



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL

Trabalho de Conclusão de Curso

Pesquisa científica

**Análise da resistência de união de dentina/resina após
aplicação de um primer experimental contendo nanopartículas
de Quitosana**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Borsato

Orientado: Heitor Silva Prado

Ribeirão Preto

2019



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL

Trabalho de Conclusão de Curso

Pesquisa científica

Análise da resistência de união de dentina/resina após aplicação de um primer experimental contendo nanopartículas de Quitosana

Projeto de pesquisa apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP para apreciação na categoria de Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Cirurgião Dentista

Ribeirão Preto

2019

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 03 |
| 2 OBJETIVO..... | 05 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 05 |
| 3.1 Delineamento Experimental..... | 05 |
| 3.2 Preparação dos Primers Experimentais contendo NLS de Quitosana..... | 06 |
| 3.3 Procedimentos Restauradores..... | 07 |
| 3.4 Resistência a Microtração de Resina-Dentina..... | 07 |
| 3.5 Análise Estatística..... | 07 |
| 3.6 Análise Qualitativa..... | 07 |
| 4 RESULTADOS..... | 08 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 11 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 12 |
| 7 REFERENCIAS..... | 12 |

1. Introdução

A complexidade da estrutura dentinária, pode dificultar a adesão de materiais restauradores, sendo esse fato um desafio clínico que pode influenciar na estabilidade funcional das estrutural das restaurações e reabilitações dentárias (Tjärderhane, 2015). A adesão entre a resina e o tecido dentinário ocorre por meio do estabelecimento da camada híbrida, formada pela união mecânica entre monômeros hidrofílicos, hidrofóbicos e fibras colágenas (Opdam et al., 2014; Nakabayashi e Takarada, 1982). Esta força de união pode estar sujeita a micro infiltrações e nano infiltrações, se tornando um desafio clínico, pois é um tecido de composição heterogênea, com alto conteúdo orgânico e presença de umidade. (Y. Liu, L. Tjärderhane, L. Breschi et al, 2011).

A micro-infiltração é resultante da falha na adaptação entre o sistema adesivo e as paredes da cavidade, formando lacunas microscópicas que permitem a recorrência de cárie (Pashley, 1990). Já a nano-infiltração ocorre por uma imprecisão entre a camada híbrida e a dentina mineralizada que com o decorrer do tempo leva a degradação da interface dentina-resina (Hashimoto, m, 2000). A degradação dos componentes dessa união ocorre pela atuação conjunta da água e de enzimas proteolíticas como as Metaloproteinases de Matriz (MMPs) ou por fontes exógenas como bactérias e saliva (Sanabe, 2009; Campos et al., 2009; Carrilho et al., 2007; Hashimoto et al., 2003; Martin-de Las Heras et al., 2000 ; Pereira et al. ,2006).

As MMPs são endopeptidases cálcio-zinco dependentes que degradam os componentes da matriz extracelular, secretadas como precursores inativos que necessitam de ativação para exercer degradação em um substrato. (Visse e Nagase, 2003). Essa ativação pode se dar pela queda de pH, o que ocorre durante a desmineralização superficial da dentina, um passo fundamental no processo de adesão de polímeros resinosos, ocorrendo previamente a aplicação de um sistema adesivo, sendo este, convencional ou auto condicionante.

A ação dessas enzimas compromete a longevidade da união restauração-dentina, a qual depende da integridade estrutural e das propriedades mecânicas do colágeno. Alguns estudos buscam a incorporação aos sistemas adesivos de compostos com potencial para inibição das MMPs, como a clorexidina (CHX) e a epigallocatequina galato (EGCg), estes agentes mimetizam a ação de inibidores teciduais naturais preservando a integridade do colágeno na presença dessas enzimas proteolíticas (Tjärderhane, 2015; Carrilho et al., 2009; Sulkala et al., 2007; Sulkala et al., 2002;

Mazzoni et al., 2006; Pashley et al., 2004; De Munk et al., 2003; Tekçe et al., 2016; Boushell et al., 2011; Kato et al., 2011).

Dentre esses compostos utilizados, toma-se nota da Quitosana, um polímero natural biocompatível produzida a partir da desacetilação da quitina, um componente da estrutura do exoesqueleto de artrópodes e encontrada também em diatomáceas, algas e paredes celulares de alguns fungos (Tangsadthakun et al., 2007). Dentre suas inúmeras propriedades biológicas destaca-se sua capacidade antioxidante e antimicrobiana (Elsaka e Elnaghy, 2012). Com base no exposto acima, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resistência de união do conjunto dentina/resina após a aplicação de um primer experimental contendo nanopartículas de quitosana.

2. Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a resistência de união do conjunto dentina/resina após a aplicação de um primer experimental contendo nanopartículas de quitosana.

3. Material e Métodos

3.1. Delineamento Experimental

Os Primers Experimentais contendo Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) de Quitosana foram sintetizados através de uma emulsão seguida de sonicação. A partir dessas concentrações obtidas em estudos microbiológicos e baseado em estudo contido na literatura (Loguercio et al., 2016), os grupos experimentais foram alocados da seguinte forma: G1: sem aplicação de Primer (controle negativo), G2: Aplicação de Primer contendo Clorexidina 2% (controle positivo), G3: Aplicação de Primer contendo NLS de Quitosana 2%, G4: Aplicação de Primer contendo NLS de Quitosana 0.6%, G5: Aplicação de Primer contendo NLS de Quitosana 0.4%. Após isso foi realizado o procedimento restaurador sobre o espécime de dentina planejado, onde foram realizadas secções expondo a interface dentina-resina, os quais foram submetidos ao teste de Resistência a Microtração.

3.2 Preparação dos Primers Experimentais contendo NLS de Quitosana

A formulação dos Primers Experimentais contendo NLS de Quitosana se deu por meio da confecção de uma emulsão seguida de um processo de sonicação. Na primeira fase do processo, foi preparada uma solução contendo Quitosana de baixo peso molecular (CAS: 9012764 Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) a 6.6 mg/ml, Ácido Acético Glacial PAACS (Labysinth, São Paulo, Brasil) e água deionizada. Desse modo 10 ml dessa solução, foi diluída em 10 ml de água deionizada e acrescentado 0.5% de Pluoronic F68 (Sigma Aldrich, Germany).

A segunda fase desse processo se dá por meio da fase oleosa, onde utilizou-se Manteiga de Illipe. O processo se deu por meio do aquecimento das duas fases a 60°C separadamente. Após atingir essa temperatura, a solução aquosa foi adicionada à fase oleosa a 1%, sendo então essa emulsão sonicada por 10 minutos em uma temperatura de 48°C e amplitude de 40% (SonicsVCX750, USA). As NLS de Quitosana foram formados após o resfriamento da dispersão até 25 °C.

3.3. Procedimentos Restauradores

Após aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética (CAAE: 85389417.5.0000.5419, 50 molares humanos hígidos recém-extraídos foram coletados junto ao Biobanco de dentes humanos da unidade FORP-USP, limpos e armazenados à temperatura de -2º C até o uso. As porções radiculares e os terços oclusais foram seccionados utilizando disco diamantado (Struers, A/S, Dinamarca) sob refrigeração em cortadeira metalográfica (Struers, A/S, Dinamarca). Após isso, as superfícies dentinárias foram polidas por 20 segundos, utilizando lixas d'água de granulação #400, #600 e #1200 montadas em uma Politriz (Aropol 2V, Arotec Indústria e Comércio, São Paulo, Brasil) obtendo superfícies planas e lisas de dentina. Após isso, a superfícies dentinárias foram avaliadas em lupa estereoscópica (Carls Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com o aumento de 40 x para assegurar que o esmalte foi totalmente removido. Finalizando essa etapa os dentes permaneceram em água deionizada a 4º C durante 24 horas.

Um protocolo de adesão total foi selecionado utilizando Ácido Fosfórico a 35% (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) por 15 s, seguido de pela aplicação ativa do Adper Single Bond Plus (3M ESPE, St.Paul, MN, EUA - N561025) nas superfícies dentinária por 15 s. Então, jatos de ar suaves foram aplicados para remover o excesso de solvente, e o adesivo foi fotopolimerizado por 20s usando um Fotopolimerizador Ultralux (Dabi Atlante S/A Ind. Médico Odontológicas, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os Primers experimentais

foram utilizados após a etapa de condicionamento ácido, como segue: CHX 2% (Controle positivo), NLS de Quitosana 2%, NLS de Quitosana 0.4% e NLS de Quitosana 0.6%, os primers foram aplicados nas preparações por 60 s, enxaguados por 60 s e o excesso de água removido com papel absorvente (Kimwipes, Kimberly Clark, Irving, TX, EUA).

A seguir os dentes foram restaurados com resina composta X350 XT cor A2 (3M Dental Products, St. Paul, MN, EUA), sendo confeccionado um platô de resina com 4 mm de altura, aplicado em 4 incrementos de 1 mm cada, e fotopolimerizados (Fotopolimerizador Ultralux, Dabi Atlante S/A Ind. Médico Odontológicas, Ribeirão Preto, SP, Brasil) durante 20 segundos após cada inserção de modo contínuo.

3.4. Resistência a Microtração de Resina-Dentina

Para a realização deste teste os corpos de prova foram cortados com disco de diamante (Buehler – Series 15 LC Diamond, Buehler, Lake Buff, IL, USA) montado em máquina de corte ISOMET (Buehler, Illinois, USA) em formato de palito (0,8 x 0,8 mm), de acordo com a técnica de teste de microtração non-trimming (Pashley et al., 1999). Os palitos (n=6) foram adaptados em um dispositivo metálico, composto de duas partes cilíndricas. Foram fixados no centro do dispositivo com éster de cianoacrilato gel (Super Bonder Flex Gel, Henkel Loctite Ltda., São Paulo, Brasil), na união entre as duas partes do dispositivo. Cada segmento foi, então, acoplado às extremidades da Máquina de Teste Universal (Emic - Model 1L-2000, São José dos Pinhais, PR, BR) sendo realizado o teste à velocidade de 0,5 mm/min.

3.5. Análise Estatística

Para a análise de Microtração foi utilizada a análise de variância (ANOVA) “one way” (p=0,9054), seguido do teste de Tukey. Foi utilizado o Software R Core Team (2018), adotando nível de significância de 95%

3.6. Análise Qualitativa

Foi utilizada para a análise qualitativa do tipo de fratura por Microtração, imagens obtidas por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Evo 10 Zeiss de todas as amostras de concentração.

4. Resultados

A análise exploratória indicou que os dados atendem as pressuposições de uma análise paramétrica. Foi então aplicada análise de variância (ANOVA) “one way”, considerando o nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no programa R.

Na tabela 1 pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos quanto à Resistência a Microtração ($p=0,9054$).

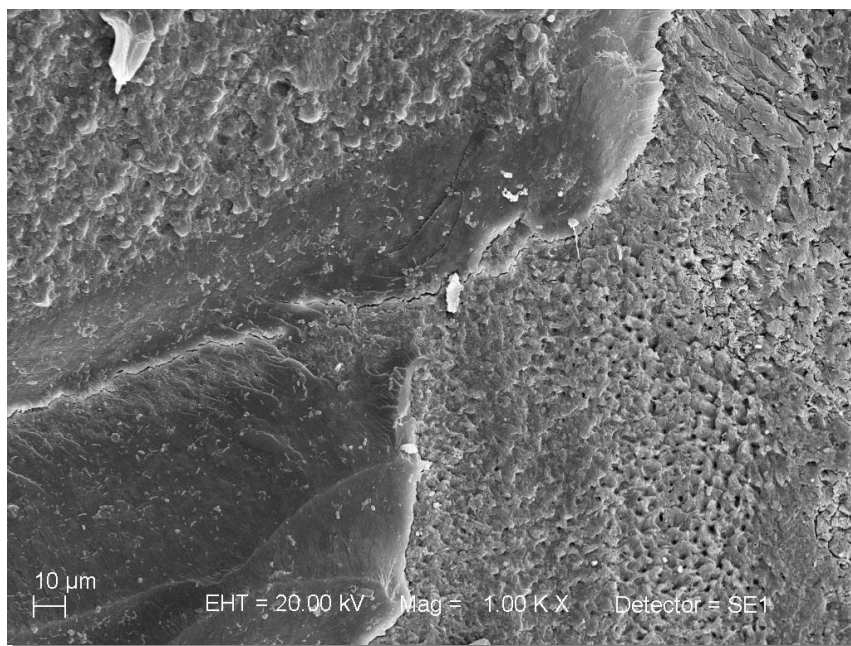
Tabela 1. Média (desvio padrão) da resistência a microtração (Mpa) em função dos grupos de estudo.

| Grupo | Média (desvio padrão) |
|----------------|-----------------------|
| Controle | 33,46 (7,05) a |
| CHX | 32,12 (8,08) a |
| Quit 2% | 32,31 (6,09) a |
| Quit 0,6% | 31,59 (5,68) a |
| Quit 0,4% | 30,46 (7,08) a |
| p-valor | 0,9054 |

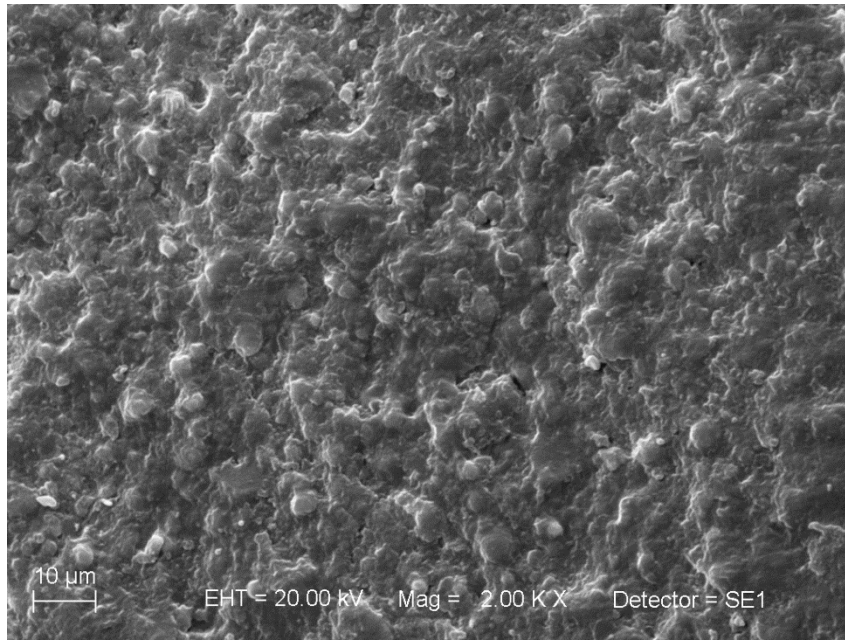
Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si ($p>0,05$)

Segue alguns exemplos das concentrações do primer e dos controles, em diferentes aumentos:

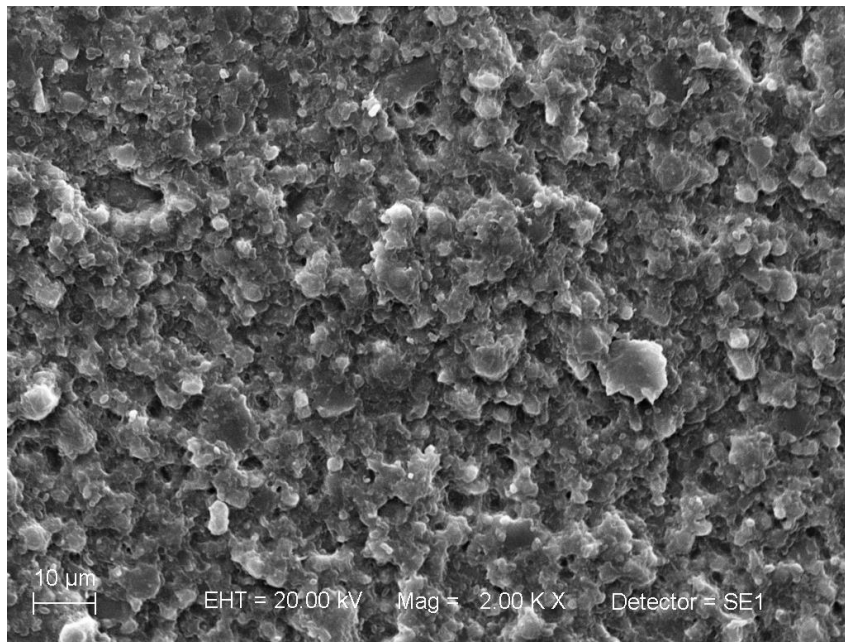
- **Imagem da Concentração 0,4:**



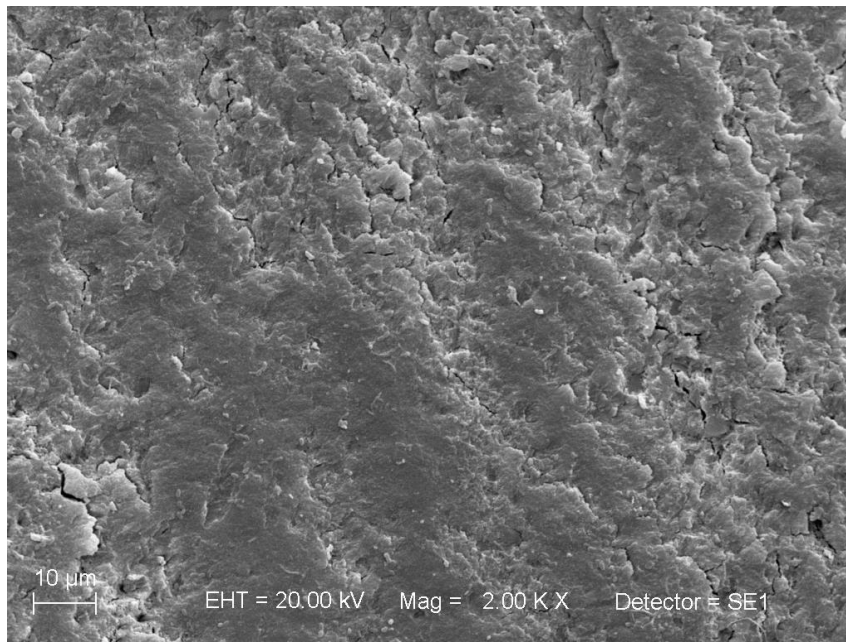
- **Imagem da Concentração 0,6**



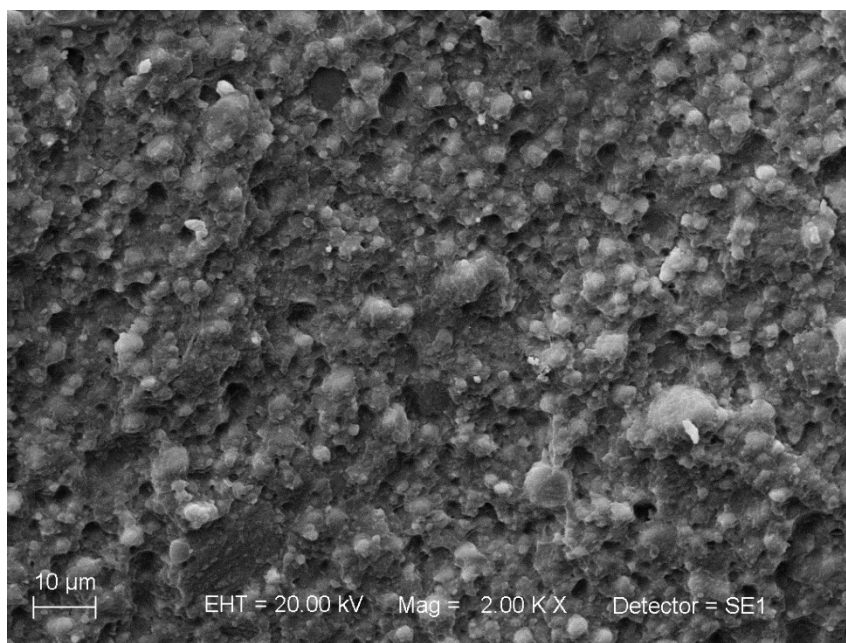
- **Imagem da Concentração 2.0**



- **Imagem do Controle +**



- **Imagem do Controle -**



5. Discussão

A constante evolução do desenvolvimento de novos Biomateriais tem sido uma grande evolução na área médico-odontológica, abrangendo áreas específicas como engenharia tecidual (Jahan et al., 2018; Hashmi et al., 2017; Gong et al., 2016), controle de microrganismos (Parsa et al., 2018; Ye et al., 2018; Wang et al., 2018) e adesão de

materiais poliméricos ao substrato dentário (Altinci et al., 2018; Huang et al., 2018; Serkies et al., 2016). Essa síntese de novos materiais tem sido benéfica e amplamente estudada na atualidade, gerando resultados positivo, e até mesmo novas perspectivas comerciais (Maravik et al., 2018; Altinci et al., 2018; Altinci et al., 2017 Tekçe et al., 2016; Boushell et al., 2011; Kato et al., 2011)

Dentro do contexto de adesão, uma das principais investigações é a de síntese e caracterização de produtos capazes de inibir MMPs, a qual possui o potencial, quando em atividade, de degradar algumas estruturas da interface e principalmente a estrutura colágena da dentina (Tekçe et al., 2016; Boushell et al., 2011; Kato et al., 2011). Essa degradação pode levar ao enfraquecimento da camada híbrida, formando ``gaps`` na interface dentina-resina, podendo gerar o deslocamento do material presente dentro da cavidade dentária, necessitando assim, de um novo procedimento restaurador (Altinci et al., 2016; Loguercio, 2016; Tjäderhane et al., 2015; Tjäderhane et al., 2013).

Desse modo, os primers experimentais têm sido desenvolvidos com o objetivo da inativação de MMPs, preservando a integridade da camada híbrida do sistema resina- dentina (Loguercio et al., 2016; Silva Sousa et al., 2016). Foram desenvolvidos primers contendo Cloreto de benzalcônio (Sabatini & Patel, 2013, Sabatini & Pashley, 2015), Fluoreto de Sódio (Altinci et al., 2016), Clorexidina (Loguercio et al., 2016; Carrilho et al., 2007a, B, Breschi et al., 2010), Galardin (Breschi et al., 2010) e associações com Doxiciclina (Silva Sousa et al., 2016).

Dentre essas partículas, a quitosana apresenta propriedades altamente importantes para a integridade da camada híbrida, como seu potencial antimicrobiano, podendo dessa forma garantir que o pH da região não permaneça ácido implicando na degradação das estruturas. Além disso, apresenta-se como um agente reticulador de colágeno, podendo devolver integridade a estrutura colágena da dentina. (Kishen et al., 2016; Gu et al., 2018; Imani et al., 2018; Elsaka et al., 2012)

O presente estudo teve como objetivo avaliar resistência de união após a aplicação de um primer experimental contendo nanopartículas de quitosana sobre a superfície dentinária condicionada por meio da análise de Resistência a Microtração. O resultado das medias dos grupos experimentais, não apresentou diferença estatística para nenhum grupo experimental analisado ($p=0,9054$), podendo ser explicado pelo fato das partículas estarem na escala nanométrica de tamanho não interferindo assim, no escoamento do adesivo nos túbulos dentinários, proporcionando uma retenção mecânica adequada, semelhante ao grupo controle (Elsaka et al., 2012; Kishen et al., 2016; Loguercio et al., 2016). Nesse estudo, foi analisado apenas o tempo inicial, sendo

o benefício a não interferência das partículas na formação de uma camada híbrida adequada, onde essas poderiam impedir o escoamento do sistema adesivo para o interior dos túbulos dentinário.

Com base no exposto acima, pode-se concluir que a aplicação do primer experimental não altera a resistência de união do conjunto resina/dentina, mantendo assim a integridade da camada híbrida.

6. Conclusão

Conclui-se que a aplicação do primer experimental não altera a resistência de união do conjunto resina/dentina, mantendo assim a integridade da camada híbrida.

7. Referencias

1. Altinci P, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, Pashley D, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A. NaF Inhibits Matrix-Bound Cathepsin-Mediated Dentin Matrix Degradation. *Caries Res.* 2016;50(2):124-32. doi: 10.1159/000444222.
2. Altinci P, Mutluay M, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A Effect of calcium fluoride on the activity of dentin matrix-bound enzymes. *Arch Oral Biol.* 2018 Sep 11;96:162-168. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.09.006.
3. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Yamauchi M. Distribution and relative activity of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Int J Oral Sci.* 2011 (4):192-9.
4. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Visintini E, Cadenaro M, Tay FR, De Stefano Dorigo E, Pashley DH. Use of a specific MMP-inhibitor (Galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater* 2010;26:571–8.
5. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, Ruggeri A Jr, Tay FR, Dorigo E, Pashley D. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year in vitro study. *Dental Materials* 2010;26(4):320-325.
6. Campos, E. A. et al. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *Journal of dentistry*,2009; 2(37):108–114.

7. Carrilho, M. R. O. et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *Journal of Dental Research*, 2007; (86): 90–94.
8. Chaussain-Miller, C. et al. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *Journal of Dental Research*, 2006; (85): 22–32.
9. Pashley D. H, F. R. Tay, C. Yiu et al., “Collagen degradation by host-derived enzymes during aging,” *Journal of Dental Research*, vol. 83, no. 3, pp. 216–221, 2004.
10. Pashley D. H., F. R. Tay, L. Breschi et al., “State of the art etch-and-rinse adhesives,” *Dental Materials*, vol. 27, no. 1, pp. 1–16, 2011.
11. Elsaka SE, Elnaghy AM. Antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chitosan solutions and the outcomes on the bond strength of RealSeal sealer to radicular dentin. *J Biomed Res*. 2012 (3):193-9.
12. Fawzy et al. Chitosan/Riboflavin-modified demineralized dentin as a potential substrate for bonding. *journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 2013; (17): 278–289.
13. Gong T, Heng BC, Lo EC, Zhang C. Current Advance and Future Prospects of Tissue Engineering Approach to Dentin/Pulp Regenerative Therapy. *Stem Cells Int*. 2016;2016:9204574. doi: 10.1155/2016/9204574.
14. Gu LS, Cai X, Guo JM, Pashley DH, Breschi L, Xu HHK, Wang XY, Tay FR, Niu LN. Chitosan-Based Extrafibrillar Demineralization for Dentin Bonding. *J Dent Res*. 2018 Oct 16;22034518805419. doi: 10.1177/0022034518805419.
15. Hashimoto, M. et al. In vitro degradation of resin–dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials*, 2003; 21(24): 3795–3803.
16. Hashimoto, M. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *Journal of Dental Research*, Estados Unidos, 2000, jun; 6(79):1385-1391.
17. Hashmi B, Mammoto T, Weaver J, Ferrante T, Jiang A, Jiang E, Feliz J, Ingber DE. Mechanical induction of dentin-like differentiation by adult mouse bone marrow stromal cells using compressive scaffolds. *Stem Cell Res*. 2017 Oct;24:55-60. doi: 10.1016/j.scr.2017.08.011.
18. Hebling. J.; Pashley, D.H.; Tjäderhane, L.; Tay, F.R. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005;84:741–746.
19. Huang Z, Qi Y, Zhang K, Gu L, Guo J, Wang R, Mai S. Use of experimental-resin-based materials doped with carboxymethyl chitosan and calcium phosphate microfillers to induce biomimetic remineralization of caries-affected dentin. *J*

- Mech Behav Biomed Mater. 2019 Jan;89:81-88. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.09.008.
20. Jahan K, Mekhail M, Tabrizian M. One-step fabrication of apatite-chitosan scaffold as a potential injectable construct for bone tissue engineering. *Carbohydr Polym.* 2019 Jan 1;203:60-70. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.09.017
 21. Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, Carrilho M, Tjäderhane L, Buzalaf MA. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Caries Res.* 2011;45(5):429-34.
 22. Kishen A, Shrestha S, Shrestha A, Cheng C, Goh C. Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. *Dent Mater.* 2016 Aug;32(8):968-77. doi: 10.1016/j.dental.2016.05.005.
 23. Loguercio AD, Hass V, Gutierrez MF, Luque-Martinez IV, Szezs A, Stanislawczuk R, Bandeca MC, Reis A. Five-year Effects of Chlorhexidine on the In Vitro Durability of Resin/Dentin Interfaces. *J Adhes Dent.* 2016;18(1):35-42. doi: 10.3290/j.jad.a35514.
 24. Lotfi, m.; Naceur, m.; Nejib, m. Cell Adhesion to Biomaterials: Concept of Biocompatibility. [s.l.] INTECH Open Access Publisher, 2013.
 25. Martin-De Las Heras, S.; Valenzuela, A.; Overall, C. M. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Archives of Oral Biology*, 2000; 9(45): 757–765.
 26. Nakabayashi, N.; Takarada, K. Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dental Materials*, Inglaterra , 1982,mar-abr, 6(8): 125-130.
 27. Opdam N, van de Sande F, Bronkhorst E, Bottenberg P, Cenci M, Gaengler P, et al. Longevity of posterior composite restorations: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*, 93 (2014), pp. 943–949.
 28. Parsa P, Paydayesh A, Davachi SM. Investigating the effect of tetracycline addition on nanocomposite hydrogels based on polyvinyl alcohol and chitosan nanoparticles for specific medical applications. *Int J Biol Macromol.* 2018 Oct 17. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.074.
 29. Pashley, D. H. Clinical considerations of microleakage. *Journal of Endodontics*, Estados Unidos, 1990, mar: 2(16): 70-77.
 30. Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakajima M, Yoshijama M, Shono Y, Fernandes CA, Tay FR. The microtensile bond test: a review. *J Adhes Dent* 1999;1:299-309.
 31. Pashley, D. H. et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *Journal of Dental Research*, Estados Unidos, mar; 2004; 3(83): 216-21.

32. Pereira, P. N. et al. Bond strengths of a 1-step self-etching system to caries-affected and normal dentin. *Operative dentistry*, 2006. 6(31): 677–681.
33. Pessoa JIC, Guimarães GN, Viola NV, Silva WJ, Souza AP, Tjäderhane L, Line SR, Marques MR. In situ study of the gelatinase activity in demineralized dentin from rat molar teeth. *Acta Histochemica* 2013;115(3),245–251.
34. Sabatini C, Pashley DH. Mechanisms regulating the degradation of dentin matrices by endogenous dentin proteases and their role in dental adhesion. A review. *Am J Dent*. 2014 (4):203-14.
35. Sabatini C, Patel SK. Matrix metalloproteinase inhibitory properties of benzalkonium chloride stabilizes adhesive interfaces. *Eur J Oral Sci*. 2013 (6):610-6.
36. Sanabe, M. E. Efeito da inibição de metaloproteinases da matriz dentinária na produção e estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie. 2009. 122 f. Tese (Doutorado) - Curso de Odontologia, Universidade Estadual Paulista "júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2009.
37. Scaffa, P.M.; Vidal, C.M.; Barros, N.; Gesteira, T.F.; Carmona, A.K.; Breschi, L.; Pashley, D.H.; Tjäderhane, L.; Tersariol, I.L.; Nascimento, F.D.; Carrilho, M.R. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res* 2012;91(4):420-5.
38. Serkies KB, Garcha R, Tam LE, De Souza GM, Finer Y. Matrix metalloproteinase inhibitor modulates esterase-catalyzed degradation of resin-dentin interfaces. *Dent Mater*. 2016 Dec;32(12):1513-1523. doi: 10.1016/j.dental.2016.09.007.
39. Silva Sousa AB, Vidal CMP, Leme-Kraus AA, Pires-de-Souza FCP, Bedran-Russo AK. Experimental primers containing synthetic and natural compounds reduce enzymatic activity at the dentin-adhesive interface under cyclic loading. *Dent Mater*. 2016 Oct;32(10):1248-1255. doi: 10.1016/j.dental.2016.07.012.
40. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *J Dent* 2011;39:40–7.
41. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res* 2002;81(9):603-7.
42. 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;52:121–127
43. Tangsadthakun C, Kanokpanont S, Sanchavanakit N, Pichyangkura R, Banaprasert T, Tabata Y, Damrongsakkul S. The influence of molecular weight

- of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2007;18(2):147-63
44. Tavaría, F. K. et al. Chitosan as a dental biomaterial: state of the art. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, 2013; (29): 110–120.
 45. Tekçe N , Tuncer S, Demirci M, Balci S. Do Matrix Metalloproteinase Inhibitors Improve the Bond Durability of Universal Dental Adhesives? *Scanning* 2016 (9999) 1-10.
 46. Tekçe N , Tuncer S, Demirci M, Balci S. Do Matrix Metalloproteinase Inhibitors Improve the Bond Durability of Universal Dental Adhesives? *Scanning* 2016 (9999) 1-10.
 47. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho M, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer - A review. *Dent Mater* 2013;29(10):999-1011.
 48. Tjäderhane L. Dentin Bonding : Can We Make it Last? *Operative Dentistry* 2015;4–18
 49. Visse, R.; Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circulation research*, 2003; 8(92): 827–839.
 50. Y. Nishitani, M. Yoshiyama, B. Wadgaonkar Et Al., “Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives,” *European Journal of Oral Sciences*, vol. 114, no. 2, pp. 160–166, 2006.
 51. Ye H, Cheng J, Yu K. In situ reduction of silver nanoparticles by gelatin to obtain porous silver nanoparticle/chitosan composites with enhanced antimicrobial and wound-healing activity. *Int J Biol Macromol.* 2018 Oct 13;121:633-642. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.056
 52. Zhou J, Tan J, Yang X, Xu X, Li D, Chen L. MMP-inhibitory effect of chlorhexidine applied in a self-etching adhesive. *J Adhes Dent* 2011;13(2):111-5.