

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Curso de Pós-Graduação em Odontologia

Bruna de Oliveira Reis

**INFLUÊNCIA DE INIBIDORES DE PROTEASES NO
POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO
PROVENIENTE DA DENTINA SADIA, ESCLERÓTICA
E AFETADA POR CÁRIE**

ARAÇATUBA - SP

2017

Bruna de Oliveira Reis

**INFLUÊNCIA DE INIBIDORES DE PROTEASES NO
POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO
PROVENIENTE DA DENTINA SADIA, ESCLERÓTICA
E AFETADA POR CÁRIE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para a obtenção do título de “Mestre em Odontologia” – Área de Concentração em Dentística.

Orientador: Prof. Adj. Dr. Paulo Henrique dos Santos

Coorientadora: Prof^a. Ass. Dra. Ticiane Cestari Fagundes Tozzi

ARAÇATUBA - SP

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

Catalogação na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

O48i Oliveira-Reis, Bruna de.
Influência de inibidores de proteases no potencial de degradação do colágeno proveniente da dentina sadia, esclerótica e afetada por cárie / Bruna de Oliveira Reis. - Araçatuba, 2017
85 f.: 2 il.; 7 tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Paulo Henrique dos Santos
Coorientadora: Profa. Ticiane Cestari Fagundes Tozzi

1. Dentina 2. Colágeno 3. *Camellia sinensis* 4. Catequina
I. Título

Black D2
CDD 617.6

Dados Curriculares

Bruna de Oliveira Reis

NASCIMENTO

24/09/1990 – São Paulo - SP

FILIAÇÃO

Salatiel de Oliveira

Lídia de Oliveira

2009/2014

Curso de Graduação em
Odontologia Universidade Estadual
Paulista - UNESP, Faculdade de
Odontologia de Araçatuba.

2015/2017

Obtenção dos créditos referentes ao
curso de Pós-Graduação em
Odontologia, área de concentração
Dentística, nível de Mestrado,
Universidade Estadual Paulista -
UNESP, Faculdade de Odontologia
de Araçatuba.

Dedicatória

Dedicatória

À Deus

Que me criou e me conhece desde o ventre da minha mãe. Razão pela qual procuro ser melhor do que fui ontem. Amor que me ensina e consola. Sem esse amor eu nada seria! Obrigada, Senhor.

À minha mãe, Lídia de Oliveira

Uma pessoa de bondade e caráter incomparáveis, que através de bons exemplos, me mostrou a importância que existe em se conduzir uma vida em intimidade com Deus. Antes de minha mãe, uma mulher humilde, batalhadora e sempre doce, apesar dos dias amargos já vividos. Obrigada por ser a minha segurança, por cuidar de mim com amor incondicional, e por todo o suor derramado para me criar e promover tudo o que precisei para chegar até aqui. Você é o meu maior motivo para vencer! Te amo infinitamente.

Ao meu pai, Salatiel de Oliveira

Por todos os cuidados desde a infância. Por ter me educado e proporcionado muitos dias felizes na vida! Homem de vida sofrida, que através de sua história me ensinou o valor de coisas pequenas. Obrigada por me incentivar, acreditar nos meus sonhos e me permitir vivê-los! Amo você.

Aos meus tios, Elis Regina Oliveira Cotello e José Roberto Scalon Cotello

Grandes amores, que sempre confiaram em mim, me incentivaram nos estudos, e estiveram à disposição para proporcionar aquilo que meus pais não puderam. Sem vocês, o caminho até aqui seria muito mais longo e árduo. Devo a maior parte dos meus sonhos realizados à vocês! Espero sempre valer a pena. Meu amor e gratidão serão eternos!

Agradecimentos

especiais

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Henrique dos Santos

A minha referência de como ensinar e guiar alunos de forma humana. Sua humildade, compromisso, e paciência me estimulam a buscar fazer meu trabalho pensando em superar minhas dificuldades. Em meio à competitividade do meio em que vivemos, o sr é a calma que sempre me lembra do quanto a qualidade deve vir antes da quantidade. E esse pensamento em comum nos permitiu e permite uma relação de confiança e respeito. É um privilégio muito grande ter o sr como orientador e a certeza de que além disso, tenho um grande amigo. Muito obrigada por tudo!

À minha coorientadora, Profa. Dra. Ticiane Cestari Fagundes Tozzi

Por acreditar e confiar em mim desde a graduação, me oferecendo oportunidades e abrindo portas. Com sua eficiência, organização e bons conselhos muitas vezes me ajudou a enxergar formas de melhorar. Muito obrigada por se preocupar e contribuir tanto para a minha formação! Tenho muito carinho pela sra.

Às minhas parceiras, “Pauletes A1”, Ana Teresa Malufy Proni e Thaís Yumi Umeda Suzuki

O professor Paulinho me proporcionou muitas coisas boas na vida, uma delas foi a oportunidade conhecer e de trabalhar com pessoas como vocês! Uma que me ensina a ser apaixonada pela clínica e o poder de transformar sorrisos, e a outra (Paulete Master) que me ensina a importância e beleza de uma pesquisa bem delineada e realizada. Vocês são incríveis! Grandes exemplos de profissionais e pessoas para mim. Me sinto extremamente abençoada por tudo o que me ensinam no dia-a-dia, por todo o carinho, amizade, conselhos e até pelas broncas. Amo muito muito muito vocês! Contem sempre comigo. OBRIGADA!

Ao meu esposo, Erik Neiva Ribeiro de Carvalho Reis

Presente que recebi durante o mestrado, para me ajudar a evoluir tanto pessoalmente como profissionalmente! Meu melhor amigo e companheiro em todas as situações! Me mostra todos os dias a diferença entre pessoas que entram nas nossas vidas, e pessoas que DEUS coloca em nossas vidas. Sou muito grata pela sua existência! Te amo!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo nº 2015/10566-7), indispensável para a realização deste trabalho.

Agradecimientos

Agradecimentos

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba** pela oportunidade de fazer parte do programa de pós-graduação desta instituição. Tenho muito orgulho de ser unespiana e ter a oportunidade de poder aprender e usufruir da estrutura física e dos docentes desta casa desde a minha graduação. Minha eterna gratidão e admiração!

Ao **Prof. Dr. Eduardo Bresciani**, por ser um dos principais pensadores no desenvolvimento deste projeto à mim confiado.

À **Profa. Dra. Anuradha Prakki**, pela enorme participação no desenvolvimento do projeto, além de ajuda fundamental durante o meu preparo para iniciar o experimento, dando dicas, ensinando e se colocando sempre à disposição para contribuir. Muito obrigada!

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, **Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso**. Primeiramente por todos os ensinamentos na dentística desde a graduação, por todo o carinho e incentivo durante a convivência no departamento, e por estar sempre disposto a me ouvir e ajudar. Segundo, pela competência e maestria na condução da nossa pós-graduação. Muito obrigada, professor! Conte comigo para o que precisar.

Às funcionárias da secretaria de pós-graduação, **Valéria Zagato, Critiane Lui e Lilian Mada**, pela paciência no esclarecimento e resolução dos problemas burocráticos no decorrer destes dois anos de mestrado.

Ao assistente administrativo, **Washington de Brito Martins**, e presidente do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos, **Prof. Dr. André Bertoz**, por toda a assessoria durante o processo de submissão da pesquisa ao comitê de ética, sempre muito educados e solícitos. Muito obrigada!

À todos os **professores do curso de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela oportunidade de crescimento e por todo conhecimento científico compartilhado.

Ao **Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por todos os ensinamentos transmitidos, pela motivação e carinho com que me trataram desde a graduação.

À funcionária, **Andresa Almeida**, por manter o nosso ambiente de trabalho sempre limpo e agradável.

Às técnicas, *Elaine e Nelci*; e ao secretário *Peterson*, do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, agradeço por estarem sempre dispostos a ajudar com muita competência, paciência, e atenção; colaborando para o sucesso de todos os trabalhos.

Aos pacientes, pela confiança depositada a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as nossas habilidades e contribuindo para a ciência, minha gratidão.

Ao *Departamento de Materiais Dentários e Prótese* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP e ao professor *Wirley Assunção*, pela recepção e autorização do uso da cortadeira, fundamental para a realização deste trabalho.

Ao *Departamento de Odontologia Infantil e Social* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP e ao professor *Alberto Carlos Botazzo Delbem e alunos de pós-graduação do departamento*, pela recepção e autorização do uso da balança de precisão, mesa agitadora e centrífuga, também indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao professor *Getúlio de Vasconcelos e sua equipe (Vitor Ribeiro, Silvelene, e Viviane Teleginski)*, do *Instituto de Estudos Avançados*, Centro Técnico Aeroespacial de São José dos Campos, pela gentileza em me ensinar a operar e conceder autorização para utilização do Nanoindentador, equipamento indispensável para a realização deste trabalho. Além de todo o carinho e cuidado durante minha estadia na cidade. Vocês são muito especiais e queridos por mim. Muito obrigada!

Ao *Laboratório de Bioquímica* da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, em especial à técnica *Larissa Tercilia Grizzo*, pelo empenho e gentileza para manipulação da saliva artificial necessária para o desenvolvimento deste estudo.

Aos professores *Renato Sundfeld, Ricardo Okida, Rodrigo Sversut e Silvio Mauro*, por todos os ensinamentos passados, atenção e ajuda.

Ao professor *Eloi Dezan*, pelas oportunidades de participação nos projetos do grupo PET da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Além do carinho, atenção e amizade.

Aos professores, *Leonardo Perez Faverani e Ana Paula Fernazi Bassi*, do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, por toda a disponibilidade em ajudar nos projetos paralelos realizados no departamento.

Ao aluno de pós-graduação e colega de turma, *Bruno Guandalini Cunha*, pelo carinho e paciência em me ensinar no preparo da solução da EGCG e familiarização no laboratório da pediatria. Muito obrigada!

Aos colegas e também já orientados pelo professor Paulinho, *André Godas e Ana Paula de Albuquerque Guedes*, pela disponibilidade em ajudar sempre. Desde a minha iniciação

científica até os termos para doação de dentes, necessários para o comitê de ética deste trabalho. Muito obrigada!

Às colegas de equipe, **Mariana Dias Moda**, pela parceria durante as clínicas de dentística, no início da pós-graduação, como minha dupla e pelas vezes que me esclareceu dúvidas e ajudou; e **Glúvia Queiroz** pelos ainda poucos, mas bons momentos de convivência.

Ao colega de equipe e de turma, **Henrico Badaoui Strazzi Sahyon**, por ter me ensinado tantas coisas, dentre elas como usar a embutidora e a cortadeira. Muito obrigada por tudo, Paulito!!

Às minhas colegas de pós-graduação orientadas pelo professor André Briso, **Úrsula Escalero, Sandra Borghi, Janáina Cardoso, Morganna Borges, Ana Carolina Souza e Marjorie Gallinari**, por serem sempre presentes, dispostas a ajudar, e me “salvarem” diversas vezes no departamento. Pessoas muito esforçadas que merecem muito sucesso. Obrigada por toda a ajuda, meninas!

Aos meus colegas de pós-graduação orientados pelo professor Renato Sundfeld, **Lucas Silveira Machado, Fabio Martins Salomão, Laura Molinar Franco, Núbia Pini e Caio Pavani**, por estarem sempre à disposição para me ajudar quando precisei. Além de me oferecerem oportunidades impagáveis de trabalhar em parceria! Vocês são demais. Obrigada!

Aos **colegas de pós-graduação do Departamento de Cirurgia** e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, sempre presentes e dispostos a ajudar. Muito obrigada!

Aos colegas de departamento, **Francine Benetti, Carlos Bueno, Renan Dal Fabbro, e Mariane Azuma**, por toda a atenção, ajuda e carinho.

Às minhas amigas desde a graduação, **Hiskell Francine Fernandes e Oliveira e Marcela Ito Rey**, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e por toda nossa história juntas.

À minha melhor amiga, “soul sister”, **Mariana Alves de Souza**, por ser como uma irmã para mim, presente desde sempre, compartilhando todas as dificuldades e vitórias. Te amo!

A todos os meus **familiares**, pelo amor e apoio em todas as fases da minha vida.

**À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse concluído
deixo o meu MUITO OBRIGADA!**

*“Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você
veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.”*

Martin Luther King

Resumo

OLIVEIRA-REIS, B. Influência de inibidores de proteases no potencial de degradação do colágeno proveniente da dentina sadia, esclerótica e afetada por cárie. [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2017.

Resumo

Objetivo: Avaliar a influência de inibidores de proteases no potencial de degradação do colágeno das dentina sadia, esclerótica e afetada por cárie.

Materiais e métodos: Trinta e nove molares humanos foram utilizados, treze para cada condição dentinária. Três fatias foram obtidas de cada dente, cada uma imersa em diferentes soluções: 1) saliva artificial; 2) clorexidina 2%; 3) EGCG 0,5%. Após incubação nas soluções por 1h, amostras foram sujeitas à degradação enzimática pela colagenase derivada da *Clostridium histolyticum*. Propriedades mecânicas de nanodureza (HIT) e módulo de elasticidade (Er) dos três diferentes tipos de dentina foram mensuradas antes e após a degradação, bem como a resistência à tração do colágeno. Resultados do

teste de resistência à tração e nanoindentação foram submetidos à ANOVA dois e três fatores para medidas repetidas, e pós-teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Resultados: Maiores valores de resistência à tração foram encontrados para dentina sadia, nos grupos controle ($40,30 \pm 21,38$ MPa) e EGCG 0,5% ($30,05 \pm 19,67$ MPa). Antes da degradação, maiores valores de HIT ($0,237 \pm 0,062$ GPa) e Er ($5,58 \pm 1,75$ GPa) foram encontrados para o grupo EGCG 0,5%, na dentina afetada por cárie. Após a degradação, grupo clorexidina 2% apresentou maiores valores de HIT e Er para dentinas sadia ($0,134 \pm 0,020$ GPa e $3,57 \pm 0,40$ GPa) e esclerótica ($0,201 \pm 0,048$ GPa e $4,30 \pm 0,56$ GPa).

Conclusões: O uso da clorexidina 2%, principalmente em dentina esclerótica, mostrou-se mais efetivo em promover aumento na resistência à tração e nas propriedades mecânicas, antes e após a degradação. A EGCG 0,5% apresentou melhor efeito sobre as propriedades mecânicas na dentina afetada por cárie, especialmente antes da degradação enzimática.

Relevância Clínica: O efetivo conhecimento do mecanismo de ação de inibidores de proteases em diferentes tipos de dentina poderia contribuir para melhoria da resistência do substrato e para maior longevidade dos processos de união sobre este tecido.

Palavras-chaves: Dentina. Colágeno. *Camellia sinensis*. Catequina.

Abstract

OLIVEIRA-REIS, B. Influence of protease inhibitors on the degradation potential of collagen from sound, sclerotic and caries-affected dentin. [dissertation]. Araçatuba: São Paulo State University, School of Dentistry; 2017.

Abstract

Objective: To evaluate the influence of proteases inhibitors on the collagen degradation from sound, sclerotic and caries-affected dentin.

Materials and Methods: Thirty-nine human molars were used, thirteen for each dentin condition. Three slices were obtained from each tooth, each one immersed in different solutions: 1) artificial saliva; 2) 2% chlorhexidine; 3) 0.5% EGCG. After incubation in the solutions for 1h, samples were subjected to enzymatic degradation by collagenase derived from *Clostridium histolyticum*. Mechanical properties of nanohardness (HIT) and elastic modulus (Er) of the three types of dentin were measured before and after degradation, as well as the microtensile strength. Results of the microtensile strength and

nanindentation tests were submitted to ANOVA two and three factors for repeated measurements, and Tukey post-test ($\alpha = 0.05$).

Results: Higher values of tensile strength were found for sound dentin in control (40.30 ± 21.38 MPa) and 0.5% EGCG (30.05 ± 19.67 MPa) groups. Before degradation, higher values of HIT (0.237 ± 0.062 GPa) and Er (5.58 ± 1.75 GPa) were found for the 0.5% EGCG group in caries-affected dentin. After degradation, 2% chlorhexidine group had higher values of HIT and Er for sound (0.134 ± 0.020 GPa and 3.57 ± 0.40 GPa) and sclerotic (0.201 ± 0.048 GPa and 4.30 ± 0.56 GPa) dentin.

Conclusions: The use of 2% chlorhexidine, mainly in sclerotic dentin, was shown to be more effective in promoting increase in the microtensile strength and mechanical properties, before and after the degradation. The 0.5% EGCG showed a better effect on mechanical properties in caries-affected dentin, before the enzymatic degradation.

Clinical Relevance: The effective knowledge of the mechanism of action of protease inhibitors in different types of dentin could contribute to the improvement of the resistance of the substrate and to the longer longevity of the bonding processes on this tissue.

Keywords: Dentin. Collagen. *Camellia sinensis*. Catechin.

Listas e

Sumário

Lista de Figuras

Figura 1: Fluxograma do design do estudo.....	49
Figura 2: Esquema do delineamento experimental adotado neste estudo.....	50

Lista de Tabelas

Tabela 1: ANOVA dois fatores para resistência à tração pelo teste de microtração.....	51
Tabela 2: Valores de resistência à tração (MPa) do colágeno proveniente das dentinas sadia, esclerótica e afetada por cárie após tratamento com diferentes inibidores de proteases.....	51
Tabela 3: Número de fatias com falhas prematuras de acordo com cada tratamento e tipo de dentina.....	51
Tabela 4: ANOVA três fatores para nanodureza pelo teste de nanoindentação.....	52
Tabela 5: Valores de nanodureza (HIT) (GPa) do colágeno proveniente das dentinas sadia, esclerótica e afetada por cárie após tratamento com diferentes inibidores de proteases, antes e após a degradação enzimática.....	52
Tabela 6: ANOVA três fatores para módulo de elasticidade pelo teste de nanoindentação.....	53
Tabela 7: Valores de módulo de elasticidade (Er) (GPa) do colágeno proveniente das dentinas sadia, esclerótica e afetada por cárie após tratamento com diferentes inibidores de proteases, antes e após a degradação enzimática.....	53

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

°C	= grau Celsius
=	= igual
>	= maior
<	= menor
±	= mais ou menos
≥	= maior ou igual
%	= porcentagem
α	= alfa
μm	= micrometro
μN	= micro Newton
ANOVA	= Análise da variância
Ass.	= Assistente
Ca ²⁺	= Cálcio
CaCl ₂	= Cloreto de Cálcio
CFU	= Colony Forming Unit (Unidade Formadora de Colônia)
Dr.	= Doutor
Dra.	= Doutora
Er	= Módulo de elasticidade reduzido
EGCG	= Epigallocatequina-galato

et al.	= e colaboradores
GPa	= giga Pascal
G.V. Black	= Greene Vardiman Black
H ₂ O	= água
HEPES	= hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid
HIT	= dureza de indentação
L	= litro
LSD	= Least Significant Difference
Ltd.	= Limited
mg	= miligrama
min	= minuto
ml	= mililitro (unidade de medida equivalente a 10 ⁻³ l)
mm	= milímetro (unidade de medida equivalente a 10 ⁻³ m)
MMP	= matriz metaloproteinases
mmol	= mili mol
mN	= mili Newton
MPa	= mega Pascal
n	= número amostral
n ^o	= número
NaCl	= Cloreto de Sódio
NaN ₃	= Azida de Sódio
p	= probabilidade de significância
pH	= potencial hidrogeniônico
Prof.	= Professor

Prof^a.

= Professora

UNESP

= Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Zn²⁺

= Zinco

Sumário

1	Introdução e Proposição.....	26
2	Materiais e Método.....	29
	2.1 Delineamento experimental.....	29
	2.2 Preparo dos espécimes de dentina.....	30
	2.3 Avaliação da resistência à tração do colágeno.....	31
	2.4 Avaliação da nanodureza e módulo de elasticidade do colágeno.....	32
	2.5 Análise estatística.....	33
3	Resultados.....	34
4	Discussão.....	38
5	Conclusão.....	43
6	Referências.....	43
7	Anexos.....	54

Influência de inibidores de proteases no potencial de degradação do colágeno proveniente da dentina sadia, esclerótica e afetada por cárie.

**Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico Clinical Oral Investigations*

1-Introdução

Com o passar dos anos, o tratamento para cáries dentárias evoluiu de intervenções mais invasivas (conceito G.V. Black) para uma filosofia mais conservadora, a odontologia minimamente invasiva [1]. A filosofia deste conceito baseia-se principalmente no desenvolvimento de materiais restauradores adesivos e no conhecimento aprofundado do processo de cárie dentária, obtido através de estudos que determinam a importância do flúor, o papel da placa bacteriana, a caracterização das camadas de dentina cariada, e também a microbiologia do processo [1].

Atualmente, o foco das pesquisas sobre o tema tem sido a busca por interferências bioquímicas no processo de cárie, a fim de estabelecer um tratamento mais biológico [2,3]. Entende-se que o processo de cárie pode não estar associado apenas à dissolução físico-química de minerais do dente resultante do contato com ácidos bacterianos, mas também devido à atividade das proteínas colagenolíticas e gelatinolíticas (enzimas proteolíticas), presentes na matriz orgânica dentinária [2,3]. Estudos sobre enzimas intrínsecas da matriz dentinária, metaloproteinases (MMPs), foram realizados e sua influência previamente determinada [2,3].

As MMPs da dentina são ativadas durante o processo de cárie, levando à degradação de colágeno [4,5], e, por conseguinte, à progressão da lesão. Esta degradação do colágeno interfere no processo de remineralização da dentina, que é dependente de uma rede de colágeno adequada [6]. Dentre os diversos papéis das MMPs estão: a participação na organização da matriz orgânica da pré-dentina e na regulação de sua mineralização, através do controle do volume de proteoglicanas [6]; sua deposição no interior da dentina já mineralizada, podendo degradar o colágeno intratubular e outras proteínas [7,8]; na progressão da cárie, podendo estar envolvidas na liberação e ativação

de fatores de crescimento ligados à dentina, os quais ativam reações de defesa na polpa [9]; durante a dentinogênese reparadora, podendo ter um papel na degradação da matriz, contribuindo para a formação da dentina reparadora atubular [10]; participação na degradação da interface restauração-dentina [10]; e, por fim, a possível participação na regulação da matriz extracelular do tecido pulpar em condições fisiológicas e patológicas [11].

Diante disto, um dos produtos mais utilizados como inibidor de proteases é a clorexidina, uma solução composta por moléculas anfifílicas que se ligam a várias proteínas por um mecanismo cátion-quelante, e podem inibir a atividade catalítica das MMPs através da ligação de Zn^{2+} ou Ca^{2+} (minerais fundamentais para que as MMPs consigam realizar suas funções) [12]. Seu uso como inibidor de proteases, por ser o procedimento mais comum testado clinicamente, é considerado como padrão ouro e mostrou prevenir a queda na resistência de união de sistemas adesivos *in vivo* [13-15].

Embora o uso da clorexidina seja um método extremamente conveniente devido à disponibilidade comercial, em estudos recentes, potenciais inibidores de MMPs, como as galardinas, íons metálicos, ou polifenóis presentes em substâncias como o chá verde, estão sendo testados [16,17]. A vantagem esperada com o uso de tais inibidores seria a possibilidade do uso em concentrações menores, porém mais efetivas por serem mais específicos [17]. O chá verde, extraído da planta *camellia sinensis*, contém catequinas que são antioxidantes químicos capazes de destruir radicais livres, sendo a epigallocatequina-galato (EGCG) a mais ativa e presente no mesmo. É solúvel em água, biocompatível, possuindo inúmeras utilidades, como o tratamento de doenças cardíacas, câncer e infecções virais [18]. Na Odontologia, esses polifenóis são utilizados na prevenção de perda óssea alveolar em doenças periodontais, na redução da perda de tecido

dentinário nos processos de erosão e abrasão, e na prevenção da cárie [19-21]. Sugere-se que o mecanismo ocorra devido à ação inibitória dos polifenóis sobre as metaloproteinases [22], uma vez que já existe relato de aumento da resistência à degradação enzimática, o que levaria a um aumento da estabilidade de colágeno [23].

Diferença na concentração de MMPs específicas foi relatada para dentina esclerótica em comparação à dentina sadia [24]. Na dentina esclerótica, embora a presença da MMP-2 seja reduzida, as MMPs 8 e 9 são aumentadas [24]. Os mecanismos e implicações para essa observação ainda não são claros e podem ajudar a elucidar o processo de remineralização e a busca por abordagens terapêuticas mais biológicas. Também foram relatadas algumas alterações estruturais e químicas na dentina afetada por cárie em comparação à dentina sadia, como a diminuição do conteúdo de fosfato e carbonato, e a modificação na estrutura do colágeno pelo processo cariioso [25], onde a presença de fibrilas intactas de colágeno e proteoglicanas se mostraram significativamente menor do que na dentina sadia, sugerindo participação ativa das MMPs [26]. No entanto, a literatura ainda é escassa sobre as propriedades bioquímicas da dentina esclerótica e afetada por cárie em relação ao potencial de degradação do colágeno, e da influência dos inibidores de proteases sobre estes tipos de dentina.

Assim, o objetivo do presente estudo foi averiguar o potencial de degradação do colágeno derivado da dentina esclerótica e afetada por cárie, em comparação à dentina sadia e verificar a influência de inibidores de protease (clorexidina 2% e EGCG 0,5%) sobre a estabilidade da matriz de colágeno. As hipóteses nulas testadas foram: (1) não há alteração na resistência à tração do colágeno para as dentinas sadias, escleróticas ou afetadas por cárie, quando da aplicação de inibidores de proteases (clorexidina 2% e EGCG 0,5%) submetidas ao processo de degradação enzimática; e (2) a aplicação dos

inibidores de proteases (clorexidina 2% e EGCG 0,5%) não são capazes de alterar as propriedades mecânicas de nanodureza e módulo de elasticidade das dentinas sadias, escleróticas ou afetadas por cárie, antes e após o processo de degradação enzimática.

2-Materiais e Método

Os materiais e método encontram-se resumidos na Figura 1. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Plataforma Brasil - processo nº 46742515.0.0000.5420).

2.1-Delineamento Experimental

No presente estudo, as variáveis respostas foram: resistência à tração e propriedades mecânicas (nanodureza e módulo de elasticidade) do colágeno. Para o estudo da resistência à tração do colágeno, dois fatores experimentais foram analisados: (1) tipos de dentina, em três níveis (sadia, afetada por cárie e esclerótica); e (2) inibidor de protease, em três níveis (controle, clorexidina 2% e EGCG 0,5%). Para o estudo das propriedades mecânicas três fatores foram estudados: (1) tipos de dentina, em três níveis (sadia, afetada por cárie e esclerótica); (2) inibidor de protease, em três níveis (controle, clorexidina 2% e EGCG 0,5%) e (3) tempo de avaliação, em dois níveis (antes e após a degradação enzimática). Treze molares humanos foram obtidos para cada uma das seguintes condições clínicas: dentina sadia em dentes hígidos, dentina afetada por cárie em cavidade oclusal (classe I) e dentina esclerótica em cavitação cervical (classe V). Fatias provenientes de oito dentes para cada condição dentinária foram desmineralizadas em ácido fosfórico 37%, submetidas aos diferentes inibidores de proteases e testados mecanicamente quanto à resistência à tração do colágeno. Fatias provenientes de cinco dentes para cada condição dentinária foram analisadas quanto as propriedades mecânicas

de nanodureza e módulo de elasticidade antes e após a degradação enzimática. Os três princípios básicos da experimentação científica foram respeitados (repetição, aleatorização e blocagem). Os dados da resistência à tração do colágeno e das propriedades mecânicas de nanodureza e módulo de elasticidade foram submetidos a testes estatísticos de normalidade e testes específicos para verificação da significância entre as médias. O fluxograma do design do estudo está representado na Figura 1.

2.2-Preparo dos espécimes de dentina

Trinta e nove molares humanos recém-extraídos foram obtidos de pacientes de 18 - 45 anos de idade e usados de acordo com as orientações do Comitê de Ética. Treze dentes foram obtidos para cada uma das seguintes condições clínicas: dentina sadia em dentes hígidos, dentina afetada por cárie em cavidade oclusal (classe I) e dentina esclerótica em cavitação cervical (classe V).

Para obtenção da dentina afetada por cárie, a dentina infectada dos dentes cariados foi curetada com um escavador de dentina nº 19 (Millenium – Golgran, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil). A remoção foi realizada até que a dentina apresentasse resistência à curetagem, permanecendo nos dentes somente a dentina afetada ou hipermineralizada, de acordo com a condição clínica desejada. Tal condição foi validada por dois operadores previamente calibrados.

A dentina esclerótica foi obtida a partir de cavidades classe V, as quais apresentavam no mínimo 2mm de largura no sentido méso-distal. Nenhum preparo foi realizado nessa cavidade.

Os dentes foram cortados perpendicularmente ao seu longo eixo, obtendo-se três fatias de dentina sadia, afetada por cárie ou esclerótica (com aproximadamente 0,5mm de espessura). O sentido do corte nos dentes hígidos e com cavidade oclusal classe I foi

mésio-distal. Nos dentes com cavidade classe V, vestibulo-lingual. Para tanto, foi utilizado um disco diamantado em baixa velocidade (Isomet 5000, Buehler Ltd., Lake Bluff, Illinois, Estados Unidos), sob refrigeração de água.

2.3-Avaliação da resistência à tração do colágeno

Para avaliação da resistência à tração do colágeno, as três fatias provenientes de oito dentes para cada condição dentinária (sadia, afetada por cárie e esclerótica) foram utilizadas.

Para tanto, as fatias foram desgastadas em forma de ampulheta, utilizando uma broca esférica diamantada nº 1014 (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brasil) até a contração da área do pescoço de $0,5 \pm 0,1 \times 0,5 \pm 0,1$ mm (Figura 2) [28].

Todas as amostras foram desmineralizadas em ácido fosfórico 37% gel durante 12 horas, cuidadosamente enxaguadas com água deionizada, e divididas em três grupos experimentais, de acordo com o inibidor de protease utilizado, sendo que uma fatia de cada tipo de dentina foi incubada em saliva artificial (50 mmol/L de HEPES, 1,5mmol/L CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$, 150 mmol/L de NaCl, e 3 mmol/L de NaN_3 , pH 7,2) (grupo controle), uma fatia foi incubada em solução de clorexidina 2% (Apothicário, Araçatuba, São Paulo, Brasil) e a outra fatia foi incubada em solução de EGCG 0,5% (5mg EGCG/mL de água deionizada em pH 7,0) (E4143-50mg, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), contendo extrato de EGCG com $\geq 95\%$ de pureza, a 37°C durante 1 hora sob agitação (n=8) [28].

Após a incubação, as amostras foram sujeitas à degradação enzimática. Para tanto, as amostras foram centrifugadas e extensivamente lavadas, três vezes com água deionizada. Cada amostra foi degradada com 2ml de colagenase bacteriana derivada de

Clostridium histolyticum (7,5 CFU/ml) (C0130-100mg, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) em saliva artificial sob agitação a 37°C durante 24 horas [28].

As amostras foram então submetidas ao teste de resistência à tração. Para tanto, as amostras foram coladas a um dispositivo metálico com cola de cianoacrilato (Super Bonder Power Flex Gel, Loctite, Itapevi, São Paulo, Brasil), os quais foram montados na máquina de ensaios universal Odeme Microtensile OM 100 (Odeme Dental Research, Luzerna, Santa Catarina, Brasil) a velocidade de 0,7mm por minuto para avaliação da resistência à tração (MPa). Os valores de resistência à tração foram obtidos em MPa por meio da fórmula:

$$R = (F/A)$$

Onde R = resistência à tração do colágeno, F = carga necessária para fraturar o espécime (N), A = área da interface de união em mm². Para as fatias que apresentaram falhas prematuras foram atribuídas o valor igual a zero para a resistência à tração.

2.4-Avaliação de nanodureza e módulo de elasticidade do colágeno

As fatias provenientes dos outros cinco dentes para cada condição dentinária (sadia, afetada por cárie e esclerótica) foram utilizadas na avaliação da nanodureza e módulo de elasticidade através do teste de nanoindentação. Essas fatias foram submetidas aos mesmos tratamentos anteriormente descritos. No entanto, foram submetidas à avaliação de nanodureza e módulo de elasticidade antes e após a degradação enzimática.

Para tanto, as fatias de cada grupo experimental foram embutidas em resina acrílica autopolimerizável incolor (Vipiflash, Pirassununga, São Paulo, Brasil), desgastadas manualmente com lixas abrasivas de granulação 320, 600, 800 e 1200 (Extec Corp, Enfield, Connecticut, Estados Unidos) e então polidas com soluções diamantadas

(6, 3 e 1 μm) (Extec Corp, Enfield, Connecticut, Estados Unidos). As amostras foram limpas em cuba ultrassônica (Cristófoli, Campo Mourão, Paraná, Brasil) com água deionizada durante 8 minutos entre as lixas e pastas e ao final do processo.

A superfície preparada foi levada ao nanodurômetro Anton Paar TriTec (modelo NHT², Anton Paar, Peseux, Suíça) para verificação da nanodureza (HIT) e módulo de elasticidade (E_r), sob ação de carga de $1000\mu\text{N}$, aplicada durante 5 segundos, seguida pela manutenção de carga máxima por 2 segundos adicionais e remoção da carga durante 5 segundos (5-2-5) [29]. Tal protocolo permite que a deformação do material não interfira no cálculo do módulo de elasticidade. A ponta indentadora utilizada foi a ponta piramidal Berkovich, sendo realizadas cinco indentações em cada amostra. Os valores de HIT e E_r foram calculados baseados na curva tensão-deformação de acordo com a seguinte equação matemática [30]:

$$E_r = S \sqrt{\pi} / 2 \sqrt{A}$$

Onde S é a rigidez do segmento inicial de remoção da carga e A é a área de contato projetada entre a ponta indentadora e a amostra no pico máximo de força.

$$\text{HIT} = P_{\text{max}} / A$$

Onde P_{max} é a carga máxima e A é a área de contato projetada como descrita no cálculo do módulo de elasticidade.

2.5-Análise estatística

Os dados da resistência à tração do colágeno e das propriedades mecânicas de nanodureza e módulo de elasticidade foram submetidos a testes estatísticos de normalidade (Shapiro-Wilk), através do software Bioestat 2.0. Após aceitos estes pressupostos, os dados do teste de resistência à tração foram submetidos à análise de variância ANOVA dois fatores para medidas repetidas, e os dados dos testes de

nanodureza e módulo de elasticidade à análise de variância ANOVA três fatores para medidas repetidas. Para todas as análises foi realizado pós-teste de Tukey ($\alpha=0,05$), através do software Stat View 5.0.1. Além disso, para todos os grupos experimentais foi calculado o poder do teste, através do site onepi.com.

3–Resultados

Avaliação da resistência à tração do colágeno

Os resultados da Análise de Variância (Tabela 1) mostraram que, dentre os dois fatores de estudo analisados, houve diferença estatisticamente significativa para o fator dentina ($p=0,0123$). Para o fator inibidor de protease, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,3103$). A interação entre os fatores foi estatisticamente significativa ($p=0,0490$). O maior poder do teste encontrado foi de 81,66%.

Na comparação entre os tipos de dentina, de acordo com os valores apresentados na Tabela 2, pode-se observar que os maiores valores de resistência à tração foram encontrados para a dentina sadia, nos grupos controle ($40,30 \pm 21,38$ MPa) e tratado com EGCG 0,5% ($30,05 \pm 19,67$ MPa). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as dentinas esclerótica e afetada por cárie em nenhum dos tratamentos adotados ($p>0,05$). Quando tratadas com EGCG 0,5%, a dentina afetada por cárie apresentou os menores valores de resistência de união ($9,10 \pm 9,74$ MPa), com diferença estatisticamente significativa para a dentina sadia ($30,05 \pm 19,68$ MPa).

Na comparação entre os tratamentos (fator inibidor de proteases), apenas para o grupo de dentina afetada por cárie, os valores de resistência de união obtidos para a clorexidina 2% foram estatisticamente superiores ($25,73 \pm 15,97$ MPa) aos valores do mesmo tipo de dentina quando tratada com EGCG 0,5% ($9,10 \pm 9,74$ MPa). Para os

demais tipos de dentina estudados (sadia e esclerótica), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Os valores de falhas prematuras de acordo com cada grupo estão representados na Tabela 3, onde observou-se que o grupo com maior número de falhas prematuras foi o grupo tratado com EGCG 0,5% (total de falhas = 3), seguido pelo grupo controle (total de falhas = 2). O grupo tratado com clorexidina 2% não apresentou falha prematura.

Avaliação da nanodureza (HIT) do colágeno

Os resultados da Análise de Variância (Tabela 4) mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa para o fator inibidor de protease ($p=0,1296$), bem como para o tempo de análise ($p=0,0605$). Para o fator tipo de dentina, bem como a interação entre os fatores, houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$). O maior poder do teste encontrado foi de 100%.

Na comparação entre os tipos de dentina antes da degradação enzimática (Tabela 5), os maiores valores de HIT foram encontrados para a dentina afetada por cárie em todas as condições experimentais ($0,170 \pm 0,037$ GPa para o grupo controle; $0,125 \pm 0,014$ GPa para o grupo tratado com clorexidina 2% e $0,237 \pm 0,062$ GPa para o grupo tratado com EGCG 0,5%). No entanto, essa diferença foi estatisticamente significativa para os outros tipos de dentina apenas no grupo controle ($p<0,05$) e para dentina esclerótica no grupo tratado com EGCG 0,5% ($p=0,005$). Em nenhum grupo houve diferença significativa entre dentina sadia e esclerótica ($p>0,05$). Após a degradação enzimática (Tabela 5), os maiores valores de HIT foram encontrados para a dentina afetada por cárie, nos grupos controle ($0,297 \pm 0,008$ GPa) e EGCG 0,5% ($0,185 \pm 0,051$ GPa). Em ambos, não houve diferença significativa entre as dentinas sadia e esclerótica ($p>0,05$).

Na comparação entre os tratamentos (fator inibidor de proteases) antes da degradação enzimática (Tabela 5), os maiores valores de HIT foram encontrados para o grupo tratado com EGCG 0,5%, nas dentinas sadia ($0,185 \pm 0,064$ GPa) e afetada por cárie ($0,237 \pm 0,062$ GPa), com diferença estatisticamente significativa para o grupo controle e clorexidina 2%, respectivamente. Porém, ainda que sem diferença significativa para o grupo clorexidina 2%, os valores do grupo controle na dentina sadia foram os menores encontrados dentre todos os grupos e condições. Após a degradação enzimática (Tabela 5), o grupo clorexidina 2% apresentou maiores valores de HIT para as dentinas sadia ($0,134 \pm 0,020$ GPa) e esclerótica ($0,201 \pm 0,048$ GPa), com diferença estatisticamente significativa para os demais grupos ($p < 0,05$). Na dentina afetada por cárie, houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos, sendo os maiores valores encontrados para o grupo controle ($0,297 \pm 0,008$ GPa), com diferença estatisticamente significativa para os demais grupos ($p < 0,05$).

Na comparação entre os tempos de avaliação (antes e após a degradação enzimática), os três tipos de dentina estudadas apresentaram aumento nos valores de HIT após a degradação enzimática ($p < 0,05$) nos grupos controles. O mesmo fenômeno ocorreu para a dentina esclerótica tratada com clorexidina 2% ($p = 0,023$). Para dentina esclerótica submetida ao tratamento com EGCG 0,5% e para dentina afetada por cárie tratada com clorexidina 2%, houve diminuição nos valores de HIT após a degradação enzimática ($p = 0,011$ e $p = 0,009$, respectivamente).

Avaliação do módulo de elasticidade (Er) do colágeno

Os resultados da Análise de Variância (Tabela 6) mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa para o fator inibidor de protease ($p = 0,0849$), bem como para o fator tempo de análise ($p = 0,4795$). Para o fator tipo de dentina, bem como a

interação entre os fatores, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O maior poder do teste encontrado foi de 100%.

Na comparação entre os tipos de dentina antes da degradação enzimática (Tabela 7), os maiores valores de Er foram encontrados para a dentina afetada por cárie, nos grupos tratados com clorexidina 2% ($4,33 \pm 0,82$ GPa) e EGCG 0,5% ($5,58 \pm 1,75$ GPa), com diferença estatisticamente significativa para as dentinas sadia ($3,25 \pm 0,40$ GPa) e esclerótica ($2,82 \pm 0,16$ GPa), respectivamente ($p < 0,05$). Em nenhum grupo houve diferença estatisticamente significativa entre dentina sadia e esclerótica ($p > 0,05$). Após a degradação enzimática (Tabela 7), os maiores valores de Er foram encontrados para a dentina esclerótica, tanto no grupo controle ($4,15 \pm 0,40$ GPa) quanto no grupo tratado com clorexidina 2% ($4,30 \pm 0,56$ GPa). Quando tratada com EGCG 0,5%, a dentina afetada por cárie apresentou maiores valores de Er ($3,74 \pm 1,04$ GPa), quando comparada à dentina sadia ($2,67 \pm 0,34$ GPa) ($p = 0,031$).

Na comparação entre os tratamentos (fator inibidor de proteases) antes da degradação enzimática (Tabela 7), na dentina esclerótica, os maiores valores de Er foram encontrados para o grupo tratado com clorexidina 2% ($3,46 \pm 0,64$ GPa), com diferença estatisticamente significativa para o grupo controle ($2,73 \pm 0,17$ GPa) ($p = 0,026$). Para dentina afetada por cárie, o tratamento com EGCG 0,5% apresentou maiores valores de Er ($5,58 \pm 1,75$ GPa) comparado ao grupo controle ($2,67 \pm 0,23$ GPa) ($p = 0,005$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os tratamentos para a dentina sadia antes da degradação enzimática ($p > 0,05$). Após a degradação enzimática (Tabela 7), as dentinas sadia e esclerótica tratadas com clorexidina 2% apresentaram maiores valores de Er ($3,57 \pm 0,40$ GPa e $4,30 \pm 0,56$ GPa, respectivamente), com diferença estatisticamente significativa para as dentinas tratadas com EGCG 0,5% ($2,67 \pm 0,34$ GPa

e $2,68 \pm 0,09$ GPa, respectivamente) ($p=0,013$ e $p<0,001$). Na dentina afetada por cárie, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Na comparação entre os tempos de avaliação (antes e após a degradação enzimática), a dentina esclerótica apresentou aumento nos valores de Er nos grupos controle e tratado com clorexidina 2%, bem como a dentina afetada por cárie em seu grupo controle ($p<0,05$). A dentina sadia tratada com EGCG 0,5% apresentou diminuição nos valores de Er após a degradação enzimática ($2,67 \pm 0,34$ GPa), quando comparado aos valores antes da degradação enzimática ($4,77 \pm 1,48$ GPa), com diferença estatisticamente significativa entre eles ($p=0,033$). Nas demais situações experimentais estudadas, a diferença entre os valores de Er antes e após a degradação enzimática não foram estatisticamente significantes ($p>0,05$).

4–Discussão

A cárie é considerada o processo modificador do substrato dentinário mais comum que existe [28, 31, 32]. Sabe-se muito, com base na literatura, a respeito do efeito da clorexidina [33] e de extratos de plantas ricas em polifenóis (como a EGCG, o extrato de semente de uva, dentre outros) sobre os componentes da matriz orgânica dentinária, em especial as metaloproteinases [34], onde demonstraram elevada bioatividade, melhorando propriedades biomecânicas do tecido [28]. Porém, pouco ainda é encontrado a respeito do comportamento destes tipos de tratamentos nos diferentes tipos de dentina, uma vez que a dentina além de ser um tecido naturalmente mais heterogêneo se comparado ao esmalte dentário, pode possuir diferentes características morfológicas e variações estruturais provocadas por fatores externos (como por exemplo trauma, erosão, etc) [29].

O digluconato de clorexidina 2% é um poderoso antimicrobiano catiônico pertencente ao grupo dos compostos quaternários de amônio, capaz de desativar MMPs,

impedindo-as de degradar fibras colágenas [35]. Devido ao número de vezes que essa capacidade foi comprovada por pesquisas relatadas na literatura [9,13,14,15,17,35], a clorexidina 2% é considerada como padrão ouro para pré-tratamento dentinário. Em estudo realizado por Zarella et al. (2016) [33], onde clorexidina 2% e EGCG 0,5% foram utilizados como inibidores de proteases incorporados em resinas compostas para que ao longo do tempo fossem liberados e inibissem a ação proteolítica das MMPs (ativadas pelo condicionamento ácido durante o processo restaurador), o uso da clorexidina 2% apresentou melhores resultados [33]. O que corrobora com o presente estudo, onde de maneira geral, quando comparada à EGCG 0,5%, atuou de forma mais positiva tanto na resistência à tração quanto nas propriedades mecânicas, especialmente sobre dentina esclerótica (Tabelas 2, 5 e 7). Dessa forma, ambas as hipóteses nulas do estudo foram rejeitadas. No caso da clorexidina 2%, seu efeito sobre a dentina esclerótica, antes da degradação enzimática, tanto nos valores de nanodureza (Tabela 5) quanto módulo de elasticidade (Tabela 7), diverge de outros estudos, os quais relatam que os efeitos do tratamento com clorexidina sobre a dentina só são notáveis após seis meses da aplicação devido ao tempo que as MMPs levam para degradar as fibras colágenas [35]. Sugere-se que tal fato se deva à degradação ter sido realizada, no presente estudo, de maneira planejada e não ocorrido espontaneamente por processos fisiológicos.

Uma teoria chamada teoria da remineralização do colágeno exposto tem sido associada à estabilidade de interfaces adesivas [35]. Essa suposição parte do princípio de que fibras de colágeno protegidas pela camada híbrida ou cercadas por tecido mineral são inacessíveis para MMPs, e que, dessa maneira, a remineralização do tecido dentinário proporciona maior longevidade clínica quando presentes em processos restauradores [35]. Especula-se, portanto, que o melhor efeito da clorexidina 2% em dentina esclerótica, tenha ocorrido devido à grande afinidade das moléculas anfífilas da solução de

clorexidina à grande quantidade de minerais (adquiridos por processo de remineralização) presentes na dentina esclerosada, que possuem menor quantidade de túbulos do que a dentina sadia, porém quantidade muito semelhante e, por vezes até maior, de colágeno e minerais [24,26]. É importante salientar que, além disso, o grupo tratado com clorexidina 2% não apresentou falhas prematuras em nenhum tipo de dentina, confirmando sua grande efetividade também nas demais condições dentinárias (sadia e afetada por cárie), à semelhança de um estudo prévio realizado [36].

Diferente da clorexidina (inibidor de protease sintético), a EGCG é considerada um inibidor de protease natural, por ser um polifenol extraído do chá verde [33]. Tem sua atividade comprovada por inúmeras pesquisas [5, 16-23, 28, 33] e apresenta efeitos sobre proteinases descritos como iguais aos da clorexidina, no que se diz respeito à preservação da camada híbrida e eficácia inibitória sobre a collagenase *Clostridium histolyticum*, de acordo com alguns estudos [18,25,33]. A EGCG parece apresentar ligações de hidrogênio e uma interação hidrofóbica com as collagenases que, ao entrarem em contato, têm uma estrutura secundária modificada, e são inibidas. Entretanto, seu mecanismo de ação ainda não está esclarecido [22]. No presente estudo, foi possível destacar um melhor efeito da EGCG 0,5% sobre a dentina afetada por cárie em relação às propriedades mecânicas, no período antes da degradação enzimática (Tabelas 5 e 7). Tanto na dentina sadia quanto na dentina esclerótica, já foi relatada diferença de concentrações de MMPs específicas, como, por exemplo, maior atuação de MMP-2 na dentina sadia [24]. Porém, sobre a dentina afetada por cárie sabe-se apenas que esta possui menos fibrilas intactas de colágeno e proteoglicanas do que a dentina sadia, sugerindo maior quantidade e atuação das MMPs no tecido, mas sem especificação de quais tipos [26]. Até o momento, não foram publicados estudos relacionando a maior ação da EGCG 0,5% em dentina afetada por cárie. Portanto, especula-se que a EGCG 0,5% possua maior espectro de ação sobre

os diferentes tipos de MMPs atuantes na dentina afetada por cárie do que a clorexidina 2%, o que pode ter levado aos melhores resultados obtidos quanto à nanodureza e ao módulo de elasticidade, antes das amostras serem submetidas à degradação enzimática. Se comparado ao grupo controle, o grupo tratado com EGCG 0,5% apresentou efeito positivo sobre todos os tipos de dentina, apenas antes da degradação enzimática (Tabelas 5 e 7), reforçando a comprovação de sua efetividade no tecido dentinário em geral. Há aproximadamente 20 anos vem-se estudando a respeito das catequinas e sabe-se que diversos de seus potenciais efeitos são limitados devido à sua baixa biodisponibilidade e estabilidade, dificultando sua aplicação terapêutica [37]. A maior parte delas, principalmente a EGCG, são altamente instáveis em solução aquosa e sofrem degradação por processos oxidativos devido à diversos fatores tais como o pH, a concentração de oxigênio, a temperatura e a força iônica [38]. Sugere-se que este seja o motivo pelo qual seu efeito positivo tenha ocorrido principalmente de forma imediata (antes da degradação enzimática), tanto para a resistência à tração do colágeno (Tabela 2), quanto para as propriedades mecânicas (Tabelas 5 e 7), tendo seu efeito diminuído após a degradação, em comparação à clorexidina 2%.

Quanto maior o grau de infecção da dentina, menor sua dureza. Tal fato justifica, os maiores valores de resistência à tração encontrados no presente estudo para a dentina sadia, nos grupos controle e EGCG 0,5% (Tabela 2). Durante a fase de desmineralização provocada pelas cáries dentárias, a hidroxiapatita é solubilizada pelos ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias presentes na boca. Tais ácidos podem se difundir pelos tecidos dentais calcificados quando ocorre a queda do pH, levando à dissolução dos cristais minerais [32]. O processo dinâmico de desmineralização que ocorre numerosas vezes por dia, geralmente é balanceado pelo potencial de remineralização da saliva [32]. Entretanto, se este balanço é prejudicado, fatores patológicos predominam e a progressão da cárie se

inicia [32]. A partir desta progressão, diversas modificações como a redução de conteúdo mineral, o aumento de porosidades devido às mudanças na estrutura e distribuição do colágeno e proteínas não colagenosas, são induzidas na dentina, contribuindo para a redução em suas propriedades físicas e mecânicas [32]. Portanto, pode-se dizer que a dentina afetada por cárie, em comparação com a dentina sadia, é uma dentina enfraquecida; fato confirmado no presente estudo, onde a dentina afetada por cárie apresentou os menores valores de resistência à tração na maioria dos grupos (controle e EGCG 0,5%) (Tabela 2). A desmineralização da dentina e desnaturação do colágeno são consideradas o ponto de início da formação da dentina esclerótica, uma tentativa dos odontoblastos de formar uma barreira contra estímulos agressivos, que apesar de possuir estrutura tubular irregular, apresenta características ópticas e mecânicas muito similares à dentina sadia [24,26]. Isto provavelmente ocorra devido à quantidade semelhante de colágeno e conteúdo mineral de ambas [24,26]. Tais semelhanças também foram encontradas no presente estudo, onde os valores de resistência à tração, nanodureza e módulo de elasticidade obtidos para a dentina sadia não foram estatisticamente diferentes dos valores obtidos para a dentina esclerótica na maioria das condições (Tabelas 2, 5 e 7).

Neste estudo, alguns fatores podem ser considerados como limitantes, como a sensibilidade da técnica e das soluções utilizadas, e a maneira como os inibidores se difundem e reagem em cada tipo de tecido dentinário para cada situação [33]. Na medicina, diversos inibidores exógenos de MMPs estão disponíveis devido ao elevado número de pesquisas realizadas nesta linha [34]. Porém, as pesquisas relacionadas ao seu uso na odontologia ainda são escassas, indicando a necessidade de maior exploração a respeito destes novos meios de se obter inibição da atividade colagenolítica na dentina, e consequentemente, interfaces restauradoras [34].

5–Conclusão

A partir dos resultados descritos e considerando as limitações do presente estudo, foi possível concluir que a utilização de clorexidina 2% como inibidor de protease, principalmente em dentina esclerótica, mostrou-se mais efetiva e promissora na melhora da resistência à tração e das propriedades mecânicas, antes e após a degradação enzimática. O EGCG 0,5% apresentou melhor efeito do que a clorexidina 2% apenas sobre as propriedades mecânicas do colágeno proveniente da dentina afetada por cárie, antes da degradação enzimática. Sendo assim, o conhecimento da interação dos inibidores de MMPs com diferentes tipos de dentina faz-se necessária, na busca pela manutenção da estabilidade do colágeno ao longo do tempo.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (Processo nº 2015/10566-7).

6-Referências

1. Frencken JE, Peters MC, Manton DJ, Leal SC, Gordan VV, Eden E. Minimal intervention dentistry for managing dental caries - a review: report of a FDI task group (2012) *Int Dent J* 62:223-243. doi: 10.1111/idj.12007
2. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, Di Lenarda R, Pashley DH, Breschi L. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin (2007) *J Dent Res* 86:436-440. doi: 10.1177/154405910708600509

3. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin (2007) *Arch Oral Biol* 52:121-127. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.08.009
4. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions (1998) *J Dent Res* 77:1622-1629. doi: 10.1177/00220345980770081001
5. Mankovskaia A, Lévesque CM, Prakki A. Catechin-incorporated dental copolymers inhibit growth of *Streptococcus mutans* (2013) *J Appl Oral Sci* 21:203-207. doi: 10.1590/1678-7757201302430
6. Hall R, Septier D, Embery G, Goldberg M. Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor-coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role (1999) *Histochem J* 31:761-770.
7. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine (2000) *Arch Oral Biol* 45:757-765.
8. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth (2002) *J Dent Res* 81:603-607. doi: 10.1177/154405910208100905
9. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats (2001) *J Dent Res* 80:1545-1549. doi:10.1177/00220345010800061301
10. Tjaderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs) (2001) *Adv Dent Res* 15:55-58. doi: 10.1177/08959374010150011401
11. Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjaderhane L, Salo T. The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of

- MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue (2001) *Eur J Oral Sci* 111:117-127.
12. De Munck J, Van Den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces (2009) *J Dent Res* 88:1101–1106. doi: 10.1177/0022034509346952
 13. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, Pashley DH. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive (2009) *Oper Dent* 34:379-383. doi: 10.2341/08-103
 14. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo* (2005) *J Dent Res* 84:741-746. doi: 10.1177/154405910508400811
 15. Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, De Goes MF, Arvalho RM, Tjaderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D. *In vivo* preservation of the hybrid layer by chlorhexidine (2007) *J Dent Res* 86:529-533. doi: 10.1177/154405910708600608
 16. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, Visitini E, Cadenaro M, Tay FR, De Stefano Dorigo E, Pashley DH. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer (2010) *Dent Mat* 26:571-578. doi: 10.1016/j.dental.2010.02.007
 17. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhaes AC, Pereira JC, Buzalaf MAR. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase (2012) *J Dent Res* 91:1119-1123. doi: 10.1177/0022034512455801
 18. Shang W, Lu W, Han M, Qiao J. The interactions of anticancer agents with tea catechins: current evidence from preclinical studies (2014) *Anticancer Agents Med Chem* 14:1343-1350.

19. Huang CC, Wu WB, Fang JY, Chiang HS, Chen SK, Chen BH, Chen YT, Hung CF. Epicatechin-3-gallate, a green tea polyphenol is a potent agent against UVB-induced damage in HaCaT keratinocytes (2007) *Molecules* 12:1845-1858.
20. Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion (2009) *J Appl Oral Sci* 17:560-564.
21. Naderi NJ, Niakan M, Kharazi Fard MJ, Zardi S. Antibacterial activity of Iranian green and black tea on streptococcus mutants: an *in vitro* study (2011) *J Dent (Tehran)* 8:55-59.
22. Khamverdi Z, Rezaei-Soufi L, Kasraei S, Ronasi N, Rostami S. Effect of Epigallocatechin Gallate on shear bond strength of composite resin to bleached enamel: an *in vitro* study (2013) *Rest Dent Endo* 38:241-247. doi: 10.5395/rde.2013.38.4.241
23. Sono R, Sofiqul I, Yiu C, Nakamura H, Otsuki M. *In vitro* evaluation of plant-derived agents to preserve dentin collagen (2013) *Dent Mat* 29:1048-1054. doi: 10.1016/j.dental.2013.07.015
24. Wang DY, Zhang L, Fan J, Li F, Ma KQ, Wang P. Matrix metalloproteinases in human sclerotic dentine of attrited molars (2012) *Arch Oral Biol* 57:1307-1312. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.04.012
25. Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy (2007) *J Biomed Mat Res* 81A:279–286. doi: 10.1002/jbm.a.30981
26. Suppa P, Ruggeri A Jr, Tay FR, Prati C, Biasotto M, Falconi M, Pashley DH, Breschi L. Reduced antigenicity of type I collagen and proteoglycans in sclerotic dentin (2006) *J Dent Res* 85:133–137. doi: 10.1177/154405910608500204

27. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, Breschi L, Foulger S, Pashley DH. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen (2009) *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 90:373-380. doi: 10.1002/jbm.b.31295
28. Vidal CM, Aguiar TR, Phansalkar R, McAlpine JB, Napolitano JG, Chen SN, Araújo LS, Pauli GF, Bedran-Russo A. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins (2014) *Acta Biomater* 10:3288-3294. doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.036
29. Pinna R, Maioli M, Eramo S, Mura I, Milia E. Carious affected dentine: its behaviour in adhesive bonding (2015) *Aust Dent J* 60:276-293. doi: 10.1111/adj.12309
30. Banerjee A, Cook R, Kellow S, Shah K, Festy F, Sherriff M, Watson T. A confocal micro-endoscopic investigation of the relationship between the microhardness of carious dentine and its autofluorescence (2010) *Eur J Oral Sci* 118:75-79. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00692.x
31. Joves GJ, Inoue G, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Nanoindentation hardness of intertubular dentin in sound, demineralized and natural caries-affected dentin (2014) *J Mech Behav Biomed Mater* 32:39-45. doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.12.017
32. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability (2015) *J Dent Res* 94:241-251. doi: 10.1177/0022034514562833
33. Zarella BL, Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR, Salo T, Tjäderhane L, Prakki A. Cytotoxicity and effect on protease activity of copolymer extracts containing catechin (2016) *Arch Oral Biol* 65:66-71. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.01.017
34. Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review (2013) *J Esthet Restor Dent* 25:219-241. doi: 10.1111/jerd.12016

35. Dos Santos RA, De Lima EA, Montes MAJR, Braz R. Pre-treating dentin with chlorhexidine and CPP-ACP: self-etching and universal adhesive systems (2016) *Acta Biomed Odontol Scandinavica* 2:79-85. doi: 10.1080/23337931.2016.1203265
36. Kawasaki K, Kambara M. Effects of ion-releasing tooth-coating material on demineralization of bovine tooth enamel (2014) *Int J Dent* 2014:463149. doi: 10.1155/2014/463149.
37. Suzuki Y, Miyoshi N, & Isemura M. Health-promoting effects of green tea (2012) *Proc Jpn Acad* 88:88-101. doi: 10.2183/pjab.88.88
38. Yoshino K, Suzuki M, Kiyotaka S, Miyase T, & Sano M. Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma (1999) *J Nutr Biochem* 10:223-229.

FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do design do estudo

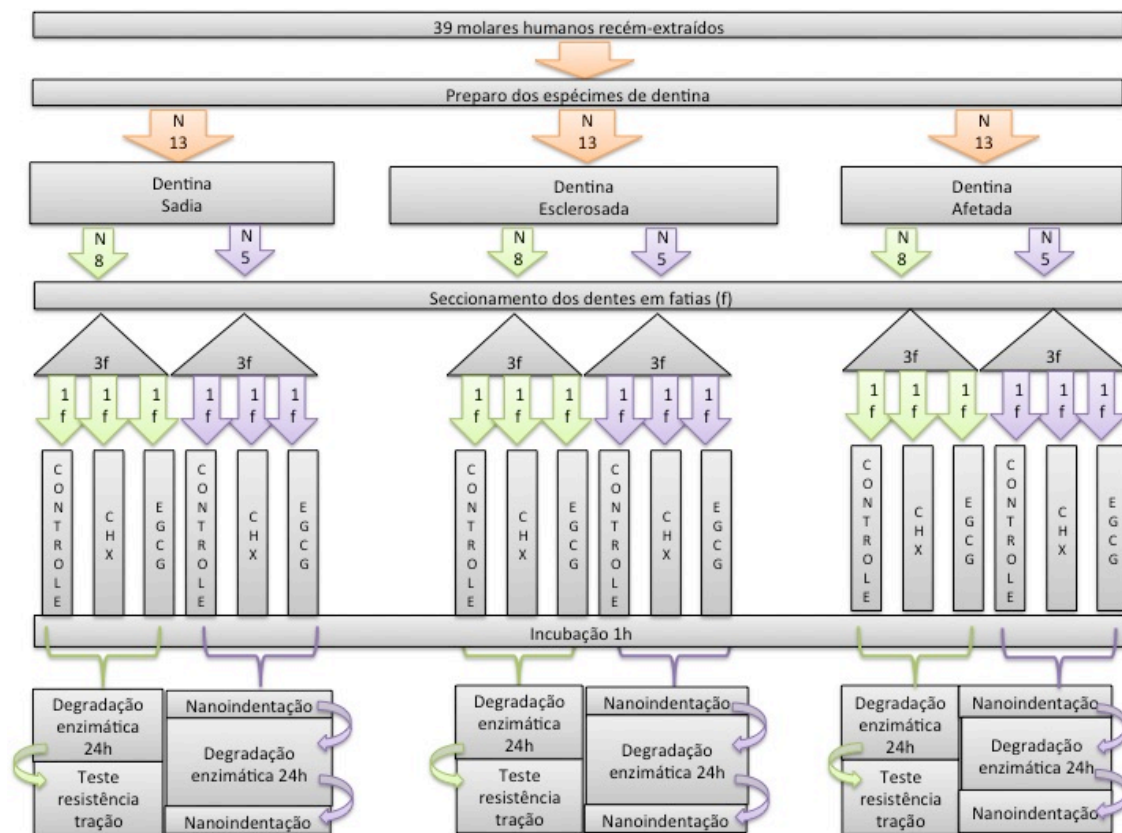
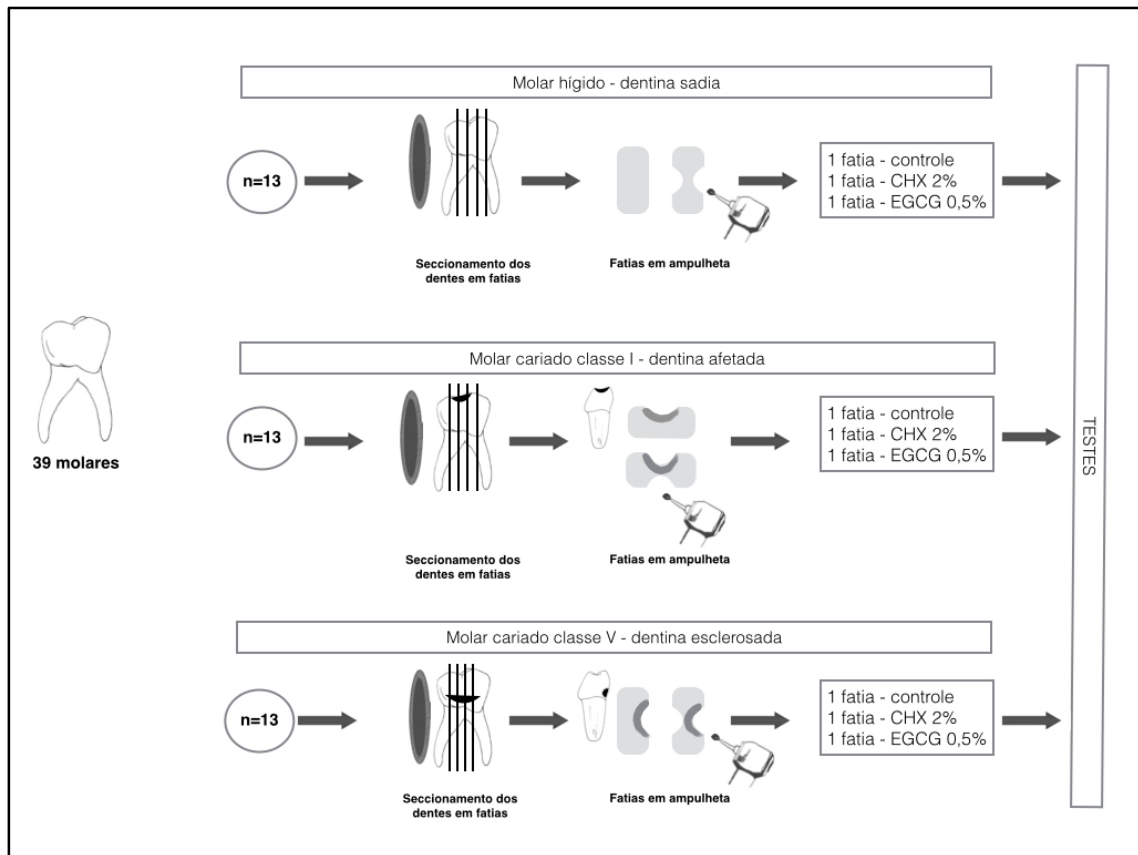


Figura 2. Esquema do delineamento experimental adotado neste estudo

TABELAS

Tabela 1: ANOVA dois fatores para resistência à tração pelo teste de microtração.

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	2111.108	1055.554	5.315	.0123	10.630	.793
Subject(Group)	24	4766.351	198.598				
Category for Group	2	733.050	366.525	1.199	.3103	2.399	.241
Category for Group * Dentin	4	3152.969	788.242	2.579	.0490	10.316	.681
Category for Group * Subject(Group)	48	14670.047	305.626				

Tabela 2: Valores de resistência à tração (MPa) do colágeno proveniente das dentinas sadia, esclerótica e afetada por cárie após tratamento com diferentes inibidores de proteases.

	Controle	Clorexidina 2%	EGCG 0,5%
Dentina sadia	40,30 ± 21,38 Aa	16,73 ± 14,21 Aa	30,05 ± 19,68 Aa
Dentina esclerótica	19,81 ± 11,36 Ba	21,60 ± 25,88 Aa	16,36 ± 9,77 ABa
Dentina afetada por cárie	17,33 ± 11,77 Bab	25,73 ± 15,97 Aa	9,10 ± 9,74 Bb

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si (p<0.05)

Tabela 3: Número de fatias com falhas prematuras de acordo com cada tratamento e tipo de dentina.

	Grupo Controle	Grupo Clorexidina 2%	Grupo EGCG 0,5%
Dentina Sadia	1	0	2
Dentina Esclerótica	0	0	0
Dentina Afetada por Cárie	1	0	1

Foram analisadas as 54 fatias destinadas ao teste de resistência à tração

Tabela 4: ANOVA três fatores para nanodureza pelo teste de nanoindentação.

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	.083	.042	34.267	<.0001	68.534	1.000
Group	2	.005	.003	2.163	.1296	4.327	.402
Dentin * Group	4	.126	.032	25.909	<.0001	103.638	1.000
Subject(Group)	36	.044	.001				
Category for Measurement	1	.003	.003	3.755	.0605	3.755	.457
Category for Measurement * Dentin	2	.005	.003	3.396	.0446	6.792	.597
Category for Measurement * Group	2	.050	.025	31.140	<.0001	62.280	1.000
Category for Measurement * Dentin * Gro...	4	.031	.008	9.640	<.0001	38.558	1.000
Category for Measurement * Subject(Gro...	36	.029	.001				

Tabela 5: Valores de nanodureza (HIT) (GPa) do colágeno proveniente das dentinas sadia, esclerótica e afetada por cárie após tratamento com diferentes inibidores de proteases, antes e após a degradação enzimática.

Tempo de avaliação e tipo de dentina	Grupo Controle	Grupo Clorexidina 2%	Grupo EGCG 0,5%
Antes			
Dentina Sadia	0,068 ± 0,003 Bb*	0,115 ± 0,053 Aab	0,185 ± 0,064 ABa
Dentina Esclerótica	0,090 ± 0,003 Bc*	0,122 ± 0,007 Aa*	0,104 ± 0,006 Bb*
Dentina Afetada por Cárie	0,170 ± 0,037 Aab*	0,125 ± 0,014 Ab*	0,237 ± 0,062 Aa
Após			
Dentina Sadia	0,106 ± 0,009 Bb*	0,134 ± 0,020 Ba	0,103 ± 0,016 Bb
Dentina Esclerótica	0,117 ± 0,010 Bb*	0,201 ± 0,048 Aa*	0,087 ± 0,005 Bb*
Dentina Afetada por Cárie	0,297 ± 0,008 Aa*	0,091 ± 0,010 Bc*	0,185 ± 0,051 Ab

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna (para cada período de avaliação) e minúsculas na linha, diferem entre si ($p < 0,05$)

Médias seguidas por asterisco (*) indicam diferença entre antes e depois da degradação enzimática para cada grupo experimental ($p < 0,05$)

Tabela 6: ANOVA três fatores para módulo de elasticidade pelo teste de nanoindentação.

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	6.145	3.072	5.061	.0116	10.122	.791
Group	2	3.209	1.605	2.643	.0849	5.287	.482
Dentin * Group	4	13.883	3.471	5.717	.0011	22.868	.971
Subject(Group)	36	21.854	.607				
Category for Elastic modulus	1	.241	.241	.511	.4795	.511	.104
Category for Elastic modulus * Dentin	2	7.393	3.697	7.815	.0015	15.630	.946
Category for Elastic modulus * Group	2	20.355	10.177	21.516	<.0001	43.032	1.000
Category for Elastic modulus * Dentin * G...	4	4.347	1.087	2.297	.0778	9.189	.605
Category for Elastic modulus * Subject(G...	36	17.029	.473				

Tabela 7: Valores de módulo de elasticidade (Er) (GPa) do colágeno proveniente das dentinas sadia, esclerótica e afetada por cárie após tratamento com diferentes inibidores de proteases, antes e após a degradação enzimática.

Tempo de avaliação e tipo de dentina	Grupo Controle	Grupo Clorexidina 2%	Grupo EGCG 0,5%
Antes			
Dentina Sadia	3,13 ± 0,95 Aa	3,25 ± 0,40 Ba	4,77 ± 1,48 ABa*
Dentina Esclerótica	2,73 ± 0,17 Ab*	3,46 ± 0,64 ABa*	2,82 ± 0,16 Bab
Dentina Afetada por Cárie	2,67 ± 0,23 Ab*	4,33 ± 0,82 Aab	5,58 ± 1,75 Aa
Após			
Dentina Sadia	3,31 ± 0,48 Bab	3,57 ± 0,40 Ba	2,67 ± 0,34 Bb*
Dentina Esclerótica	4,15 ± 0,40 Aa*	4,30 ± 0,56 Aa*	2,68 ± 0,09 ABb
Dentina Afetada por Cárie	3,92 ± 0,06 ABa*	3,46 ± 0,27 Ba	3,74 ± 1,04 Aa

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna (para cada período de avaliação) e minúsculas na linha, diferem entre si ($p < 0,05$)

Médias seguidas por asterisco (*) indicam diferença entre antes e depois da degradação enzimática para cada grupo experimental ($p < 0,05$)

Anexos

ANEXO A – Comprovante de aprovação pelo comitê de ética

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Influência de inibidores de proteases no potencial de degradação do colágeno proveniente da dentina sadia, esclerótica e afetada por cárie.

Pesquisador: Paulo Henrique dos Santos

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 46742515.0.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.521.687

Apresentação do Projeto:

Trinta e nove molares humanos recém-extraídos serão utilizados, sendo 13 para cada condição clínica dentinária (sadia, esclerótica e afetada por cárie). Três fatias serão obtidas de cada dente. Para o teste de resistência à tração do colágeno, as fatias serão desgastadas em forma de ampulheta, e divididas em 3 grupos experimentais de acordo com o inibidor de protease utilizado: Grupo 1: saliva artificial (grupo controle); Grupo 2: solução de clorexidina a 2%; Grupo 3: solução de EGCG (epigalocatequina galato) a 0,5%. Após a incubação, as amostras serão sujeitas à degradação enzimática (pela collagenase bacteriana derivada da *Clostridium histolyticum*), e então serão submetidas ao teste de resistência à tração do colágeno (MPa). As propriedades mecânicas de nanodureza e módulo de elasticidade da dentina serão mensuradas em nanodurômetro digital, sob carga de 1000N, antes e após a degradação enzimática. Os dados da resistência à tração do colágeno e das propriedades mecânicas de nanodureza e módulo de elasticidade serão submetidos a testes estatísticos de normalidade e testes específicos para verificação da significância entre as médias ($\alpha = 0,05$).

Objetivo da Pesquisa:

Averiguar o potencial de degradação do colágeno derivado da dentina esclerótica e afetada por cárie, em comparação à dentina sadia e verificar a influência de inibidores de protease (clorexidina

Continuação do Parecer: 1.521.687

e EGCG) sobre a estabilidade da matriz de colágeno.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Este estudo oferece risco mínimo.

Benefícios:

Possível consagração de novos procedimentos clínicos na literatura.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todas as alterações solicitadas foram realizadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não havendo pendências, propõe a aprovação do projeto de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Não havendo pendências, o CEP propõe a aprovação do projeto de pesquisa salientando que, de acordo com a Resolução 466 CNS de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 01/11/2016. O CEP reitera a necessidade de entrega de uma via (não cópia) do TCLE ao sujeito participante da pesquisa e solicita ao pesquisador responsável leitura da carta circular 003/2011 CONEP/CNS antes do início do projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_548353.pdf	02/03/2016 17:41:16		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	P_02_03_2016.pdf	02/03/2016 17:40:58	Paulo Henrique dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	tcle.pdf	18/12/2015 10:09:24	Paulo Henrique dos Santos	Aceito

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 1.521.687

Ausência	tcle.pdf	18/12/2015 10:09:24	Paulo Henrique dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	02/07/2015 10:25:18		Aceito
Declaração de Pesquisadores	digitalizar0001.jpg.pdf	02/07/2015 08:35:13		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACATUBA, 29 de Abril de 2016

Assinado por:
André Pinheiro de Magalhães Bertoz
(Coordenador)

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONCA CEP: 16.015-050
UF: SP Município: ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 Fax: (18)3636-3332 E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

ANEXO B – Normas da revista selecionada para a publicação do artigo

Clinical Oral Investigations

Editor-in-Chief: Matthias **Hannig**

ISSN: 1432-6981 (print version)

ISSN: 1436-3771 (electronic version)

Journal no. 784

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

Papers may be submitted for the following sections:

Original articles

Invited reviews

Short communications

Letters to the editor

It is the general policy of this journal not to accept case reports and pilot studies.

EDITORIAL PROCEDURE

If you have any questions please contact:

Prof. Dr. G. Schmalz

University of Regensburg

Department of Conservative Dentistry and Periodontology

Franz-Josef-Strauß-Allee 11

93053 Regensburg

Germany

e-mail: gottfried.schmalz@klinik.uni-regensburg.de

Tel.: +49 941 9446024,

Fax: +49 941 9446025

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Further Useful Information

Please follow the link below

[Further Useful Information](#)

The Springer Author Academy is a set of comprehensive online training pages mainly geared towards first-time authors. At this point, more than 50 pages offer advice to authors on how to write and publish a journal article.

[Springer Author Academy](#)

TITLE PAGE

The title page should include:

The name(s) of the author(s)
 A concise and informative title
 The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
 The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

Objectives (stating the main purposes and research question)
 Materials and Methods
 Results
 Conclusions
 Clinical Relevance

These headings must appear in the abstract.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `sbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

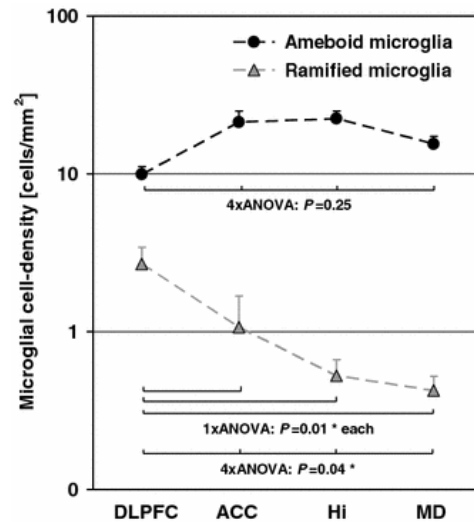
Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

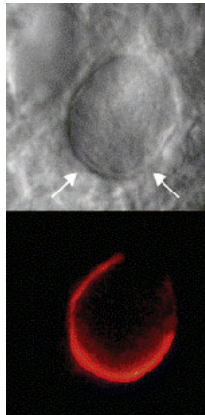
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

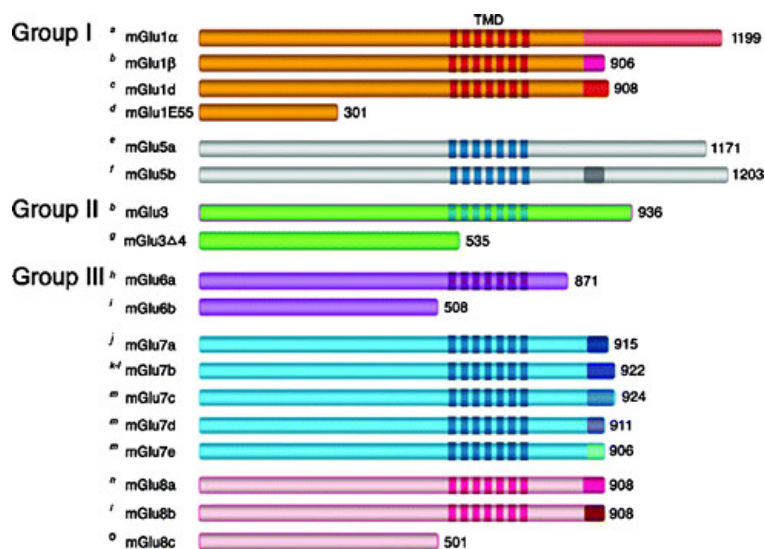


Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a

reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted. **Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not** accepted **after** acceptance of a manuscript.

Adding and/or deleting authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the role of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.

Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief’s implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is **maintained on the platform**, watermarked “retracted” and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author’s institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

Please make sure to submit all Conflict of Interest disclosure forms together with the manuscript. See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly

approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

RESEARCH DATA POLICY

The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature’s list of repositories and research data policy.

List of Repositories

Research Data Policy

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

DataCite

Springer Nature provides a research data policy support service for authors and editors, which can be contacted at researchdata@springernature.com.

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

Helpdesk

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Open Choice

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

[Find more about the license agreement](#)

ANEXO C – Análise Estatística

Análise estatística - resistência à tração do colágeno

ANOVA Table for Group

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	2111.108	1055.554	5.315	.0123	10.630	.793
Subject(Group)	24	4766.351	198.598				
Category for Group	2	733.050	366.525	1.199	.3103	2.399	.241
Category for Group * Dentin	4	3152.969	788.242	2.579	.0490	10.316	.681
Category for Group * Subject(Group)	48	14670.047	305.626				

Means Table for Group

Effect: Category for Group * Dentin

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
Sound, Control	9	40.307	21.384	7.128
Sound, Chlorhexidine	9	16.736	14.210	4.737
Sound, EGCG	9	30.057	19.678	6.559
Caries-affected, Control	9	17.336	11.775	3.925
Caries-affected, Chlorhexidine	9	25.733	15.972	5.324
Caries-affected, EGCG	9	9.106	9.747	3.249
Sclerotic, Control	9	19.811	11.369	3.790
Sclerotic, Chlorhexidine	9	21.602	25.877	8.626
Sclerotic, EGCG	9	16.361	9.771	3.257

Análise geral

Tukey/Kramer for Group

Effect: Dentin

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Sound, Caries-affected	11.642	9.574	S
Sound, Sclerotic	9.775	9.574	S
Caries-affected, Sclerotic	-1.866	9.574	

Tukey/Kramer for Group

Effect: Category for Group

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.
Control, Chlorhexidine	4.461	11.519
Control, EGCG	7.310	11.519
Chlorhexidine, EGCG	2.849	11.519

Comparação entre os grupos para cada tipo de dentina

ANOVA Table for Group

Split By: Dentin

Cell: Sound

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	8	694.242	86.780				
Category for Group	2	2514.170	1257.085	2.620	.1037	5.240	.437
Category for Group * Subject	16	7677.069	479.817				

ANOVA Table for Group**Split By: Dentin****Cell: Caries-affected**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	8	1061.147	132.643				
Category for Group	2	1244.129	622.064	3.493	.0551	6.987	.561
Category for Group * Subject	16	2849.104	178.069				

Tukey/Kramer for Group**Effect: Category for Group****Significance Level: 5 %****Split By: Dentin****Cell: Caries-affected**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Control, Chlorexidine	-8.397	16.236	
Control, EGCG	8.230	16.236	
Chlorexidine, EGCG	16.627	16.236	S

ANOVA Table for Group**Split By: Dentin****Cell: Sclerotic**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	8	3010.962	376.370				
Category for Group	2	127.720	63.860	.247	.7844	.493	.082
Category for Group * Subject	16	4143.873	258.992				

Comparação entre dentinas**ANOVA Table for Control**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	2861.510	1430.755	5.919	.0081	11.838	.840
Residual	24	5801.474	241.728				

Tukey/Kramer for Control**Effect: Dentin****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Sound, Caries-affected	22.970	18.294	S
Sound, Sclerotic	20.496	18.294	S
Caries-affected, Sclerotic	-2.474	18.294	

ANOVA Table for Chlorexidine

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	365.051	182.526	.486	.6210	.972	.118
Residual	24	9013.220	375.551				

ANOVA Table for EGCG

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	2037.516	1018.758	5.290	.0125	10.581	.791
Residual	24	4621.703	192.571				

Tukey/Kramer for EGCG**Effect: Dentin****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Sound, Caries-affected	20.951	16.329	S
Sound, Sclerotic	13.696	16.329	
Caries-affected, Sclerotic	-7.255	16.329	

Análise estatística – nanodureza do colágeno**ANOVA Table for Nanohardness**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	.083	.042	34.267	<.0001	68.534	1.000
Group	2	.005	.003	2.163	.1296	4.327	.402
Dentin * Group	4	.126	.032	25.909	<.0001	103.638	1.000
Subject(Group)	36	.044	.001				
Category for Measurement	1	.003	.003	3.755	.0605	3.755	.457
Category for Measurement * Dentin	2	.005	.003	3.396	.0446	6.792	.597
Category for Measurement * Group	2	.050	.025	31.140	<.0001	62.280	1.000
Category for Measurement * Dentin * Gro...	4	.031	.008	9.640	<.0001	38.558	1.000
Category for Measurement * Subject(Gro...	36	.029	.001				

Means Table for Nanohardness**Effect: Category for Measurement * Dentin * Group**

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
Sound, control, Before	5	.068	.003	.001
Sound, control, After	5	.106	.009	.004
Sound, chlorexidine, Before	5	.115	.053	.024
Sound, chlorexidine, After	5	.134	.020	.009
Sound, EGCG, Before	5	.185	.064	.029
Sound, EGCG, After	5	.103	.016	.007
caries-affected, control, Before	5	.170	.037	.016
caries-affected, control, After	5	.297	.008	.003
caries-affected, chlorexidine, Before	5	.125	.014	.006
caries-affected, chlorexidine, After	5	.091	.010	.005
caries-affected, EGCG, Before	5	.237	.062	.028
caries-affected, EGCG, After	5	.185	.051	.023
sclerotic, control, Before	5	.090	.003	.001
sclerotic, control, After	5	.117	.010	.005
sclerotic, chlorexidine, Before	5	.122	.007	.003
sclerotic, chlorexidine, After	5	.201	.048	.021
sclerotic, EGCG, Before	5	.104	.006	.003
sclerotic, EGCG, After	5	.087	.005	.002

Análise geral

Tukey/Kramer for Nanohardness

Effect: Dentin

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Sound, caries-affected	-.065	.022	S
Sound, sclerotic	-.002	.022	
caries-affected, sclerotic	.064	.022	S

Tukey/Kramer for Nanohardness

Effect: Group

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.
control, chlorhexidine	.010	.022
control, EGCG	-.009	.022
chlorhexidine, EGCG	-.019	.022

Tukey/Kramer for Nanohardness

Effect: Category for Measurement

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.
Before, After	-.012	.012

Comparação entre antes de depois da degradação

ANOVA Table for Nanohardness

Split By: Dentin, Group

Cell: Sound, control

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	1.791E-4	4.477E-5				
Category for Measurement	1	.004	.004	76.111	.0010	76.111	1.000
Category for Measurement * Subject	4	1.877E-4	4.693E-5				

ANOVA Table for Nanohardness

Split By: Dentin, Group

Cell: Sound, chlorhexidine

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	.007	.002				
Category for Measurement	1	.001	.001	.633	.4709	.633	.094
Category for Measurement * Subject	4	.005	.001				

ANOVA Table for Nanohardness
Split By: Dentin, Group
Cell: Sound, EGCG

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	.008	.002				
Category for Measurement	1	.016	.016	7.066	.0565	7.066	.522
Category for Measurement * Subject	4	.009	.002				

ANOVA Table for Nanohardness
Split By: Dentin, Group
Cell: caries-affected, control

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	.003	.001				
Category for Measurement	1	.040	.040	60.114	.0015	60.114	1.000
Category for Measurement * Subject	4	.003	.001				

ANOVA Table for Nanohardness
Split By: Dentin, Group
Cell: caries-affected, chlorhexidine

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	.001	1.713E-4				
Category for Measurement	1	.003	.003	22.103	.0093	22.103	.937
Category for Measurement * Subject	4	.001	1.354E-4				

ANOVA Table for Nanohardness
Split By: Dentin, Group
Cell: caries-affected, EGCG

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	.020	.005				
Category for Measurement	1	.007	.007	5.054	.0878	5.054	.401
Category for Measurement * Subject	4	.005	.001				

ANOVA Table for Nanohardness
Split By: Dentin, Group
Cell: sclerotic, control

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	3.314E-4	8.284E-5				
Category for Measurement	1	.002	.002	58.701	.0016	58.701	1.000
Category for Measurement * Subject	4	1.246E-4	3.114E-5				

ANOVA Table for Nanohardness
Split By: Dentin, Group
Cell: sclerotic, chlorhexidine

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	.004	.001				
Category for Measurement	1	.016	.016	12.564	.0239	12.564	.759
Category for Measurement * Subject	4	.005	.001				

ANOVA Table for Nanohardness
Split By: Dentin, Group
Cell: sclerotic, EGCG

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	7.553E-5	1.888E-5				
Category for Measurement	1	.001	.001	19.595	.0115	19.595	.909
Category for Measurement * Subject	4	1.606E-4	4.015E-5				

Comparação entre as dentinas antes da degradação

ANOVA Table for Before**Split By: Group****Cell: control**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	.029	.014	31.728	<.0001	63.457	1.000
Residual	12	.005	4.507E-4				

Tukey/Kramer for Before**Effect: Dentin****Significance Level: 5 %****Split By: Group****Cell: control**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Sound, caries-affected	-.102	.036	S
Sound, sclerotic	-.022	.036	
caries-affected, sclerotic	.080	.036	S

ANOVA Table for Before**Split By: Group****Cell: chlorexidine**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	2.565E-4	1.282E-4	.127	.8816	.255	.065
Residual	12	.012	.001				

ANOVA Table for Before**Split By: Group****Cell: EGCG**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	.044	.022	8.404	.0052	16.808	.914
Residual	12	.032	.003				

Tukey/Kramer for Before**Effect: Dentin****Significance Level: 5 %****Split By: Group****Cell: EGCG**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Sound, caries-affected	-.052	.087	
Sound, sclerotic	.080	.087	
caries-affected, sclerotic	.132	.087	S

Comparação entre as dentinas depois da degradação**ANOVA Table for After****Split By: Group****Cell: control**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	.114	.057	696.193	<.0001	1392.385	1.000
Residual	12	.001	8.197E-5				

Tukey/Kramer for After
Effect: Dentin
Significance Level: 5 %
Split By: Group
Cell: control

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Sound, caries-affected	-.190	.015	S
Sound, sclerotic	-.011	.015	
caries-affected, sclerotic	.179	.015	S

ANOVA Table for After
Split By: Group
Cell: clorexidine

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	.031	.016	16.834	.0003	33.667	.998
Residual	12	.011	.001				

Tukey/Kramer for After
Effect: Dentin
Significance Level: 5 %
Split By: Group
Cell: clorexidine

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Sound, caries-affected	.043	.051	
Sound, sclerotic	-.068	.051	S
caries-affected, sclerotic	-.111	.051	S

ANOVA Table for After
Split By: Group
Cell: EGCG

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	.027	.014	14.488	.0006	28.976	.994
Residual	12	.011	.001				

Tukey/Kramer for After
Effect: Dentin
Significance Level: 5 %
Split By: Group
Cell: EGCG

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Sound, caries-affected	-.081	.052	S
Sound, sclerotic	.017	.052	
caries-affected, sclerotic	.098	.052	S

Comparação entre as soluções antes da degradação

ANOVA Table for Before
Split By: Dentin
Cell: Sound

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Group	2	.034	.017	7.469	.0078	14.939	.876
Residual	12	.027	.002				

Tukey/Kramer for Before**Effect: Group****Significance Level: 5 %****Split By: Dentin****Cell: Sound**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
control, chlorexidine	-.047	.081	S
control, EGCG	-.116	.081	
chlorexidine, EGCG	-.069	.081	

ANOVA Table for Before**Split By: Dentin****Cell: caries-affected**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Group	2	.031	.016	8.790	.0045	17.580	.926
Residual	12	.021	.002				

Tukey/Kramer for Before**Effect: Group****Significance Level: 5 %****Split By: Dentin****Cell: caries-affected**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
control, chlorexidine	.045	.071	S
control, EGCG	-.067	.071	
chlorexidine, EGCG	-.111	.071	

ANOVA Table for Before**Split By: Dentin****Cell: sclerotic**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Group	2	.002	.001	41.283	<.0001	82.565	1.000
Residual	12	3.553E-4	2.960E-5				

Tukey/Kramer for Before**Effect: Group****Significance Level: 5 %****Split By: Dentin****Cell: sclerotic**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
control, chlorexidine	-.031	.009	S
control, EGCG	-.014	.009	S
chlorexidine, EGCG	.017	.009	S

Comparação entre as soluções depois da degradação**ANOVA Table for After****Split By: Dentin****Cell: Sound**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Group	2	.003	.001	5.768	.0176	11.537	.770
Residual	12	.003	2.443E-4				

Tukey/Kramer for After
Effect: Group
Significance Level: 5 %
Split By: Dentin
Cell: Sound

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
control, chlorhexidine	-.028	.026	S
control, EGCG	.003	.026	
chlorhexidine, EGCG	.030	.026	S

ANOVA Table for After
Split By: Dentin
Cell: caries-affected

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Group	2	.106	.053	58.488	<.0001	116.976	1.000
Residual	12	.011	.001				

Tukey/Kramer for After
Effect: Group
Significance Level: 5 %
Split By: Dentin
Cell: caries-affected

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
control, chlorhexidine	.206	.051	S
control, EGCG	.112	.051	S
chlorhexidine, EGCG	-.094	.051	S

ANOVA Table for After
Split By: Dentin
Cell: sclerotic

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Group	2	.035	.018	22.032	<.0001	44.065	1.000
Residual	12	.010	.001				

Tukey/Kramer for After
Effect: Group
Significance Level: 5 %
Split By: Dentin
Cell: sclerotic

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
control, chlorhexidine	-.084	.048	S
control, EGCG	.031	.048	
chlorhexidine, EGCG	.115	.048	S

Análise estatística - módulo de elasticidade do colágeno

ANOVA Table for Elastic modulus

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	6.145	3.072	5.061	.0116	10.122	.791
Group	2	3.209	1.605	2.643	.0849	5.287	.482
Dentin * Group	4	13.883	3.471	5.717	.0011	22.868	.971
Subject(Group)	36	21.854	.607				
Category for Elastic modulus	1	.241	.241	.511	.4795	.511	.104
Category for Elastic modulus * Dentin	2	7.393	3.697	7.815	.0015	15.630	.946
Category for Elastic modulus * Group	2	20.355	10.177	21.516	<.0001	43.032	1.000
Category for Elastic modulus * Dentin * G...	4	4.347	1.087	2.297	.0778	9.189	.605
Category for Elastic modulus * Subject(G...	36	17.029	.473				

Means Table for Elastic modulus

Effect: Category for Elastic modulus * Dentin * Group

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
Sound, control, Before	5	3.133	.954	.426
Sound, control, After	5	3.315	.486	.217
Sound, chlorexidine, Before	5	3.257	.409	.183
Sound, chlorexidine, After	5	3.575	.402	.180
Sound, EGCG, Before	5	4.770	1.480	.662
Sound, EGCG, After	5	2.672	.347	.155
caries-affected, control, Before	5	2.678	.234	.105
caries-affected, control, After	5	3.925	.067	.030
caries-affected, chlorexidine, Before	5	4.331	.821	.367
caries-affected, chlorexidine, After	5	3.467	.273	.122
caries-affected, EGCG, Before	5	5.585	1.756	.785
caries-affected, EGCG, After	5	3.748	1.042	.466
sclerotic, control, Before	5	2.739	.174	.078
sclerotic, control, After	5	4.150	.405	.181
sclerotic, chlorexidine, Before	5	3.462	.643	.287
sclerotic, chlorexidine, After	5	4.304	.561	.251
sclerotic, EGCG, Before	5	2.822	.161	.072
sclerotic, EGCG, After	5	2.688	.099	.044

Analise geral

Tukey/Kramer for Elastic modulus**Effect: Dentin****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Sound, caries-affected	-.502	.492	S
Sound, sclerotic	.093	.492	
caries-affected, sclerotic	.595	.492	S

Tukey/Kramer for Elastic modulus**Effect: Group****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff.
control, chlorexidine	-.410	.492
control, EGCG	-.391	.492
chlorexidine, EGCG	.019	.492

Tukey/Kramer for Elastic modulus**Effect: Category for Elastic modulus****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff.
Before, After	.104	.294

Comparação entre antes de depois da degradação**ANOVA Table for Elastic modulus****Split By: Dentin, Group****Cell: Sound, control**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	2.708	.677				
Category for Elastic modulus	1	.083	.083	.177	.6960	.177	.062
Category for Elastic modulus * Subject	4	1.872	.468				

ANOVA Table for Elastic modulus**Split By: Dentin, Group****Cell: Sound, chlorexidine**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	.966	.242				
Category for Elastic modulus	1	.253	.253	2.895	.1641	2.895	.255
Category for Elastic modulus * Subject	4	.349	.087				

ANOVA Table for Elastic modulus**Split By: Dentin, Group****Cell: Sound, EGCG**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	4.942	1.236				
Category for Elastic modulus	1	10.996	10.996	10.225	.0330	10.225	.674
Category for Elastic modulus * Subject	4	4.301	1.075				

ANOVA Table for Elastic modulus**Split By: Dentin, Group****Cell: caries-affected, control**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	.093	.023				
Category for Elastic modulus	1	3.893	3.893	108.475	.0005	108.475	1.000
Category for Elastic modulus * Subject	4	.144	.036				

ANOVA Table for Elastic modulus**Split By: Dentin, Group****Cell: caries-affected, chlorexidine**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	1.900	.475				
Category for Elastic modulus	1	1.870	1.870	6.825	.0593	6.825	.509
Category for Elastic modulus * Subject	4	1.096	.274				

ANOVA Table for Elastic modulus**Split By: Dentin, Group****Cell: caries-affected, EGCG**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	8.295	2.074				
Category for Elastic modulus	1	8.444	8.444	4.028	.1152	4.028	.333
Category for Elastic modulus * Subject	4	8.386	2.096				

ANOVA Table for Elastic modulus**Split By: Dentin, Group****Cell: sclerotic, control**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	.387	.097				
Category for Elastic modulus	1	4.980	4.980	51.186	.0020	51.186	.999
Category for Elastic modulus * Subject	4	.389	.097				

ANOVA Table for Elastic modulus**Split By: Dentin, Group****Cell: sclerotic, chlorexidine**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	2.510	.628				
Category for Elastic modulus	1	1.774	1.774	17.654	.0137	17.654	.880
Category for Elastic modulus * Subject	4	.402	.100				

ANOVA Table for Elastic modulus**Split By: Dentin, Group****Cell: sclerotic, EGCG**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	4	.054	.013				
Category for Elastic modulus	1	.045	.045	2.011	.2291	2.011	.192
Category for Elastic modulus * Subject	4	.089	.022				

Comparação entre as dentinas antes da degradação**ANOVA Table for Before****Split By: Group****Cell: control**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	.611	.306	.922	.4242	1.844	.169
Residual	12	3.977	.331				

ANOVA Table for Before**Split By: Group****Cell: chlorexidine**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	3.252	1.626	3.888	.0499	7.776	.582
Residual	12	5.019	.418				

Fisher's PLSD for Before**Effect: Dentin****Significance Level: 5 %****Split By: Group****Cell: chlorexidine**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
Sound, caries-affected	-1.074	.891	.0221
Sound, sclerotic	-.205	.891	.6260
caries-affected, sclerotic	.869	.891	.0550

S

Tukey/Kramer for Before**Effect: Dentin****Significance Level: 5 %****Split By: Group****Cell: chlorexidine**

	Mean Diff.	Crit. Diff.
Sound, caries-affected	-1.074	1.090
Sound, sclerotic	-.205	1.090
caries-affected, sclerotic	.869	1.090

ANOVA Table for Before**Split By: Group****Cell: EGCG**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	20.162	10.081	5.705	.0181	11.410	.765
Residual	12	21.204	1.767				

Tukey/Kramer for Before**Effect: Dentin****Significance Level: 5 %****Split By: Group****Cell: EGCG**

	Mean Diff.	Crit. Diff.
Sound, caries-affected	-.816	2.241
Sound, sclerotic	1.948	2.241
caries-affected, sclerotic	2.764	2.241

S

Comparação entre as dentinas depois da degradação

ANOVA Table for After**Split By: Group****Cell: control**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	1.868	.934	6.936	.0100	13.872	.848
Residual	12	1.616	.135				

Tukey/Kramer for After**Effect: Dentin****Significance Level: 5 %****Split By: Group****Cell: control**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Sound, caries-affected	-.611	.619	
Sound, sclerotic	-.835	.619	S
caries-affected, sclerotic	-.225	.619	

ANOVA Table for After**Split By: Group****Cell: chlorexidine**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	2.075	1.038	5.649	.0187	11.298	.760
Residual	12	2.204	.184				

Tukey/Kramer for After**Effect: Dentin****Significance Level: 5 %****Split By: Group****Cell: chlorexidine**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Sound, caries-affected	.109	.723	
Sound, sclerotic	-.729	.723	S
caries-affected, sclerotic	-.838	.723	S

ANOVA Table for After**Split By: Group****Cell: EGCG**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Dentin	2	3.799	1.900	4.687	.0313	9.374	.671
Residual	12	4.864	.405				

Tukey/Kramer for After**Effect: Dentin****Significance Level: 5 %****Split By: Group****Cell: EGCG**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
Sound, caries-affected	-1.075	1.073	S
Sound, sclerotic	-.015	1.073	
caries-affected, sclerotic	1.060	1.073	

Comparação entre as soluções antes da degradação

ANOVA Table for Before**Split By: Dentin****Cell: Sound**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Group	2	8.301	4.151	3.812	.0523	7.623	.573
Residual	12	13.067	1.089				

ANOVA Table for Before**Split By: Dentin****Cell: caries-affected**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Group	2	21.271	10.636	8.366	.0053	16.732	.913
Residual	12	15.255	1.271				

Tukey/Kramer for Before**Effect: Group****Significance Level: 5 %****Split By: Dentin****Cell: caries-affected**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
control, clorexidine	-1.654	1.901	S
control, EGCG	-2.908	1.901	
chlorexidine, EGCG	-1.254	1.901	

ANOVA Table for Before**Split By: Dentin****Cell: sclerotic**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Group	2	1.567	.783	5.009	.0262	10.019	.704
Residual	12	1.877	.156				

Tukey/Kramer for Before**Effect: Group****Significance Level: 5 %****Split By: Dentin****Cell: sclerotic**

	Mean Diff.	Crit. Diff.	
control, clorexidine	-.723	.667	S
control, EGCG	-.083	.667	
chlorexidine, EGCG	.640	.667	

Comparação entre as soluções depois da degradação**ANOVA Table for After****Split By: Dentin****Cell: Sound**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Group	2	2.160	1.080	6.255	.0138	12.509	.806
Residual	12	2.072	.173				

Tukey/Kramer for After
Effect: Group
Significance Level: 5 %
Split By: Dentin
Cell: Sound

	Mean Diff.	Crit. Diff.
control, chlorexidine	-.261	.701
control, EGCG	.642	.701
chlorexidine, EGCG	.903	.701

S

ANOVA Table for After
Split By: Dentin
Cell: caries-affected

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Group	2	.535	.268	.689	.5207	1.379	.137
Residual	12	4.657	.388				

ANOVA Table for After
Split By: Dentin
Cell: sclerotic

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Group	2	7.959	3.979	24.427	<.0001	48.855	1.000
Residual	12	1.955	.163				

Tukey/Kramer for After
Effect: Group
Significance Level: 5 %
Split By: Dentin
Cell: sclerotic

	Mean Diff.	Crit. Diff.
control, chlorexidine	-.154	.680
control, EGCG	1.462	.680
chlorexidine, EGCG	1.617	.680

S

S

Análise estatística – poder do teste resistência à tração

Poder para comparar duas médias

Dados de entrada

Intervalo de Confiança em 95% bicaudal			
	Grupo 1	Grupo 2	Diferença*
Média	30.05	9.1	20.95
Tamanho da amostra	9	9	
Desvio padrão	19.68	9.74	
Variância	387.302	94.8676	

Power = 81.66%
pele método de aproximação da normal

* Diferença de Médias= (Média do Grupo 1) - (Média do Grupo 2)

Análise estatística – poder do teste nanodureza

Poder para comparar duas médias

Dados de entrada

Intervalo de Confiança em 95% bicaudal			
	Grupo 1	Grupo 2	Diferença*
Média	0.17	0.297	-0.127
Tamanho da amostra	5	5	
Desvio padrão	0.037	0.008	
Variância	0.001369	0.000064	

Power = 100%

pele método de aproximação da normal

* Diferença de Médias= (Média do Grupo 1) - (Média do Grupo 2)

Análise estatística – poder do teste módulo de elasticidade

Poder para comparar duas médias

Dados de entrada

Intervalo de Confiança em 95% bicaudal			
	Grupo 1	Grupo 2	Diferença*
Média	2.67	3.92	-1.25
Tamanho da amostra	5	5	
Desvio padrão	0.23	0.06	
Variância	0.0529	0.0036	

Power = 100%

pele método de aproximação da normal

* Diferença de Médias= (Média do Grupo 1) - (Média do Grupo 2)