



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ROCIO GENG VIVANCO

**EFEITO DO USO DE PRÓPOLIS ASSOCIADA A VITROCERÂMICA
BIOATIVA NA INTERFACE DENTINA-ADESIVO**

Ribeirão Preto

2020

ROCIO GENG VIVANCO

**EFEITO DO USO DE PRÓPOLIS ASSOCIADA A VITROCERÂMICA
BIOATIVA NA INTERFACE DENTINA-ADESIVO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre, junto ao Departamento de Materiais Dentários e Prótese.

Área de concentração: Reabilitação Oral

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do *Campus* USP – Ribeirão Preto

Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

Geng Vivanco, Rocio

Efeito do uso de própolis associada a vitrocerâmica bioativa na interface dentina-adesivo. Ribeirão Preto, 2020.

121 p.: il.; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientadora: Pires-de-Souza, Fernanda de Carvalho Panzeri

1. Adesão dentinária. 2. Própolis. 3. Vitrocerâmica bioativa.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ROCIO GENG VIVANCO

Efeito do uso de própolis associada a vitrocerâmica bioativa na interface dentina-adesivo

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Reabilitação Oral

Aprovado em: 22/01/2020

Banca Examinadora

1) Prof.(a). Dr.(a).: Victor Pinheiro Feitosa

Instituição: Faculdade de Paulo Picanço

Julgamento: Aprovado

Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: Miguel Ángel Saravia Rojas

Instituição: Facultad de Odontologia – UPCH

Julgamento: Aprovado

Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: Oscar Peitl Filho

Instituição: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Julgamento: Aprovado

Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus pais, **Jacqueline e Victor**, sou grata pelo esforço, apoio e motivação para ir atrás dos meus sonhos; e por me terem preparado para os desafios da vida, sem medo e com humildade. Esta conquista é nossa! Amo vocês!*

*À minha querida irmã, **Valeria**, pelo carinho e amor; e por transmitir essa alegria que te caracteriza, mesmo estando longe. Você me fez muita falta! Amo você!*

*À minha querida **Sami**, exemplo de força, otimismo e autonomia para encarar a vida. Você estará sempre no meu coração.*

Agradecimento Especial

À Profª Drª Fernanda de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza, minha orientadora, pela sua disponibilidade, confiança, amizade e carinho; pelos ensinamentos, oportunidades e gratos momentos compartilhados, de grande importância para o meu crescimento profissional e pessoal; e por me conduzir pelo caminho certo, com ética e humildade. Muito obrigada! Meu eterno carinho e admiração.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral, representada pelo Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro; e aos Professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, pela oportunidade inigualável de tanto aprendizado. Honrada em fazer parte desta casa.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho e bolsa de Mestrado fornecida.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de Mestrado concedida nos primeiros meses.

À empresa Apis Flora, pelo fornecimento dos extratos de própolis utilizados neste estudo; e especialmente, à pesquisadora responsável, Dr^a Franciane Marquede de Oliveira, que foi sempre solícita.

À Rafaella Tonani Torrieri, pela paciência, ensinamentos, disposição e amizade. Assim como, pelos momentos inesquecíveis. Você foi fundamental para o desenvolvimento do projeto. Obrigada pela dedicação e excelente trabalho!

À Técnica do Laboratório de Pesquisa de Metrologia, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Ana Paula Macedo; e aos Técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, José Augusto Maulim e Roberta Ribeiro Costa Rosales, pela ajuda, disponibilidade, paciência e trabalho árduo.

Ao Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti e ao Pós-doutorando, Gabriel Flores Abuna, do Departamento de Odontologia Restauradora, da

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela colaboração na Microscopia Eletrônica de Transmissão.

*Às minhas queridas amigas, **Carolina Noronha Ferraz de Arruda e Bruna Santos Honório Tonin**, pela amizade, apoio e acolhida desde o primeiro dia; e pelas risadas, momentos inesquecíveis e viagens compartilhados. Sem vocês não teria sido igual. Que nossa amizade dure para sempre!*

*Ao meu amigo e companheiro de laboratório, **Ayodele Alves Amorim**, obrigada pelo apoio e parceria sem esperar nada em troca.*

*Ao meu namorado, amigo e cúmplice, **Sebastián Reátegui Ramos**, pelo apoio, incentivo e suporte para atingir minhas conquistas; e pelo carinho, risadas e sobretudo, paciência.*

A todos que participaram da pesquisa, meu sincero agradecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Resumo

GENG-VIVANCO, R. **Efeito do uso de própolis associada a vitrocerâmica bioativa na interface dentina-adesivo.** 2020. 121 p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

RESUMO

Este estudo *in vitro* avaliou o efeito do uso de própolis associada a suspensão de Biosilicato na resistência de união (RU) à dentina de restaurações em compósito. Foram selecionados 320 dentes molares humanos hígidos e preparadas cavidades oclusais (5 mm de comprimento, 4 mm de largura e 4 mm de profundidade) utilizando brocas carbide. Metade das amostras foram submetidas a protocolos Des-Re para formação de cárie artificial. Posteriormente, todos os dentes foram separados em oito grupos (n = 20) de acordo com o tratamento recebido antes do adesivo (Single Bond Universal – 3M ESPE): Grupo Controle – Sistema Adesivo; Grupo CHX – Cloredixina a 0,12% (CHX); Grupo Bio – Suspensão de Biosilicato a 10% (Bio); Grupo P16 – Extrato de própolis com baixo teor de polifenóis (P16); Grupo P45 – Extrato de própolis com alto teor de polifenóis (P45); Grupo CHX Bio – CHX + Bio; Grupo P16 Bio – P16 + Bio; P45 Bio – P45 + Bio. Após restauração (Filtek Z350, 3M ESPE), as amostras foram seccionadas em formato de palitos, divididos e armazenados em água destilada a 37 °C por 24 horas, 6 meses e 1 ano. Após o período de armazenamento, foram submetidos ao teste de microtração (0,5 mm/min). Os dados foram analisados (ANOVA de dois fatores, teste de Bonferroni, $p < .05$), os padrões de fratura observados com microscópio óptico (VH-M100, Keyence) e MEV (EVO MA10, ZEISS); e a interface adesiva, através da MET (JEM-1010, JEOL). A associação de tratamentos resultou em maior RU ($p < .05$) nos dentes cariados em relação às amostras Controle, testados após 24 horas, sem diferença entre si ($p > .05$). Entre os hígidos testados após 6 meses, o grupo P16 mostrou maior RU que os grupos Bio e Controle ($p < .05$). Dentre os dentes cariados, o grupo P45 mostrou maior RU do que o grupo CHX Bio ($p < .05$) quando testados após 1 ano. O envelhecimento das amostras só foi significativo ($p < .05$) para os substratos cariados, de forma que houve menor RU após 6 meses para o grupo P45 Bio e após 1 ano para o grupo CHX Bio. As imagens em MEV demonstraram que substratos hígidos apresentam padrão clássico de condicionamento obtido com sistemas *self-etch*. Nos cariados, nota-se maior remoção da *smear layer* e formação dos *tags* de resina em maior quantidade. Encontraram-se túbulos mais expostos e fibrilas colágenas desorganizadas. Foi possível identificar partículas de Biosilicato nos grupos tratados com esse biomaterial. Nos substratos cariados, foi possível identificar partículas de própolis sobre a dentina tratada. Na MET foi observada boa interação do adesivo com as fibrilas colágenas e a formação da camada híbrida.

No substrato cariado percebe-se um tecido conjuntivo mais frouxo e desorganizado. Foi também possível identificar partículas de Biosilicato e do extrato de própolis. O tratamento com própolis com baixo teor de polifenóis, resultou em melhor resistência de união em substrato hígido após 6 meses de envelhecimento. A associação de tratamentos com Biosilicato promove melhor resistência de união após 24 horas em substratos cariados. Não houve diferença na resistência de união em virtude do envelhecimento no substrato hígido. O padrão de fratura mais prevalente foi o não adesivo, que aumentou à medida que houve maior tempo de envelhecimento.

Palavras-chave: Adesão dentinária. Própolis. Vitrocerâmica bioativa.

Abstract

GENG-VIVANCO, R. **Effect of the use of propolis associated to bioactive glass-ceramic on dentin/adhesive interface.** 2020. 121 p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

ABSTRACT

This *in vitro* study evaluated the effect of the use of propolis associated with Biosilicate suspension on the bond strength (BS) of composite restorations to dentin. 320 sound human molars were selected and occlusal cavities (5 mm length, 4 mm width and 4 mm depth) were prepared with carbide burs. Half of them were submitted to Des-Re protocols for development of artificial caries. Then, all teeth were separated into eight groups (n = 20) according to the treatment received before the adhesive system (Single Bond Universal – 3M ESPE): Control Group – Adhesive System; CHX Group – 0,12% Chlorhexidine (CHX); Bio Group – 10% Biosilicate suspension (Bio); P16 Group – Propolis extract with low levels of polyphenols (P16); P45 Group – Propolis extract with high levels of polyphenols (P45); CHX Bio Group – CHX + Bio; P16 Bio Group – P16 + Bio; P45 Bio Group – P45 + Bio. After restorations (Filtek Z350, 3M ESPE), samples were sectioned into sticks, separated and stored in distilled water at 37 °C for 24 hours, 6 months and 1 year. After that, the sticks were submitted to microtensile test (0,5 mm/min). Data was analyzed (2-way ANOVA, Bonferroni's Test, $p < .05$), fracture patterns were observed with optical microscope (VH-M100, Keyence) and SEM (EVO MA10, ZEISS); and the adhesive interface, under TEM (JEM-1010, JEOL). In caries-affected dentin (CAD), the association of treatments resulted in higher BS ($p < .05$) compared to Control group, tested after 24 hours, with no difference among them ($p > .05$). Among the sound dentin (SD) tested after 6 months, P16 group showed higher BS than Bio and Control groups ($p < .05$). On CAD tested after 1 year, P45 group presented higher BS than CHX Bio Group ($p < .05$). Aging was significant ($p < .05$) for CAD; thus, there was lower BS after 6 months for P45 Bio group and after 1 year for CHX Bio group. SEM displayed that SD present the classical etching pattern obtained with self-etch systems. Among CAD, there was greater removal of smear layer and higher amount of resin tags. It was also found dentinal tubules more exposed and disorganized collagen fibrils. It was identified Biosilicate particles in groups treated with this biomaterial. On CAD, it was possible to identify propolis particles on the treated dentin. TEM showed good interaction between adhesive and collagen fibrils, and the formation of the hybrid layer. In CAD, a looser and more disorganized connective tissue was noticed. It was also identified Biosilicate and propolis particles. The treatment with propolis with low levels of polyphenols resulted in the best bond strength on sound dentin after 6 months of aging. The association of

treatments with Biosilicate promoted the best bond strength after 24 hours on caries-affected dentin. On sound substrates, there was no difference in bond strength due to aging. The most prevalent fracture pattern was the non-adhesive fracture, which increased with longer aging periods.

Keywords: Dentin adhesion. Propolis. Bioactive glass-ceramic.

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	29
2. PROPOSIÇÃO.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Material.....	43
3.2. Métodos	44
3.2.1. Resistência de união à microtração	44
3.2.1.1. Preparo dos dentes	44
3.2.1.2. Protocolos de tratamento do substrato dentinário	47
3.2.1.2.1. Clorexidina.....	47
3.2.1.2.2. Suspensão de Biosilicato.....	48
3.2.1.2.3. Suspensão de própolis.....	49
3.2.1.2.4. Sistemas adesivo.....	50
3.2.1.3. Restauração com compósito	51
3.2.1.4. Corte das amostras e teste de microtração.....	51
3.2.1.5. Análise estatística	53
3.2.2. Análise dos padrões de fratura.....	53
3.2.3. Morfologia da fratura – Microscopia eletrônica de varredura	53
3.2.4. Análise da interface adesiva – Microscopia eletrônica de transmissão.....	55
4. RESULTADOS	57
4.1. Resistência de união à microtração	59
4.2. Análise dos padrões de fratura	62
4.3. Morfologia da fratura – Microscopia eletrônica de varredura	64
4.4. Análise da interface adesiva – Microscopia eletrônica de transmissão.....	74
5. DISCUSSÃO	85
6. CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXOS	117

1. Introdução

Nas últimas décadas, muitos avanços tecnológicos foram alcançados no desenvolvimento de materiais adesivos a fim de melhorar a resistência de união (RU) entre compósitos e os substratos dentários. Os sistemas adesivos têm sido sistematicamente simplificados e as técnicas aprimoradas com o intuito de conseguir a melhor eficiência com o menor tempo de utilização clínica.

Entretanto, a longevidade das restaurações e da interface adesiva, que permanece como a área mais frágil das restaurações de resina, (1–3) são assuntos ainda de muito interesse na Odontologia, e muitas são as tentativas de melhorar essa questão. (4,5)

Duas estratégias principais têm sido usadas para a hibridização da dentina, caracterizada pela união micromecânica entre a resina e a matriz dentinária rica em colágeno: 1) a utilização de sistemas adesivos “*etch-and-rinse*” em que um ácido é aplicado para desmineralizar a superfície dentinária, que é então lavada e sobre ela aplicada um *primer* e um adesivo; podendo esses últimos serem apresentados na forma simplificada, como o sistema adesivo de 2 passos. Tem sido demonstrado (6) que o ácido fosfórico, mais usado para o condicionamento da dentina, produz uma grande desmineralização da dentina e, conseqüentemente, um maior volume de colágeno desprotegido no fundo da camada híbrida. 2) o uso de monômeros ácidos sem enxague que, simultaneamente, condicionam e tratam com *primer* a dentina; são os chamados sistemas adesivos “*self-etch*”. Nos sistemas adesivos mais recentes, além da retenção micromecânica alcançada com a hibridização da dentina, há uma interação química adicional entre grupamentos específicos carboxílicos/fosfatos dos monômeros funcionais com a hidroxiapatita. (7)

A durabilidade da interface adesiva é influenciada por muitos fatores, dentre eles a degradação devido à hidrólise da resina hidrofílica do sistema adesivo, não totalmente polimerizada, e a degradação da matriz colágena pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) e catepsina cisteínas. (1)

As MMPs são uma família de 20 enzimas cálcio e zinco-dependentes que são importantes em muitos processos biológicos e patológicos porque são capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz extracelular. (8–10) Várias MMPs são encontradas na dentina, dentre elas as MMP-2 e MMP-9 (gelatinases), MMP-20 (enamelisina), MMP-3 (estromelisina-1) e MMP-8 (colagenase). (11–13) Na dentina mineralizada, as MMPs estão inativas. Porém, o condicionamento ácido, necessário para a formação da camada híbrida, desmineraliza superficialmente a dentina expondo as fibrilas colágenas e ativando as MMPs. (14) Se o

monômero resinoso não consegue infiltrar completamente na matriz colágena desmineralizada, as fibrilas colágenas ficam suscetíveis à degradação proteolítica, (15–17) o que tem um efeito adverso na resistência de união. (18) As MMPs também exercem grande influência na modulação da matriz dentinária durante a progressão da cárie. (19,20)

Estratégias adequadas para aumentar a longevidade da interface resina-dentina e assim, das restaurações adesivas, seriam diminuir a atividade das MMPs (21) protegendo a interface e remineralizando a dentina. (2)

O agente sintético para inativar as proteases endógenas da interface adesiva mais investigado é o digluconato de clorexidina (CHX), que tem se apresentado eficiente *in vitro* e *in vivo* (22–25) devido à capacidade da CHX de ser um inibidor de gelatinase/colagenase que age pela quelação não específica de cátions como Zn^{2+} e Ca^{2+} ; íons necessários para manter as funções enzimáticas das MMPs. (23) Porém, estudos recentes têm demonstrado que a CHX tem ligação somente eletrostática com a hidroxiapatita dentinária (26) e o efeito inibitório da CHX sobre as MMPs da dentina pode ser perdido em 1,5-2 anos. (27) Assim, outros inibidores têm sido propostos, como a galardina (28) e os metacrilatos de amônio quaternário, (29) além da indicação de agentes de ligações cruzadas do colágeno (5,30,31) para aumentar a longevidade das restaurações.

As ligações cruzadas intermoleculares e interfibrilares são a base para a estabilidade, resistência e viscoelasticidade da matriz dentinária. A quantidade e o tipo de ligações cruzadas também determinam a estabilidade do colágeno e sua capacidade de resistir à biodegradação. (32) Estes preservam a integridade estrutural e aumentam a estabilidade bioquímica e biomecânica da matriz colágena da dentina desmineralizada; (31) além de aumentar a resistência à degradação pelas colagenases pelas bactérias, (33) inibir a atividade das metaloproteinases da matriz (34) e diminuir a taxa de desmineralização da dentina (35) contribuindo para a estabilização da interface adesiva resina-dentina. A atividade das MMPs em amostras tratadas com agentes de ligações cruzadas diminuiu significativamente entre 21% e 70%, dependendo da fonte usada, enquanto que em amostras sem tratamento a ação das MMPs aumentou em até 84%. (36)

Um dos agentes de ligações cruzadas mais estudados atualmente é a proantocianidina (PAC) derivada de plantas, extraída de resíduos de fontes renováveis e ricos em polifenóis; como o extrato de semente de uva (*Grape seed extract* ou GSE). (5,30,31) Sugere-se que os mecanismos de ligações cruzadas entre as proantocianidinas e o colágeno possam ocorrer

através de ligações covalentes e, principalmente, através de pontes de hidrogênio. (32) O colágeno exibe dois sítios de ligação terminais (um grupo amina e outro carboxila) e a PAC seria capaz de se ligar nessas regiões através do seu grupo hidroxila, gerando ligações intermoleculares e interfibrilares. (32)

A própolis, um adesivo resinoso coletado, processado e usado pelas abelhas, (37) tem recebido grande atenção na comunidade científica nos últimos anos; devido as suas múltiplas propriedades como agente antibacteriano, antifúngico, antiinflamatório, antiviral, anestésico, regenerador de tecidos, entre outros. (38,39) A composição química da própolis é muito complexa e depende da flora local do sítio de coleta, (40) sendo basicamente formada por 55% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de voláteis e 5% de pólen. (40–42) Além disso, sabe-se que apresenta compostos fenólicos e ésteres, e que os agentes químicos mais prevalentes são todos os tipos de flavonoides e vários compostos aromáticos (38) que, segundo Jin et al., (39) apresentam grande efeito inibidor sobre a MMP-9. O ácido fenil éster caféico (CAPE), um dos compostos majoritários encontrados na própolis, possui atividade antiinflamatória, antioxidante, antimicrobianas, antineoplásica e inibe a atividade desta metaloproteinase, restringindo assim a degradação da matriz e a invasão celular. (39) Além disso, a própolis é 10 vezes menos citotóxica aos fibroblastos, células da polpa e do ligamento periodontal do que o hidróxido de cálcio. (38)

Apesar de existirem vários estudos na literatura utilizando a própolis como agente terapêutico na Odontologia, a maioria deles está relacionada à verificação de biocompatibilidade, (43–45) eficiência em tratamentos endodônticos, (46) como dessensibilizante, (47,48) antibacteriano contra *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* (43,49,50) ou adicionada aos cimentos de ionômero de vidro. (51) Há conhecimento de apenas um estudo sobre a ação da própolis sobre inibição de MMPs e resistência de união dentina/adesivo. (52)

Além disso, os flavonoides são considerados os componentes mais ativos biologicamente da própolis, responsáveis pelas suas propriedades terapêuticas (53) apresentando pronunciada bioatividade com os componentes da matriz celular e extracelular. (54) Diversos estudos tem demonstrado que as propriedades biológicas e terapêuticas da própolis estão diretamente relacionadas ao teor de polifenóis, (49,55) salientando entre eles os flavonóides. (56) Sabe-se que quanto maior for o teor, maior será a atividade antimicrobiana e antioxidante. (49,55,56)

Apesar disso, não há relatos na literatura da ação desses compostos da própolis, em diferentes concentrações, em Odontologia restauradora.

Como dito anteriormente, uma outra estratégia para aumentar a longevidade das restaurações seria proporcionar a remineralização do tecido dentinário. (2) Um material indicado para isso seria o Biosilicato, uma vitrocerâmica bioativa com partículas cristalizadas, composto de $23,75\text{Na}_2\text{O}-23,75\text{CaO}-48,5\text{SiO}_2-4\text{P}_2\text{O}_5$ (% em peso) que, em contato com fluidos, tem demonstrado bons resultados na formação de hidroxicarbonoapatita (HCA) sobre tecidos mineralizados. (57)

A camada de HCA reforçada com fibrilas de colágeno, é quimicamente e estruturalmente equivalente ao osso natural. (58) Este biomaterial é produzido com uma (BioS-1P) ou duas (BioS-2P) fases cristalinas, que contribuem para aumentar a resistência mecânica, módulo de elasticidade e módulo de fratura dos tecidos. (57,59)

Trata-se de um material com maior resistência mecânica que o Bioglass 45S5. Apesar disso, apresenta maior reatividade, sendo que a formação de HCA ocorre após 6 horas do uso do Bioglass e 4 horas após Biosilicato. (59)

Especificamente em Odontologia, o Biosilicato tem mostrado bons resultados em estudos clínicos e laboratoriais, (60–62) induzindo proliferação e diferenciação de fibroblastos e osteoblastos. (63) Do mesmo modo, Varanasi et al. (64) relataram que o Biosilicato promove o aumento da expressão gênica do colágeno do tipo I, da osteocalcina e da fosfatase alcalina nos fibroblastos dos ligamentos humanos.

Na dentina, as partículas do material previamente aderido ao tecido dental sofrem dissolução no meio oral, liberando constantemente íons cálcio e fosfato da composição dos biovidros, o que eleva o pH local, favorecendo a ação anticariogênica e o processo de remineralização dental. (60,65)

Esse biovidro apresenta um amplo espectro de propriedades antimicrobianas, incluindo bactérias anaeróbicas, e valores de concentração inibitória mínima menores para microrganismos orais. (66)

Estudo recente (67) demonstrou que o tratamento da dentina com Biosilicato previamente à utilização do sistema adesivo *etch-and-rinse* influenciou positivamente a RU dentina/adesivo; já que, quando entra em contato com a dentina, as partículas reagem rapidamente com o tecido circundante no interior dos túbulos dentinários. (61,62,67) Além disso, não interferiu na habilidade adesiva do sistema *self-etch* à dentina. Resultados de pesquisa anterior (68)

demonstram que a aplicação de Biosilicato sobre dentina hígida e cariada artificialmente aumentou a RU dentina/adesivo quando utilizado o sistema adesivo *etch-and-rinse*, mas não houve diferença significativa entre os substratos quando utilizado o sistema *self-etch* em dentina cariada.

Assim, considerando os resultados promissores de pesquisas anteriores, a busca constante pela inovação utilizando substâncias naturais, com menor potencial de efeitos colaterais; e um possível material remineralizante, diminuindo a necessidade de substituição de restaurações dentais ao longo do tempo e recuperando o tecido injuriado, torna-se fundamental estudar alternativas que permitam melhor qualidade de vida aos pacientes.

O presente trabalho de investigação avaliou o efeito do uso de própolis, com baixo ou alto teor de polifenóis, associada a suspensão de Biosilicato, na resistência de união (RU) à dentina hígida e cariada de restaurações em compósito, visando conhecer o protocolo que permita a melhor resistência de união à microtração, fator importante para garantir a longevidade da restauração na boca e o sucesso do tratamento. Finalmente, a interface adesiva foi caracterizada morfolologicamente através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para, assim, analisar a interação dos tratamentos de superfície propostos no substrato dentinário.

2. Proposição

O objetivo geral deste trabalho foi:

Avaliar o efeito do uso de própolis associada a suspensão de Biosilicato na resistência de união (RU) à dentina de restaurações em compósito.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o efeito do uso de duas formulações de própolis associadas a suspensão de Biosilicato a 10% na resistência de união à dentina hígida e cariada de restaurações adesivas em diferentes tempos de envelhecimento;
- Avaliar os padrões de fratura com microscópio óptico e microscopia eletrônica de varredura;
- Caracterizar morfológicamente a interface adesiva, para verificação da remineralização do substrato e da interação dos tratamentos propostos com a dentina, via microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

A hipótese nula deste estudo foi que a associação de própolis e Biosilicato não promoveria maior resistência de união na interface dentina/adesivo, independente do teor de polifenóis e tempo de envelhecimento.

3. Material e Métodos

3.1. MATERIAL

Os materiais utilizados neste estudo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Materiais utilizados no presente estudo.

Material	Nome comercial	Fabricante	Composição
Sistema adesivo	Single Bond Universal	3M ESPE, St. Paul, MN, EUA	Monômero fosfatado MDP, resinas de dimetacrilato, HEMA, copolímero ácido poliacrílico modificado por metacrilato, partículas, etanol, água, iniciadores e silano.
Clorexidina	Peridex	3M ESPE, St. Paul, MN, EUA	Gluconato de clorexidina a 0.12%, água, álcool, glicerina, diisosteato de sorbitano, saborizante, sacarina sódica.
Vitrocerâmica bioativa	Biosilicato	Vitrovita, São Carlos, SP, Brasil	$23,75\text{Na}_2\text{O}-23,75\text{CaO}-8,5\text{SiO}_2-4\text{P}_2\text{O}_5$ (0,18 μm), 100% cristalino.
Própolis com baixo teor de polifenóis	-	Apis Flora, Ribeirão preto, SP, Brasil	10% de resíduo seco + 10% de óleo de rícino etoxilado. Teor de polinefóis: $16,584 \pm 0,9699$.
Própolis com alto teor de polifenóis	-	Apis Flora, Ribeirão preto, SP, Brasil	Extrato aquoso de própolis 16 mg/mL - 40% p/v. Teor de polinefóis: $45,446 \pm 0,9582$.
Compósito resinoso	Filtek Z350	3M ESPE, St. Paul, MN, EUA	Bis-GMA, Bis-EMA, UDMA, TEGDMA, partículas de sílica (20 nm), partículas de zircônia (4 a 11 nm) e agregados de partículas de zircônia/sílica.

*10-MDP, 10-metacriloiloxidecil dihidrogeno fosfato; HEMA, hidroxietil metacrilato; Bis-GMA, bisfenol A-glicidil metacrilato; Bis-EMA, bisfenol A-glicidil dimetacrilato etoxilado; UDMA, uretano dimetacrilato; TEGMA, trietilenoglicol dimetacrilato.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Resistência de união à microtração

3.2.1.1. Preparo dos dentes

Após aprovação do protocolo da pesquisa pelo Comitê de Ética (CAAE nº 78665717.1.0000.5419), 320 molares humanos hígidos recém-extraídos foram coletados junto ao Biobanco de dentes humanos da unidade FORP - USP, limpos e armazenados à temperatura de -2 °C até o uso.

As raízes dos dentes foram incluídas em resina acrílica (Figura 1) em anéis de PVC e tiveram suas superfícies oclusais aplainadas, perpendicularmente ao longo eixo do dente, com lixas de carbeto de silício de granulação 220 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), sob água corrente, expondo a dentina do terço oclusal (Figura 2).

Figura 1 - Dentes incluídos em resina acrílica.

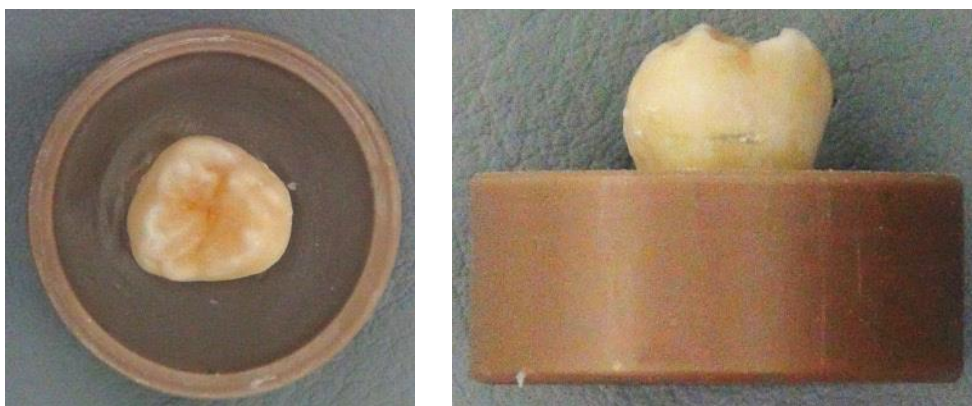
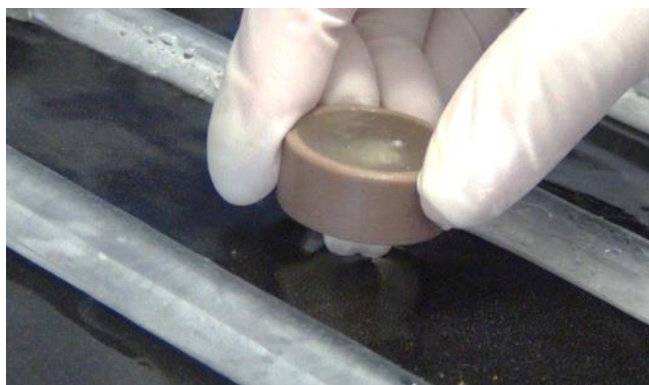


Figura 2 - Desgaste de dente em lixa para expor a dentina do terço oclusal.



Cavidades oclusais (5 mm de comprimento, 4 mm de largura e 4 mm de profundidade) foram preparadas na área central da superfície exposta dos dentes utilizando broca carbide número 245 (Regular Carbide Burs – Dentsply, Des Plaines, IL, EUA) montada em alta rotação refrigerado com água (Figura 3).

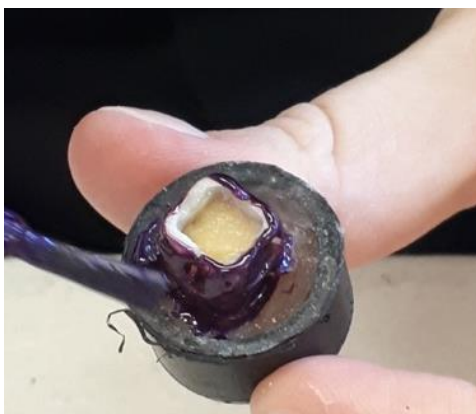
Figura 3 - Preparo dos dentes (Cavidades de Classe I).



Metade desses dentes foram submetidas à formação de cárie artificial, de forma que a cavidade preparada foi submetida a desafio cariogênico, conforme descrito por Markezan et al. (69) cuja condição padrão de ciclagem de pH foi a escolhida, em um esquema diário de dois ciclos; sendo 8 horas de desmineralização e 16 horas de remineralização, por um período de 14 dias em temperatura ambiente, sem agitação. Ao final de cada ciclo, a cavidade foi lavada com

água destilada e seca com papel absorvente. As demais faces dos dentes foram protegidas com esmalte para unhas (Colorama, L'Oreal Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura 4).

Figura 4 - Proteção das superfícies dentais do processo de Des-Re.



As soluções desmineralizantes continham 2,2 mM de CaCl_2 ; 2,2 mM de NaH_2PO_4 e 50 mM de ácido acético ($\text{pH} = 4.8$), e as remineralizantes continham 1,5 mM CaCl_2 ; 0,9 mM NaH_2PO_4 e 0,15 M KCl ($\text{pH} = 7.0$).

Novas soluções foram utilizadas para cada ciclo, em uma quantidade de 10 mL, garantindo assim, que as soluções não se ficaram saturadas ou com falta de íons. Antes e após a obtenção da cárie artificial, foram realizadas medidas de microdureza Knoop (Microdurômetro HMV, Shimadzu, Tóquio, Japão), com uma carga estática de 25 gramas por 30 segundos na dentina hígida e com carga de 10 gramas por 30 segundos na cariada, para certificação de que a dentina estivesse desmineralizada. (69)

Os dentes foram aleatoriamente separados em 8 grupos ($n = 20$), conforme o tipo de tratamento a que os substratos foram submetidos (Tabela 2).

Tabela 2 - Grupos de estudo.

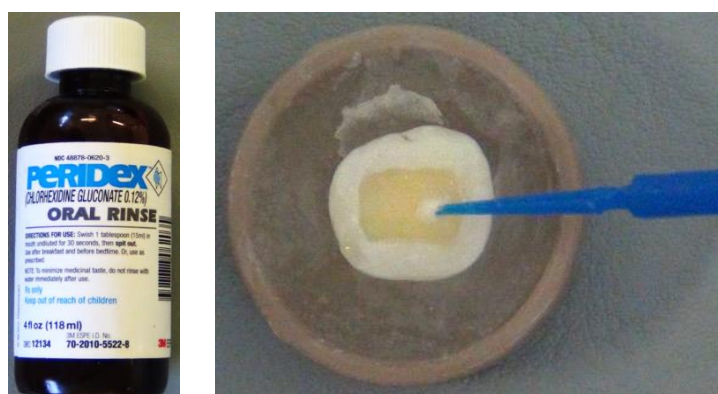
Grupo	Tratamento
Controle	Sistema adesivo
CHX	Clorexidina a 0,12%
Bio	Suspensão de Biosilicato a 10%
P16	Extrato de própolis com baixo teor de polifenóis
P45	Extrato de própolis com alto teor de polifenóis
CHX Bio	Clorexidina a 0,12% + Biosilicato
P16 Bio	Extrato de própolis com baixo teor de polifenóis + Biosilicato
P45 Bio	Extrato de própolis com alto teor de polifenóis + Biosilicato

3.2.1.2. Protocolos de tratamento do substrato dentinário

3.2.1.2.1. Clorexidina

A Clorexidina (CHX) a 0,12% foi aplicada na cavidade preparada com microbrush durante 30 segundos (Figura 5). Em seguida, as superfícies foram lavadas e o excesso de água foi retirado com papel absorvente.

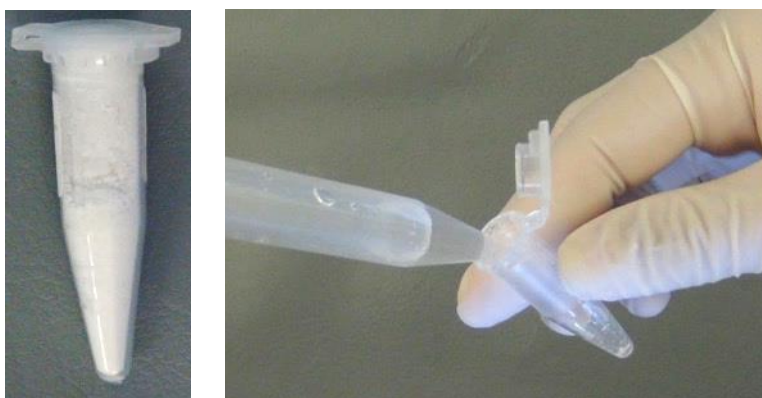
Figura 5 - Aplicação da Clorexidina.



3.2.1.2.2. Suspensão de Biosilicato (10%)

O Biosilicato é um pó de vidro bioativo, que apresenta diâmetro médio de 4 μm . Este material apresenta grande reatividade, sendo capaz de apresentar uma camada rica em sílica gel em apenas uma hora de exposição em fluido corporal simulado. (57) Sendo assim, as partículas de Biosilicato foram misturadas em água destilada e deionizada em concentração de 10% imediatamente antes de sua aplicação. Para isso, 0,15 mg de Biosilicato foram adicionadas a 1,35 mL de água destilada e deionizada em tubos de 1,5 mL (Microtubos Eppendorf Brasil, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 6).

Figura 6 - Preparo do Biosilicato para aplicação.



Após um minuto da mistura, a suspensão de Biosilicato foi aplicada sobre a superfície da cavidade dental utilizando microbrush e aguardou-se 1 minuto (Figura 7). Em seguida, um leve jato de ar foi aplicado para remoção do excesso de umidade.

Figura 7 - Aplicação do Biosilicato nos dentes.



3.2.1.2.3. Suspensão de própolis

Ambos extratos de própolis são insolúveis. Dessa forma, em um deles, com menor teor de polifenóis, foi adicionado um tensoativo (óleo de rícino etoxilado) na forma de excipiente para que pudesse aumentar a interação com os tecidos dentinário e conjuntivo.

Independente do teor de polifenóis, as suspensões de extrato de própolis foram aplicadas da mesma maneira. Utilizando uma pipeta, 100 µl de extrato de própolis a 10% (Apisflora, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) foram aplicados no interior da cavidade, foi aguardado 1 minuto; e em seguida, a cavidade foi lavada por 15 segundos (Figura 8). O excesso de água foi removido por papel absorvente.

Figura 8 - Aplicação da própolis nos dentes.



Nos grupos em que foi testada a associação de CHX/própolis e biovidro, o protocolo utilizado foi a aplicação do *primer* seguido da aplicação do Biosilicato, como descrito anteriormente.

3.2.1.2.4. Sistema adesivo

Após o tratamento da dentina, o sistema adesivo foi aplicado na cavidade com pincel microbrush de forma simplificada, ou seja, como adesivo *self-etch*, conforme a recomendação do fabricante (Figura 9). Para isso, uma gota do adesivo foi dispensada e foi aplicada de forma ativa na superfície da dentina, esfregando por 30 segundos, e fotoativado por 10 segundos (FLASHlite 1401, Discus Dental, Culver City, CA, EUA, 460-480 nm, 1.100 mW/cm²).

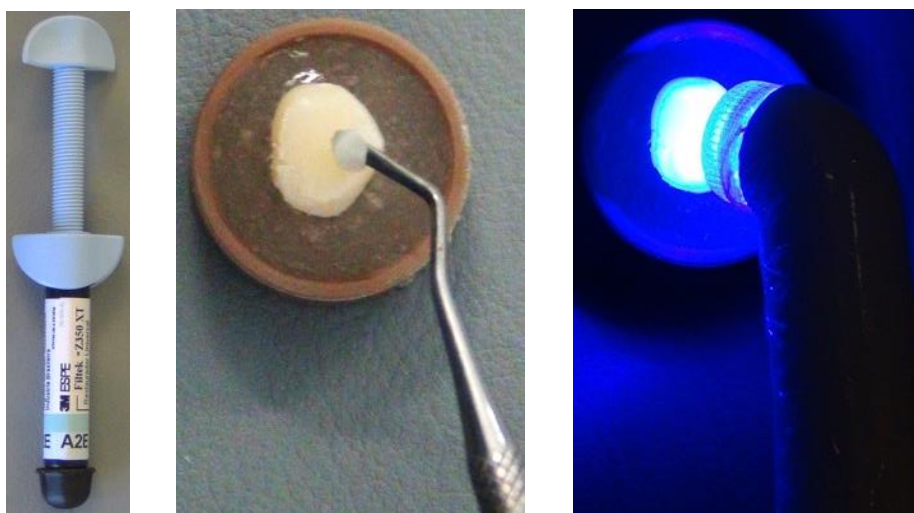
Figura 9 - Aplicação do sistema adesivo nos dentes.



3.2.1.3. Restauração com compósito

Em seguida, os dentes foram restaurados com compósito (Filtek Z350, 3M ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA), segundo a técnica incremental, e polimerizados por aparelho tipo LED (FLASHlite 1401, Discus Dental), por 20 segundos, segundo recomendações do fabricante (Figura 10).

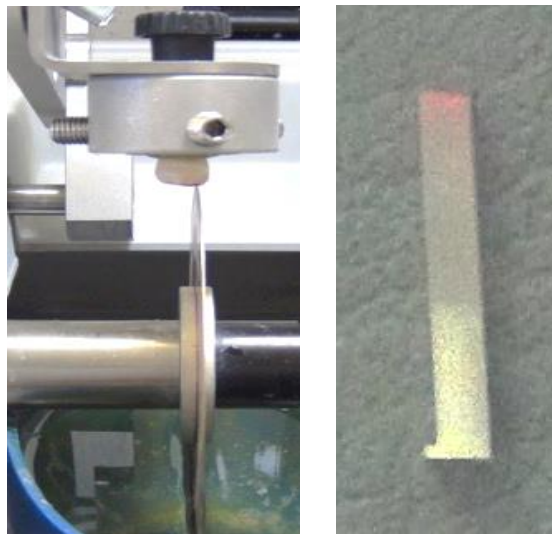
Figura 10 - Restauração dos dentes com compósito.



3.2.1.4. Corte das amostras e teste de microtração

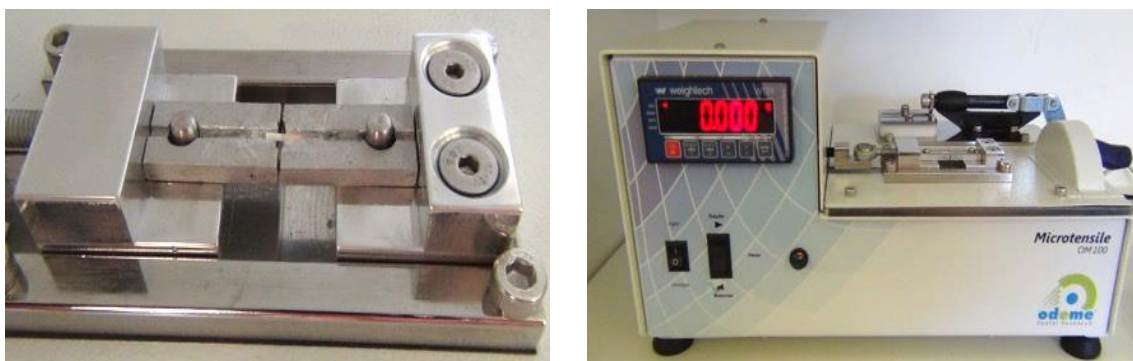
Ato contínuo, as amostras foram seccionadas verticalmente em série (Buehler, Lake Buff, IL, EUA), em formato de palito ($0,9 \text{ mm}^2$), de acordo com a técnica de teste de microtração “*non-trimming*” (Figura 11). (70) Cada palito foi cuidadosamente examinado por inspeção visual. Os palitos selecionados para testes pertenciam ao centro da cavidade e foram divididos e armazenados segundo o tempo de envelhecimento para o teste: Após 24 horas, 6 meses e 1 ano.

Figura 11 - Corte das amostras em formato de palito.



Após os períodos de armazenamento, cada palito foi posicionado no dispositivo específico para microtração, fixado com adesivo a base de cianoacrilato (Super Bonder, Henkel Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e submetidos ao ensaio de microtração (OM 100, Odeme, Luzerna, Santa Catarina, Brasil) com velocidade de deslocamento de 0,5 mm/min até a fratura (Figura 12).

Figura 12 - Ensaio de microtração das amostras.



Os valores da resistência de união foram calculados de acordo com a fórmula $R = (F/A)/10$, onde ‘R’ é a resistência (MPa), ‘F’ é a carga exigida para a ruptura do corpo-de-prova (kgf) e ‘A’ é a área da interface do corpo-de-prova (mm²) e expressos em MPa. Para

cada grupo foi obtida uma média dos valores de microtração (mTBS) pela somatória dos valores de microtração e divisão pelo número de palitos testados. A área da secção transversal, no local da fratura foi medida com paquímetro digital (Absolute Digimatic®, Mitutoyo, Tóquio, Japão).

3.2.1.5. Análise estatística

Os valores de Resistência de união foram analisados quanto a normalidade e homocedasticidade da amostra utilizando o teste de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0.05$) e submetidos ao teste estatístico ANOVA de dois fatores (Fatores de variação: Substrato – hígido ou cariado – e tipo de tratamento da dentina), teste de Bonferroni, $p < .05$. Quando o tempo foi analisado (Após 24 horas, 6 meses ou 1 ano), foi considerado para cada substrato isoladamente.

3.2.2. Análise dos padrões de fratura

As amostras fraturadas foram observadas em microscópio óptico (VH-M100 Keyence Brasil, São Paulo, SP, Brasil) para realização da análise do padrão de fratura (Coesiva, adesiva ou mista).

3.2.3. Morfologia da fratura - Microscopia eletrônica de varredura

Análises complementares demonstrativas de cada tipo de padrão de fratura encontrado para os diferentes grupos, foram analisados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV, EVO MA10, ZEISS) a fim de caracterizar a interface.

Para isso, os palitos fraturados foram armazenados em água deionizada por um período não superior a 24 horas, secos com papel absorvente e fixados em stubs de alumínio com auxílio de fita dupla face de carbono (Electron Microscopy Sciences, Washington, EUA) (Figura 13).

Em seguida, todos os espécimes receberam cobertura de ouro-paládio (Bal-Tec, modelo SCD 050 sputter coater, Balzers, Liechtenstein) (Figura 14) para serem observados em microscópio eletrônico de varredura em aumentos de 1000x, 2000x e 5000x, a uma aceleração de voltagem de 20 kV, WD = 30 mm e spotsize 28 mm.

Figura 13 - Palitos fixados para serem metalizados em seguida, para análise em MEV.



Figura 14 - Palitos sendo metalizados para serem analisados em MEV.



3.2.4. Análise da interface adesiva - Microscopia eletrônica de transmissão

Para análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET, JEM-1010, JEOL, Tokio, Japão), foram selecionados dois dentes para cada grupo ($n = 2$) e restaurados conforme descrito anteriormente. Após restauração, foram cortados (Buehler, Lake Buff, IL, EUA) em secções de 2 x 2 mm a 1 mm da interface adesiva. Os espécimes foram fixados (Karnovsky, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) (Figura 15) e posteriormente, embebidos em resina epóxica (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) em reservatórios apropriados (Figura 16). Ato contínuo, foram obtidas fatias nanométricas, de aproximadamente 90 nm, com o auxílio de faca de diamante acoplada em micrótomo (MT-2C, RMC, Florida, EUA) e analisadas nos mesmos períodos testados para a RU.

Figura 15 - Fixação das amostras para serem incluídas em resina epóxi, a fim de serem analisadas em MET.



Figura 16 - Amostras incluídas em resina epóxi a fim de serem analisadas em MET.



4. Resultados

4.1. RESISTÊNCIA DE UNIÃO À MICROTRAÇÃO

As medianas e erro padrão (EP) da resistência de união (MPa) para cada grupo são apresentados nas Tabelas 3 a 7.

Tabela 3 - Mediana e erro padrão da média (EP) da resistência de união (MPa) para os grupos testados após 24 horas (ANOVA de dois fatores, teste de Bonferroni, $p < .05$).

Tratamentos	Hígidos	Cariados
Controle	14.47 (2.13) aA	3.72 (0.43) bA
CHX	17.43 (1.91) aA	5.29 (1.22) bAB
Bio	16.07 (2.07) aA	4.78 (0.69) bAB
P16	16.05 (1.91) aA	6.86 (0.79) aAB
P45	13.20 (3.51) aA	7.36 (1.17) bAB
CHX Bio	17.96 (3.22) aA	7.62 (1.61) aB
P16 Bio	14.01 (1.41) aA	8.04 (1.69) aB
P45 Bio	13.60 (1.78) aA	8.66 (1.45) aB

Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($p < .05$).

Tabela 4 - Mediana e erro padrão da média (EP) da resistência de união (MPa) para os grupos testados após 6 meses (ANOVA de dois fatores, teste de Bonferroni, $p < .05$).

Tratamentos	Hígidos	Cariados
Controle	14.95 (1.62) aAB	10.13 (1.77) aA
CHX	12.48 (1.48) aAB	3.98 (1.65) bA
Bio	10.96 (1.31) aA	5.44 (0.95) aA
P16	20.77 (1.98) aB	1.81 (1.85) bA
P45	15.47 (2.01) aAB	6.41 (0.79) aA
CHX Bio	12.98 (1.54) aAB	9.23 (2.90) bA
P16 Bio	14.56 (1.41) aAB	2.65 (1.26) bA
P45 Bio	14.20 (1.95) aAB	3.20 (0.87) bA

Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($p < .05$).

Tabela 5 - Mediana e erro padrão da média (EP) da resistência de união (MPa) para os grupos testados após 1 ano (ANOVA de dois fatores, teste de Bonferroni, $p < .05$).

Tratamentos	Hígidos	Cariados
Controle	15.68 (1.55) aA	4.69 (1.13) bA
CHX	15.12 (1.54) aA	3.42 (0.46) bA
Bio	14.35 (1.75) aA	4.90 (0.68) bA
P16	13.92 (2.56) aA	3.47 (0.98) bA
P45	16.88 (1.78) aA	8.10 (1.71) bA
CHX Bio	13.73 (1.91) aA	3.10 (0.86) bA
P16 Bio	15 (1.90) aA	6.24 (1.12) bA
P45 Bio	15.06 (2.67) aA	3.95 (0.76) bA

Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($p < .05$).

Tabela 6 - Mediana e erro padrão da média (EP) da resistência de união (MPa) para os grupos hígidos testados após 24 horas, 6 meses e 1 ano (ANOVA de dois fatores, teste de Bonferroni, $p < .05$).

Tratamentos	24 horas	6 meses	1 ano
Controle	14.47 (2.13) aA	14.95 (1.62) aA	15.68 (1.55) aA
CHX	17.43 (1.91) aA	12.48 (1.48) aAB	15.12 (1.54) aA
Bio	16.07 (2.07) aA	10.96 (1.31) aAB	14.35 (1.75) aA
P16	16.05 (1.91) aA	20.77 (1.98) aB	13.92 (2.56) aA
P45	13.20 (3.51) aA	15.47 (2.01) aAB	16.88 (1.78) aA
CHX Bio	17.96 (3.22) aA	12.98 (1.54) aAB	13.73 (1.91) aA
P16 Bio	14.01 (1.41) aA	14.56 (1.41) aAB	15 (1.90) aA
P45 Bio	13.60 (1.78) aA	14.20 (1.95) aAB	15.06 (2.67) aA

Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($p < .05$).

Tabela 7 - Mediana e erro padrão da média (EP) da resistência de união (MPa) para os grupos cariados testados após 24 horas, 6 meses e 1 ano (ANOVA de dois fatores, teste de Bonferroni, $p < .05$).

Tratamentos	24 horas	6 meses	1 ano
Controle	3.72 (0.43) aA	10.13 (1.77) aA	4.69 (1.13) aAB
CHX	5.29 (1.22) aA	3.98 (1.65) aAB	3.42 (0.46) aAB
Bio	4.78 (0.69) aA	5.44 (0.95) aAB	4.90 (0.68) aAB
P16	6.86 (0.79) aA	1.81 (1.85) aAB	3.47 (0.98) aAB
P45	7.36 (1.17) aA	6.41 (0.79) aAB	8.10 (1.71) aA
CHX Bio	7.62 (1.61) aA	9.23 (2.90) abAB	3.10 (0.86) bB
P16 Bio	8.04 (1.69) aA	2.65 (1.26) aAB	6.24 (1.12) aAB
P45 Bio	8.66 (1.45) aA	3.20 (0.87) bB	3.95 (0.76) bAB

Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($p < .05$).

Os resultados demonstraram que entre as amostras testadas após 24 horas, o substrato foi significativo ($p < .05$), com maior resistência de união na dentina hígida quando não foi tratada (Controle) e quando foram empregados os tratamentos CHX, Bio e P45 (Tabela 3). Entre os dentes hígidos testados após 24 horas não houve diferença significativa ($p > .05$) independente do tratamento executado; enquanto que nos cariados, os grupos onde houve associação de tratamentos (CHX Bio, P16 Bio e P45 Bio) resultaram em maior resistência de união, sendo significativa ($p < .05$) quando comparado com o grupo Controle, sem diferença entre si ($p > .05$) (Tabela 3).

Ao contrário das amostras testadas após 24 horas, após 6 meses de envelhecimento o substrato hígido apresentou maior resistência de união ($p < .05$) em comparação com o cariado para todos os grupos, exceto para os grupos Controle, Bio e P45, em que não houve diferença significativa ($p > .05$) (Tabela 4). Entre os dentes hígidos testados após 6 meses, o grupo P16 mostrou a maior resistência de união, sendo significativa ($p < .05$) quando comparado com o grupo Bio. Porém, entre os dentes cariados não houve diferença ($p > .05$) (Tabela 4).

Entre as amostras testadas após 1 ano de envelhecimento, o substrato foi significativo ($p < .05$) para o tratamento de superfície em todos os casos, sendo a resistência de união maior na dentina hígida. Contudo, entre os tratamentos não houve diferença ($p > .05$) para nenhum dos substratos (Tabela 5).

Quando comparado o tempo de envelhecimento nos substratos hígidos, este não foi significativo ($p > .05$) na resistência de união, independentemente do tempo de envelhecimento testado. No entanto, entre os dentes hígidos testados após 6 meses, o grupo P16 exibiu a maior resistência de união, sendo significativa ($p < .05$) quando comparado com o grupo Controle (Tabela 6).

Por outro lado, o tempo de envelhecimento nos dentes cariados foi significativo para o grupo CHX Bio. Dentes testados após 24 horas apresentaram maior resistência de união ($p < .05$) que aqueles envelhecidos por 1 ano. Do mesmo modo, o grupo P45 Bio exibiu maior resistência de união ($p < .05$) quando foi testado após 24 horas, resultado diferente dos envelhecidos por 6 meses e 1 ano ($p < .05$), que não apresentaram diferença entre si ($p > .05$) (Tabela 7). Entre os dentes cariados testados após 6 meses, o grupo Controle obteve a maior resistência de união, sendo significativa ($p < .05$) quando comparado com o grupo P45 Bio. Assim mesmo, entre as amostras cariadas testadas após 1 ano, o grupo P45 mostrou a maior resistência de união, sendo significativa ($p < .05$) quando comparado com o grupo CHX Bio (Tabela 7).

4.2. ANÁLISE DOS PADRÕES DE FRATURA

A distribuição dos padrões de fratura dos diferentes grupos propostos, pode ser observada nos Gráficos 1 a 3.

Gráfico 1 - Distribuição (%) dos padrões de fratura para os grupos testados após 24 horas.

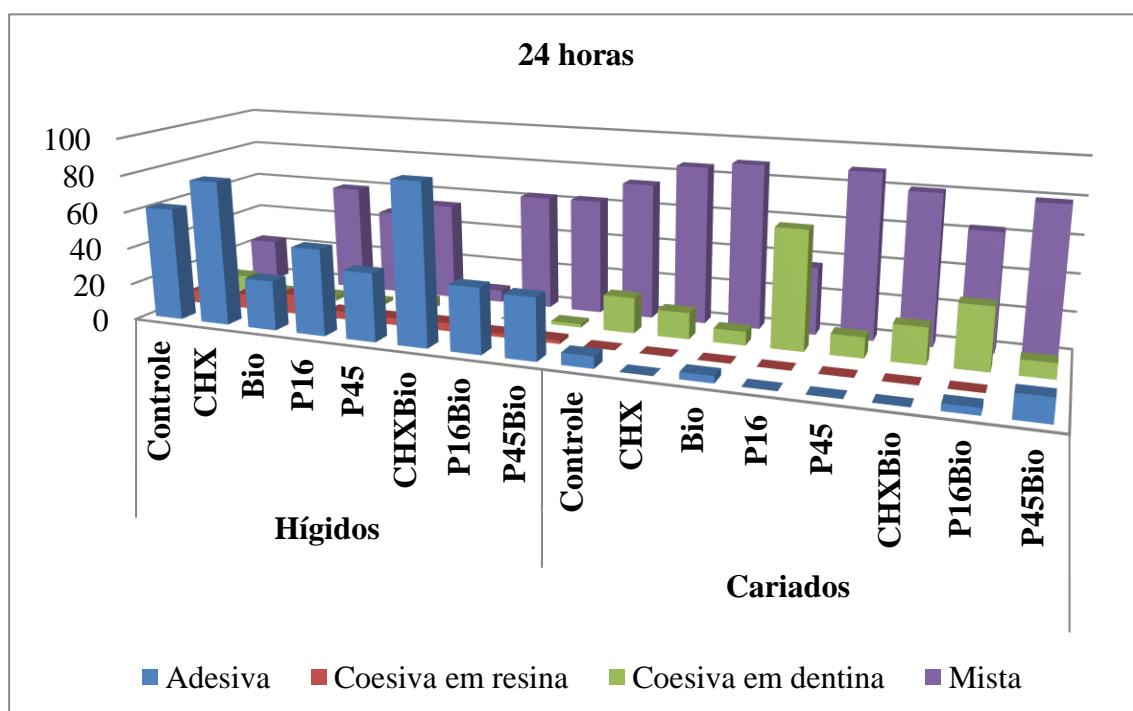


Gráfico 2 – Distribuição (%) dos padrões de fratura para os grupos testados após 6 meses.

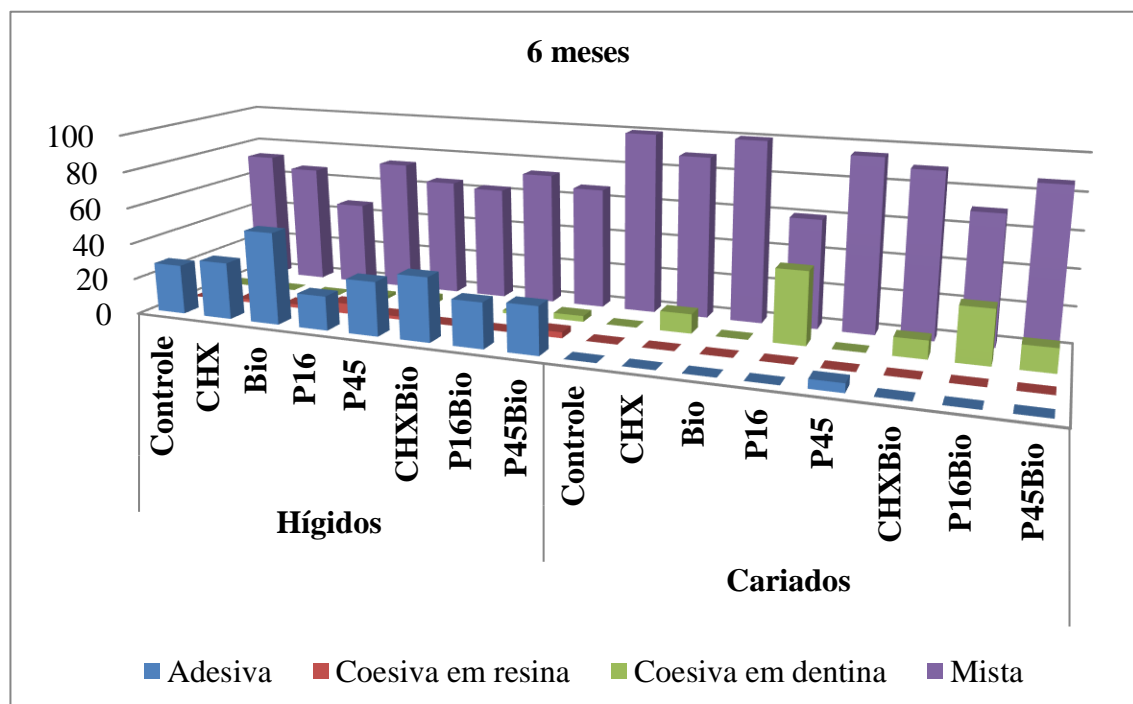
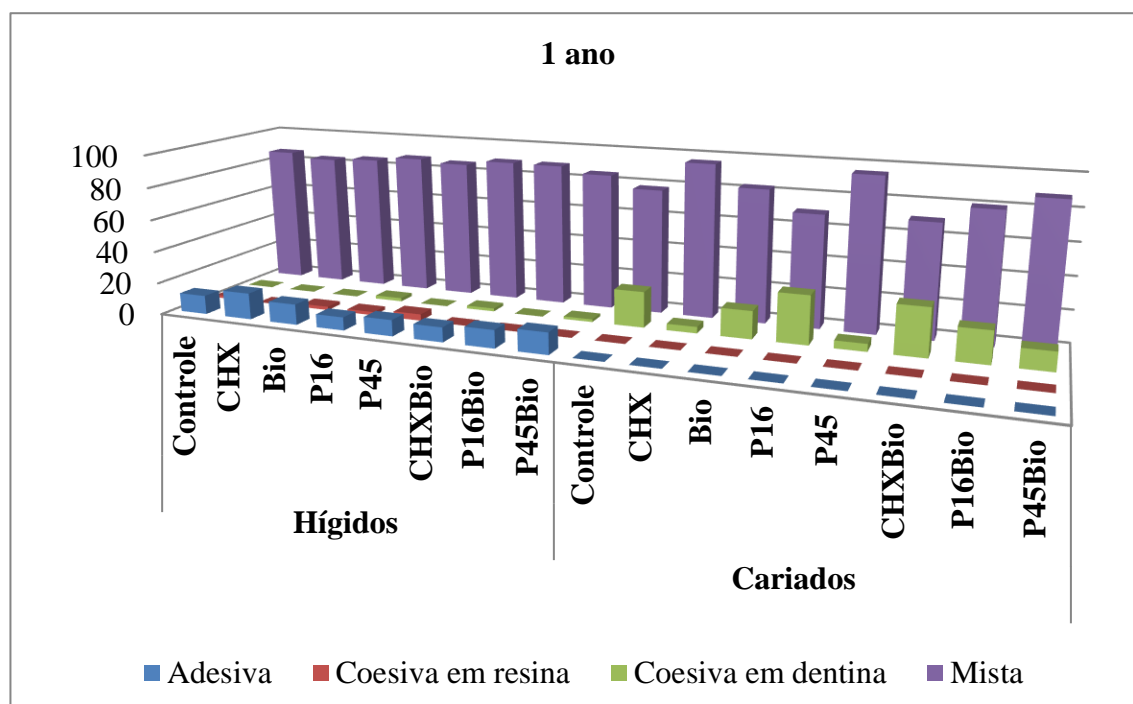


Gráfico 3 – Distribuição (%) dos padrões de fratura para os grupos testados após 1 ano.

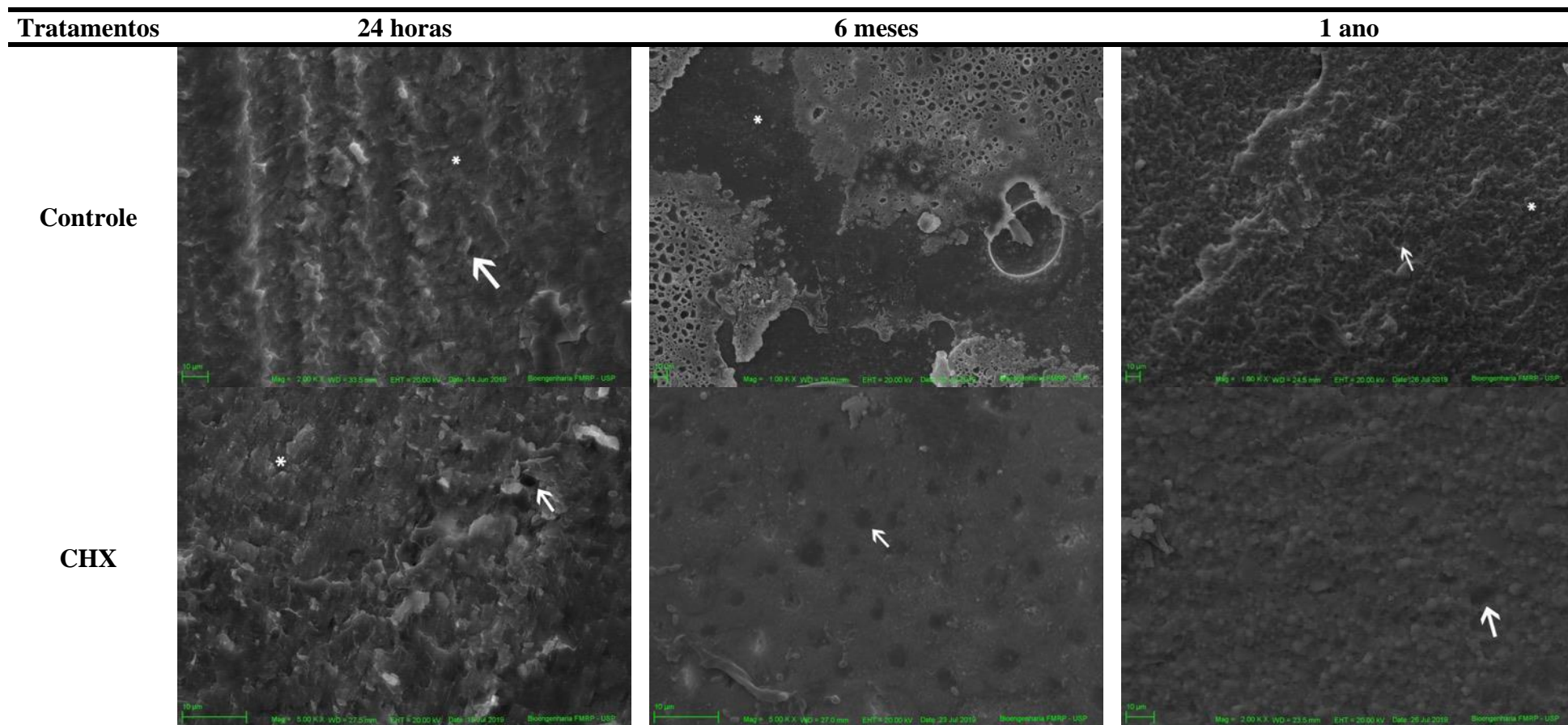


Independentemente do tempo de envelhecimento, a dentina hígida apresentou maior prevalência de fraturas adesivas e mistas, enquanto a dentina cariada mostrou mais fraturas não adesivas (Gráficos 1-3). As amostras hígidas testadas após 24 horas exibiram maior incidência de fraturas não adesivas quando o Própolis e/ou o Biosilicato foi utilizado como tratamento de superfície (Gráfico 1). Por outro lado, independente do substrato, depois do envelhecimento as fraturas não adesivas aumentaram para todos os grupos (Gráficos 1-3), aumentando ainda mais após 1 ano (Gráfico 3).

4.3. MORFOLOGIA DA FRATURA - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

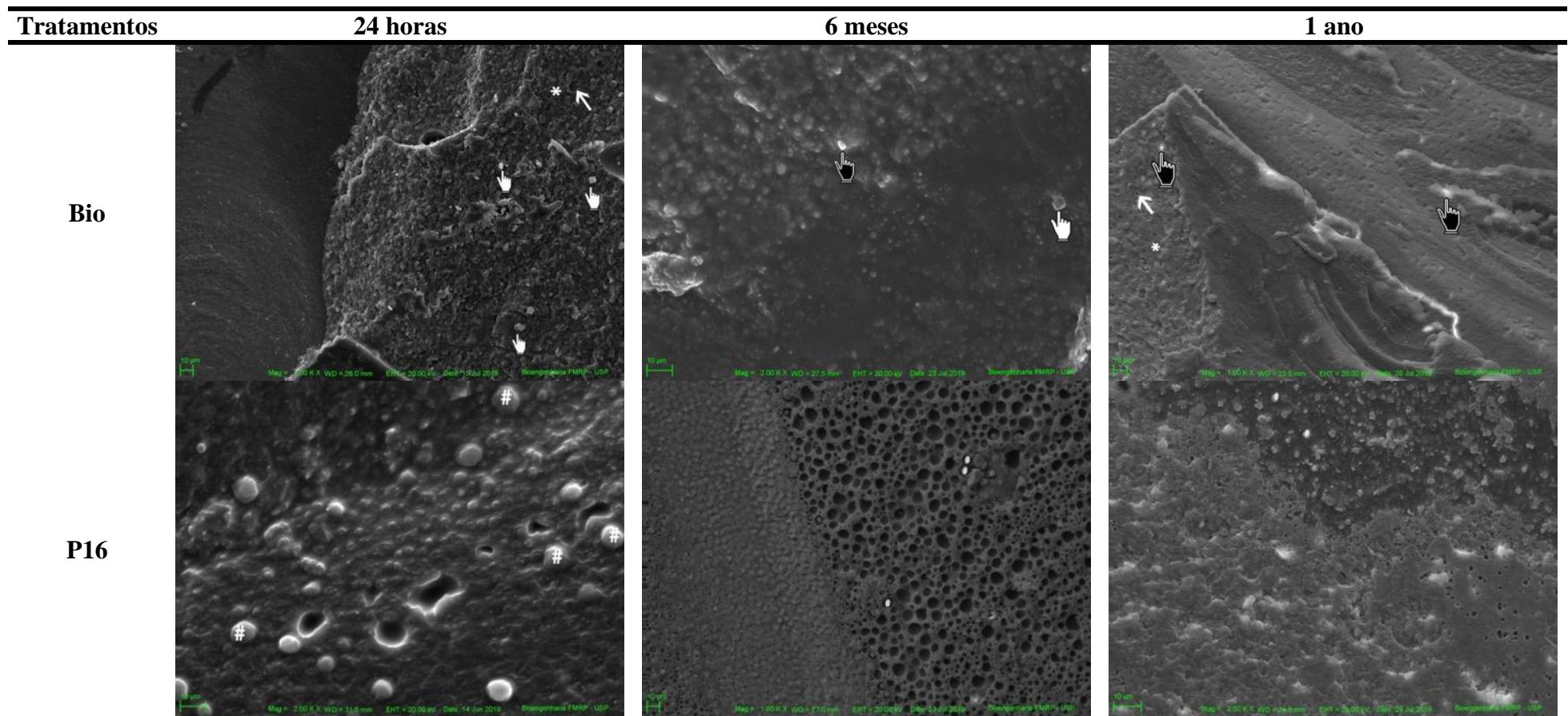
As fotomicrografias (MEV) da interface adesiva para todos os grupos testados podem ser encontradas nos Quadros 1 e 2, ilustrando as características mais representativas.

Quadro 1 (Continua) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MEV para os grupos hígidos.



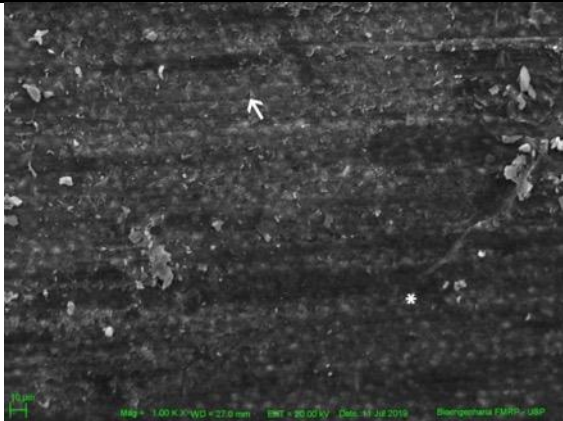
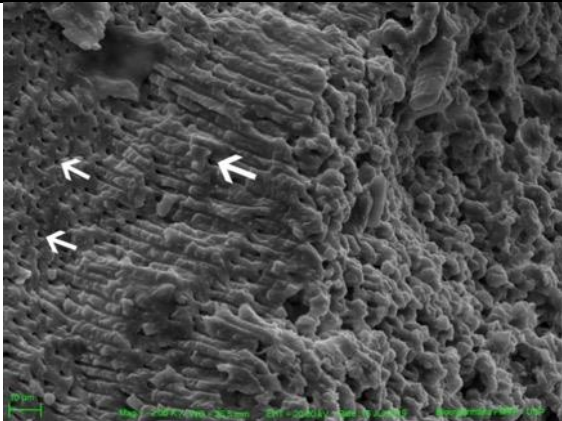
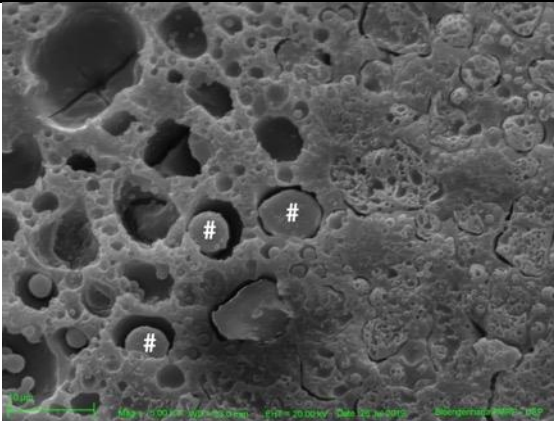
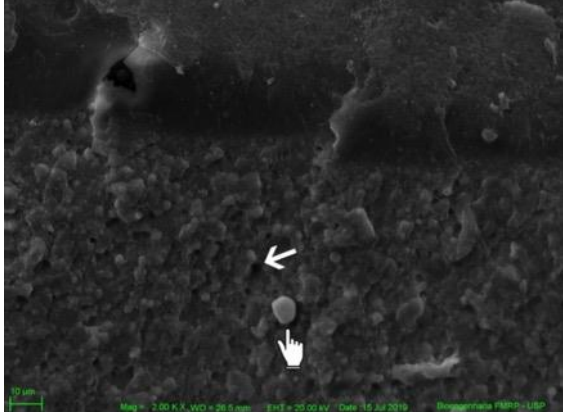
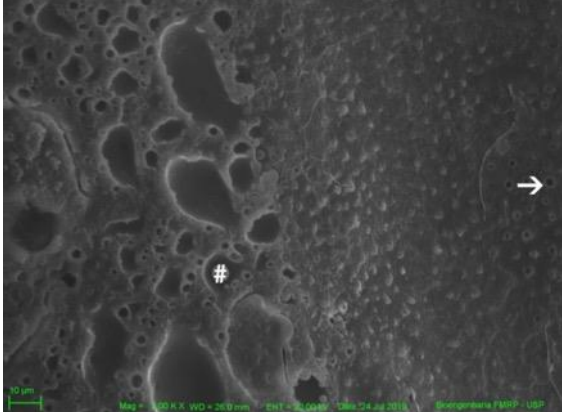

Asterisco = *Smear layer*; Seta branca = Túbulo dentinário aberto.

Quadro 1 (Continuação) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MEV para os grupos hígidos.



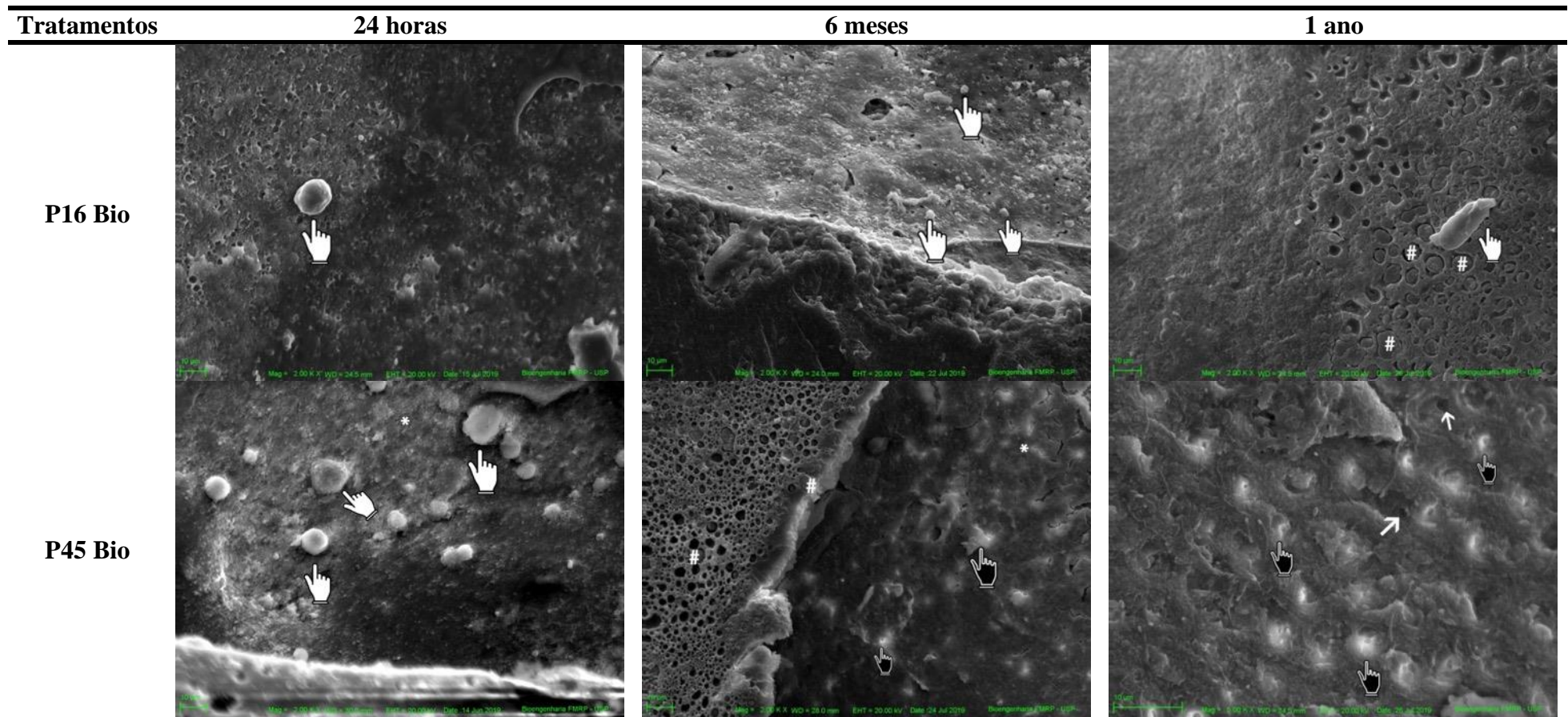
Asterisco = *Smear layer*; Seta branca = Túbulo dentinário aberto; Mão branca = Partícula de Biosilicato; Mão preta = Ponto de remineralização; Sustenido = *Tags* de resina.

Quadro 1 (Continuação) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MEV para os grupos hígidos.

Tratamentos	24 horas	6 meses	1 ano
P45			
CHX Bio			

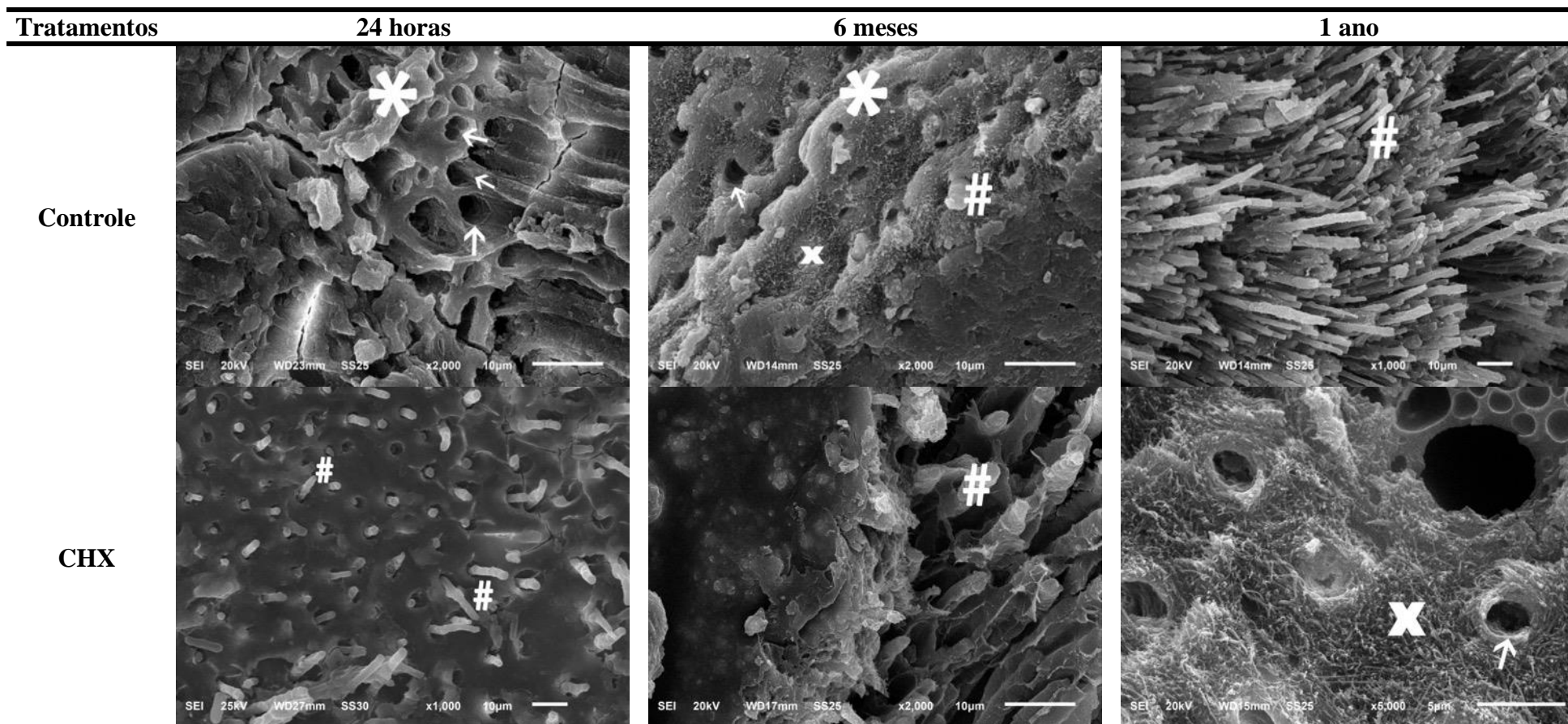
Asterisco = *Smear layer*; Seta branca = Túbulo dentinário aberto; Mão branca = Partícula de Biosilicato; Sustenido = *Tags* de resina.

Quadro 1 (Conclusão) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MEV para os grupos hígidos.



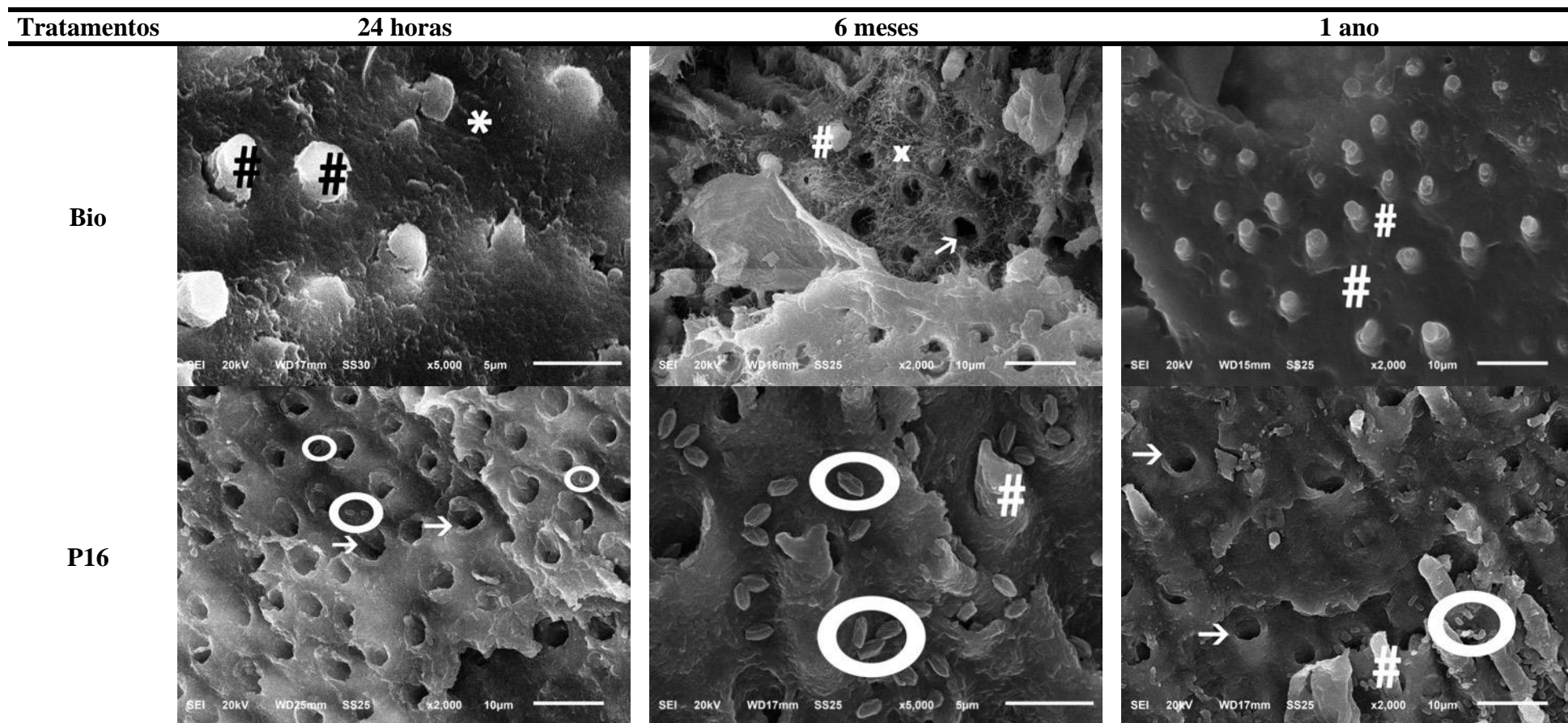
Asterisco = *Smear layer*; Seta branca = Túbulo dentinário aberto; Mão branca = Partícula de Biosilicato; Mão preta = Ponto de remineralização; Sustenido = *Tags* de resina.

Quadro 2 (Continua) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MEV para os grupos cariadados.



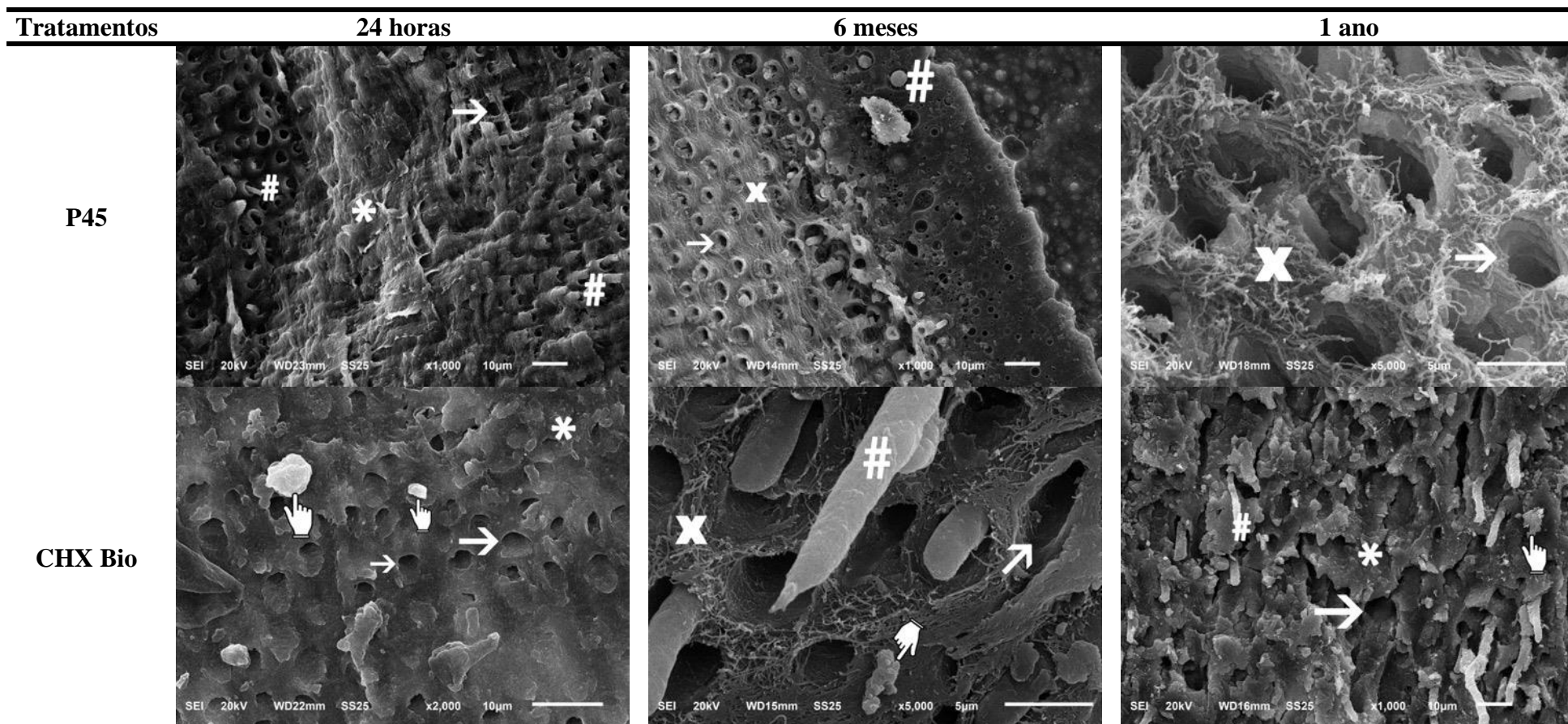
Asterisco = *Smear layer*; Seta branca = Túbulo dentinário aberto; Letra X = Fibrilas colágenas desprotegidas e desorganizadas; Sustenido = *Tags* de resina.

Quadro 2 (Continuação) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MEV para os grupos cariadados.



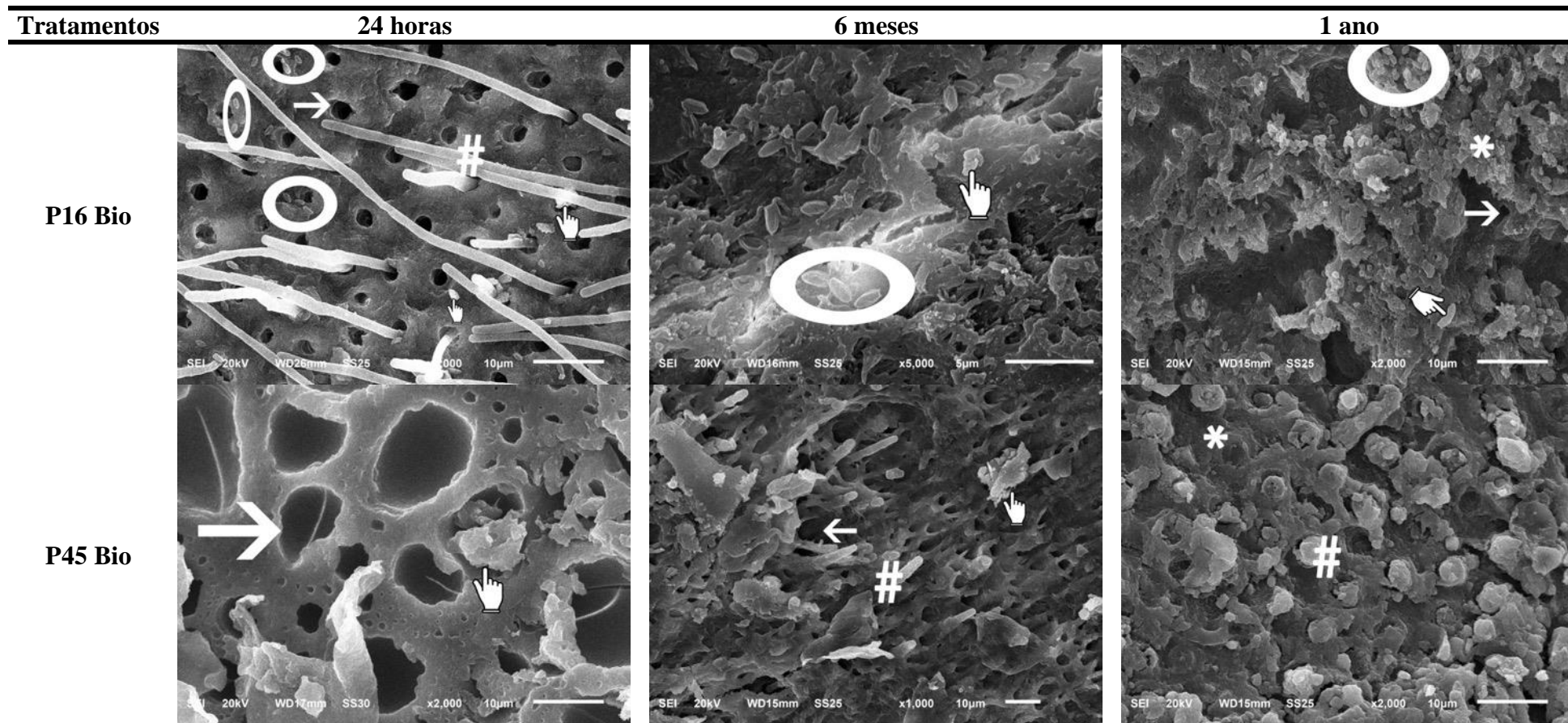
Asterisco = *Smear layer*; Seta branca = Túbulo dentinário aberto; Letra X = Fibrilas colágenas desprotegidas e desorganizadas; Elipse = Partículas do extrato de própolis com baixo teor de polifenóis; Sustenido = *Tags* de resina.

Quadro 2 (Continuação) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MEV para os grupos cariadados.



Asterisco = *Smear layer*; Seta branca = Túbulo dentinário aberto; Letra X = Fibrilas colágenas desprotegidas e desorganizadas; Mão branca = Partícula de Biosilicato; Sustenido = *Tags* de resina.

Quadro 2 (Conclusão) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MEV para os grupos cariados.



Asterisco = *Smear layer*; Seta branca = Túbulo dentinário aberto; Elipse = Partículas do extrato de própolis com baixo teor de polifenóis; Mão branca = Partícula de Biosilicato; Sustenido = *Tags* de resina.

Através da Microscopia Eletrônica de Varredura, nos substratos hígidos, percebe-se a presença de uma camada de *smear layer*, parcialmente removida, cobrindo os túbulos dentinários, quase completamente obliterados por ela e pela *smear plug* (Quadro 1). Mostra-se, assim, o padrão clássico de condicionamento obtido com sistemas *self-etch*. (68) Do mesmo modo, foram observados poucos *tags* de resina, curtos e circundados por dentina superficialmente desmineralizada apenas nos substratos que foram tratados com os extratos de própolis ou quando os tratamentos foram associados (Quadro 1 – Grupos P16 em todos os períodos de tempo, P45 após 1 ano, CHX Bio após 6 meses, P16 Bio após 1 ano e P45 Bio após 6 meses).

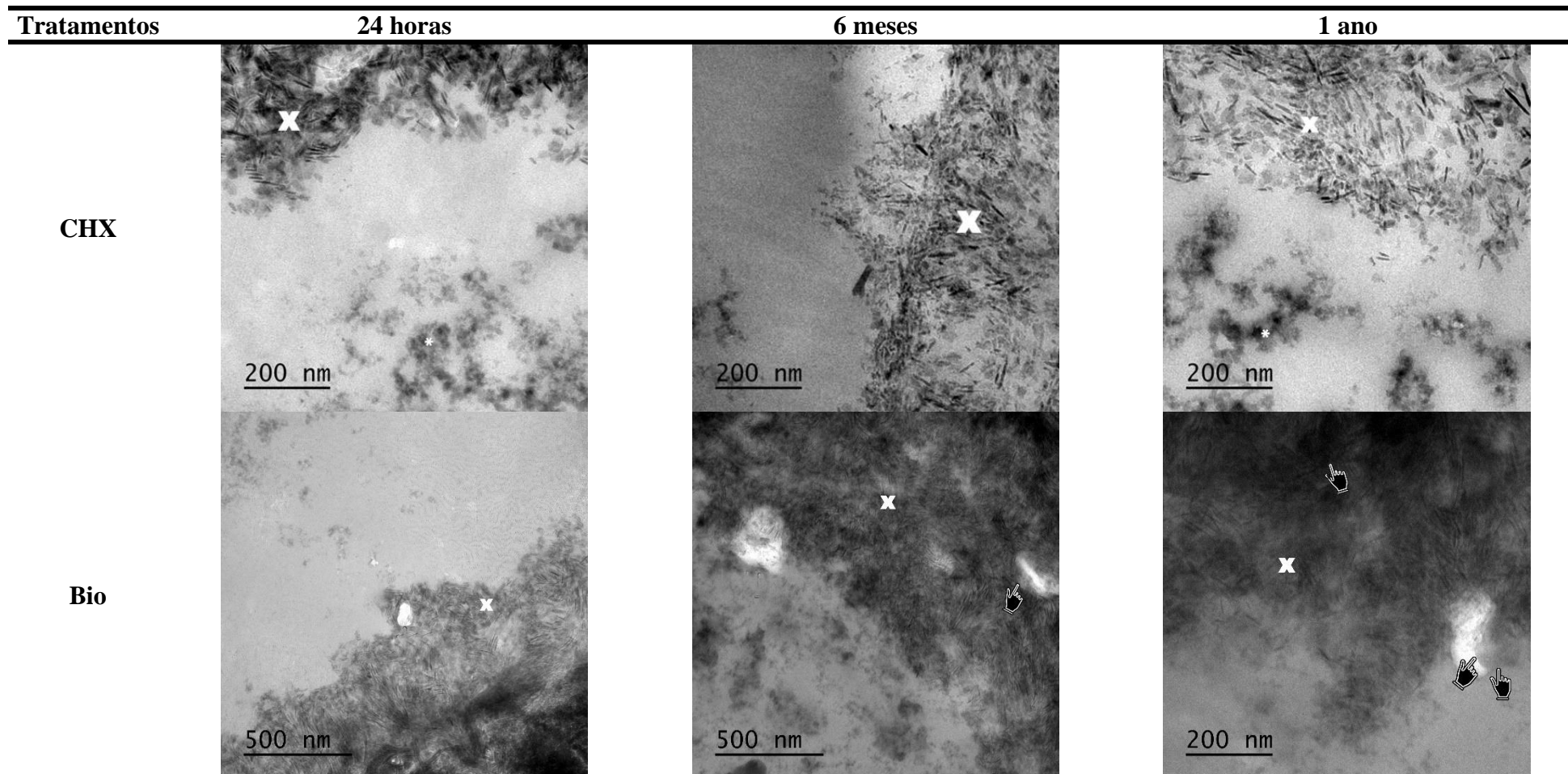
Nos dentes cariados foi possível apreciar, em todos os grupos, uma maior desmineralização da superfície dentinária, maior remoção da *smear layer* e a formação dos *tags* de resina, em maior quantidade e comprimento no interior dos túbulos dentinários (Quadro 2). Neste substrato encontraram-se também túbulos mais expostos e com maior diâmetro (Quadro 2) comparado com o observado nos substratos hígidos (Quadro 1). Assim mesmo, evidencia-se uma dentina peritubular e intertubular com fibras colágenas expostas, desprotegidas e desorganizadas pelo processo de cárie (Quadro 2).

Nos substratos hígidos e cariados tratados com Biosilicato, com e sem associação de outro tratamento, nota-se partículas de Biosilicato bem definidas, na *smear layer* (Quadro 1 e 2), algumas delas obliterando os túbulos dentinários (Quadro 2 – Grupos P16 Bio e P45 Bio testados após 24 horas). Além disso, especificamente nos substratos hígidos tratados só com Biosilicato e em associação com própolis com alto teor de polifenóis, e submetidos a envelhecimento (Quadro 1 – Grupos Bio e P45 Bio após 6 meses e 1 ano), percebe-se um aumento na radiopacidade destas partículas, sugestivo de possíveis pontos de remineralização. Por outro lado, nos dentes cariados artificialmente, nos grupos onde foi aplicada a própolis com baixo teor de polifenóis, com e sem associação, evidencia-se micropartículas provenientes do próprio extrato (Quadro 2 – Grupos P16 e P16 Bio em todos os períodos de tempo).

4.4. ANÁLISE DA INTERFACE ADESIVA - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

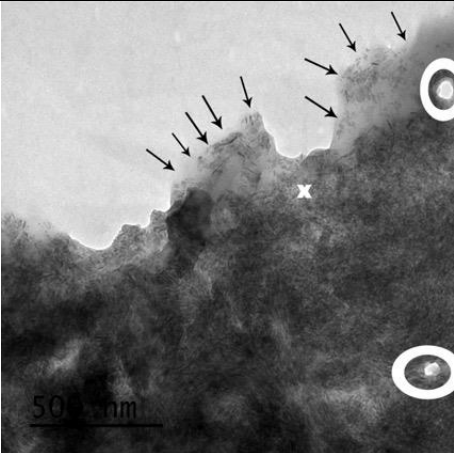
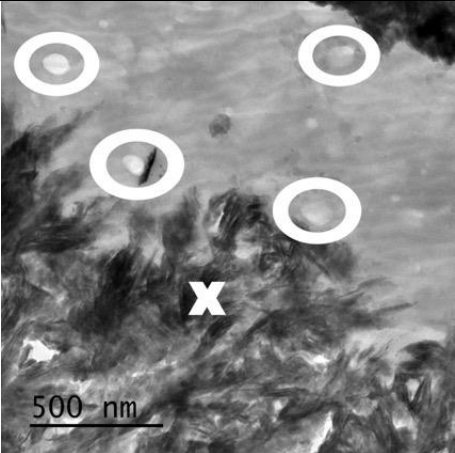
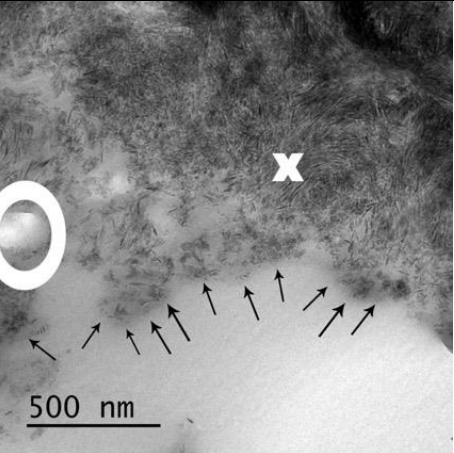
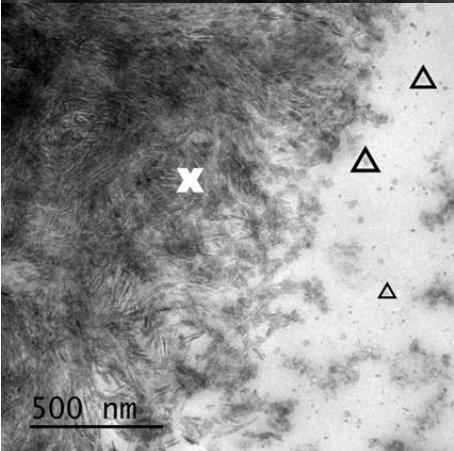
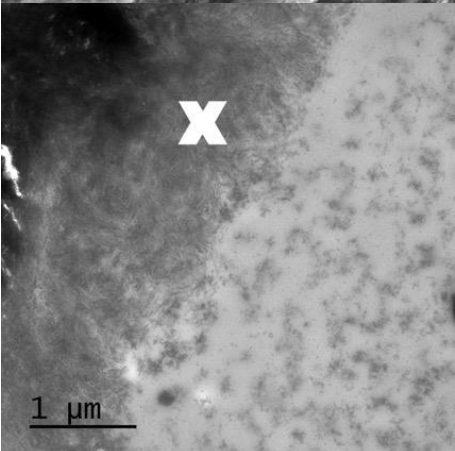
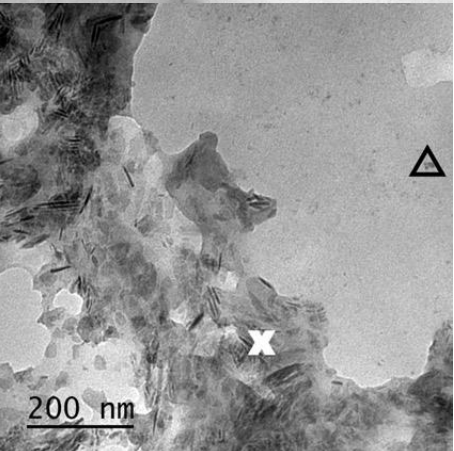
As fotomicrografias (MET) da interface adesiva para todos os grupos testados podem ser encontradas nos Quadros 3 e 4, ilustrando as características mais representativas.

Quadro 3 (Continua) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MET para os grupos hígidos.



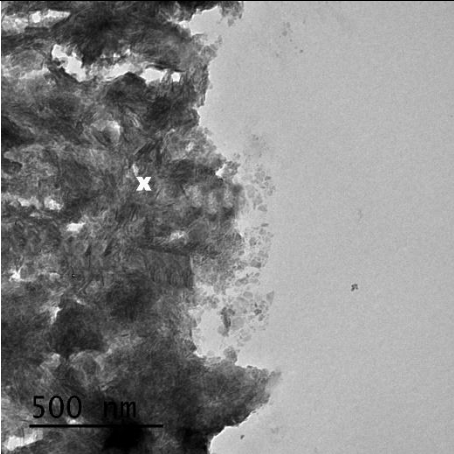
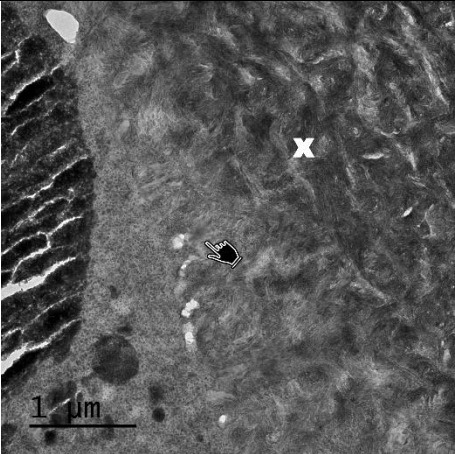
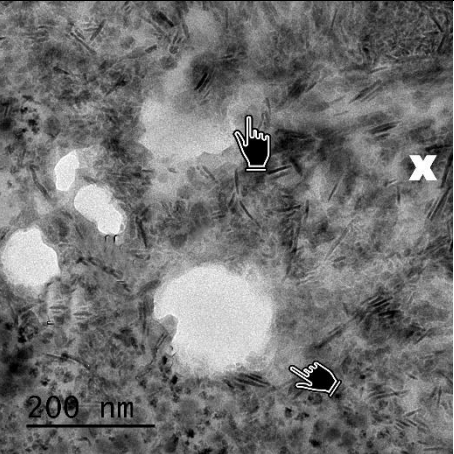
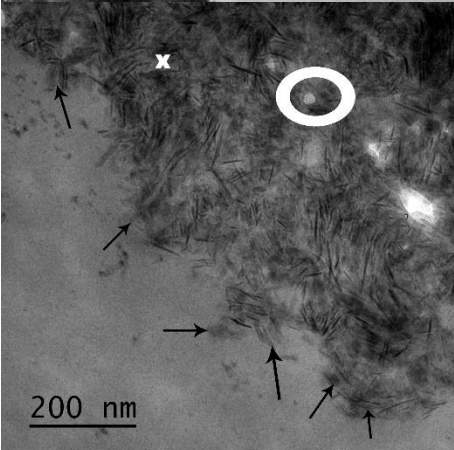
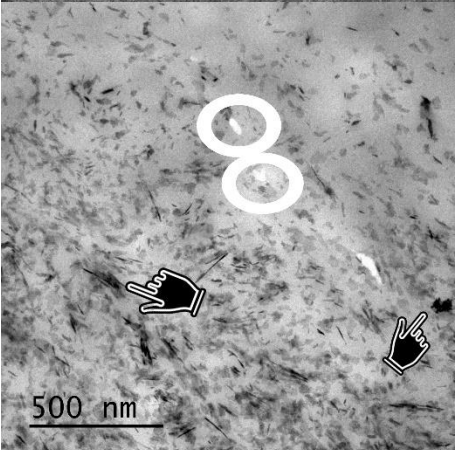
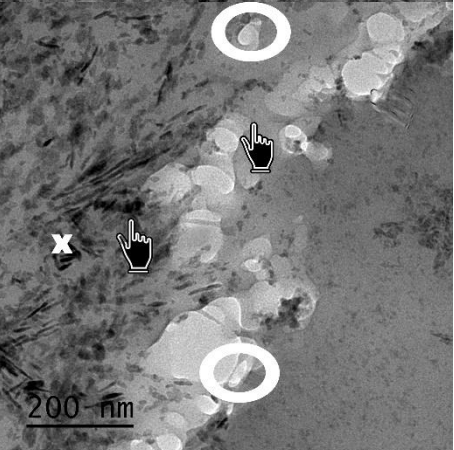
Asterisco = *Smear layer*; Letra X = Mineral da dentina; Mão preta = Ponto de remineralização.

Quadro 3 (Continuação) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MET para os grupos hígidos.

Tratamentos	24 horas	6 meses	1 ano
P16			
P45			

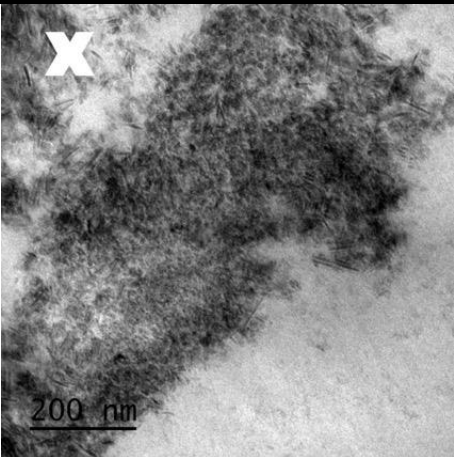
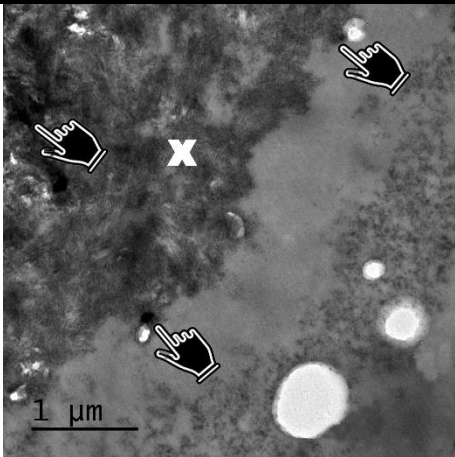
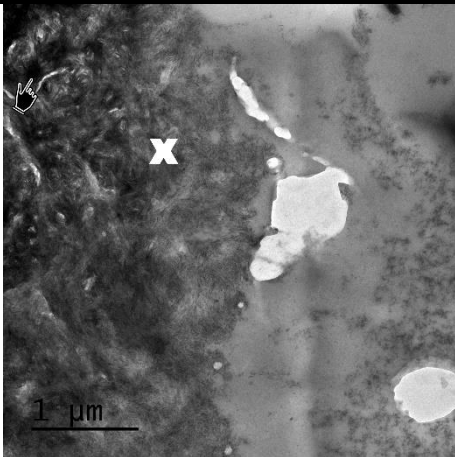
Letra X = Mineral da dentina; Elipse = Partículas do extrato de própolis com baixo teor de polifenóis; Seta preta = Imagem indicativa da ação do veículo do extrato de própolis na dentina; Triângulo = Extrato de própolis com alto teor de polifenóis.

Quadro 3 (Continuação) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MET para os grupos hígidos.

Tratamentos	24 horas	6 meses	1 ano
CHX Bio			
P16 Bio			

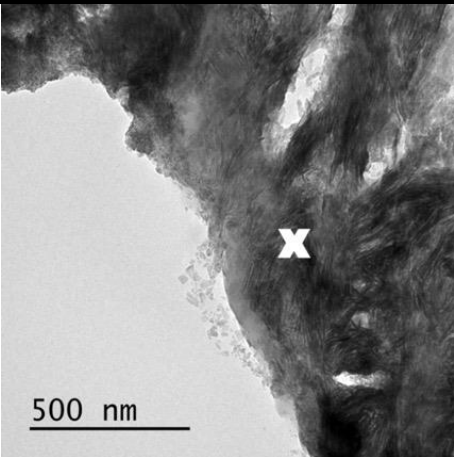
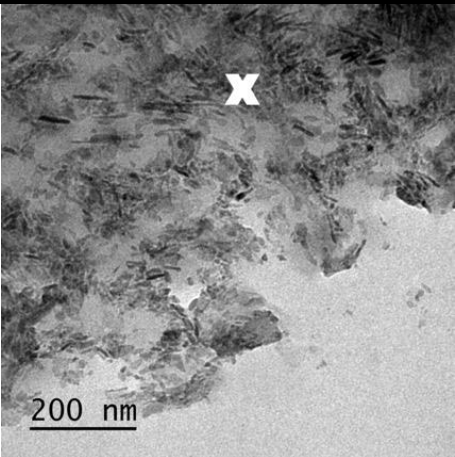
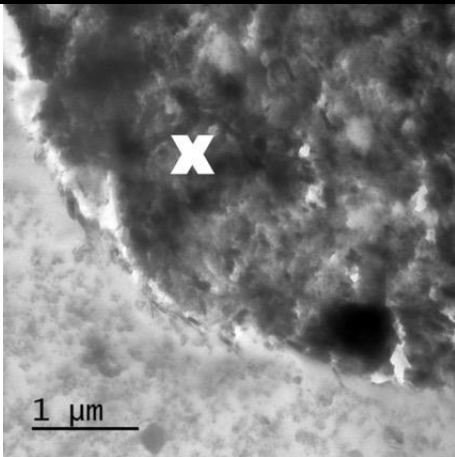
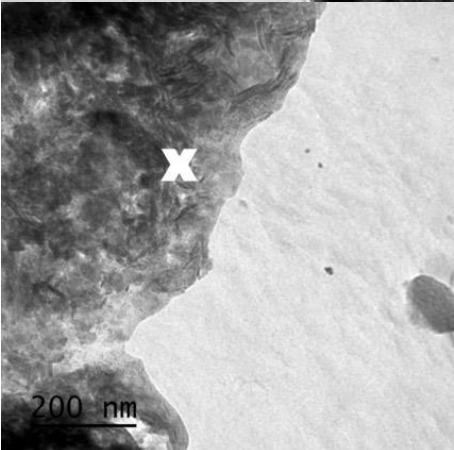
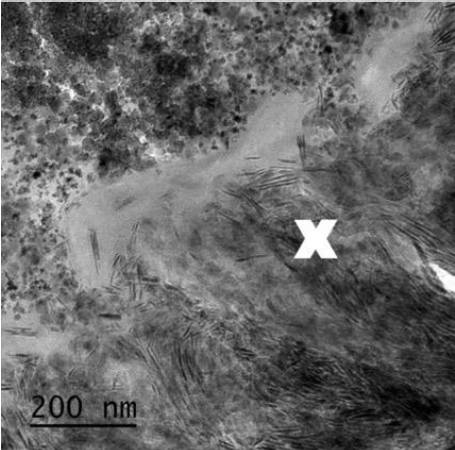
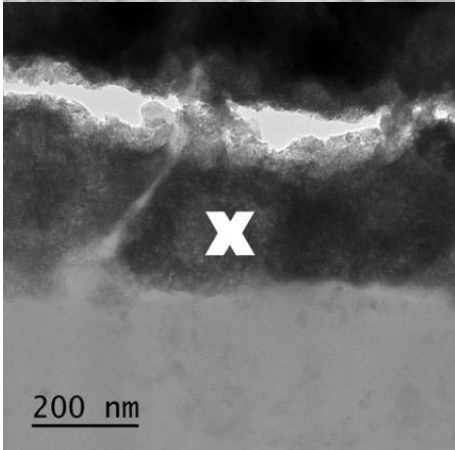
Letra X = Mineral da dentina; Mão preta = Ponto de remineralização; Elipse = Partículas do extrato de própolis com baixo teor de polifenóis; Seta preta = Imagem indicativa da ação do veículo do extrato de própolis na dentina.

Quadro 3 (Conclusão) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MET para os grupos hígidos.

Tratamentos	24 horas	6 meses	1 ano
P45 Bio			

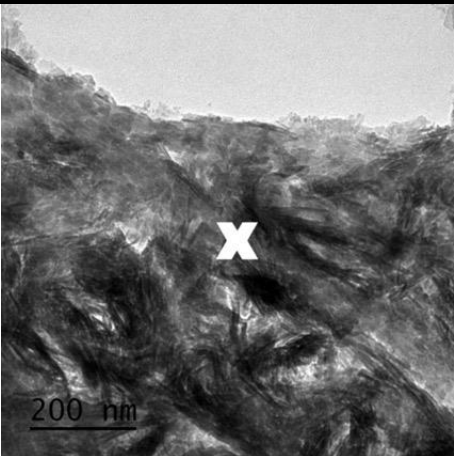
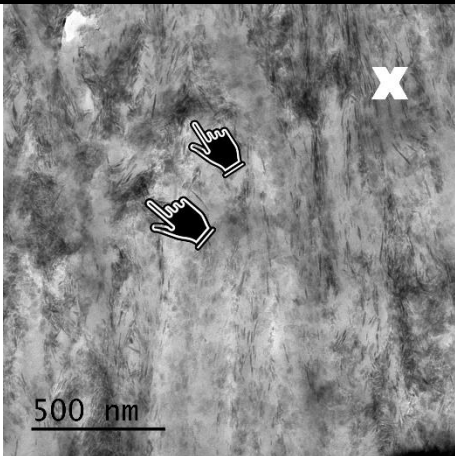
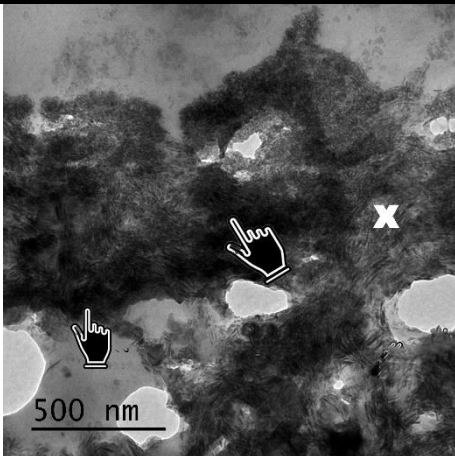
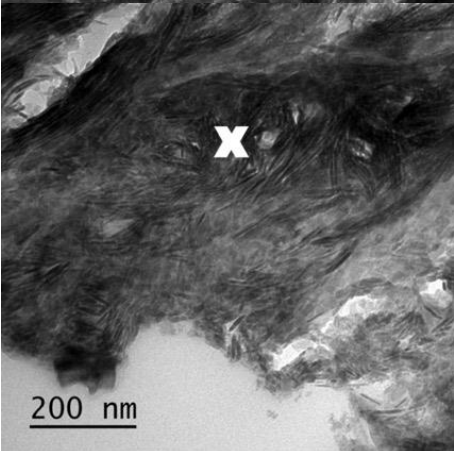
Letra X = Mineral da dentina; Mão preta = Ponto de remineralização.

Quadro 4 (Continua) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MET para os grupos cariados.

Tratamentos	24 horas	6 meses	1 ano
Controle			
CHX			

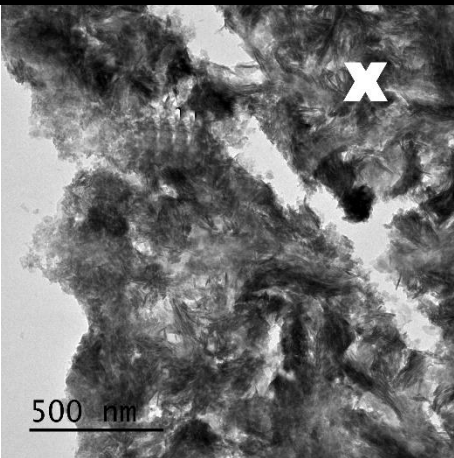
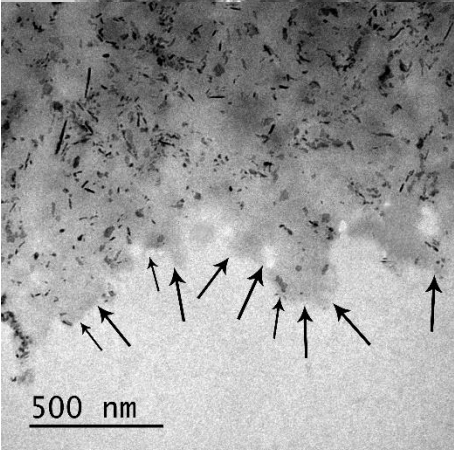
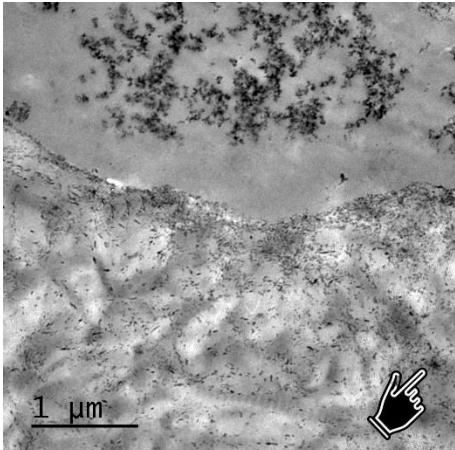
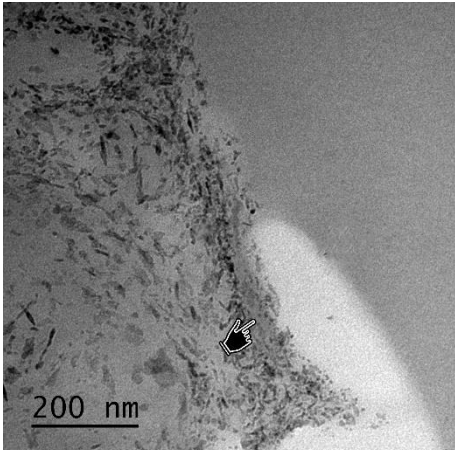
Letra X = Mineral da dentina.

Quadro 4 (Continuação) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MET para os grupos cariados.

Tratamentos	24 horas	6 meses	1 ano
Bio			
P45			

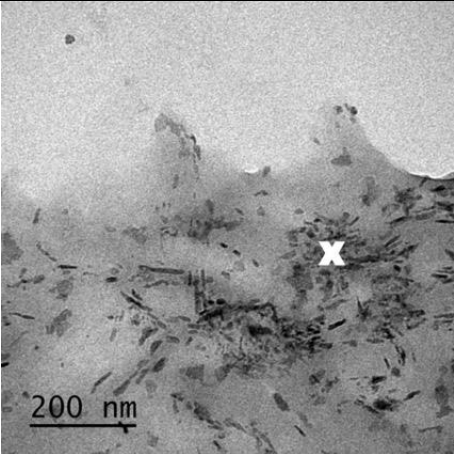
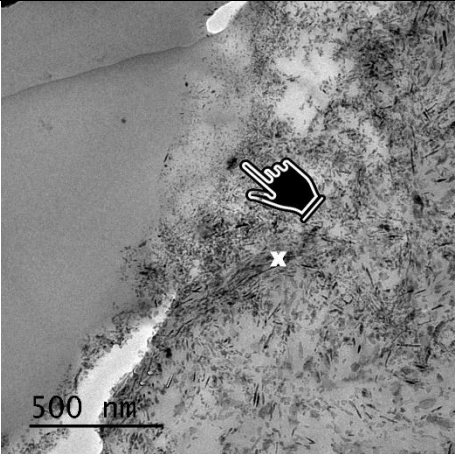
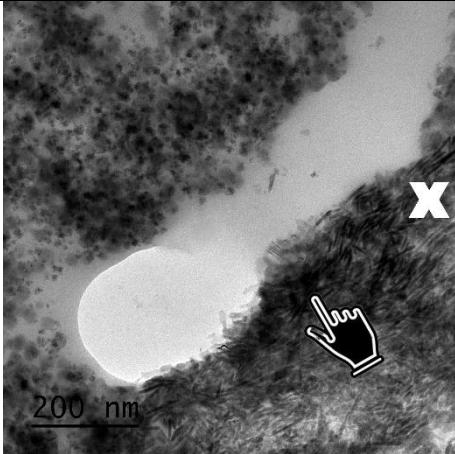
Letra X = Mineral da dentina; Mão preta = Ponto de remineralização.

Quadro 4 (Continuação) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MET para os grupos cariados.

Tratamentos	24 horas	6 meses	1 ano
CHX Bio			
P16 Bio			

Letra X = Mineral da dentina; Mão preta = Ponto de remineralização; Seta preta = Imagem indicativa da ação do veículo do extrato de própolis na dentina.

Quadro 4 (Conclusão) - Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por MET para os grupos cariados.

Tratamentos	24 horas	6 meses	1 ano
P45 Bio			

Letra X = Mineral da dentina; Mão preta = Ponto de remineralização.

Através da Microscopia Eletrônica de Transmissão foi possível observar boa interação do sistema adesivo com a dentina e a formação da camada híbrida, em ambos substratos (Quadro 3 e 4). Além disso, no substrato hígido tratado só com clorexidina, nota-se a presença de *smear layer*, não completamente removida, incorporada à camada (Quadro 3 – Grupo CHX analisado após 24 horas e 1 ano). Por outra parte, no caso dos substratos cariados percebe-se maior degradação da camada híbrida (Quadro 4), que foi aumentando para ambos substratos à medida que o tempo de envelhecimento aumentou (Quadro 3 e 4). Assim, na dentina cariada tratada com clorexidina sem associação, observa-se, após 6 meses de envelhecimento, uma camada híbrida muito fina (Quadro 4 – Grupo CHX analisado após 6 meses) e após um ano a degradação dela (Quadro 4 – Grupo CHX analisado após 1 ano) que também foi visto quando este substrato foi tratado só com o sistema adesivo (Quadro 4 – Grupo Controle analisado após 1 ano).

Independentemente do substrato, nos grupos tratados com Biosilicato, com e sem associação de outro tratamento (Quadro 3 – Grupos Bio, CHX Bio, P16 Bio e P45 Bio após 6 meses e 1 ano; Quadro 4 – Grupos Bio, P16 Bio e P45 Bio após 6 meses e 1 ano), constata-se áreas com maior densidade, sugestivo de regiões de início de remineralização no tecido dentinário, áreas que aumentaram ao longo do tempo.

Por outro lado, nas amostras híginas tratadas com própolis com baixo teor de polifenóis, com e sem associação, é possível visualizar uma excelente hibridização e formação de uma camada híbrida, com partículas do extrato espalhadas no tecido (Quadro 3 – Grupos P16 e P16 Bio em todos os períodos). Assim mesmo, tanto na dentina hígida quanto na cariada, foi possível observar boa interação do extrato com a dentina em virtude do óleo de rícino, o qual é visto como uma sombra em íntimo contato com a superfície dentinária (Quadro 3 – Grupos P16 analisados após 24 horas e 1 ano e P16 Bio analisado após 24 horas; Quadro 4 – Grupo P16 Bio analisado após 24 horas).

De outra parte, quando o substrato foi tratado somente com o Biosilicato, verifica-se, além de áreas de remineralização, áreas de degradação, visíveis na coloração branca. Entretanto, observa-se no grupo tratado com própolis com baixo teor de polifenóis, seguido deste biomaterial, menor degradação da camada híbrida quando comparado com os demais grupos (Quadro 4 – Grupos analisados após 1 ano).

Finalmente, na dentina hígida tratada com própolis como alto teor de polifenóis, nota-se estruturas sugestivas de serem partículas de própolis suspensas incorporadas à camada híbrida (Quadro 3 – Grupo P45 analisado após 24 horas e 1 ano).

Em razão da fragilidade do substrato cariado, para os grupos tratados com extrato de própolis como alto teor de polifenóis e onde foram associados clorexidina e Biosilicato, não foi possível a obtenção de imagens após 6 meses e 1 ano de envelhecimento. Esse fato também aconteceu para o grupo tratado com extrato de própolis como baixo teor de polifenóis, onde não foi possível conseguir imagens em nenhum dos períodos.

5. Discussão

O presente trabalho avaliou o efeito do uso de própolis, com diferentes teores de polifenóis, associada a suspensão de Biosilicato na resistência de união à dentina hígida e cariada de restaurações em compósito, visando conhecer também a interação desses tratamentos com a superfície dentinária. O estudo partiu da hipótese nula de que esta associação não promoveria uma maior resistência de união na interface dentina/adesivo, independente do teor de polifenóis e do tempo de envelhecimento. Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que a hipótese testada foi rejeitada, uma vez que, nas amostras cariadas testadas após 24 horas de armazenamento, a associação de tratamentos resultou em maior resistência de união, sendo significativa ($p < .05$) quando comparado com o grupo Controle. Além disso, após 1 ano de envelhecimento, houve maior resistência de união para o grupo tratado com própolis com alto teor de polifenóis, significativamente ($p < .05$) maior do que o grupo onde foram associados CHX e o Biosilicato.

O conceito de Odontologia minimamente invasiva está sendo cada vez mais utilizado na prática clínica. Visa preservar a estrutura dental, limitando o preparo à remoção seletiva da dentina infectada por bactérias e mantendo a dentina afetada sem microorganismos e com capacidade remineralizável, o que ajudaria na adesão. (71) É por esse motivo que o presente estudo avaliou também o comportamento dos diferentes tratamentos de superfície propostos na dentina artificialmente cariada. Contudo, o substrato hígido obteve melhores resultados em comparação com o cariado.

Estudos prévios têm mostrado resultados similares aos encontrados no presente estudo, sendo a resistência de união na dentina cariada até 50% menor do que na hígida. (22) Isto acontece devido à perda do conteúdo mineral durante a progressão da cárie, que leva à formação de porosidades e alterações na estrutura do colágeno dentinário. (8) As fibrilas colágenas degradam-se, diminuindo o número de ligações cruzadas do colágeno Tipo I. Essas modificações afetam as propriedades mecânicas da dentina, (22) entre elas, a resistência de união à tração. Assim mesmo, existe evidência de que a camada híbrida formada neste substrato é pouco infiltrada pelos monômeros dos sistemas adesivos, deixando fibrilas colágenas expostas e susceptíveis à degradação ao longo do tempo. (22,72,73)

Mesmo na dentina hígida, a resistência de união de uma restauração adesiva depende da estabilidade da camada híbrida, (11) a qual pode sofrer degradação hidrolítica e/ou proteólise das fibrilas colágenas se encontram-se desprotegidas. (15) Tanto o condicionamento com ácido fosfórico ou com monômeros ácidos dos sistemas *self-etch* quanto os ácidos produzidos pelas

bactérias, diminuem o pH do meio gerando alterações na estrutura dentinária e ativando as MMPs. (11,14,19) O sistema adesivo Single Bond Universal, empregado no presente estudo, apresenta um pH de 2.7 que lhe fornece a acidez necessária para seu uso no modo *self-etch* (74) mas também segundo Mazzoni et al., suficiente para ativar as MMPs. (75)

As MMPs são enzimas proteolíticas que intervêm em muitos processos biológicos; (8,13) por exemplo durante o desenvolvimento e maturação dental contribuem na reorganização da matriz orgânica antes da sua mineralização. (13,14) Uma vez mineralizada, permanecem dentro da matriz dentinária cobertas por cristais de hidroxiapatita, tornando-se imóveis e não-funcionais (14,76) até que a superfície seja alterada. Quando reativadas, estas enzimas quebram as ligações peptídicas por meio da adição de água, degradando a matriz. (14)

É assim que, têm sido propostos diversos inibidores de MMPs, os quais baseiam-se na quelação dos grupos zinco e cálcio, necessários para a atividade enzimática delas. (23) A clorexidina tem mostrado bons resultados clínicos e laboratoriais aumentando a longevidade das restaurações. (22–25) Graças a suas moléculas anfipáticas, pode penetrar facilmente no interior dos túbulos dentinários e se ligar a várias proteínas. (77) Além disso, é um agente catiônico com forte afinidade por estruturas orgânicas (colágeno) e inorgânicas (hidroxiapatita) carregadas negativamente, especialmente quando aplicado após condicionamento ácido. (78,79) Assim, na dentina mineralizada a clorexidina se liga eletrostaticamente aos grupos fosfatos da hidroxiapatita, enquanto que na dentina desmineralizada, além de se ligar aos grupos carboxílicos do colágeno, também pode formar ligações de hidrogênio com eles. (27)

A clorexidina inibe a atividade das MMPs por mecanismo de quelação, no qual os íons metálicos (cálcio e zinco) do meio são sequestrados impedindo a ativação catalítica das MMPs. (23) Contudo, é solúvel em água, portanto, a sua eficácia ao longo prazo pode ser comprometida. (27,29) Também, sabe-se que perde sua efetividade na presença de íons de cálcio liberados por alguns sistemas adesivos, e neste caso proveniente das partículas de Biosilicato. (80) Provavelmente foi por essas razões que quando os dentes cariados tratados com clorexidina seguido do Biosilicato foram envelhecidos por 1 ano antes do teste, a resistência de união diminuiu, sendo significativamente menor ($p < .05$) quando comparado com aqueles tracionados após 24 horas (Tabela 7). Do mesmo modo, nas amostras tratadas com esta substância, a MET revelou uma camada híbrida muito fina após 6 meses de envelhecimento (Quadro 4 – Grupo CHX analisado após 6 meses) e a sua degradação após 1 ano (Quadro 4 – Grupo CHX analisado após 1 ano). Em um estudo realizado por Montagner et al., (21) também

encontraram uma maior resistência de união em períodos iniciais quando a clorexidina foi aplicada como inibidor, comparado com os períodos de envelhecimento. Devido a esse inconveniente, agentes de ligação cruzada têm sido introduzidos como uma forma mais permanente de inativar as enzimas proteases. (32)

Nas últimas décadas, os produtos naturais têm sido bastante estudados para serem utilizados na área da odontologia, em razão de sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e por ser um recurso renovável. (32) A própolis é uma resina viscosa e de cor variada, extraída de árvores e plantas (principalmente casca de árvores e folhas), que depois é mastigada e misturada com enzimas salivares (amilases, catepsinas, lipases e tripsina) das próprias abelhas e adicionada cera. (37) Graças a sua composição química, apresenta múltiplas propriedades já conhecidas e bem descritas na literatura, (38,39) e poderia ser um substituto natural à clorexidina.

A matriz extracelular da dentina está composta principalmente por colágeno Tipo I que representa cerca de 90% da parte orgânica. Dessa maneira, estratégias para aumentar a durabilidade das restaurações adesivas seriam inibindo as collagenases ou melhorando as propriedades mecânicas do colágeno, tornando as fibrilas mais estáveis, resistentes e insolúveis. (81) No colágeno, a própolis promove a formação de ligações cruzadas inter e intramoleculares, reforçando as fibrilas colágenas e evitando a sua degradação enzimática. Como consequência, as suas propriedades mecânicas são melhoradas, entre elas a resistência de união à tração. (82) Além disso, induz a diferenciação de fibroblastos, os quais remodelam a matriz extracelular; produzindo colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e elastina. (83)

Mais especificamente, os flavonoides, componentes ativos mais importantes da própolis, interagem com o colágeno, estabilizando-o através de quatro mecanismos: Ligações covalentes, iônicas, pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas. (84) Sabe-se também que estes são capazes de diminuir a peroxidação lipídica, incrementando a resistência das fibrilas colágenas, e de inibir a atividade enzimática das MMPs. (39) Outro componente ativo destacável é o tanino, um polifenol que precipita proteínas e forma ligações cruzadas com elas para formar complexos estáveis, (85) melhorando a estabilidade mecânica e estrutural do colágeno e, por tanto, aumentando a durabilidade da camada híbrida. (86)

Ambos compostos são potentes antioxidantes, podendo ser benéfico para o colágeno. Segundo Edgar et al., (87) na pele, uma diminuição das defesas antioxidantes resulta no incremento da expressão das MMPs e redução da síntese de colágeno. Assim, a administração

de antioxidantes, como os polifenóis, diminuiria o estresse oxidativo; já que, são capazes de interceptar a cadeia de oxidação de radicais livres através da doação de hidrogênio de suas hidroxilas fenólicas. (88) Assim mesmo, graças a este potencial, os componentes do extrato de própolis poderiam ser liberados mais vagarosamente, auxiliando na preservação da interface adesiva por longos períodos de tempo. (89) Todas estas características descritas anteriormente explicariam porquê quando os dentes hígidos foram testados após 6 meses de envelhecimento, o grupo tratado com própolis com baixo teor de polifenóis obteve a maior resistência de união (Tabela 4), sendo inclusive maior daquele grupo tratado com própolis com alto teor de polifenóis ($p > .05$).

Como citado previamente, vários estudos afirmam que a atividade da própolis depende do teor de fenóis e flavonoides totais. (49,55) Desta forma, o extrato aquoso de própolis com alto teor de polifenóis teria maior capacidade antioxidante. No entanto, segundo Du et al. (90) um alto poder antioxidante pode influenciar negativamente na polimerização inicial do adesivo e, por tanto, na conversão de monômeros em polímeros. Aparentemente, a canforoquinona e a amina terciária interagem com os flavonoides, retardando a polimerização, porém, sem prejudicar as propriedades finais ou a estabilidade do material. (89,91) Gotti et al. (91) avaliaram o efeito de antioxidantes na interface dentina/adesivo, encontrando que altas concentrações afetam negativamente a resistência de união imediata; não obstante, após o envelhecimento a resistência aumenta. Ao longo prazo, os antioxidantes podem sofrer hidrólise; como resultado, alguns monômeros e iniciadores ficam liberados levando a uma polimerização tardia. (91) Possivelmente, esse seria o motivo pelo qual as amostras tratadas com própolis com alto teor de polifenóis exibiram baixa resistência de união quando testados após 24 horas ($p > .05$); porém, à medida que o tempo de envelhecimento aumentou, a resistência em ambos substratos também aumentou ($p > .05$), exibindo a maior resistência entre os grupo; no entanto, sendo significativo ($p < .05$) só nos dentes cariados submetidos ao teste depois de 1 ano (Tabela 7).

Por outro lado, a atividade biológica da própolis também é influenciada pelos solventes utilizados para sua extração; (55) sendo que, são empregados para remover o material inerte preservando os compostos desejados. (51) O extrato de própolis é comumente obtido usando etanol, metanol, clorofórmio, éter ou acetona. Recentemente, novos métodos de extração têm sido sugeridos, destacando aquele obtido com óleo vegetal, o qual conserva bem as características organolépticas da própolis sem necessidade de uma posterior remoção. (92)

Buriol et al. (92) encontraram que os óleos vegetais permitem extrair eficazmente as substâncias fenólicas bioativas da própolis, mostrando resultados antimicrobianos e citotóxicos promissores. Mais especificamente, Pujirahayu et al. (93) observaram que o extrato oleoso de própolis obtido usando como solvente propilenglicol apresentou um alto teor de polifenóis e propriedades similares ou melhores do que o extrato etanólico, mais frequentemente empregado. Em outro estudo realizado por Da Silva et al., (94) acharam que o extrato obtido a partir de óleo de canola teve um efeito antifúngico melhor do que o extrato etanólico e uma atividade antibacteriana equivalente ao extrato aquoso. Além disso, quando foi obtido um extrato oleoso metanólico, a atividade antibacteriana foi inclusive melhor do que o aquoso.

No presente trabalho, o extrato de própolis com baixo teor de polifenóis foi obtido a partir de óleo de rícino etoxilado, conseguindo uma suspensão microparticulada, como observado na MEV e MET (Quadro 2 e 3 – Grupos P16 e P16 Bio em todos os períodos). Este óleo é um tensoativo amplamente utilizado na indústria farmacêutica, que quando etoxilado incrementa seu caráter hidrofílico, o que altera a sua solubilidade em água, permitindo seu uso como solubilizante. (95) Também, essa capacidade tensoativa reduz significativamente a tensão superficial e diminui o ângulo de contato, (95) o que contribuiria para que o extrato de própolis e o adesivo se espalhem e penetrem nos túbulos dentinários, como pode ser observado com a formação de *tags* de resina de maior comprimento (Quadro 2 – Grupo P16 Bio testados após 24 horas).

Sendo uma molécula anfifílica tem como característica possuir duas regiões de solubilidade diferentes, uma parte polar que possui afinidade pela água (hidrofílica) e outra apolar com afinidade por compostos orgânicos (hidrofóbica). (95) Assim, essa parte hidrofílica poderia ter afinidade com os monômeros hidrofílicos do sistema adesivo, facilitando sua penetração através dos túbulos; enquanto que, a parte hidrofóbica poderia permitir uma maior interação com a dentina e com a parte hidrofóbica do adesivo, como mostrado com a MET (Quadro 3 – Grupos P16 analisados após 24 horas e 1 ano e P16 Bio analisado após 24 horas; Quadro 4 – Grupo P16 Bio analisado após 24 horas).

Finalmente, o óleo de rícino é extraído das sementes da planta *Ricinus communis*, rica em flavonoides e taninos. (96) Isto aumentaria o teor de polifenóis no extrato de própolis; no entanto, uma vez que é um extrato oleoso, a liberação deles seria mais lentamente e por um longo período de tempo, o que justificaria porquê o extrato manteve bons resultados ao longo prazo.

Outra alternativa para aumentar a longevidade da interface adesiva seria remineralizando a superfície dentinária, principalmente porque, atualmente, muitas das restaurações adesivas são realizadas com uma abordagem minimamente invasiva. Os vidros bioativos e vitrocerâmicas bioativas pertencem ao grupo dos biomateriais, desenvolvidos com o intuito de tratar lesões ósseas, substituir ou regenerar osso. (57) Estes biomateriais estimulam respostas celulares específicas no nível molecular e ativam genes que estimulam e controlam a regeneração de tecidos. (57) O Bioglass 45S5 é o vidro bioativo mais conhecido e estudado. Foi desenvolvido por Larry Hench na década dos 60 apresentando bons resultados. (97) Após o desenvolvimento deste biovidro, foram introduzidos outros materiais visando combinar a excelente bioatividade do Bioglass 45S5 com as boas propriedades mecânicas de algumas vitrocerâmicas, em especial o Biosilicato. (57)

O Biosilicato é uma nova vitrocerâmica bioativa completamente cristalizada, que combina a alta bioatividade dos vidros bioativos com as excelentes propriedades mecânicas das vitrocerâmicas. Quando entra em contato com os fluidos libera íons cálcio, sódio, sílica e fosfato que elevam o pH do meio e estimulam a remineralização, (97) além de gerar uma forte união química com os monômeros funcionais do sistema adesivo. (98) Do mesmo modo, tem em sua composição P_2O_5 , que é capaz de sequestrar o cálcio da dentina formando compostos no interior dos túbulos dentinários. (99) Tirapelli et al. (62) encontraram que este biomaterial oclui os túbulos (Fato que também foi presenciado na MEV do presente estudo, Quadro 2 – Grupos P16 Bio e P45 Bio testados após 24 horas) e forma uma camada de hidroxiapatita na superfície dentinária, o que favorece a união química entre o material e o tecido mineralizado. (100) Porém, requer um tempo para reagir; sendo assim, a dissolução e precipitação dos minerais ocorre lentamente. (57,101)

Os grupos tratados só com a suspensão de Biosilicato, sem associação de outro tratamento, não apresentaram os resultados esperados e observados em outros estudos prévios. De Moraes et al. (68) encontraram uma maior resistência de união após 6 meses de envelhecimento, tanto em dentina hígida quanto desmineralizada, quando o substrato foi tratado com Biosilicato, comparado com grupos sem tratamento. Contrariamente, no presente trabalho, os substratos hígidos tratados com Biosilicato tracionados após 6 meses, exibiram a menor resistência de união entre os grupos, sendo significativo ($p < .05$) quando comparado com o grupo onde foi aplicado o extrato de própolis com baixo teor de polifenóis (Tabela 4).

As microfotografias feitas na MEV revelam a presença das partículas de Biosilicato sobre a superfície dentinária (Quadro 1 e 2), algumas ocluindo os túbulos dentinários. Provavelmente o tamanho das partículas não foi o adequado ou elas não foram completamente dissolvidas, o que interferiu na penetração do sistema adesivo nos túbulos dentinários para a formação de *tags* de resina ou na infiltração das próprias partículas de Biosilicato. Por outro lado, inicialmente foram observadas com a MEV (Quadro 1 e 2) partículas mais definidas e uniformes; conforme aumentou o tempo de envelhecimento, as partículas se tornaram mais irregulares e menos nítidas. Aparentemente, após o envelhecimento, as partículas de Biosilicato não foram dissolvidas completamente, mas percebe-se uma integração com o tecido conjuntivo. Além disso, especificamente nas amostras hígidas tratadas com Biosilicato e em associação com própolis com alto teor de polifenóis, nota-se aumento na radiopacidade destas partículas (Quadro 1 – Grupos Bio e P45 Bio após 6 meses e 1 ano); e por meio da análise em MET, independente do substrato, áreas de maior densidade indicando possível início de remineralização do tecido dentinário (Quadro 3 – Grupos Bio, CHX Bio, P16 Bio e P45 Bio após 6 meses e 1 ano; Quadro 4 – Grupos Bio, P16 Bio e P45 Bio após 6 meses e 1 ano), que aumentaram ao longo do tempo.

Outro fator que pode ter contribuído na baixa resistência de união destes grupos tratados com Biosilicato, é o sistema adesivo empregado. O adesivo Single Bond Universal é um adesivo universal ou multimodal que pode ser utilizado tanto pela técnica convencional (*etch-and-rinse*) quanto pela autocondicionante (*self-etch*). (102) É apresentado em um único frasco, e no modo *self-etch* é empregado como passo único com o objetivo de diminuir os passos clínicos, assim, minimizando o tempo e a sensibilidade da técnica. Não obstante, apresenta uma acidez menor do que a obtida com ácido fosfórico, (103) mostrando então, uma ação limitada. Os sistemas adesivos *self-etch* desmineralizam só superficialmente a dentina e removem parcialmente a *smear layer*, (68) incorporando-a à camada híbrida. Através da MEV e MET foi possível observar nos substratos hígidos tratados com o sistema adesivo, um tecido conjuntivo desorganizado e a presença de *smear layer* e *smear plug* (Quadro 1 – em todos os grupos e Quadro 3 – Grupo CHX analisado após 24 horas e 1 ano), o que poderia justificar os resultados encontrados, devido à ação maior do sistema adesivo sobre a *smear layer* do que sobre a dentina subjacente e às características operacionais de cada tratamento realizado. Assim mesmo, a falta de uma remoção completa da *smear layer*, também pode ter influenciado negativamente na ação do biomaterial. Presumivelmente, os monômeros ácidos de metacrilato do adesivo não

tiveram a acidez suficiente para criar microporosidades com a profundidade necessária, ficando as partículas de Biosilicato sedimentadas só na superfície (Quadro 1 e 2). De outra parte, de acordo com Gabbai-Armelin et al., (104) quando o Biosilicato reage, o pH torna-se alcalino, podendo apresentar um pH 10 em 24 horas. Talvez isso gerou um efeito tampão, novamente interferindo no potencial desmineralizante do adesivo e diminuindo a eficácia da vitrocerâmica.

Em contraste, na dentina cariada, a presença de minerais ácidos decorrentes da solução desmineralizante do desafio cariogênico, pode ter colaborado na desmineralização mais profunda da dentina, (105) exibindo através da MEV uma maior remoção da *smear layer*, maior exposição dos túbulos dentinários e a penetração do sistema adesivo neles, para a formação dos *tags* de resina, em maior comprimento e quantidade (Quadro 2). Deste modo, nos substratos cariados tratados só com o sistema adesivo encontraram-se valores de resistência de união semelhantes aos obtidos nos outros grupos.

É importante salientar que os substratos hígidos tiveram resultados similares após 24 horas, independentemente do grupo, provavelmente devido ao fato de que testes imediatos só mostram o desempenho do sistema adesivo. Os tratamentos de superfície precisam de algum tempo para reagir com a superfície dentinária. (60)

Melhoras na composição química dos sistemas adesivos *self-etch*, incluindo novos monômeros hidrofílicos e monômeros ácidos resinosos, permitiriam uma interação efetiva com a dentina, melhorando a resistência de união inicial deles. (106) Assim, o sistema adesivo Single Bond Universal apresenta na sua composição o monômero ácido funcional 10-metacriloiloxidecil dihidrogênio fosfato (10-MDP) e o copolímero de ácido polialcenóico, os quais permitem uma união química e estável com o cálcio da hidroxiapatita. (107) Porém, a incorporação de maior quantidade de monômeros hidrofílicos e seu pH, incrementariam a sorção de água e a acumulação dela nas porosidades, o que degradaria os monômeros resinosos 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA), trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA) e MDP, (108) e em longo prazo ocasionaria a hidrólise da camada híbrida, (106,109) como constatado nas amostras hígidas envelhecidas por 6 meses. Nessas condições, o grupo Controle mostrou a menor resistência de união, sendo significativa ($p < .05$) quando comparado com o grupo que foi tratado com o extrato de própolis com baixo teor de polifenóis (Tabela 6).

De outro lado, embora vários estudos tenham demonstrado uma diminuição nos valores de resistência de união após períodos de armazenamento, mesmo curtos, devido à hidrólise da interface adesiva, (18,21,110) no presente estudo isso não aconteceu; para os substratos hígidos

o envelhecimento não influenciou negativamente na adesão (Tabela 6, $p > .05$). Em todos os grupos, os valores de resistência de união foram mantidos ao longo do tempo, o que resulta em efeito promissor. Já na dentina cariada, os resultados foram diferentes. Neste substrato, o volume de água aumenta, já que ela substitui os minerais perdidos, em uma mesma proporção. Por meio da MET foi possível verificar maior degradação da camada híbrida neste substrato quando comparado ao hígido, a qual foi aumentando à medida que o tempo de envelhecimento aumentou (Quadro 4) A presença de água pode levar à diminuição da resistência de união, mesmo imediata. (72) Possivelmente, o motivo pelo qual os dentes cariados que só foram tratados com o sistema adesivo, exibiram a menor resistência de união após 24 horas entre todos os grupos, sendo significativa ($p < .05$) quando comparado com os grupos onde houve associação de tratamentos (Tabela 3). Assim mesmo, este fato também justificaria a degradação observada neste grupo após 1 ano (Quadro 4 – Grupo Controle analisado após 1 ano).

Como dito inicialmente, para a dentina cariada, a associação de tratamentos influenciou positivamente na resistência de união após 24 horas. Novamente, a acidez proveniente da solução desmineralizante do desafio cariogênico pode ter auxiliado na criação de porosidades mais profundas e de maior diâmetro permitindo a penetração das suspensões, inclusive das partículas de Biosilicato (Quadro 2 – Grupos P16 Bio e P45 Bio testados após 24 horas), e a infiltração dos monômeros do adesivo, comprovada com a MEV, a partir da visualização de *tags* de resina dentro dos túbulos dentinários abertos (Quadro 2 – Grupos CHX Bio, P16 Bio e P45 Bio).

Certamente, pelas características descritas anteriormente neste estudo, os agentes de ligação cruzada puderam interagir com as fibrilas colágenas desprotegidas (Quadro 4 – Grupos CHX Bio, P16 Bio e P45 Bio analisados após 24 horas), com os monômeros do adesivo e, provavelmente, formar ligações iônicas com o cálcio e fosfato liberados da suspensão de Biosilicato. Não obstante, sabe-se que as ligações eletrostáticas não são estáveis, podendo se perder rapidamente. (26) Assim, isto e o ataque hidrolítico maior nos substratos cariados, seriam as razões pelas quais, quando foram tratados com clorexidina seguido do Biosilicato, apresentaram a menor resistência de união entre os grupos envelhecidos por 1 ano, sendo este período de tempo significativo para este grupo (Tabela 7, $p < .05$). Do mesmo modo, explicaria o motivo pelo qual os dentes cariados tratados com própolis com alto teor de polifenóis seguido do Biosilicato mostraram uma diminuição na resistência de união após os tempos de envelhecimento (Tabela 7, $p < .05$), e fundamentaria os baixos valores de resistência obtidos

neste grupo após 6 meses. Os polifenóis também podem sofrer hidrólise, (111) além de degradar-se em pH alcalinos, (112) como o pH atingido com a reação do Biosilicato. Porém, estas circunstâncias não influenciaram negativamente o desempenho do extrato de própolis com baixo teor de polifenóis, provavelmente devido à presença do óleo de rícino que favorece a união, como já descrito. Neste grupo também foi observada menor degradação da camada híbrida quando comparado com os demais (Quadro 4 – Grupos analisados após 1 ano).

É indispensável também analisar os padrões de fratura obtidos, já que podem expressar o desempenho dos tratamentos na adesão. (113) Geralmente, altos valores de resistência de união exibem maior número de fraturas coesivas e menor número de adesivas. (114) Porém, Dursun et al. (115) afirmam que não existe uma relação direta entre esses valores e os padrões de fratura. No presente estudo, independentemente do substrato, conforme o tempo de envelhecimento aumentou, as fraturas não adesivas aumentaram para todos os grupos (Gráficos 1 a 3). Isto poderia indicar uma melhor interação, mais estável e forte, dos tratamentos com a superfície dentinária ao longo do tempo, mesmo com baixos valores de resistência. Do mesmo modo, no teste após 24 horas (Gráfico 1), observamos uma maior incidência de fraturas não adesivas quando a dentina hígida foi tratada previamente com própolis, Biosilicato ou a associação deles; e na dentina cariada, independentemente do tempo e tratamento de superfície, evidenciando novamente a atuação efetiva dos tratamentos. Finalmente, independentemente do envelhecimento e tratamento, a dentina hígida exibiu uma maior prevalência de fraturas adesivas (Gráfico 1 a 3), o que poderia indicar uma boa penetração do sistema adesivo; (68) no entanto, com sua posterior degradação hidrolítica.

Uma das limitações deste estudo é o método de obtenção da cárie artificial, a qual foi feita seguindo os protocolos de desmineralização e remineralização *in vitro* sugeridos por Marquezan et al., (69) porém que não consideram a degradação orgânica do substrato dentário que ocorre *in vivo* durante a progressão da cárie. (68) Entretanto, Joves et al. (116) afirmam que o desafio cariogênico gera uma dentina desmineralizada com um padrão mais regular do que o observado na dentina naturalmente cariada, favorecendo a homogeneização do conteúdo mineral na superfície, em contraste com o que ocorre naturalmente.

Mais do que comparar os valores de resistência de união, é fundamental observar e analisar a interação dos diferentes tratamentos de superfície com os substratos dentários, neste caso, com a dentina. Os resultados obtidos na dentina hígida são altamente promissores; já que, a resistência de união não foi afetada pelo envelhecimento, o que já é benéfico. Mesmo que os

tratamentos propostos não tenham melhorado significativamente a resistência de união na interface dentina/adesivo, os resultados de análises microscópicas demonstraram que houve boa interação dos tratamentos com o tecido dentinário, especialmente com o extrato de própolis com baixo teor de polifenóis. Assim mesmo, parece ser que, após um ano, as partículas de Biosilicato conseguem iniciar o processo de remineralização do tecido dentinário; porém, seria necessário estudar outras concentrações e tamanhos de partículas para que este processo seja iniciado antes, além da compatibilidade dele com o sistema adesivo.

Finalmente, o conceito de odontologia minimamente invasiva ainda deve ser mais investigado, visto que a camada híbrida formada nos substratos cariados é mais susceptível a hidrólise, colocando em dúvida a preservação da dentina afetada por cárie.

6. Conclusões

Considerando os resultados encontrados no estudo e suas limitações, foi possível concluir que:

- 1) O tratamento com própolis com baixo teor de polifenóis, resultou em melhor resistência de união em substrato hígido após 6 meses de envelhecimento;
- 2) A associação de tratamentos com Biosilicato promove melhores resultados de resistência de união após 24 horas em substratos cariados;
- 3) Não houve diferença na resistência de união em virtude do envelhecimento no substrato hígido;
- 4) O padrão de fratura mais prevalente foi o não adesivo após os tratamentos propostos, que aumentou à medida que houve maior tempo de envelhecimento.

*Referências Bibliográficas**

*De acordo com as Normas de Vancouver

1. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater.* 2008;24(1):90–101. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.02.009>
2. Toledano M, Aguilera FS, Sauro S, Cabello I, Osorio E, Osorio R. Load cycling enhances bioactivity at the resin-dentin interface. *Dent Mater.* 2014;30(7):e169–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2014.02.009>
3. Zhang Z, Beitzel D, Mutluay M, Tay FR, Pashley DH, Arola D. On the durability of resin-dentin bonds: Identifying the weakest links. *Dent Mater.* 2015;31(9):1109–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2015.06.011>
4. Freitas PH, Giannini M, França R, Correr AB, Correr-Sobrinho L, Consani S. Correlation between bond strength and nanomechanical properties of adhesive interface. *Clin Oral Investig.* 2017;21(4):1055–62. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1847-7>
5. Fawzy AS, Priyadarshini BM, Selvan ST, Lu TB, Neo J. Proanthocyanidins-Loaded Nanoparticles Enhance Dentin Degradation Resistance. *J Dent Res.* 2017;96(7):780–9. Available from: <https://doi.org/10.1177/0022034517691757>
6. Toledano M, Osorio E, Aguilera FS, Cabrerizo-Vilchez MA, Osorio R. Surface Analysis of Conditioned Dentin and Resin–Dentin Bond Strength. *J Adhes Sci Technol.* 2012;26(1–3):27–40. Available from: <https://doi.org/10.1163/016942411X559067>
7. Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials. *Dent Mater.* 2005;21(9):864–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.02.003>
8. Tjäderhane L, Buzalaf MA, Carrilho M, Chaussain C. Matrix Metalloproteinases and Other Matrix Proteinases in Relation to Cariology: The Era of ‘Dentin Degradomics’. *Caries Res.* 2015;49(3):193–208. Available from: <https://doi.org/10.1159/000363582>
9. Cauwe B, Van Den Steen PE, Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2007;42(3):113–85. Available from: <https://doi.org/10.1080/10409230701340019>
10. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6–7):1362–78. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.12.006>
11. Mazzoni A, Carrilho M, Papa V, Tjäderhane L, Gobbi P, Nucci C, et al. MMP-2 assay within the hybrid layer created by a two-step etch-and-rinse adhesive: Biochemical and immunohistochemical analysis. *J Dent.* 2011;39(7):470–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.04.004>

12. Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY, et al. Localization of MMP-2 , MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent*. 2011;39(8):536–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.05.004>
13. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2007;52(2):121–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.08.009>
14. Tezvergil-Mutluay A, Agge KA, Hoshika T, Uchiyama T, Tjäderhane L, Breschi L, et al. Inhibition of MMPs by alcohols. *Dent Mater*. 2011;27(9):926–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2011.05.004>
15. Frankenberger R, Pashley DH, Reich SM, Lohbauer U, Petschelt A, Tay FR. Characterisation of resin–dentine interfaces by compressive cyclic loading. *Biomaterials*. 2005;26(14):2043–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.003>
16. Wang Y, Spencer P. Hybridization Efficiency of the Adhesive/Dentin Interface with Wet Bonding. *J Dent Res*. 2003;82(2):141–5. Available from: <https://doi.org/10.1177/154405910308200213>
17. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo Degradation of Resin-Dentin Bonds in Humans Over 1 to 3 Years. *J Dent Res*. 2000;79(6):1385–91. Available from: <https://doi.org/10.1177/00220345000790060601>
18. Armstrong SR, Keller JC, Boyer DB. The influence of water storage and C-factor on the dentin-resin composite microtensile bond strength and de bond pathway utilizing a filled and unfilled adhesive resin. *Dent Mater*. 2001;17(3):268–76. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(00\)00081-6](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(00)00081-6)
19. Tjäderhane 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. *J Dent Res*. 1998;77(8):1622–9. Available from: <https://doi.org/10.1177/00220345980770081001>
20. Boukpepsi T, Menashi S, Camoin L, TenCate JM, Goldberg M, Chaussain-Miller C. The effect of stromelysin-1 (MMP-3) on non-collagenous extracellular matrix proteins of demineralized dentin and the adhesive properties of restorative resins. *Biomaterials*. 2008;29(33):4367–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.07.035>
21. Montagner AF, Sarkis-Onofre R, Pereira-Cenci T, Cenci MS. MMP inhibitors on dentin stability: A systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*. 2014;93(8):733–43. Available from: <https://doi.org/10.1177/0022034514538046>
22. Tjäderhane L. Dentin Bonding: Can We Make it Last? *Oper Dent*. 2015;40(1):4–18.

- Available from: <https://doi.org/10.2341/14-095-BL>
23. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005;84(8):741–6. Available from: <https://doi.org/10.1177/154405910508400811>
 24. Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, et al. Chlorhexidine Inhibits the Activity of Dental Cysteine Cathepsins. *J Dent Res.* 2012;91(4):420–5. Available from: <https://doi.org/10.1177/0022034511435329>
 25. Stanislawczuk R, Pereira F, Muñoz MA, Luque I, Farago PV, Reis A, et al. Effects of chlorhexidine-containing adhesives on the durability of resin-dentine interfaces. *J Dent.* 2014;42(1):39–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.002>
 26. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, et al. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dent Mater.* 2010;26(8):771–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.04.001>
 27. Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol Wet-bonding Anti-degradation Strategy. *J Dent Res.* 2010;89(12):1499–504. Available from: <https://doi.org/10.1177/0022034510385240>
 28. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater.* 2010;26(6):571–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.02.007>
 29. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Uchiyama T, Imazato S, Mutluay MM, Cadenaro M, et al. The Inhibitory Effects of Quaternary Ammonium Methacrylates on Soluble and Matrix-bound MMPs. *J Dent Res.* 2011;90(4):535–40. Available from: <https://doi.org/10.1177/0022034510389472>
 30. Sousa ABS, Vidal CMP, Leme-Kraus AA, Pires-de-Souza FdeCP, Bedran-Russo AK. Experimental primers containing synthetic and natural compounds reduce enzymatic activity at the dentin–adhesive interface under cyclic loading. *Dent Mater.* 2016;32(10):1248–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2016.07.012>
 31. Leme-Kraus AA, Aydin B, Vidal CM, Phansalkar RM, Nam JW, McAlpine J, et al. Biostability of the Proanthocyanidins-Dentin Complex and Adhesion Studies. *J Dent Res.* 2017;96(4):406–12. Available from: <https://doi.org/10.1177/0022034516680586>
 32. Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen S-N, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification: Strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater.* 2013;30(1):62–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2013.10.012>
 33. Ma DH-K, Lai J-Y, Cheng H-Y, Tsai C-C, Yeh L-K. Biomaterials Carbodiimide cross-linked amniotic membranes for cultivation of limbal epithelial cells. *Biomaterials.* 2010;31(25):6647–58. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.034>

34. Khaddam M, Salmo B, Le Denmat D, Tjäderhane L, Menashi S, Chaussain C, et al. Grape seed extracts inhibit dentin matrix degradation by MMP-3. 2014;5(425):1–8. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00425>
35. Pavan S, Xie Q, Hara AT, Bedran-Russo AK. Biomimetic Approach for Root Caries Prevention Using a Proanthocyanidin-Rich Agent. Caries Res. 2011;45(5):443–7. Available from: <https://doi.org/10.1159/000330599>
36. Seseogullari-Dirihan R, Apollonio F, Mazzoni A, Tjäderhane L, Pashley D, Breschi L, et al. Use of crosslinkers to inactivate dentin MMPs. Dent Mater. 2015;32(3):423–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2015.12.012>
37. Burdock GA. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). Food Chem Toxicol. 1998;36(4):347–63. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00145-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00145-2)
38. Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of Propolis on Human Fibroblasts from the Pulp and Periodontal Ligament. J Endo. 2004;30(5):359–61. Available from: <https://doi.org/10.1097/00004770-200405000-00012>
39. Jin U-H, Chung T-W, Kang S-K, Suh S-J, Kim J-K, Chung K-H, et al. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: Isolation and identification. Clin Chim Acta. 2005;362(1–2):57–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.05.009>
40. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie. 1995;26(2):83–99. Available from: <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>
41. Tomás-Barberán FA, García-Viguera C, Vit-Olivier P, Ferreres F, Tomás-Lorente F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. Phytochemistry. 1993;34(1):191–6. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90804-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90804-5)
42. Bruschi ML, Franco SL, Gremião MPD. Application of an HPLC Method for Analysis of Propolis. J Liq Chromatogr Relat Technol. 2003;26(14):2399–409. Available from: <https://doi.org/10.1081/JLC-120023254>
43. De Luca MP, Franca JR, Macedo FAFF, Grenho L, Cortes ME, Faraco AAG, et al. Propolis Varnish: Antimicrobial Properties against Cariogenic Bacteria, Cytotoxicity, and Sustained-Release Profile. Biomed Res Int. 2014;2014:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/348647>
44. Hwu Y-J, Lin F-Y. Effectiveness of Propolis on Oral Health: A Meta-Analysis. J Nurs Res. 2014;22(4):221–30. Available from: <https://doi.org/10.1097/jnr.0000000000000054>

45. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Kooc H. Natural Products in Caries Research: Current (Limited) Knowledge, Challenges and Future Perspective. *Caries Res.* 2011;45(3):243–63. Available from: <https://doi.org/10.1159/000327250>
46. Üstün Y, Arslan S, Aslan T. Effects of calcium hydroxide and propolis intracanal medicaments on bond strength of resin-based endodontic sealer as assessed by push-out test. *Dent Mater J.* 2013;32(6):913–9. Available from: <https://doi.org/10.4012/dmj.2013-094>
47. Chen CL, Parolia A, Pau A, Porto CdeM. Comparative evaluation of the effectiveness of desensitizing agents in dentine tubule occlusion using scanning electron microscopy. *Aust Dent J.* 2015;60(1):65–72. Available from: <https://doi.org/10.1111/adj.12275>
48. Purra AR Mushtaq M, Acharya SR, Saraswati V. A comparative evaluation of propolis and 5.0% potassium nitrate as a dentine desensitizer: A clinical study. *J Indian Soc Periodontol.* 2014;18(4):466. Available from: <https://doi.org/10.4103/0972-124X.138695>
49. Kayaoglu G, Ömürlü H, Akca G, Gürel M, Genay Ö, Sorkun K, et al. Antibacterial activity of propolis versus conventional endodontic disinfectants against enterococcus faecalis in infected dentinal tubules. *J Endod.* 2011;37(3):376–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.11.024>
50. Carbajal JB. Antimicrobial effects of calcium hydroxide, chlorhexidine, and propolis on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *J Investig Clin Dent.* 2014;5(3):194–200. Available from: <https://doi.org/10.1111/jicd.12041>
51. Prabhakar AR, Karuna YM, Yavagal C, Deepak BM. Comparative Evaluation of Shear Bond Strength and Fluoride Release of Conventional Glass Ionomer with 1% Ethanolic Extract of Propolis Incorporated Glass Ionomer Cement – In vitro Study. *Contemp Clin Dent.* 2016;10(5):ZC88-91. Available from: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/17056.7818>
52. Perote LCC, Kamozaiki MBB, Gutierrez NC, Tay FR, Pucci CR. Effect of Matrix Metalloproteinase-inhibiting Solutions and Aging Methods on Dentin Bond Strength. *J Adhes Dent.* 2015;17(4):347–52. Available from: <https://doi.org/10.3290/j.jad.a34594>
53. Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol.* 2000;45(2):141–8. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(99\)00117-X](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(99)00117-X)
54. Vidal CMP, Aguiar TR, Phansalkar R, Mcalpine JB, Napolitano JG, Chen S-N, et al. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta Biomater.* 2014;10(7):3288–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.036>

55. Cabral ISR, Oldoni TLC, Prado A, Bezerra RMN, De Alencar SM, Ikegaki M, et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quim Nov.* 2009;32(6):1523–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600031>
56. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol.* 2007;113:278–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.005>
57. Crovace MC, Souza MT, Chinaglia CR, Peitl O, Zanotto ED. Biosilicate® - A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro, in vivo and clinical trials. *J Non Cryst Solids.* 2016;432:90–110. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnoncrsol.2015.03.022>
58. Rana M, Warraich R, Kokemüller H, Lemound J, Essig H, Tavassol F, et al. Reconstruction of mandibular defects - clinical retrospective research over a 10-year period. *Head Neck Oncol.* 2011;3(23):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1186/1758-3284-3-23>
59. Peitl O, Zanotto ED, Hench LL. Highly bioactive P2O5–Na2O–CaO–SiO2 glass-ceramics. *J Non-Cryst Solids.* 2001;292(1–3):115–26. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(01\)00822-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(01)00822-5)
60. Pires-de-Souza FdeCP, De Marco FF, Casemiro LA, Panzeri H. Desensitizing bioactive agents improves bond strength of indirect resin-cemented restorations: preliminary result. *J Appl Oral Sci.* 2007;15(2):120–6. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1678-77572007000200009>
61. Tirapelli C, Panzeri H, Soares RG, Peitl O, Zanotto ED. A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity. *Braz Oral Res.* 2010;24(4):381–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242010000400002>
62. Tirapelli C, Panzeri H, Lara EHG, Soares RG, Peitl O, Zanotto ED. The effect of a novel crystallised bioactive glass-ceramic powder on dentine hypersensitivity: A long-term clinical study. *J Oral Rehabil.* 2011;38(4):253–62. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2010.02157.x>
63. Araujo MG, Liljenberg B, Lindhe J. Beta-tricalcium phosphate in the early phase of socket healing: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(4):445–54. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01876.x>
64. Varanasi VG, Owyong JB, Saiz E, Marshall SJ, Marshall GW, Loomer PM. The ionic products of bioactive glass particle dissolution enhance periodontal ligament fibroblast osteocalcin expression and enhance early mineralized tissue development. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2011;98 A(2):177–84. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33102>

65. Yang S-Y, Piao Y-Z, Kim S-M, Lee Y-K, Kim K-N, Kim K-M. Acid neutralizing , mechanical and physical properties of pit and fissure sealants containing melt-derived 45S5 bioactive glass. *Dent Mater.* 2013;29(12):1228–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2013.09.007>
66. Martins CHG, Carvalho TC, Souza MGM, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, et al. Assessment of antimicrobial effect of Biosilicat® against anaerobic, microaerophilic and facultative anaerobic microorganisms. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22(6):1439–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-011-4330-7>
67. De Moraes RC, Silveira RE, Chinelatti MA, Pires-de-souza FdeC. Biosilicate as a dentin pretreatment for total-etch and self-etch adhesives: In vitro study. *Int J Adhes Adhes.* 2016;70:271–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2016.07.007>
68. De Moraes RC, Silveira RE, Chinelatti M, Geraldeli S, Pires-de-Souza FdeC. Bond strength of adhesive systems to sound and demineralized dentin treated with bioactive glass ceramic suspension. *Clin Oral Investig.* 2017;22(5):1923–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-017-2283-z>
69. Marquezan M, Corrêa FNP, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol.* 2009;54(12):1111–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.09.007>
70. Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakajima M, Yoshiyama M, Shono Y, et al. The Microtensile Bond Test: A Review. *J Adhes Dent.* 1999;1(4):299–309. Available from: https://www.researchgate.net/publication/11629506_The_microtensile_bond_test_A_review
71. Nakajima M, Kunawarote S, Prasansuttiporn T, Tagami J. Bonding to caries-affected dentine. *Jpn Dent Sci Rev.* 2011;47(2):102–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2011.03.002>
72. Pinna R, Maioli M, Eramo S, Mura I, Milia E. Carious affected dentine: Its behaviour in adhesive bonding. *Aust Dent J.* 2015;60(3):276–93. Available from: <https://doi.org/10.1111/adj.12309>
73. Carvalho RM, Tjäderhane L, Manso AP, Carrilho MR, Carvalho CAR. Dentine as a bonding substrate. *Endod Top.* 2012;21:62-88. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00274.x>
74. Jayasheel A, Niranjana N, Pamidi H, Suryakanth MB. Comparative evaluation of shear bond strength of universal dental adhesives-An in vitro study. *J Clin Exp Dent.* 2017;9(7):e892–6. Available from: <https://doi.org/10.4317/jced.53816>
75. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched

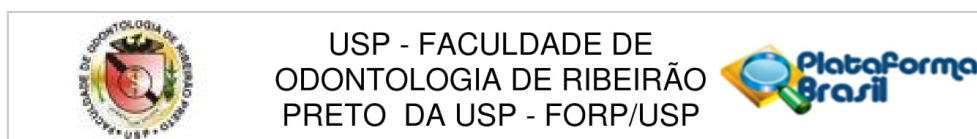
- dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*. 2006;27(25):4470–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.040>
76. Carrilho MRdeO, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater*. 2005;21(3):232–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2004.06.001>
77. Newton APN, Cadena SMSC, Rocha MEM, Carnieri EGS, De Oliveira MBM. New data on biological effects of chlorhexidine: Fe²⁺ induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition. *Toxicol Lett*. 2004;151(3):407–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.02.013>
78. Iskander M, Elkassas D, Mohsen MA. Effect of two matrix metalloproteinase inhibitors on the color stability of a nanofilled resin composite. *Oper Dent*. 2015;40(1):E11–20. Available from: <https://doi.org/10.2341/12-428-L>
79. Say EC, Koray F, Tarim B, Soyman M, Gülmez T. In vitro effect of cavity disinfectants on the bond strength of dentin bonding systems. *Quintessence Int*. 2004;35(1):56–60.
80. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015;94(2):241–51. Available from: <https://doi.org/10.1177/0022034514562833>
81. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Antunes A, Pereira PNR. Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: One-year bond strength study. *Int J Dent*. 2013;2013(918010):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/918010>
82. Suresh M, Madhubala M, Sanjeev K, Sekar M. Clotting Co-Factor and Bees Extract in Dentin Stabilization. *World J Med Sci*. 2014;10(2):204–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.wjms.2014.10.2.82182>
83. Sandri G, Bonferoni MC, D’Autilia F, Rossi S, Ferrari F, Grisoli P, et al. Wound dressings based on silver sulfadiazine solid lipid nanoparticles for tissue repairing. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;84(1):84–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.11.022>
84. Bedran-Russo AKB, Pereira PNR, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of Crosslinkers to Dentin Collagen Enhances the Ultimate Tensile Strength. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2007;80(B):268–72. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30593>
85. Mayworm MAS, Lima CA, Tomba ACB, Fernandes-Silva CC, Salatino MLF, Salatino A. Does propolis contain tannins? Evidence-based Complement Altern Med. 2014;2014(613647):1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/613647>
86. Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al.

- Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability - A literature review. *Dent Mater.* 2016;32(2):e41–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2015.11.007>
87. Edgar S, Hopley B, Genovese L, Sibilla S, Laight D, Shute J. Effects of collagen-derived bioactive peptides and natural antioxidant compounds on proliferation and matrix protein synthesis by cultured normal human dermal fibroblasts. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-28492-w>
 88. Righi AA, Alves TR, Negri G, Marques LM, Breyer H, Salatino A. Brazilian red propolis: Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric.* 2011;91(13):2363–70. Available from: <https://doi.org/10.1002/jsfa.4468>
 89. De Macedo FAA, Souza NO, Lemos MVS, De-Paula DM, Santiago SL, Feitosa VP. Dentin bonding and physicochemical properties of adhesives incorporated with epigallocatechin-3-gallate. *Odontology.* 2019;107(1):23–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10266-018-0367-0>
 90. Du X, Huang X, Huang C, Wang Y, Zhang Y. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive. *J Dent.* 2012;40(6):485–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2012.02.013>
 91. Gotti VB, Feitosa VP, Sauro S, Correr-Sobrinho L, Leale FB, Stansbury JW, et al. Effect of antioxidants on the dentin interface bond stability of adhesives exposed to hydrolytic degradation. *J Adhes Dent.* 2015;17(1):35–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.3290/j.jad.a33515>
 92. Buriol L, Finger D, Schmidt EM, Dos Santos JMT, Da Rosa MR, Quináia SP, et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Quim Nov.* 2009;32(2):296–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000200006>
 93. Pujirahayu N, Ritonga H, Uslinawaty Z. Properties and flavonoids content in propolis of some extraction method of raw propolis. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014;6(6):338–40. Available from: https://www.researchgate.net/publication/267031425_Properties_and_flavonoids_content_in_propolis_of_some_extraction_method_of_raw_propolis
 94. Da Silva KR, Mathias FT, Dutra KA, Kleinubing SD, Santa HSD, Da Rosa MR, et al. Antimicrobial Activity from a Brazilian Propolis Oily Extract Compared with Other Propolis Extracts Atividade Antimicrobiana de Extrato Oleoso de Própolis Brasileira e Comparações com Outros Extratos de Própolis. *Rev Ciênc Exatas e Nat.* 2010;12(2):327–38. Available from: <https://revistas.unicentro.br/index.php/RECEN/article/viewFile/964/1311>
 95. Santana TS, Lima ERN, Silva MS, Wanderley Neto AO. Estudo do sabão de óleo de mamona (*Ricinus communis*) como inibidor de corrosão em fluido salino. *Sci Plena.* 2018;14(6):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.14808/sci.plena.2018.064205>

96. Alugah CI, Ibraheem O. Whole plant screenings for flavonoids and tannins contents in Castor plant (*Ricinus communis* L.) and evaluation of their biological activities. *Int J Herb Med.* 2014;2(2):68–76. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/8e31/a7913db1006484a8997b990622c8cd65de19.pdf>
97. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science.* 2002;295(5557):1014–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1067404>
98. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials.* 2007;28(26):3757–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.044>
99. Brazel CS, Peppas NA. Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers. *Polymer.* 1999;40(12):3383–98. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(98\)00546-1](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00546-1)
100. Hench LL. *An Introduction to Bioceramics.* 2nd ed. London: Imperial College Press; 2013.
101. Vollenweider M, Brunner TJ, Knecht S, Grass RN, Zehnder M, Imfeld T, et al. Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. *Acta Biomater.* 2007;3(6):936–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.04.003>
102. Perdigão J, Kose C, Mena-Serrano A, De Paula E, Tay LY, Reis A, et al. A New Universal Simplified Adhesive: 18-Month Clinical Evaluation. *Oper Dent.* 2014;39(2):113–27. Available from: <https://doi.org/10.2341/13-045-C>
103. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 2011;27(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016>
104. Gabbai-Armelin PR, Cardoso DA, Zanotto ED, Peitl O, Leeuwenburgh SCG, Jansen JA, et al. Injectable composites based on biosilicate® and alginate: Handling and in vitro characterization. *RSC Adv.* 2014;4(86):45778–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA07522F>
105. Preston KP, Smith PW, Higham SM. The influence of varying fluoride concentrations on in vitro remineralisation of artificial dentinal lesions with differing lesion morphologies. *Arch Oral Biol.* 2008;53(1):20–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.08.001>
106. Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc.* 2003;69(11):726–31. Available from: <http://www.cda-adc.ca/jcda/vol-69/issue-11/726.pdf>

-
107. Patel MP, Johnstone MB, Hughes FJ, Braden M. The effect of two hydrophilic monomers on the water uptake of a heterocyclic methacrylate system. *Biomaterials*. 2000;22(1):81–6. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00171-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00171-X)
108. Nishiyama N, Suzuki K, Yoshida H, Teshima H, Nemoto K. Hydrolytic stability of methacrylamide in acidic aqueous solution. *Biomaterials*. 2004;25(6):965–9. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00616-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00616-1)
109. Tay FR, Pashley DH. Water treeing--a potential mechanism for degradation of dentin adhesives. *Am J Dent*. 2003;16(1):6–12.
110. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*. 2003;82(2):136–40. Available from: <https://doi.org/10.1177/154405910308200212>
111. Ahmed R, Tanvir EM, Hossen MS, Afroz R, Ahmmed I, Rumpa N-E-N, et al. Antioxidant properties and cardioprotective mechanism of Malaysian propolis in rats. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2017;2017(5370545):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/5370545>
112. Efraim P, Alves AB, Jardim DCP. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. *Brazilian J Food Technol*. 2011;14(3):181–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.4260/BJFT2011140300023>.
113. Alexandre RS, Sundfeld RH, Giannini M, Lovadino JR. The influence of temperature of three adhesive systems on bonding to ground enamel. *Oper Dent*. 2008;33(3):272–81. Available from: <https://doi.org/10.2341/07-79>
114. Kahveci O, Belli S. Composite bond strength to intact enamel with current simplified adhesives. *J Adhes Dent*. 2011;13(1):31–7. Available from: 10.3290/j.jad.a18514
115. Dursun E, Le Goff S, Ruse DN, Attal JP. Effect of chlorhexidine application on the long-term shear bond strength to dentin of a resin-modified glass ionomer. *Oper Dent*. 2013;38(3):275–81. Available from: <https://doi.org/10.2341/11-501-L>
116. Joves GJ, Inoue G, Nakashima S, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Mineral density, morphology and bond strength of natural versus artificial caries-affected dentin. *Dent Mater J*. 2013;32(1):138–43. Available from: <https://doi.org/10.4012/dmj.2012-243>

Anexos

ANEXO (Continua) - Comitê de ética (número de processo e aprovação).**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Efeito do uso de vitrocerâmica bioativa associada a primers naturais na interface dentina-adesivo

Pesquisador: Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 78665717.1.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.372.726

Apresentação do Projeto:

O projeto foi estruturado adequadamente, composto por um marco teórico sustentado por bibliografia pertinente ao assunto, objetivos claros e metodologia detalhada.

Todos os documentos exigidos foram apresentados devidamente.

Objetivo da Pesquisa:

Foram propostos de forma clara.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos humanos envolvidos uma vez que serão utilizados dentes extraídos.

Sobre os benefícios, os resultados da pesquisa poderão contribuir para aumentar a longevidade das restaurações em resina composta, diminuindo a taxa de substituição de restaurações dentais.

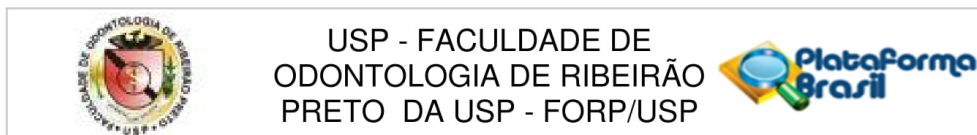
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a declarar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado de forma correta o Termo de Compromisso de Citação do Biobanco de Dentes da FORP/USP, como provedor dos dentes que irão ser utilizados na pesquisa.

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

ANEXO (Continuação) - Comitê de ética (número de processo e aprovação).

Continuação do Parecer: 2.372.726

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado "ad referendum".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1004226.pdf	28/09/2017 09:45:00		Aceito
Outros	Despacho.pdf	28/09/2017 09:42:58	Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza	Aceito
Outros	Solicitacao_Banco_de_Dentes.pdf	28/09/2017 09:28:34	Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza	Aceito
Outros	Declaracao_Banco_de_dentes.pdf	28/09/2017 09:27:43	Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_citacao.pdf	28/09/2017 09:23:51	Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_infraestrutura.pdf	28/09/2017 09:22:48	Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	28/09/2017 09:22:04	Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	26/09/2017 11:01:32	Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza	Aceito

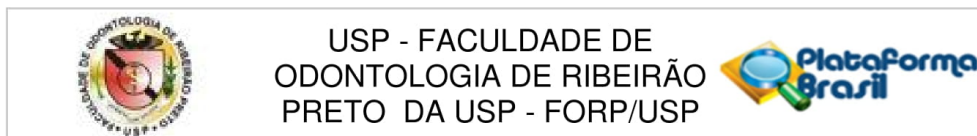
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida do Café s/nº
 Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br

ANEXO (Conclusão) - Comitê de ética (número de processo e aprovação).

Continuação do Parecer: 2.372.726

RIBEIRAO PRETO, 09 de Novembro de 2017

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

Página 03 de 03