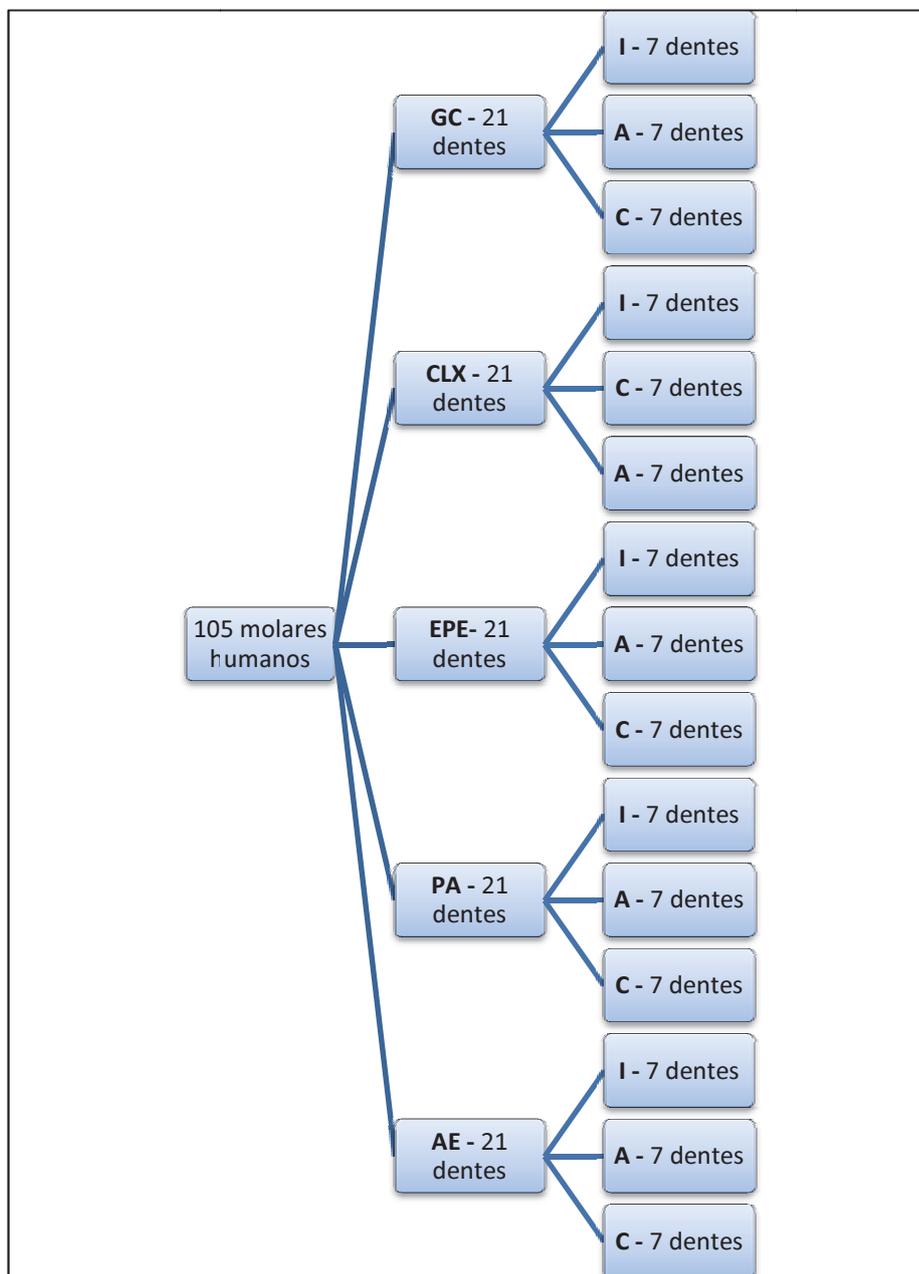


Figura 2 – Divisão dos grupos experimentais.

Todos os materiais, fabricantes, composições e lotes estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Materiais utilizados, fabricantes e suas composições.

MATERIAL	FABRICANTE	COMPOSIÇÃO	LOTE
Magic Acid Gel	Vigodent/ Rio de Janeiro/ Brasil	Gel de ácido fosfórico a 37%	004/10
Adper Single Bond 2	3M ESPE, St. Paul, MN, EUA	Bis-GMA, HEMA, dimetacrilatos, etanol, água, sistema fotoiniciador, copolímero funcional de metacrilato de ácidos poliacrílico e polialcenóico, nanopartícula de sílica	N255004BR
Filtek Z350 XT	3M ESPE, St. Paul, MN, EUA	Matriz resinosa: Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, bis-EMA Conteúdo inorgânico: nanopátículas de sílica 20nm, zircônia 4-11nm Conteúdo de carga: 78,5% em peso (63,3% em volume)	N166333
Solução aquosa de Clorexidina 0,2%	Becker Farmácia de Manipulação e Homeopatia, São José dos Campos, SP, Brasil	Digluconato de clorexidina 0,2%	Não se aplica
Extrato de Própolis 10% Etílico	Becker Farmácia de Manipulação e Homeopatia, São José dos Campos, SP, Brasil	Tintura de própolis, álcool 70	Não se aplica
Álcool Etílico 70%	Becker Farmácia de Manipulação e Homeopatia, São José dos Campos, SP, Brasil	Álcool absoluto e água purificada	Não se aplica
Propomax	Apis Flora/ Riberão Preto, São Paulo, Brasil	Própolis e água purificada (aprox. 11% extrato seco)	0300611

4.4 Simulação de pressão pulpar

As amostras foram submetidas aos testes com simulação de pressão pulpar, de 20 cm de H₂O, através dos métodos propostos por Mitchem et al. (1988) e Sauro et al. (2007), e adaptado para este estudo, de acordo com a Figura 3A. Cada amostra foi colada com cianoacrilato (Superbond, Henkel) em uma placa de resina acrílica transparente ativada quimicamente (Jet-Clássico, São Paulo, SP, Brasil) (2 cm x 2 cm x 0.5 cm), perfurada por um tubo de metal (Figura 3B), que termina na parte superior da placa. Foi utilizada uma seringa para preencher a câmara pulpar com água deionizada. O tubo de metal foi conectado a um tubo de polietileno de 30 cm de comprimento, que por sua vez estava conectado a um tubo de metal conectado a um funil, erguido sobre uma haste metálica. O funil continha água deionizada e a altura a partir da superfície da água ajustada para 20 cm, o que resultou em uma pressão de 20 cm H₂O (Sauro et al., 2007; Hiraishi et al., 2009). Isto permitiu que a câmara pulpar fosse preenchida com água deionizada para simular a condição in vivo da dentina completamente hidratada.

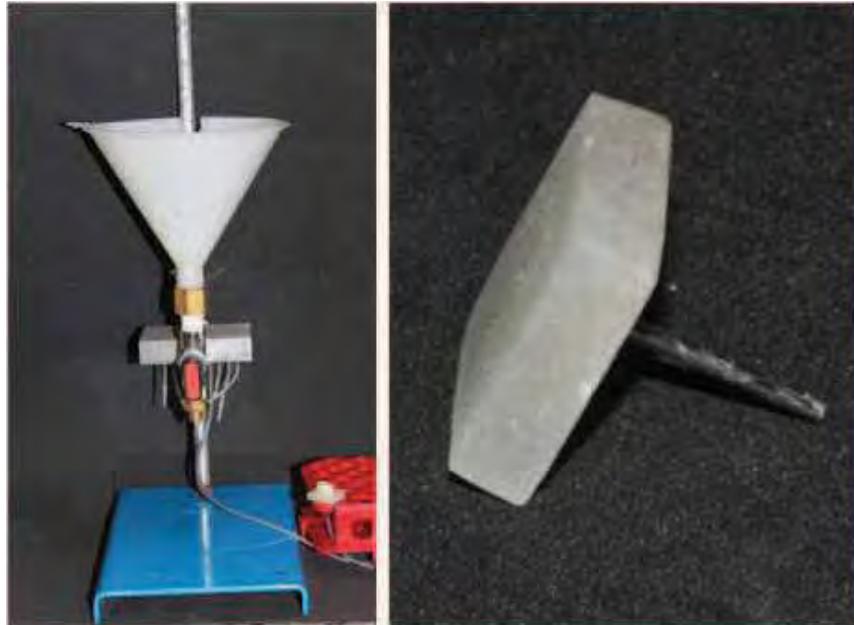


Figura 3 – A) Dispositivo para simulação de pressão pulpar; B) Placa de resina com tubo de metal anexado.

4.5 Técnica Restauradora

Em todos os dentes, a dentina foi condicionada com gel de ácido fosfórico 37%. Em seguida, foi lavada por 15 s e o excesso de água removido com papel absorvente.

No **GC**, controle, a dentina não sofreu nenhum tratamento antes da aplicação do sistema adesivo.

Para os demais grupos (**CLX**, **EPE**, **PA**, **AE**), cada solução correspondente foi aplicada ativamente por 60 segundos e o excesso removido com papel absorvente, antes da aplicação do sistema adesivo (Carrilho et al., 2007).

Em seguida, foi realizada a aplicação do sistema adesivo Adper Single Bond 2 em todos os grupos, do modo recomendado pelo

fabricante: aplicação ativa por 15 segundos, 2 camadas, secagem com leve jato de ar por 5 segundos, fotopolimerização por 10 segundos.

Após a aplicação do sistema adesivo, foram adicionados 3 incrementos de resina de 1,5 mm de espessura de resina composta Filtek Z-350XT. Estes foram fotoativados, um de cada vez, por 20 segundos, a uma distância padronizada, com o aparelho fotopolimerizador de LED, emissor de luz azul, comprimento de onda que varia entre 440nm a 480nm com uma densidade de potência de 1200 mW/cm² (Radii-cal, SDI, Victoria, Austrália). A técnica restauradora pode ser observada na Figura 4.

Após a aplicação da resina composta, o dispositivo para simulação de pressão pulpar foi removido.

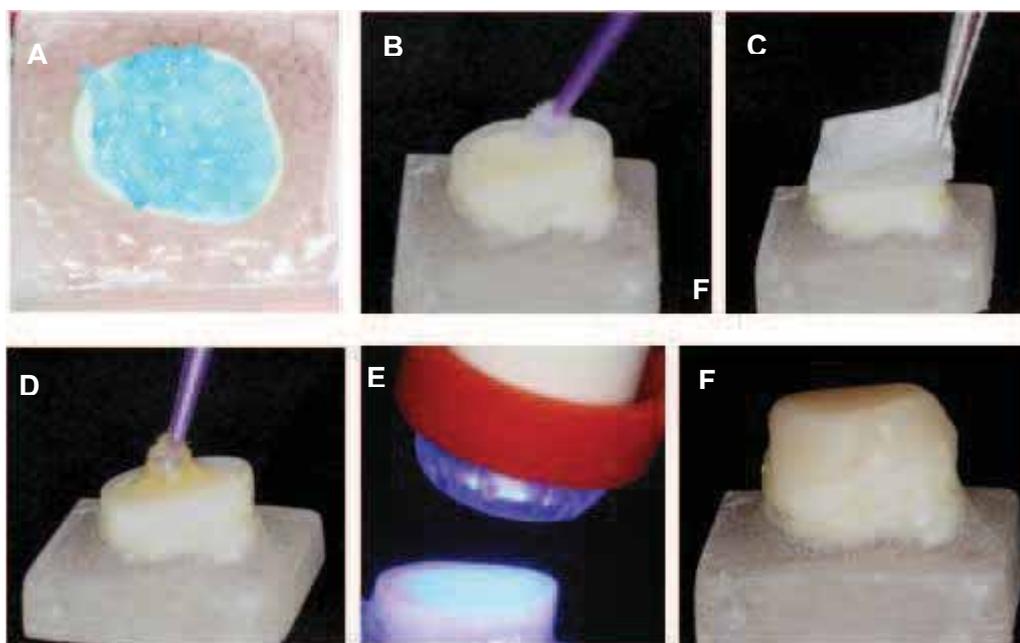


Figura 4 – A) Condicionamento ácido; B) Aplicação de solução correspondente; C) Remoção do excesso com papel absorvente; D) Aplicação do adesivo; E) Fotopolimerização; F) Restauração finalizada.

4.6 Envelhecimento

Os espécimes pertencentes ao subgrupo **I** foram armazenados por 24 h em água deionizada.

No subgrupo **C**, os espécimes foram submetidos ao desgaste termomecânico para simulação do envelhecimento ocorrido na cavidade bucal, por meio da máquina de Desgaste Termomecânico (ER 3700 ERIOS - Equipamentos técnicos e Científicos Ltda., São Paulo - SP, Brasil) (Figura 5 A). Foi realizada a ciclagem mecânica com carga de 88,4N e 240.000 ciclos, o que corresponderia a 1 ano de mastigação normal (Blatz et al., 2008). A carga foi aplicada sobre a restauração de resina, centralmente, e perpendicularmente à superfície de dentina (Figura 5 B). Ao mesmo tempo, as amostras sofreram 1000 ciclos térmicos com banhos em água durante 30 segundos para cada temperatura ($5 \pm 2^\circ \text{C}$, $37 \pm 2^\circ \text{C}$ e $55 \pm 2^\circ \text{C}$), com intervalo de 10 segundos entre cada banho. Para a ciclagem, os espécimes foram parcialmente embutidos em uma base de resina acrílica transparente ativada quimicamente (Jet-Clássico, São Paulo, SP, Brasil).



Figura 5 – A) Máquina de Desgaste Termomecânico; B) Espécime posicionado na máquina.

No subgrupo **A**, os espécimes foram armazenados em potes contendo saliva artificial (Figura 6) preparada pelo método de Gohring et al. (2004) por 6 meses. A saliva foi trocada semanalmente.



Figura 6 – Pote contendo saliva artificial e espécime.

4.7 Teste de Microtração

Ao final do envelhecimento, as amostras foram fixadas a uma base de resina acrílica transparente ativada quimicamente (Jet-Clássico, São Paulo, SP, Brasil), com cera pegajosa (Figura 7 A). Após a fixação, foram seccionadas com o auxílio de uma cortadeira de precisão (Labcut, Extec, Enfield, CT, EUA) em prismas de secção quadrangular com dimensões aproximadas de 1 mm x 1 mm de base (Figura 7 B e C).

Após a obtenção dos palitos, a área da interface adesiva foi medida com o paquímetro digital (Starret Indústria e Comércio Ltda., Itu, SP, Brasil) (Figura 7 D). Os palitos foram fixados individualmente pelas suas extremidades com cianoacrilato em gel (Loctite 454, Henkel) no dispositivo de microtração metálico (Figura 7 E), para realização do ensaio de microtração na máquina de testes universais (DL-200MF, EMIC, São José dos Pinhais- PR, Brasil) (Figura 8 A), com uma célula de carga de 10 kg, a uma velocidade de 1 mm/min (Figura 7 F). No momento da fratura, o teste foi automaticamente interrompido (Figura 7 G).

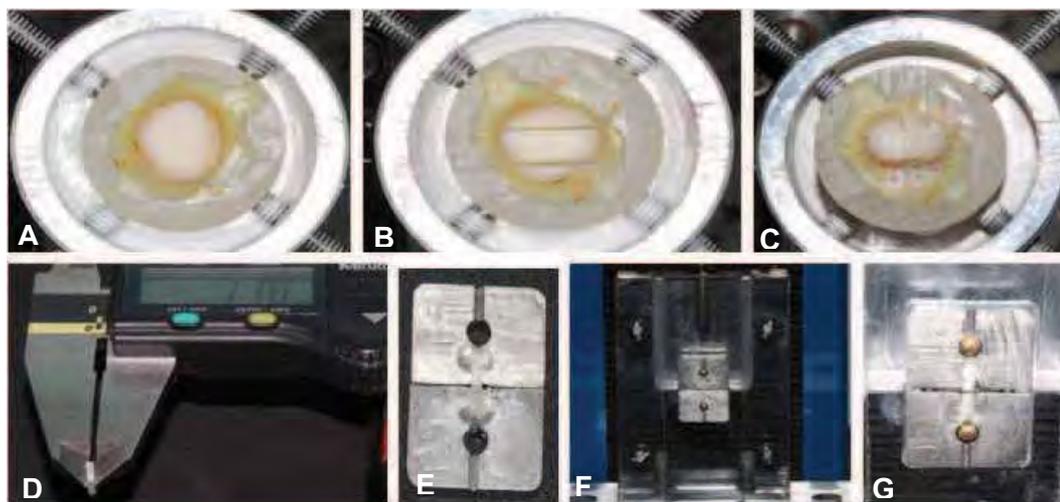


Figura 7 – A) Amostra fixada sobre resina acrílica; B) Corte longitudinal da amostra; C) Corte transversal da amostra; D) Paquímetro medindo palito; E) Palito colado no dispositivo de metal; F) Dispositivo na máquina de testes universais; G) Palito fraturado.

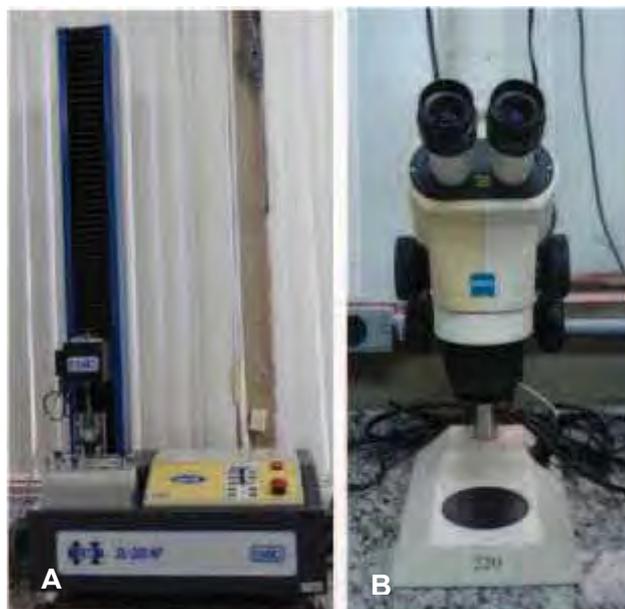


Figura 8 – A) Máquina de Testes Universais; B) Estereomicroscópio óptico.

Ao final do ensaio as partes fraturadas foram analisadas quanto ao padrão de fratura em estereomicroscópio óptico (Stemi 2000-C, ZEISS, Oberkochen, Alemanha) (Figura 8 B), e classificadas em fratura coesiva em resina, coesiva em dentina, adesiva e mista. As falhas pré-teste não foram consideradas.

4.8 Análise ilustrativa por Microscopia Eletrônica de Varredura

Posteriormente, 2 palitos fraturadas de cada subgrupo com fratura adesiva, considerando a parte de dentina, foram desidratados em sílica coloidal por 24 h, montados em *stubs*, onde foi realizada a deposição de ouro com o aparelho Desk II – Denton Vacuum (Moorestown, NJ, EUA). Seguiu-se a observação em um microscópio eletrônico de varredura (JMS 5310 – Jeol, Tóquio, Japão), com 20 kV de

potência, empregando aumentos de 100, 1000 e 5000 vezes, para fins ilustrativos.

4.9 Análise do pH das soluções

Para auxiliar a discussão dos resultados, foi realizado a medição do pH das soluções aplicadas sobre a dentina após o condicionamento ácido, com o pHmetro DM-20 (Digimed, São Paulo, SP, Brasil). Foram realizadas 3 medições e a média aritmética delas foi o valor considerado. A Tabela 2 mostra os valores de pH obtidos.

Tabela 2 – pH das soluções

Solução	pH
Digluconato de clorexidina 0,2%	5,59
Extrato de própolis etílico	5,17
Propomax	7,84
Álcool etílico 70%	6,33

4.10 Planejamento Estatístico

As seguintes hipóteses de nulidade foram testadas:

- H_{0A} : as soluções aplicadas não interferem na resistência de união entre dentina e resina;

- H_{0B} : os tipos de envelhecimento não interferem na resistência de união entre dentina e resina.

Os dados de resistência adesiva (MPa) foram analisados estatisticamente, sendo avaliados quanto à sua normalidade, através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Como estes apresentaram distribuição normal, realizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) de dois fatores e o teste de Tukey. Foi adotado o nível de significância de 5% para a tomada de decisões.

5 RESULTADOS

Os resultados do teste de ANOVA 2 fatores para avaliação da resistência de união encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultado da ANOVA 2 fatores

Fatores	Df	MS	F	p*
Envelhecimento	2	397,72	12,76	0,00*
Solução	4	36,57	1,17	0,32
Envelhecimento x Solução	8	13,07	0,42	0,91

*Diferenças significativas

A Tabela 3 mostra que apenas o fator envelhecimento mostrou diferenças significativas.

A Tabela 4 mostra os resultados do teste de Tukey para o fator envelhecimento. Nela, pode-se observar que a diminuição da resistência de união foi maior no corte imediato (I) do que no armazenamento em saliva artificial por 6 meses (A) e na ciclagem termomecânica (C), porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois últimos.

Tabela 4 – Resultados do teste de Tukey para o fator envelhecimento

Envelhecimento	Média (MPa)	±dp	Conjuntos Homogêneos*
Imediato	31,09	6,24	A
Armazenamento	24,44	4,69	B
Ciclagem	26,78	5,39	B

*Grupos com letras diferentes apresentam diferenças significantes entre si.

A Tabela 5 mostra os valores de média e desvio-padrão de resistência de união (MPa), para cada subgrupo.

Tabela 5 – Valores de média e desvio-padrão de resistência de união (MPa) para cada subgrupo

Grupo	Média (MPa)	±dp
GC. I	28,6	5,3
GC. A	23,98	3,91
GC. C	25,38	6,73
CLX. I	31,61	6,99
CLX. A	26,47	4,45
CLX. C	26,98	3,45
EPE. I	29,15	6,9
EPE. A	23,14	3,91
EPE. C	25,81	4,37
PA. I	32,97	6,68
PA. A	25,07	4,76
PA. C	26,19	7,21
AE. I	33,11	5,51
AE. A	23,54	6,56
AE. C	29,52	4,86

A Figura 9 mostra os valores de média de resistência de união (MPa), para as diferentes soluções utilizadas e diferentes tipos de envelhecimento.

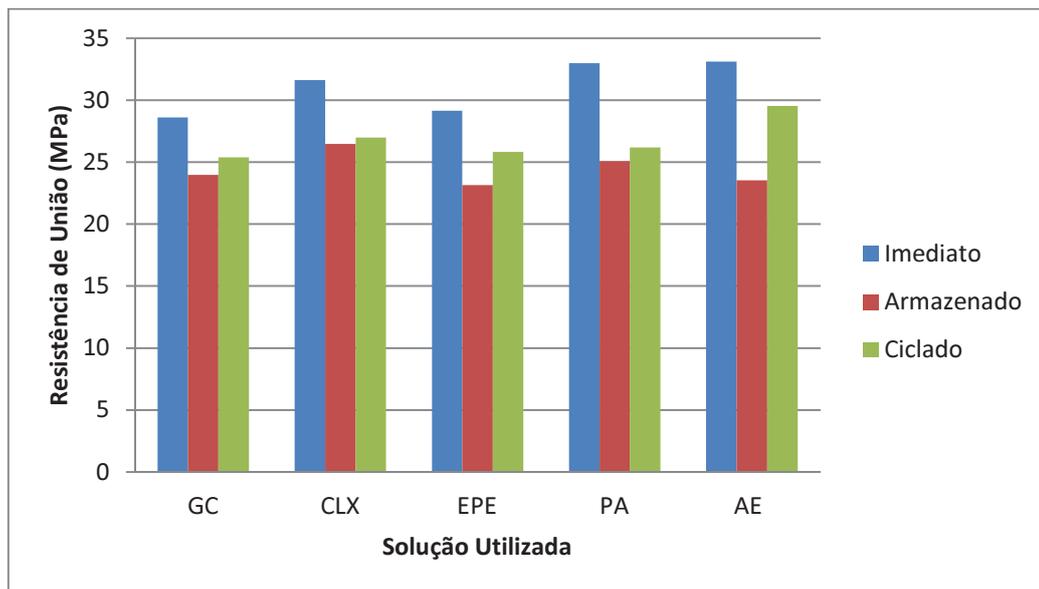


Figura 9 – Médias de resistência de união (MPa) para os diferentes grupos.

A Figura 10 mostra a porcentagem de tipos de fratura dos palitos após o teste de microtração, para cada subgrupo.

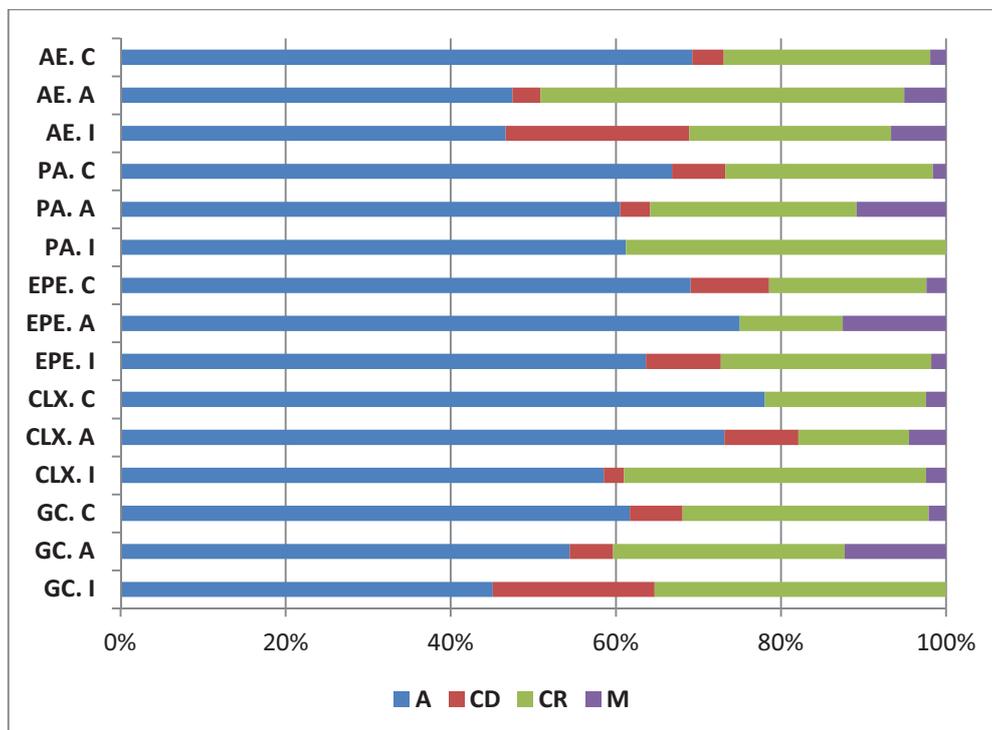


Figura 10 - Porcentagem de tipos de fratura após teste de microtração para cada subgrupo, sendo A – Adesiva; CD – Coesiva em dentina; CR – Coesiva em resina; M – Mista.

As Figuras de 11 a 15 mostram fotomicrografias de MEV da superfície dentinária de palitos após fratura classificada como adesiva para todos os grupos, com aumento de 5000X.

Na Figura 11 A, observamos no palito do subgrupo GC. I que a dentina mostra alguns túbulos obliterados por TAGs de resina e outros vazios, onde houve a remoção do TAG. Observa-se também a rede de fibras colágenas e parte da camada de adesivo. Na Figura 11 B, palito do subgrupo GC. A, observa-se a quebra de alguns TAGs de resina dentro dos túbulos dentinários, obliterando-os, e outros túbulos vazios, sem TAGs, além da trama de colágeno. Na Figura 11 C, subgrupo GC. C, observa-se a luz dos túbulos dentinários e apenas alguns destes com TAGs de resina no seu interior.

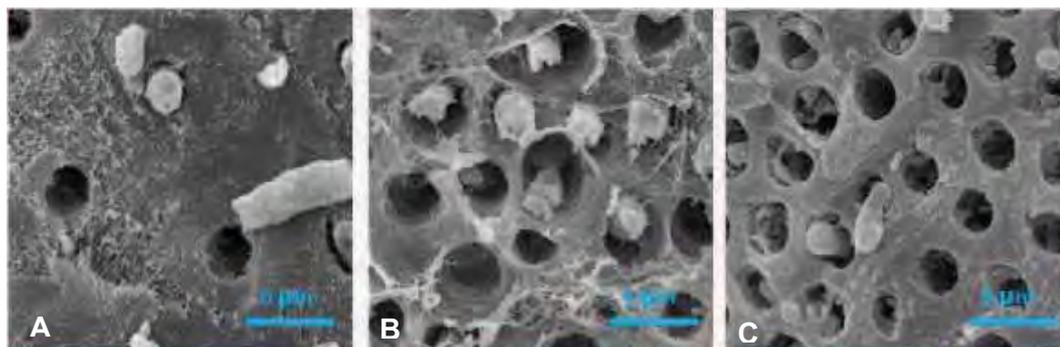


Figura 11 - Fotomicrografia de MEV da superfície dentinária de palitos após fratura avaliada como adesiva para o grupo GC. Aumento de 5000X. A) GC. I; B) GC. A; C) GC. C.

Na Figura 12 A, observamos no palito do subgrupo CLX. I que a dentina mostra túbulos obliterados por TAGs de resina; observa-se também a rede de fibras colágenas, envolvidas por adesivo. Na Figura 12 B, palito do subgrupo CLX. A, observa-se a quebra dos TAGs de resina dentro dos túbulos dentinários, obliterando-os, e a camada de adesivo sobre a dentina. Na Figura 12 C, do subgrupo CLX. C, observa-se alguns túbulos de dentina obliterados por TAGs de resina, além da trama de colágeno e parte da camada de adesivo.

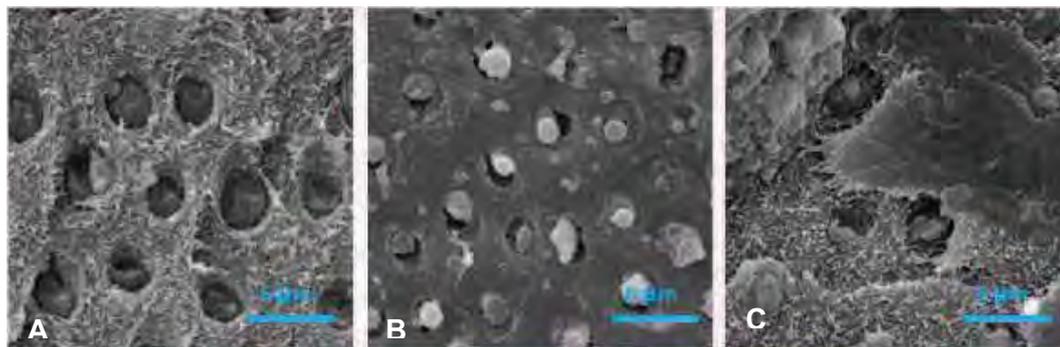


Figura 12 - Fotomicrografia de MEV da superfície dentinária de palitos após fratura avaliada como adesiva para o grupo CLX. Aumento de 5000X. A) CLX. I; B) CLX. A; C) CLX. C.

Na Figura 13 A, observamos no palito do subgrupo EPE. I que a dentina mostra túbulos obliterados por TAGs de resina; observa-se também a rede de fibras colágenas envolvidas por adesivo. Na Figura 13 B, palito do subgrupo EPE. A, observa-se a quebra dos TAGs de resina dentro dos túbulos dentinários, a rede de colágeno e parte da camada de adesivo sobre a dentina. Na Figura 13 C, do subgrupo EPE. C, observa-se TAGs de resina obliterando a entrada dos túbulos dentinários e parte da camada de adesivo.

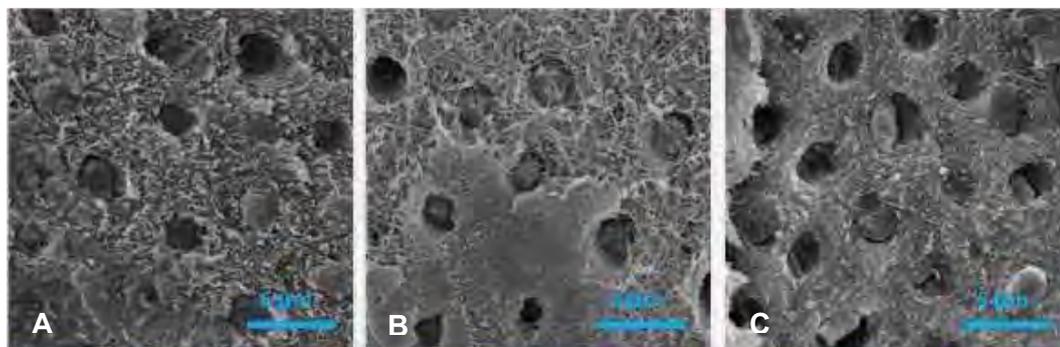


Figura 13 - Fotomicrografia de MEV da superfície dentinária de palitos após fratura avaliada como adesiva para o grupo EPE. Aumento de 5000X. A) EPE. I; B) EPE. A; C) EPE. C.

Na Figura 14 A, observamos no palito do subgrupo PA. I a luz de apenas alguns túbulos dentinários, e que a camada de adesivo cobre quase que completamente a imagem. Na Figura 14 B, palito do subgrupo PA. A, observa-se a quebra dos TAGs de resina dentro dos túbulos dentinários, a luz de apenas um túbulo dentinário e a rede de colágeno. Na Figura 14 C, do subgrupo PA. C, pode-se observar TAGs de

resina obliterando os túbulos dentinários e a camada de adesivo que cobre a dentina.

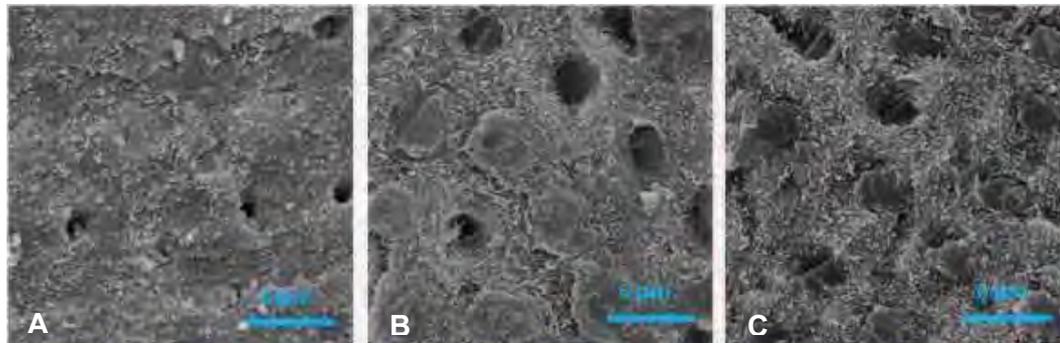


Figura 14 - Fotomicrografia de MEV da superfície dentinária de palitos após fratura avaliada como adesiva para o grupo PA. Aumento de 5000X. A) PA. I; B) PA. A; C) PA. C.

Na Figura 15 A, observamos no palito do subgrupo AE. I alguns túbulos de dentina abertos, outros obliterados por TAGs de resina, a trama de colágeno e parte da camada de adesivo. Na Figura 15 B, palito do subgrupo AE. A, observa-se a quebra dos TAGs de resina dentro dos túbulos dentinários, alguns túbulo dentinário abertos e a camada de adesivo. Na Figura 15 C, do subgrupo AE. C, pode-se observar TAGs de resina obliterando os túbulos dentinários, a rede de colágeno e a no canto inferior esquerdo camada de adesivo.

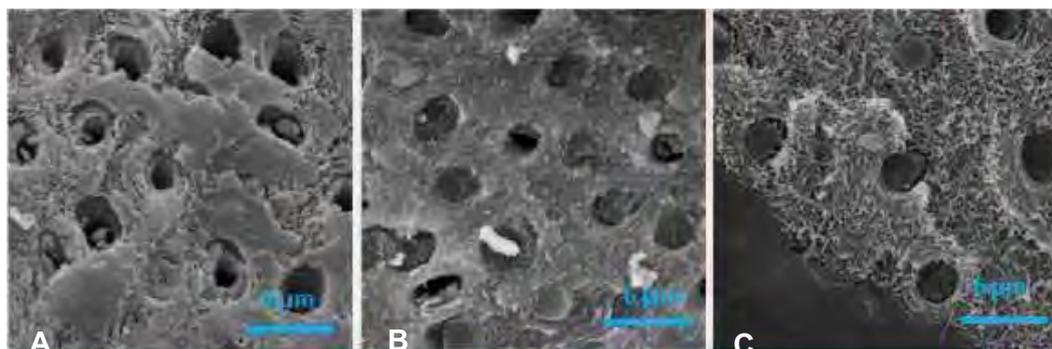


Figura 15 - Fotomicrografia de MEV da superfície dentinária de palitos após fratura avaliada como adesiva para o grupo AE. Aumento de 5000X. A) AE. I; B) AE. A; C) AE. C.

Na Figura 16, observa-se a delimitação de bolhas pela camada de adesivo sobre a camada de dentina, causada pela simulação de pressão pulpar.

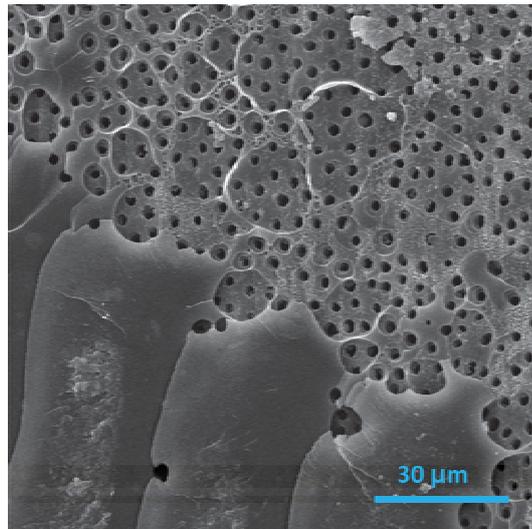


Figura 16 - Fotomicrografia de MEV da superfície dentinária de palito após fratura. Bolhas na superfície causadas pela simulação de pressão pulpar. Aumento de 1000X.

6 DISCUSSÃO

A profundidade do substrato de dentina pode influenciar a resistência de união. Como exemplo, tem-se que é difícil obter valores altos de resistência de união na parede pulpar de dentina profunda, enquanto valores mais altos são obtidos em dentina superficial (Nikaido et al., 2002). Porém, não se optou pela padronização da espessura da dentina, pois clinicamente as duas situações ocorrem. Entretanto, espécimes com espessura de dentina remanescente inferior a 2mm foram descartados.

A situação ideal seria selecionar dentes afetados por cárie, já que clinicamente esta é a situação que ocorre. Porém, Hashimoto et al. (2000), concluíram que a resistência adesiva de espécimes envelhecidos no meio oral não foi afetada pelas condições da superfície dentinária.

Utilizou-se neste estudo o teste de microtração para avaliar a resistência de união. Segundo Miyazaky et al. (2012), em sua revisão sobre os fatores que afetam o desempenho *in vitro* dos sistemas adesivos dentinários, concluíram que testes de resistência de união podem prover informação útil sobre possíveis mudanças nos processos, porém os valores gerados tem um significado limitado. Isso se deve à dispersão dos dados de resistência de união dentinária, ao se comparar os mesmos produtos em diversos estudos (Scherreer et al., 2010). Por isso, os resultados são comentados por A é melhor do que B, ao invés de comparações com os valores numéricos com outros estudos.

A concentração de clorexidina mais usada nos estudos para avaliação de seus possíveis efeitos é de 2% (Hebling et al., 2005; Carrilho et al., 2007; Brackett et al., 2009. Porém, Breschi et al. (2010) e

Mazzoni et al. (2011) concluíram que a clorexidina é capaz de inibir metaloproteinases mesmo quando usada na concentração de 0,2%, que foi a concentração adotada para este estudo. Gendron et al. (1999) observaram em seu estudo que 0,002% é a mínima concentração de clorexidina que levou a uma inibição completa da atividade da MMP-9, e 0,0001% para MMP-2. Isso se dá possivelmente por sua propriedade de quelar o cátion Zn^{2+} .

A concentração do álcool etílico usado neste estudo foi de 12,8 mol/L (Álcool 70). Tezvergil-Mutluay et al. (2011), observaram que o etanol na concentração de 4,28 mol/L foi capaz de inibir aproximadamente 15% de MMP-9 e que a concentração necessária para inibir 50% de MMP-9 seria aproximadamente 19,6 mol/L. No mesmo estudo, especulam que alcoóis que inibem MMPs, com concentrações baixas ou médias, o fazem através da formação de uma ligação covalente coordenada entre o zinco catalítico e o átomo de oxigênio do grupo hidroxila do álcool. Alcoóis com alta concentração podem desnaturar enzimas através da remoção de água destas, causando subsequente desnaturação (Gilbert e McBain., 2003).

Como foi utilizado álcool 70%, optou-se pelo extrato etílico de própolis (10% tintura de própolis e álcool 70). Jin et al, em 2005, observaram que a concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$ de extrato metanólico de própolis foi capaz de inibir aproximadamente 90% da atividade da MMP-9 em zimografia. A concentração de tintura de própolis utilizada na solução deste estudo foi de mais de 120000 $\mu\text{g/ml}$. Para a observação do efeito isolado da própolis, foi utilizada solução aquosa de própolis (Propomax), cujo processo de fabricação é patenteado, que continha aproximadamente 11% de extrato seco de própolis.

Quanto ao fator soluções, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre elas. Esperava-se, baseado na literatura (Breschi et al., 2009; Breschi et al., 2010; Campos et al., 2009; Carrilho et al., 2007a), que as soluções inibidoras de metaloproteinases

(CLX, EPE, PA, AE) tivessem diminuído a perda da resistência de união em relação ao grupo controle (GC). Vários fatores podem explicar estes resultados.

Em vários estudos *in vitro* (Breschi et al., 2009; Breschi et al., 2010; Campos et al., 2009; Carrilho et al., 2007a; Hashimoto et al., 2003; Mobarak, 2011; Stanislawczuk et al., 2001; Zhou et al., 2009) a clorexidina foi capaz de reduzir a diminuição da resistência de união ao longo do tempo, mas não de evitá-la. Porém, a maioria destes (Breschi et al., 2009; Breschi et al., 2010; Carrilho et al., 2007a; Hashimoto et al., 2003; Stanislawczuk et al., 2011; Zhou et al., 2009) realizaram o armazenamento dos dentes já na forma de palitos. Apenas dois estudos *in vitro* realizaram o envelhecimento com o próprio dente (Campos et al., 2009; Mobarak., 2011), porém em um deles o armazenamento foi por 6 meses, associado à simulação de pressão pulpar durante todo o tempo e com envelhecimento termomecânico e o outro por 2 anos, associado à simulação de pressão pulpar durante todo o armazenamento.

No presente estudo, foi realizado o envelhecimento do próprio dente. Com isso, obtém-se a proteção da interface dentina-resina pela interface esmalte-resina, o que diminui a degradação (De Munck et al., 2003; Gamborgi et al., 2007). Presume-se que sem a proteção da interface esmalte-resina, a água alcance mais rapidamente a interface dentina-resina, promovendo a degradação da estrutura e diminuindo acentuadamente a resistência de união (Carvalho et al., 2012).

Nos estudos *in vivo* (Brackett et al., 2009; Carrilho et al., 2007b; Hebling et al., 2005), o tempo de envelhecimento na cavidade oral variou de 6 a 14 meses, e para todos os estudos observou-se que nos grupos experimentais com tratamento prévio com clorexidina a camada híbrida permanecia intacta, ao contrário dos respectivos grupos controle. Apesar de um dos estudos ter realizado o envelhecimento por 6 meses (Carrilho et al., 2007b), como no presente estudo, o dente estava exposto

ao ambiente ideal, sofrendo todo tipo de envelhecimento ao mesmo tempo, o que não ocorreu no estudo.

A simulação de pressão pulpar, que também foi realizada presente estudo, influencia significativamente na redução da resistência de união, como foi observado em estudos prévios (Hiraishi et al., 2009; Hosaka et al., 2007; Mitchem et al., 1988; Sauro et al., 2007). Hashimoto et al., em 2000, observaram que quando o procedimento adesivo foi realizado sob pressão hidrostática, a quantidade de movimento de água através da interface resina-dentina aumentou após a polimerização, quando comparado com o procedimento adesivo realizado sem pressão hidrostática. Isto também explica a maior ocorrência de fraturas adesivas, em relação aos outros tipos de fratura, em todos os grupos (Figura 10). Hosaka et al., em 2007, também observaram que quando há simulação de pressão pulpar, a maioria das fraturas nos testes de microtração é adesiva.

Portanto, a não observância da menor diminuição da resistência de união dos grupos experimentais pode ser explicada pelos fatores: tipo de envelhecimento, tempo de envelhecimento, presença de borda de esmalte e simulação de pressão pulpar. Positivamente, observa-se também que a aplicação de todas as soluções inibidoras de metaloproteinases não diminuiu a resistência de união em relação ao grupo controle. Observa-se uma tendência numérica (Tabela 5 e Figura 9), porém não estatisticamente significante, de menor diminuição da resistência de união nos grupos experimentais em relação ao grupo controle.

Valores de pH entre 2,3 e 5 são efetivos em ativar metaloproteinases, em um processo chamado ativação ácida. O ácido fosfórico a 37%, utilizado neste estudo, tem pH de 0,17. Pelo seu pH muito baixo, causa desnaturação parcial das metaloproteinases. Entretanto, adesivos convencionais de dois passos, como Single Bond (pH de 3,6), utilizado neste estudo, conseguem reativar a atividade

enzimática (Campos et al., 2009; Carrilho et al., 2007; Pashley et al., 2004; Tjårdene et al., 1998). Quanto às soluções utilizadas, observa-se que o pH encontrado variou de 5,17 a 7,84 (Tabela 2), o que pode ter efeito positivo, diminuindo a ativação de metaloproteinases.

Como esperado, foi encontrada diferença estatisticamente significativa para o fator envelhecimento: os envelhecimentos por armazenamento e ciclagem termomecânica reduziram os valores de resistência de união em relação ao corte imediato, como mostram as tabelas 3 e 4. Contudo, tanto o armazenamento em saliva por 6 meses (degradação química), quanto a ciclagem termomecânica com 240.000 ciclos mecânicos e 1000 ciclos térmicos (degradação química e mecânica) não diferiram entre si.

Não há consenso entre os autores sobre uma equivalência entre ciclos mecânicos e o desgaste *in vivo*. Blatz et al, em 2008, sugerem que 1.200.000 ciclos mecânicos corresponderiam a 5 anos *in vivo*, porém não justificam esta informação.

Com relação aos ciclos térmicos, também não há consenso. O ISO TR 11450 (1994), indica que 500 ciclos com temperatura de 5° C e 55 °C é um teste de envelhecimento acelerado apropriado. Porém, Gale e Darvel (1999), ao realizarem uma extensa revisão sobre o assunto, sugeriram que 10.000 ciclos equivaleriam a um ano *in vivo*. Ou seja, 1000 ciclos térmicos equivaleriam a 1,2 mês de envelhecimento *in vivo*.

Para superar as diferenças dos estudos *in vivo* e *in vitro*, Nikaido et al. (2002) sugerem que os espécimes sejam envelhecidos de diversas formas ao mesmo tempo. Isto é o que acontece, por exemplo, na ciclagem termomecânica, que foi adotada para parte das amostras deste estudo.

Ao compararmos os valores obtidos de resistência de união (Tabela 4) para o armazenamento em saliva por 6 meses (degradação química) e para a ciclagem termomecânica com 240.000

ciclos mecânicos (o que corresponderia a 1 ano *in vivo* – degradação mecânica) e 1000 ciclos térmicos (o que corresponderia a 1,2 mês *in vivo* – degradação química), pode-se inferir que:

- a degradação química (hidrolítica) demonstrou maior influência sobre a redução da resistência de união, tendo em vista que o determinado tempo *in vivo* foi maior para a ciclagem do que para o armazenamento, e a diminuição da resistência de união não diferiu estatisticamente entre eles;
- novos estudos devem ser realizados quanto à ciclagem térmica, para maior equivalência entre o que ocorre *in vivo* e *in vitro*;
- como esperado, os métodos de envelhecimento determinaram diminuição da resistência de união, rejeitando, portanto, a hipótese de nulidade H_{0b} .

Liu et al., em 2011, concluíram que a adesão dentinária não é tão durável como foi assumido previamente, sendo dois mecanismos os principais envolvidos na degradação da interface entre resina e dentina através do tempo. Um mecanismo é a hidrólise lenta dos componentes da resina, causados pela sorção de água ou esterases. Outro é a degradação da zona rica em água e pobre em fibras de colágeno dentro da camada híbrida, através da ativação de MMPs e catepsinas durante os procedimentos adesivos. Zhang et al., em 2009, observaram que água é um fator fundamental para a função hidrolítica das MMPs. Portanto, pode-se considerar que para a interface adesiva, o estresse mecânico ao qual o dente é submetido não é tão relevante quanto o químico, causado pela exposição do dente à saliva.

Embora este estudo não tenha confirmado o efeito das soluções de própolis, álcool e clorexidina como inibidores de metaloproteinases, recomenda-se a aplicação destes inibidores previamente à aplicação dos sistemas adesivos, baseado em diversos

trabalhos que atestam sua capacidade não só de inibir a degradação do colágeno na camada híbrida, aumentando a durabilidade da adesão dentinária, mas também de prevenir a ocorrência de cáries secundárias ao redor das restaurações (Zhang et al., 2009; Kim et al., 2011).

Sugere-se, entretanto, que sejam realizados estudos futuros com diferentes soluções inibidoras de metaloproteinases, considerando entre os fatores de variação o envelhecimento por armazenamento com maior tempo, ou com ciclagem termomecânica com maior número de ciclos, ou ainda a associação destes.

7 CONCLUSÃO

Considerando a metodologia aplicada, e através dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O uso de diferentes soluções inibidoras de metaloproteinases não interferiu na resistência de união entre dentina e resina;
- A ciclagem termomecânica e o armazenamento em saliva artificial diminuíram a resistência de união da resina à dentina.

8 REFERÊNCIAS*

Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J endo.* 2004;30(5):359-61.

Armstrong SR, Keller JC, Boyer DB. The influence of water storage and C-factor on the dentin-resin composite microtensile bond strength and debond pathway utilizing a filled and unfilled adhesive resin. *Dent Mater.* 2001;17:268-76.

Belli R, Sartori N, Peruchi LD, Guimaraes JC, Araujo E, Monteiro S Jr., et al. Slow progression of dentin bond degradation during one-year water storage under simulated pulpal pressure. *J Dent.* 2010;38:802-10.

Blatz MB, Oppes S, Chiche G, Holst S, Sadan A. Influence of cementation technique on fracture strength and leakage of alumina all-ceramic crowns after cyclic loading. *Quintessence Int.* 2008;39(1):23-32.

Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S et al. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent.* 2009;34(4):379-83.

Brackett MG, Li N, Brackett WW, Sword RJ, Qi YP, Niu LN et al. The critical barrier to progress in dentine bonding with the etch-and-rinse technique. *J Dent.* 2011;39:238-48.

*Baseado em:

Internacional Comite of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referentes [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vitad F, Carrilho M et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *Adhes dent.* 2009;11(3):191-98.

Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjårdene L et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater.* 2010;26:320-25.

Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater.* 2010;26:571-8.

Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nature reviews/ Molecular cell biology.* 2002;3: 207-14.

Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnell R, Yamauchi M. Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch Oral Biol.* 2008;53:109-16.

Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol.* 1998;36:347-63.

Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent.* 2009;37:108-14.

Caron C, Xue J, Bartlett JD. Expression and localization of membrane type 1 matrix metalloproteinase in tooth tissue. *Matrix Biology.* 1998;17: 501-11.

Carrilho MRO, Carvalho RM, Goes MF, di Hipólito V, Geraldini S, Tay FR et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* 2007;86(1):90-94.

Carrilho MRO, Grealde S, Tay FR, Goes MF, Carvalho MR, Tjardene L et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res*. 2007;86(6):529-33.

Carvalho RM, Manso AP, Grealde S, Tay FR, Pashly DH. Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. *Dent Mater*. 2012; 28: 72-86.

Cawe B, Van den Steen PE, Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Critical biochem mol biol*. 2007;42:113-85.

Clark IM, Swingler TE, Sampieri CI, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The International Biochem Cell Biol*. 2008;40:1362–78.

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, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M et al. Critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*. 2005;84(2):118-32.

Ferreira FBA, Torres SA, Rosa OPS, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104:709-16.

Fiotti N, Tubaro F, Altamura N, Grassi G, Moretti M, Dapas B et al. Alcohol reduces MMP-2 in humans and isolated smooth muscle cells. *Alcohol*. 2008;42:389-95.

Frankenberger R, Pashley DH, Reich SM, Lohbauer U, Petschelt A, Tay FR. Characterisation of resin–dentine interfaces by compressive cyclic loading. *Biomaterials*. 2005;26:2043–52.

Frankenberger R, Strobel WO, Lohbauer U, Krämer N, Petschelt A. The effect of six years of water storage on resin composite bonding to human dentin. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater.* 2003; 69B(1):25-32.

Gale MS, Darvell BW. Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. *J Dent.* 1999; 27:89-99.

Gamborgi GB, Loguercio AD, Reis A. Influence of enamel border and regional variability on durability of resin–dentin bonds. *J Dent.* 2007;35:371-76.

Gendron RE, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8 and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6(3):437-439.

Gilbert P, McBain AJ. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(2):189-208.

Gohring TN, Zehnder M, Sener B, Schmidlin PR. In vitro microleakage of adhesive-sealed dentin with lactic acid and saliva exposure: a radioisotope analysis. *J Dent.* 2004;32:235-40.

Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1-3 years. *J Dent Res.* 2000;79(6):1385-91.

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

Hayacibara MF, Koo H, Rosalen PL, Duarte S, Franco EM, Bowen WH, et al. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Ethnopharmacol.* 2005;101:110-5.

Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005;84(8):741-46.

Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR. Effect of pulpal pressure on the microtensile bond strength of luting resin cements to human dentin. *Dent Mater.* 2009;25:58-66.

Hosaka K, Nakajima M, Yamauti M, Aksornmuang J, Ikeda M, Foxton RM, et al. Effect of simulated pulpal pressure on all-in-one adhesive bond strengths to dentine. *J Dent.* 2007;35:207-13.

International Organization for Standardization. ISO TR 11405; Dental Materials – guidance on testing of adhesion to tooth structure. 1994.

Jin UH, Chung TW, Kang SK, Suh SJ, Kim JK, Chung KH et al. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. *Clinica Chimica Acta.* 2005;362:57-64.

Kayaoglu G, Omurlu H, Akca G, Gurel M, Gencay O, Sorkun K, et al. Antibacterial activity of propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. *J Endod.* 2011;37:376-81.

Kim D-S, Kim J, Choi K-K, Kim S-Y. The influence of chlorhexidine on the remineralization of demineralized dentine. *J Dent.* 2011;39:855-62.

Lin J, Mehl C, Yang B, Kern M. Durability of four composite resin cements bonded to dentin under simulated pulpal pressure. *Dent Mater.* 2010; 26:1001-9.

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

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;86:436-40.

Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, Ruggeri A, Jr., et al. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *J Dent.* 2011; 39:231-7.

Mazzoni A, Carrilho M, Papa V, Tjaderhane L, Gobbi P, Nucci C, et al. MMP-2 assay within the hybrid layer created by a two-step etch-and-rinse adhesive: biochemical and immunohistochemical analysis. *J Dent.* 2011; 39:470-7.

Mitchem JC, Terkla LG, Gronas DG. Bonding of resin dentin adhesives under simulated physiological conditions. *Dent Mater.* 1988;4:351-53.

Mjör IA, Moorhead JE, Dahl JE. Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice. *Int Dent J.* 2000;50:361-66.

Mobarak EH. Effect of chlorhexidine pretreatment on bond strength durability of caries-affected dentin over 2-year aging in artificial saliva and under simulated intrapulpal pressure. *Oper Dent.* 2011;36(6):649-60.

Murchison DF, Roeters J, Vargas MA, Chan DCN. Direct anterior restorations. In: Summit JB, Robbins JW, Hilton TJ, Schwartz RS, editores. *Fundamentals of operative dentistry: a contemporary approach.* 3 ed. Illinois: Quintessence Publishing Co; 2006. Cap. 9, p.261-288.

Miyazaki M, Tsubota K, Takamizawa T, Kurokawa H, Rikuta A, Ando S. Factors affecting the in vitro performance of dentin-bonding systems. *Jap Dent Sci Rev.* 2012;48:53-60.

Nicholson JW. Biologic considerations. In: Summit JB, Robbin SW, Hilton TJ, Schwartz RS. *Fundamentals of Operative Dentistry: a contemporary approach.* 3a ed. Illinois: Quintessence Publishing Co; 2006. Cap. 1, p.1-36.

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;18:269-75.

Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY et al. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent*. 2011;39:536-42.

Osorio R, Toledano M, Osorio E, Aguilera FS, Tay FR. Effect of load cycling and in vitro degradation on resin-dentin bonds using a self-etching primer. *J Biomed Mater Res*. 2005;72 A:399-408.

Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-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.

Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nature Rev Cancer*. 2002;2:657-72.

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.

Reis AF, Gianinni M, Ambrosano GMB, Chan DCN. The effects of filling techniques and a low-viscosity composite liner on bond strength to class II cavities. *J Dent*. 2003;31:59-66.

Sadek FT, Castellan CS, Braga RR, Mai S, Tjårdene L, Pashley DH et al. One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol wet-bonding technique. *Dent Mater*. 2010;26:380-86.

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.

Sauro S, Pashley DH, Montanari M, Chersoni S, Carvalho RM, Toledano M et al. Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2007;23:705–13.

Scherrer SS, Cesar PF, Swain MV. Direct comparison of the bond strength results of different test methods: a critical literature review. *Dent Mater.* 2010;26:e78-e93.

Sforcin JM, Orsi RO, Bankova V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *J Ethnopharmacol.* 2005;98:301-5.

Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol.* 2011;133:253-60.

Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin–dentin interfaces. *J Dent.* 2011;39:40-47.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjårdene L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2007;52:121-27.

Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Uchiyama T, Tjårdene L, Breschi L et al. Inhibition of MMPs by alcohols. *Dent Mater.* 2011;27:926-33.

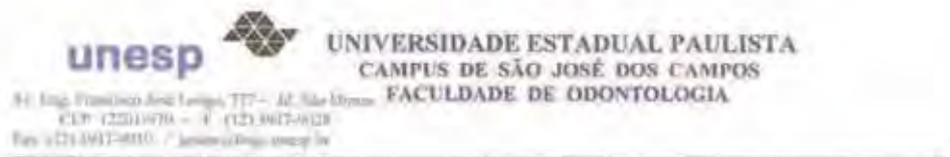
Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Lannas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998;77(8):1622-29.

Valera MC, Rosa JA, Maekawa LE, Oliveira LD, Carvalho CAT, Koga-Ito CY et al. Action of propolis and medications against escherichia coli and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110:e70-e74.

Wang Y, Spencer P. Hybridization Efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res.* 2003;82(2):141-45.

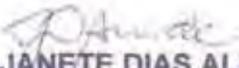
Yiu CKY, King NM, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Carrilho MRO et al. Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. *Biomaterials*. 2004;25:5789–96.

Zhang S, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci*. 2009;1(4):163-176.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **076/2011-PH/CEP**, referente ao Projeto intitulado “Efeito da utilização do própolis na resistência de união entre dentina e resina composta”, sob a responsabilidade de **LETÍCIA CARVALHO COUTINHO COSTA PEROTE**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com seres humanos, conforme, Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 11 de outubro de 2011.


Prof. Adjunto **JANETE DIAS ALMEIDA**
Coordenadora

ANEXO B – Declaração da doação dos dentes

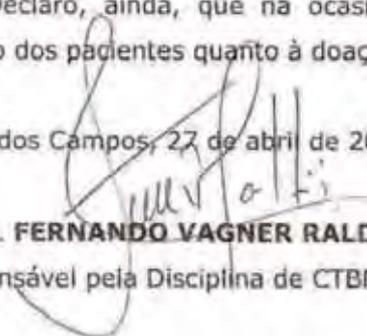
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Faculdade de Odontologia

DECLARAÇÃO

Declaro, para os fins que se fizerem necessários, que os 105 (cento e cinco) dentes recolhidos com a finalidade de pesquisa, pela aluna **LETÍCIA C. C. COSTA PEROTE**, foram extraídos de pacientes atendidos no ambulatório da Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos – UNESP, por motivo ortodôntico, o qual seriam descartados após a extração, caso não fossem de utilidade para a referida aluna.

Declaro, ainda, que na ocasião foi solicitado o consentimento esclarecido dos pacientes quanto à doação do material para pesquisa científica.

São José dos Campos, 27 de abril de 2011


Prof. Dr. **FERNANDO VAGNER RALDI**
Responsável pela Disciplina de CTBMF