



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Wilfredo Gustavo Escalante Otárola

Efeitos do fosfato ou silicato de cálcio no substrato dentinário erodido e nas propriedades do sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond

Araraquara

2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Wilfredo Gustavo Escalante Otárola

Efeitos do fosfato ou silicato de cálcio no substrato dentinário erodido e nas propriedades do sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Milton Carlos Kuga

Araraquara

2020

Escalante Otárola, Wilfredo Gustavo

Efeitos do fosfato ou silicato de cálcio no substrato dentinário erodido e nas propriedades do sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond / Wilfredo Gustavo Escalante Otárola -- Araraquara: [s.n.], 2020
97 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Milton Carlos Kuga

1. Dentina 2. Erosão dentária 3. Microscopia eletrônica de varredura 4. Microscopia de polarização
5. Remineralização dentária 6. Adesivos dentinários
I. Título

Wilfredo Gustavo Escalante Otárola

Efeitos do fosfato ou silicato de cálcio no substrato dentinário erodido e nas propriedades do sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Presidente e orientador: Prof. Dr. Milton Carlos Kuga

2º Examinador: Prof. Dr. Edson Alves de Campos

3º Examinador: Prof. Dr. Oscar Fernando Muñoz Chávez

4º Examinador: Profa. Dra. Juliana Jendiroba Faraoni

5º Examinador: Prof. Dr. Eduardo Maximiliano Fernández Godoy

Araraquara, 25 de março de 2020

DADOS CURRICULARES

Wilfredo Gustavo Escalante Otárola

NASCIMENTO: 15.09.1984 – Lima – Perú

FILIAÇÃO: Wilfredo Ettore Escalante Alcocer

Julia Maximina Otárola Tarazona

2002 – 2006	Graduação em Odontologia na Universidade Católica de Santa Maria (UCSM), Arequipa – Perú
2007 – 2008	Serviço Rural Urbano Marginal de Saúde SERUMS no Ministério de Saúde MINSA, Arequipa – Perú
2008 – 2009	Aperfeiçoamento em Cirurgia e Radiologia Oral no Hospital Militar Regional do Sul, Arequipa – Perú
2010 – 2010	Estagio em Estomatopatologia na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
2010 – 2012	Pós-graduação em Docência Universitária e Gestão Educativa na Universidade Alas Peruanas UAP, Arequipa – Perú
2012 – 2013	Especialização em Periodontia e Implantodontia na Universidade Católica de Santa Maria UCSM, Arequipa – Perú
2014 – 2016	Pós-graduação em Odontologia – Área de Periodontia, Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – Unesp
2015 e 2018	Mobilidade de Pós-graduação – Área de Periodontia, na Faculdade de Odontologia da Universidade Nacional do Nordeste FOUNNE, Corrientes – Argentina
2016 – 2020	Pós-graduação em Odontologia – Área de Periodontia, Nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – Unesp

ASSOCIAÇÕES SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia

A **Dios**,

por protegernos durante estos seis años en Brasil, por darnos salud y siempre poner a las personas indicadas en nuestro camino.

A toda mi familia, en especial a mi esposa **Gabriela**,

por tu amor y apoyo incondicional; como ya lo dije antes, ni este trabajo, ni este doctorado, ni estos años lejos de casa hubieran sido tan llevaderos sin tenerte a mi lado. Gracias por tu paciencia y comprensión, cada día a tu lado aprendo a ser una mejor persona... ¡Te amo!

a mis padres **Wilfredo y Julia**,

por el amor y buen ejemplo que siempre me dieron, si soy una buena persona solo es debido a que ustedes me lo enseñaron, espero nunca defraudarlos;

a mi hermana **Maria** y mis sobrinos **Nicolás y Ángel**,

su amor y cariño hacen que sea consciente de que la distancia no es una barrera real para el amor familiar;

y a mi abuela **Julia**,

por ser un gran ejemplo de amor, lealtad y fortaleza, te deseo mucha salud para que sigas enseñándonos por mucho tiempo más.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

A mi orientador, **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga**,
por el gran apoyo que me dió desde el inicio, usted tuvo fe en mi desde antes de conocerme y me enseñó que un verdadero maestro es para siempre porque enseña con ejemplo y motivación; de la misma manera me brindó su amistad incondicional y se convirtió en ese gran amigo que siempre está dispuesto a darnos una mano y un buen consejo; definitivamente fuimos muy afortunados de que Dios lo haya puesto en nuestro camino, muchas gracias por todo.

A mi **Tío Orestes Escalante Torres**,
por ser mi maestro de la vida, fuiste el que me enseñó la pasión por la Odontología y a pesar de la diferencia de edades, fuiste un gran amigo para mí, un beso hasta el cielo.

AGRADECIMENTOS

A la **Facultad de Odontología de Araraquara – Unesp** , en las personas de su Director **Prof. Dr. Edson Alves de Campos** y su Vicedirectora **Profa. Dra. Patricia Garcia**, por la infraestructura necesaria para la ejecución de este trabajo.

Al **Programa de Posgrado en Odontología de la Facultad de Odontología de Araraquara**, representado por el **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli**, por la gran oportunidad de realizar mi doctorado.

Al **Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq)** del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (MCTI), por el apoyo para la realización de este trabajo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (Concytec)** a través de su unidad ejecutora el **Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (Fondecyt)**, por el soporte para la ejecución de este trabajo.

A todos los Profesores del **Programa de Posgrado en Odontología**, por su valiosa contribución en mi formación profesional.

A los jurados de mi presustentación de Doctorado, **Prof. Dr. Edson Alves de Campos** y **Prof. Dr. Oscar Muñoz Chávez**, por la disposición, por el análisis criterioso e importantes sugerencias, que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al **Programa Escala de Estudiantes de Posgrado (PEEPg) de la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo (AUGM)**, por la oportunidad de realizar la movilidad de Posgrado en la **FOUNNE – Argentina**.

A la **Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste (FOUNNE)**, Corrientes – Argentina, por acogerme durante los dos meses de movilidad, así como a mis grandes amigos **Carlos Caramello, Claudia Gallego, Félix Delgado** y **Daniel Pira**, espero volver a encontrarlos muy pronto.

A todos mis compañeros de **Posgrado de la Facultad de Odontología de Araraquara**, por la convivencia en armonía durante estos años, por inspirarme y colaborar conmigo desinteresadamente en tantas oportunidades.

A los funcionarios de la **Sección de Pos Graduación, Alexandre y Cristiano**, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarnos.

A los funcionarios de la **Facultad de Odontología de Araraquara**, por siempre tener el ánimo necesario para ayudarme a tener un buen día.

A los profesores y amigos **Marcelo Ferrarezi, Renato de Toledo Leonardo y Oscar Muñoz Chávez**, por demostrarme que la relación docente-estudiante no está exenta al inicio de una buena amistad.

A los buenos amigos que **Araraquara** nos regaló, gracias por tantos buenos momentos.

Finalmente, a la valiosa colaboración de las personas que me ayudaron desinteresadamente a desarrollar este trabajo, como son los **Profesores Claudia Cristina Bigueti y Andre Shinohara** de la **FOB-USP**; **Profesora Juliana Jendiroba** de la **FORP-USP**; **Profesor Eduardo Fernandez Godoy** de la **UCHile**; a los **Profesores Josimeri Hebling, Paulo Sergio Cerri, Edson Alves de Campos, Oscar Muñoz Chávez y Andrea Abi Rached Dantas** de la **FOAr-UNESP**; a mis compañeros de Posgrado **Keren Jordão, Lays Gomes, Mateus Delfino, Thais Piragine y Vitor Souza**, y a todos aquellos que colaboraron indirectamente.

“Os professores abrem a porta, mas você deve entrar por você mesmo”

Provérbio Chinês

Escalante Otárola WG. Efeitos do fosfato ou silicato de cálcio no substrato dentinário erodido e nas propriedades do sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de agentes remineralizantes à base de fosfato ou silicato de cálcio em formar precipitados e obstruir túbulos dentinários e seus efeitos sobre o colágeno da dentina erodida. Assim mesmo, avaliar seu efeito na resistência de união, formação de camada híbrida e penetrabilidade dentinária do sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond. **Material e métodos:** Trezentos espécimes foram obtidos do segmento cervical de incisivos bovinos e previamente submetidos à erosão dentinária. Os espécimes foram distribuídos em 5 protocolos (n=30): NP, Desensibilize NanoP; RD, MI Paste Plus RecaldentTM; NR, Regenerate NR-5TM; KF, Desensibilize KF 2% e CO, sem tratamento. Cada um dos protocolos foi aplicado no total de 4 sessões, com intervalos de 7 dias. Duzentos espécimes (n=20) foram diariamente submetidos ao desafio ácido, por imersão em suco de laranja, por 5 minutos e, posteriormente mantidos em saliva artificial. Na sequência, cem espécimes foram analisados em microscopia eletrônica de varredura para avaliar a formação de precipitados sobre a superfície dentinária (500x) e obter o número de túbulos dentinários abertos (2,000x), e em microscopia EDX para obter resultados qualitativos sobre a composição do precipitado, e avaliados por meio de microscopia de luz polarizada, com coloração *picrosirius red*, para qualificar a morfologia do colágeno da dentina após a conclusão do tratamento. Nos duzentos espécimes restantes (n=20), com sem desafio ácido, o sistema adesivo Clearfil SE Bond (Kuraray) foi aplicado no substrato dentinário erodido para avaliação da resistência de união, formação de camada híbrida, e penetrabilidade na dentina erodida. **Resultados:** Em relação à formação de precipitados imediatos, RD demonstrou maior formação que KF e CO ($P<0.05$). Em relação ao número de túbulos abertos, NR e KF demonstraram maior número que RD ($P<0.05$). Em relação à matriz de colágeno, RD demonstrou maior concentração de colágeno tipo I que NP e KF ($P<0.05$), mas similar ao NR e CO ($P>0.05$). Em relação à resistência de união, NP e NR demonstraram os valores mais altos de resistência de união, no entanto, nenhum dos protocolos avaliados apresentaram diferenças significantes com CO ($P<0.05$). Em relação à formação de camada híbrida, NR demonstrou uma camada híbrida mais fina que o CO ($P<0.05$). Em relação à penetrabilidade dentinária, RD e NR demonstraram menor penetrabilidade do sistema adesivo *self-etch* que CO ($P<0.05$), na dentina erodida. Nos grupos sem submissão a desafio ácido diário, NP demonstrou os valores mais altos de resistência de união, enquanto, NR e KF apresentaram menor resistência de união que CO ($P<0.05$). Em relação à formação de tags de resina, KF demonstrou menor formação de tags que NP ($P<0.05$). Em relação à formação de camada híbrida, KF demonstrou menor formação de camada híbrida que RD e NR ($P<0.05$). Em relação à penetrabilidade dentinária, RD e NR demonstraram menor penetrabilidade do sistema adesivo *self-etch* que CO ($P<0.05$). **Conclusões:** Os agentes RD e NP são alternativas viáveis para promover a formação de precipitados e obstruir a embocadura dos túbulos dentinários, sem efeitos deletérios sobre a matriz de colágeno da dentina previamente erodida, podendo ser úteis no tratamento da hipersensibilidade dentinária. A aplicação do NP evidenciou melhores características na interface adesiva, sem diminuir a resistência de união do sistema adesivo Clearfil SE Bond.

Palavras chave: Dentina. Erosão dentária. Microscopia eletrônica de varredura. Microscopia de polarização. Remineralização dentária. Adesivos dentinários.

Escalante Otárola WG. Effects of phosphate or calcium silicate on the eroded dentin substrate and on the properties of the Clearfil SE Bond self-etch adhesive system [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of remineralizing agents based on phosphate or calcium silicate in forming precipitates and obstructing dentinal tubules and their effects on eroded dentin collagen. Also, evaluate its effect on the bond strength, formation of a hybrid layer and dentin penetrability of the self-etching adhesive system Clearfil SE Bond. **Material and methods:** Three hundred specimens were obtained from the cervical segment of bovine incisors and previously subjected to dentinal erosion. The specimens were distributed in 5 protocols ($n = 30$): NP, Desensibilize NanoP; RD, MI Paste Plus RecaldentTM; NR, Regenerate NR-5TM; KF, Desensitize KF 2% and CO, without treatment. Each of the protocols was applied for a total of 4 sessions, with 7-day intervals. Two hundred specimens ($n = 20$) were daily subjected to the acid challenge, by immersion in orange juice, for 5 minutes and subsequently kept in artificial saliva. In the sequence, one hundred specimens were analyzed in scanning electron microscopy to evaluate the formation of precipitates on the dentin surface (500x) and to obtain the number of open dentinal tubules (2,000x), and in EDX microscopy to obtain qualitative results on the composition of the tooth. precited, and evaluated by means of polarized light microscopy, with picosirius red staining, to qualify the dentin collagen morphology after the completion of treatment. In the remaining two hundred specimens ($n = 20$), one hundred without acid challenge, the Clearfil SE Bond adhesive system (Kuraray) was applied to the eroded dental substrate to evaluate the bond strength, hybrid layer formation, and penetrability in the eroded dentin. **Results:** Regarding the formation of immediate precipitates, RD showed greater formation than KF and CO ($P < 0.05$). Regarding the number of open tubules, NR and KF showed a higher number than RD ($P < 0.05$). Regarding the collagen matrix, RD showed a higher concentration of type I collagen than NP and KF ($P < 0.05$), but similar to NR and CO ($P > 0.05$). Regarding bond strength, NP and NR showed the highest bond strength values, however, none of the evaluated protocols showed significant differences with CO ($P < 0.05$). Regarding the formation of a hybrid layer, NR demonstrated a hybrid layer thinner than CO ($P < 0.05$). Regarding dentin penetrability, RD and NR demonstrated less penetrability of the self-etch adhesive system than CO ($P < 0.05$), in eroded dentin. In groups without daily acid challenge, NP showed the highest bond strength values, while NR and KF showed lower bond strength than CO ($P < 0.05$). Regarding the formation of resin tags, KF showed less tag formation than NP ($P < 0.05$). Regarding the formation of a hybrid layer, KF demonstrated less formation of a hybrid layer than RD and NR ($P < 0.05$). Regarding dentin penetrability, RD and NR demonstrated less penetrability of the self-etch adhesive system than CO ($P < 0.05$). **Conclusions:** RD and NP agents are viable alternatives to promote the formation of precipitates and obstruct the dentin tubule mouth, without deleterious effects on the previously eroded dentin collagen matrix, and may be useful in the treatment of dentin hypersensitivity. The application of NP showed better characteristics in the adhesive interface, without decreasing the bond strength of the Clearfil SE Bond adhesive system.

Keywords: Dentin. Tooth erosion. Scanning electron microscopy. Polarization microscopy. Dental remineralization. Dentin adhesives.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	15
3 PUBLICAÇÕES.....	16
3.1 Publicação 1.....	16
3.2 Publicação 2.....	38
3.3 Publicação 3.....	59
4 DISCUSSÃO	81
5 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84
APÊNDICE	88
ANEXO	97

1 INTRODUÇÃO

O desgaste dentário erosivo é um processo químico-mecânico induzido por ácidos intrínsecos (ácido clorídrico do conteúdo gástrico através de refluxo, vômito ou regurgitação) e extrínsecos (relacionados à dieta, medicação ou estilo de vida) de origem não bacteriana¹⁻⁴, que gera destruição do esmalte e consequentemente, à perda da estrutura dentária ao longo do tempo⁵. Bebidas ácidas em contato direto com a superfície dentária podem originar uma textura áspera e desgaste gradual dos dentes⁶, por ter um valor de pH que facilita a destruição da composição mineral do esmalte^{7,8}.

Quando ocorre um desequilíbrio entre os cristais de esmalte do dente e o ambiente oral⁹, devido a que o pH do ambiente cai abaixo do nível crítico (5,5 para o esmalte e 6,2 para dentina), se produz a dissolução da composição mineral dentária¹⁰. A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado que constitui a maior parte do dente e está composta por uma rede contínua de fibras de colágeno tipo I e mineral¹¹. Entretanto, a hidroxiapatita dentinária é vulnerável a desafios ácidos pelo baixo conteúdo de cálcio e alto conteúdo de carbonato¹². Assim, o desafio erosivo e a desmineralização dentária promovem perda de esmalte e remoção de detritos, expondo túbulos dentinários e desenvolvendo hipersensibilidade dentinária^{13,14}, que gera preocupação para dentistas e pesquisadores pela alta prevalência de casos^{15,16}.

A hipersensibilidade dentinária (HD) é descrita clinicamente como a dor aguda causada pela excitação das fibras nervosas A delta conectadas à dentina exposta e seus túbulos, devido a estimulação química, térmica, osmótica, evaporativa ou tátil^{17,18}. A *Canadian Advisory Board on Dentin*¹⁹ reportou que entre 8 e 57% da população apresenta HD, porém estudos mais recentes relatam que a prevalência varia muito, dependendo da idade, sexo, etnia e/ou comprometimento periodontal assim como o método de avaliação, podendo atingir até um 98%^{20,21}.

A teoria hidrodinâmica de Brannstrom²² fornece a explicação presumível para o mecanismo da HD. Por tanto, a tendência atual do seu tratamento concentra-se em duas abordagens baseadas nesta teoria, 1) obliterando túbulos dentinários abertos, e 2) bloqueando a atividade dos neurônios dentinários¹⁷. Os protocolos dessensibilizantes atuais são direcionados ao tratamento da HD, utilizando agentes remineralizantes para formação de precipitados insolúveis dentro dos túbulos dentinários²³. Várias abordagens

foram adotadas para alcançar a remineralização dentinária, que eventualmente constitui o objetivo da odontologia restauradora²⁴, porém ainda não existe consenso sobre o protocolo mais adequado.

Diversos protocolos físicos e químicos têm sido descritos na literatura, para o tratamento da HD como fluoreto de sódio²⁵, cloreto de estrôncio²⁶, nanopartículas de fosfato de cálcio²⁷, fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP)²⁸ e silicato de cálcio²⁹ pela capacidade de obliterar túbulos dentinários. Embora muitos desses protocolos sejam eficazes no controle da HD, nenhum deles demonstrou ser o ideal³⁰, devido à fragilidade da obliteração de túbulos dentinários quando expostos ao desgaste dentário erosivo³¹. A obliteração de túbulos dentinários com estes agentes teve profundidade de infiltração limitada³², sendo vulnerável aos desafios ácidos contínuos.

O fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) é um agente remineralizante à base de fosfato que atua fornecendo íons cálcio e fosfato à superfície dentária e estabilizando fluorapatita³³. O fosfopeptídeo de caseína/fluoreto de fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACPF) possui uma adição de 900 ppm de fluoreto, para melhorar sua atividade remineralizante, formando precipitados minerais de cálcio e íons fosfato com fluoreto³⁴. Por tal motivo, o CPP-ACP possui propriedades remineralizantes e anti-erosivas, sendo efetivo também no tratamento da HD³⁵.

O agente remineralizante contendo fosfato de cálcio nanoparticulado em forma de hidroxiapatita, tem sido recomendado tanto para a remineralização dos tecidos dentários, como para o tratamento da HD, ao formar uma película de proteção sobre a dentina²⁸. O seu mecanismo de ação está relacionado à capacidade de estabilizar os íons cálcio e fosfato em um estado amorfo na estrutura dental, similar ao que ocorre com o CPP-ACP³⁶. Produtos contendo silicato de cálcio, fosfato de sódio e fluoreto fornecem maior capacidade de remineralizar esmalte corroído do que os convencionais à base de flúor^{29,37}, porém sua capacidade de remineralização da dentina exposta é desconhecida.

Por outro lado, procedimentos restauradores adesivos são comumente realizados para recuperar a estética e função dos dentes³⁸. Embora sistemas adesivos atuais promovem uma adequada adesão no esmalte e na dentina, o mesmo não acontece quando a superfície dentária é exposta a diferentes desafios químicos e/ou mecânicos, como no desgaste dentário erosivo^{39,40}. Foi demonstrado que a aplicação do CPP-ACP e do fosfato

de cálcio nanoparticulado, não interferem sobre a resistência de união do sistema adesivo *total-etch* na dentina^{27,41}, porém não há estudos comparativos com sistemas autocondicionantes.

Sistemas adesivos autocondicionantes simplificaram protocolos e são menos sensíveis à técnica⁴². Estes sistemas adesivos oferecem excelente adesão à estrutura dentária (esmalte e dentina)⁴³, porém é pouco conhecida a qualidade da adesão a substratos dentários afetados pela erosão acida. O sistema adesivo *self-etch* proporciona a desmineralização parcial da dentina, deixando cristais de hidroxiapatita ao redor das fibras colágenas⁴⁴. Os monômeros funcionais (4-MET e 10-MDP) presentes no Clearfil SE Bond (Kuraray) interagem quimicamente com o íon cálcio da hidroxiapatita residual que permanece dentro da camada híbrida, criando um duplo mecanismo de adesão à dentina⁴⁵.

Por tal motivo, é importante avaliar o efeito de protocolos remineralizantes indicados para o tratamento da HD em dentina erodida por desafios ácidos, assim como a sua influência na resistência de união e na interface do sistema adesivo Clearfil SE Bond.

2 PROPOSIÇÃO

A proposição dessa tese está justificada em:

- Avaliar os efeitos dos protocolos remineralizantes dentários contendo nanopartículas de fosfato de cálcio (Desensibilize NanoP), fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo (MI Paste Plus Recaldent™ CPP-ACP) e silicato de cálcio associado com fosfato de sódio (Regenerate NR-5™) sobre a dentina cervical previamente erodida e submetida a desafio ácido diário, por meio da análise de formação de precipitados e obliteração de túbulos dentinários (SEM), composição dos precipitados formados (EDX) e avaliação das alterações sobre a matriz de colágeno do substrato dentinário, em comparação com um protocolo dessensibilizante dentinário convencional, contendo nitrato de potássio com fluoreto de sódio (Desensibilize KF 2%).
- Avaliar os efeitos dos mesmos protocolos remineralizantes na resistência de união (μ TBS), formação de camada híbrida (SEM) e penetrabilidade dentinária (CLSM), do sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond (Kuraray), aplicado sobre a dentina cervical previamente erodida, e submetida a desafio ácido diário.
- Avaliar os efeitos dos mesmos protocolos remineralizantes na resistência de união (μ TBS), formação de camada híbrida (SEM) e penetrabilidade dentinária (CLSM), do sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond (Kuraray), aplicado sobre a dentina cervical previamente erodida.

3 PUBLICAÇÕES

Esta tese de doutorado foi dividida em três publicações, na forma de artigos, que apresentam os resultados obtidos em cada etapa desse estudo. Os artigos foram formatados de acordo com as revistas à qual serão submetidos. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) dessa Universidade (Proc. n° 30/2018).

3.1 Publicação 1*

Efeitos de agentes remineralizantes à base de fosfato ou silicato de cálcio sobre a dentina cervical erodida e submetida ao desafio ácido

RESUMO

Objetivos: Avaliar por meio de análise em SEM/EDX e coloração em *picrosirius red* a efetividade de agentes remineralizantes à base de fosfato ou silicato de cálcio em formar precipitados e obstruir túbulos dentinários, e seus efeitos sobre o colágeno da dentina cervical, previamente erodida.

Métodos: Cem espécimes foram obtidos do segmento cervical de incisivos bovinos e previamente submetidos à erosão dentinária. Cinquenta espécimes foram distribuídos em 5 protocolos (n=10): (NP), Desensibilize NanoP; (RD), MI Paste Plus RecaldentTM; (NR), Regenerate NR-5TM; (KF), Desensibilize KF 2% e CO, sem tratamento. Cada um dos protocolos foi aplicado no total de 4 sessões, com intervalos de 7 dias. Todos os espécimes foram diariamente submetidos ao desafio ácido, por imersão em suco de laranja, por 5 minutos e, posteriormente mantidos em saliva artificial. Os espécimes foram analisados em SEM para avaliar a formação de precipitados sobre a superfície dentinária (500x) e obter o número de túbulos dentinários abertos (2000x), e em microscopia EDX para obter resultados qualitativos sobre a composição do precipitado. Os cinquenta espécimes restantes foram submetidos a idênticos tratamentos e avaliados por meio de microscopia de luz polarizada, com coloração *picrosirius red*, para qualificar a morfologia do colágeno da dentina após a conclusão do tratamento.

* Formatação de acordo com as normas do periódico *Journal of Dentistry*, periódico para o qual pretende-se submeter

Resultados: Em relação à formação de precipitados, RD demonstrou maior formação que KF e CO ($P<0.05$). Em relação ao número de túbulos abertos, NR e KF demonstraram maior número que RD ($P<0.05$). Em relação à matriz de colágeno, RD demonstrou maior concentração de colágeno tipo I que NP e KF ($P<0.05$), mas similar ao NR e CO ($P>0.05$).

Conclusões: Os agentes RD e NP são alternativas viáveis para promover a formação de precipitados e obstruir a embocadura dos túbulos dentinários, sem efeitos deletérios sobre a matriz de colágeno da dentina previamente erodida, podendo ser úteis no tratamento da hipersensibilidade dentinária.

Relevância clínica: Como os agentes remineralizantes proporcionam a formação de precipitados e obstruem as embocaduras dos túbulos dentinários, sem alterar a matriz de colágeno da dentina cervical erodida, são alternativas viáveis para o tratamento da hipersensibilidade dentinária.

Keywords: Dentina. Erosão dentária. Microscopia eletrônica de varredura. Microscopia de polarização. Remineralização dentária.

1. Introdução

A hipersensibilidade dentinária (HD) é caracterizada por dor aguda causada pela excitação das fibras nervosas A delta subjacente à dentina e aos túbulos dentinários expostos em resposta aos diferentes estímulos químicos, térmicos, osmóticos, por vaporização e/ou tácteis [1]. A teoria hidrodinâmica proposta por Brannstrom et. al. [2] é pontualmente aceita para explicar o mecanismo da HD.

Portanto, atualmente as estratégias de tratamento da HD estão fundamentadas no bloqueio deste mecanismo, tanto pela formação de precipitados na superfície dentinária e obstrução das embocaduras dos túbulos dentinários, como também interferindo negativamente sobre a neurotransmissão dos impulsos nervosos dos nociceptores próximos à dentina [3].

Diversos protocolos de tratamento já foram propostos, tais como a aplicação de vernizes, compostos contendo cálcio e/ou oxalatos, cloreto de estrôncio, laser, nitrato de potássio e fluoretos [4]. Nenhum destes protocolos são definitivamente efetivos na resolução da HD, principalmente em casos em que o paciente é susceptível à erosão do esmalte e/ou dentina, devido à presença de ácidos intrínsecos, tais como ácido clorídrico de origem gástrica, e extrínsecos, tais como os derivados da dieta diária e/ou estilo de vida [5-8].

A indução e formação de precipitados minerais sobre a dentina exposta, que obliterem os túbulos dentinários, e que sejam resistentes aos desafios ácidos na cavidade bucal, são procedimentos incessantemente buscados para auxiliar no tratamento da HD e oferecer um bem-estar aos pacientes acometidos deste desconforto [9-12]. Uma vez que os agentes remineralizantes do esmalte dental, principalmente aqueles que contém flúor, reagem com o cálcio presente na estrutura dental e formam depósitos microscópicos minerais, tais como o CaF_2 , que são capazes de repor parte da estrutura mineral perdida após as alterações ácidas locais, por meio dos fenômenos denominados redução da desmineralização e ativação da mineralização [13], necessitam ser avaliados como protocolos de tratamento da HD.

Compostos que contém nanopartículas de fosfato de cálcio (Dessensibilize NanoP, p.ex.), em forma de hidroxiapatita (nano-HAP), proporcionam a deposição de precipitados sobre a dentina e são recomendados para a remineralização do esmalte dental e/ou como protocolos de tratamento da HD [9, 14, 15]. O Dessensibilize NanoP também contém fluoreto de sódio e nitrato de potássio e demonstra ser eficaz em obliterar as

aberturas dos túbulos dentinários e formar uma película sobre a superfície dentinária, bem como não interfere sobre a interface adesiva com os adesivos *etch-and-rinse* [9]. Há indícios de que seu mecanismo de ação está relacionado com o potencial de estabilizar íons cálcio e fosfato, sob um estado amorfo, na estrutura dental [14-18].

Um outro agente remineralizante é o fosfopeptídeo caseína (CPP), que após a sua degradação química libera resíduos de fosfoseril, que estabilizam íons de cálcio e fósforo e que, sob condições alcalinas, formam o fosfato de cálcio que está presente como um complexo molecular amorfo associado ao CPP, referido como *casein phosphopeptide-amorphous calcium-phosphate* (CPP-ACP) [19].

O mecanismo de ação remineralizante do CPP-ACP provavelmente está relacionado com o suprimento de íons cálcio e fósforo para a superfície do dente e também por meio da estabilização de precipitados minerais formados que contenham fluoroapatita [20, 21]. Devido a este mecanismo, similar ao que ocorre com o derivado de nano-HAP, tem sido também preconizado o seu uso no tratamento da HD [22-24].

Os compostos de silicato de cálcio e fosfato de sódio (fosfato mono e trissódico) foram desenvolvidos para a prevenção e tratamento da erosão dental [25, 26]. O provável mecanismo de ação deste produto é devido a deposição de partículas de silicato de cálcio sobre o substrato dental e indução da formação de hidroxiapatita sobre o substrato erodido [27]. Como estes compostos reduzem a permeabilidade dentinária, possivelmente podem ser uma alternativa como protocolo de tratamento da HD [28, 29], mas ainda inexistem estudos conclusivos sobre esta indicação.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos dos protocolos remineralizantes dentários contendo nanopartículas de fosfato de cálcio (Desensibilize NanoP), fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo (MI Paste Plus RecaldentTM CPP-ACP) e silicato de cálcio associado com fosfato de sódio (Regenerate NR-5TM) sobre a dentina cervical previamente erodida e submetida a desafio ácido diário, por meio da análise de formação de precipitados e obliteração de túbulos dentinários (SEM), composição dos precipitados formados (EDX) e avaliação das alterações sobre a matriz de colágeno do substrato dentinário, em comparação com um protocolo dessensibilizante dentinário convencional, contendo nitrato de potássio com fluoreto de sódio (Desensibilize KF 2%). A hipótese nula foi estabelecida como a inexistência de diferenças nos parâmetros avaliados em relação aos diferentes protocolos testados.

2. Material e métodos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (Proc. CEUA nº 30/2018). Cem incisivos bovinos com coroas e raízes anatomicamente similares foram armazenados em solução de timol a 0,1%, a 4 °C, até o momento de uso.

2.1. Preparo dos espécimes

Cem espécimes (10mm de comprimento x 10mm de largura x 5mm de espessura) foram obtidos do terço médio dos dentes usando máquina de corte de tecidos duros (Isomet 100, Buehler, Lake Bluff, IL) sob refrigeração como água corrente. A superfície vestibular dos fragmentos foi desgastada em politriz (DP-10; Panambra, Struers, Ballerup, DI) usando sequencialmente lixas de granulação #600 e #1200, por 20s cada (ISO 6344-1), para a exposição da dentina cervical e padronização da *smear layer*.

A superfície dentinária foi previamente condicionada com ácido clorídrico (HCl) a 0,6% (Arte & Ciência, Araraquara, São Paulo, Brazil), por imersão durante 5 min para simular o substrato dentinário erodido. Em seguida, os espécimes foram lavados com água destilada e armazenados em saliva artificial (0.375 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.125 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.2g/l KCl, 0.85g/l NaCl, 2.5g/l $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1g/l sorbic acid, 5 g/l hydroxyethyl cellulose-sodium, e 43 g/l sorbitol solution) (Arte & Ciência, Araraquara, São Paulo, BR), a 37 °C, em pH 7, até o momento de uso.

2.2. Protocolos avaliados

Quatro protocolos com agentes remineralizantes foram utilizados no presente estudo, com o propósito de avaliar o potencial de uso como agentes auxiliares no tratamento da HD. A tabela 1 demonstra a composição química dos agentes químicos utilizados nos protocolos avaliados.

Os protocolos avaliados foram (n = 20 espécimes por protocolo, sendo 10 espécimes para análise em SEM/EDX e 10 espécimes para microscopia de luz polarizada):

- (NP): O produto contendo nanopartículas de fosfato de cálcio (Dessensibilize NanoP; FGM, Joinville, SC, BR) foi friccionado sobre a superfície dentinária com taça de borracha (KG Sorensen, São Paulo, SP, BR), em baixa rotação, com 500 rpm, por 10s.

Em seguida, os resíduos permaneceram sobre a dentina por 5 min e lavados com 10 mL de água deionizada;

- (RD): O produto contendo CPP-ACPF (MI Paste Plus Recaldent™; GC Company; JPN) foi aplicado sobre a superfície dentinária, similar ao descrito no protocolo anterior, porém o produto foi mantido sobre a dentina por 3 min;

- (NR): O produto contendo duas pastas (Regenerate NR-5™; Unilever, Wirral, UK), gel remineralizante e ativador, foram previamente misturados e utilizados identicamente ao protocolo anterior, também mantido sobre a dentina por 3 min;

- (KF): O produto utilizado foi a base de fluoreto de sódio a 2% (Dessensibilize KF 2%; FGM, Joinville, SC, BR) foi apenas aplicado sobre a superfície dentinária com um aplicador específico para sistema adesivo (KG Sorensen, São Paulo, SP, BR), sem fricção, e mantido no local por 10 min;

- (CO): Os espécimes foram mantidos em saliva artificial e serviram como protocolo controle negativo.

Os espécimes foram submetidos a 4 sessões de tratamento, com intervalos de 7 dias entre cada sessão. Durante a realização do tratamento, os espécimes foram submetidos ao desafio ácido, por imersão diária em suco de laranja (Minute Mais; Coca Cola®. SP, BR), com $\text{pH } 3.80 \pm 0.04$, por 5 min. Em seguida foram lavados com 10 mL de água deionizada e mantidos imersos individualmente em saliva artificial, a 37°C. A saliva artificial, cuja composição química foi igual a anteriormente descrita, foi trocada a cada 7 dias, imediatamente após a realização dos protocolos avaliados.

2.3. Avaliação da formação de precipitados e número de túbulos dentinários abertos

Cinquenta espécimes foram divididos aleatoriamente de acordo com o protocolo avaliado e controle ($n = 10$). Após a conclusão dos tratamentos descritos, os espécimes foram armazenados em saliva artificial por 24 h. Em seguida, os espécimes foram desidratados em câmara fechada com sílica coloidal por 7 dias. Após a montagem dos espécimes nos *stubs* metálicos, foram metalizados com ouro coloidal (ciclo simples – 120s) sob vacuum, em câmara de metalização (MED 010; Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) e examinados mediante microscopia eletrônica de varredura com JEOL 6060 (JEOL 6060; JEOL Ltda, Tokyo, Japan), operado a 20 kV, conforme descrito por Escalante-Otárola et al. [9].

Quatro campos distintos foram inicialmente avaliados e do campo mais representativo do espécime foi obtida uma imagem com a magnificação de 500x, para avaliação e quantificação dos precipitados formados sobre a superfície dentinária. A obtenção das imagens foi realizada por um único operador. Outra imagem foi obtida do mesmo local, com magnificação de 2000x, para a contagem de túbulos dentinários abertos. Todas as imagens foram obtidas pelo mesmo operador.

Dois examinadores independentes e devidamente calibrados ($k = 0.82$) classificaram a presença de precipitados formados sobre a superfície dentinária, de acordo com os parâmetros modificados, descritos por Kuga et al. [30]: Escore 0 - ausência de precipitados; Escore 1 - discreta incidência de precipitados e a maioria dos túbulos dentinários abertos; Escore 2 - mínima incidência de precipitados e $> 50\%$ da superfície dentinária sem resíduos; Escore 3 - moderada incidência de precipitados e $< 50\%$ da superfície dentinária sem resíduos e Escore 4 - intensa incidência de precipitados e aberturas dos túbulos dentinários obstruídos.

2.4 Análise em EDX (Energy-dispersive X-ray)

Quatro espécimes de cada um dos protocolos foram submetidos à cobertura com carbono (BalTec SCD 004 Sputter Coater; Balzers, Vaduz, LI), em 15 kV, por 180 s. Em seguida, foram analisados em EDX (JEOL 6060; JEOL Cia., Tokyo, Japan) para avaliar os principais componentes químicos presentes sobre a superfície dentinária após a realização dos protocolos avaliados e qualificar a composição química dos precipitados formados.

2.5. Avaliação da matriz de colágeno da dentina

Cinquenta espécimes foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos avaliados ($n = 10$). Após a conclusão dos protocolos avaliados, os espécimes foram armazenados por 24h em saliva artificial. Em seguida, foram acondicionados em solução de ácido etilenodiaminotetracético a 10% (EDTA) (Merck, Darmstadt, GER), tamponado com pH 7.0, com trocas realizadas duas vezes por semana, por 90 dias.

Os espécimes foram novamente lavados copiosamente com água destilada, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Histosec; Merck, Darmstadt, Alemanha). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos

semi-seriados de 5 μm de espessura e submetidos à técnica de coloração com *picrosirius red*.

Uma vez concluído o processamento histológico, cada lâmina foi analisada em microscópio de luz polarizada a fim de se avaliar a organização e quantidade de feixes de fibras colágenas considerando-se a intensidade de birrefringência da matriz de colágeno.

A quantificação da intensidade do brilho de birrefringência foi realizada com o software KS 300/400 com AxioVision versão 4.8 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Inicialmente foram definidos os espectros de cor verde, amarela e vermelha, seguindo valores de RGB (red, green, blue), os quais foram padronizados para todas as imagens.

De acordo com a organização da orientação das fibras de colágeno, a cor do espectro pode variar de esverdeado (colágeno tipo III) a vermelho (colágeno tipo I) [31, 32]. Para quantificar apenas fibras esverdeadas e vermelhas, correspondente à matriz colágena, as imagens foram analisadas no Affinity Photo Software, calculando a quantidade de pixels de cada cor. Na sequência, foram calculadas as medias dos valores em pixels, expressadas em porcentagem e submetidas a análise estatística.

2.6. Análise estatística

Inicialmente todos os dados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para averiguação da homocedasticidade dos dados. Os dados da formação de precipitados e número de túbulos dentinários abertos foram submetidos aos testes de Kruskal Wallis e Dunn. Os dados da avaliação da matriz orgânica dentinária foram submetidos aos testes de ANOVA two-way e Bonferroni. Todas as avaliações foram com um nível de significância de $\alpha = 5\%$.

Tabela 1. Composição dos agentes químicos utilizados nos protocolos avaliados.

Grupo	Composição	Fabricante
NP – Desensibilize NanoP	Calcium phosphate (nano-HAP), Potassium nitrate and 9000 ppm sodium fluoride.	FGM, Brasil
RD – MI Paste Plus <i>Recaldent</i> TM	CPP-ACPF (Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate Fluoride), Glycerol, D-Sorbitol, CMC-Na, Propylene glycol, Silicon dioxide, Titanium dioxide, Xylitol, Phosphoric acid, Flavoring, Sodium saccharin, Ethyl p-hydroxybenzoate, Propyl p-hydroxybenzoate, Butyl p-hydroxybenzoate. 900 ppm fluoride.	GC, Japão
NR – Regenerate <i>NR-5</i> TM	Glycerin, CalciumSilicate, PEG-8, Hydrated Silica, Trisodium Phosphate, SodiumPhosphate, Aqua, PEG-60, Sodium Lauryl Sulfate, Sodium Monofluorophosphate, Synthetic Fluorophlogopite, Sodium Saccharin, Polyacrylic Acid, Tin Oxide, Limonene, CI 77891. 1450 ppm fluoride.	Unilever, Reino Unido
KF – Desensibilize KF 2%	KNO ₃ (5%) + NaF (2%)	FGM, Brasil
CO – Controle negativo	Deionized water	–

KNO₃, nitrato de potássio; NaF, fluoreto de sódio.

3. Resultados

3.1. Avaliação da formação de precipitados e número de túbulos dentinários abertos

Em relação à avaliação da superfície dentinária, RD apresentou maior incidência de precipitados imediatos sobre a superfície dentinária que o demonstrado por KF e CO ($P < 0.05$). Entretanto, a formação de precipitados imediatos demonstrados por RD, NP e NR foram similares entre si ($P > 0.05$). Por outro lado, KF e CO demonstraram similares resultados aos de NP e NR ($P > 0.05$).

Em relação ao número de túbulos dentinários abertos, RD apresentou a menor incidência de túbulos dentinários abertos na dentina cervical quando comparado aos demonstrados por NR, KF e CO ($P < 0.05$). Entretanto, não mostrou diferença ao demonstrado por NP ($P > 0.05$).

A tabela 2 mostra a mediana, valores mínimo e máximo, e 1º e 3º quartil da formação de resíduos na dentina cervical erodida e a média aritmética e desvio padrão do número de túbulos dentinários abertos, após o uso dos protocolos avaliados. A figura 1 mostra uma imagem representativa da formação de precipitados imediatos sobre a superfície (500x) e obliteração de túbulos dentinários (2000x), em função dos protocolos avaliados

3.2. Análise em EDX (Energy-dispersive X-ray)

Em relação à análise em EDX, RD apresentou uma maior concentração entre Ca/P (atomic ratio: Ca/P = 1.93) em comparação aos demais protocolos e presença dos íons Si, Mg e Na.

NP, NR, KF e CO apresentaram menores valores da concentração entre Ca/P (atomic ratio: (NP), Ca/P = 1.78; (NR), Ca/P = 1.95; (KF), Ca/P = 1.89 e (CO), Ca/P = 2.02).

A figura 2 demonstra a relação entre Ca/P proporcionada após o uso dos protocolos avaliados. A figura 3 demonstra uma imagem representativa da composição dos precipitados, obtidas em EDX, formados sobre a superfície dentinária, em função dos protocolos avaliados.

3.3. Avaliação da matriz de colágeno da dentina

RD apresentou mais colágeno Tipo I (maturo) e menos do Tipo III (imaturo) que o NP e KF ($P < 0.05$). Assim mesmo, NP, RD e KF não mostraram diferenças significantes com os outros grupos ($P > 0.05$). A figura 4 demonstra o percentual de presença de colágeno tipo I e III no substrato dentinário, em função do protocolo avaliado e a figura 5 demonstra imagem representativa da incidência de colágeno tipo I (tonalidade vermelha) e III (tonalidade verde) no substrato dentinário, após a coloração com *picrosirius red*.

Tabela 2. Valores referentes à formação de precipitados imediatos e incidência de túbulos dentinários abertos na superfície dentinária, em função dos protocolos analisados.

		NP	RD	NR	KF	CO
<i>Precipitados imediatos</i>	mediana	2 ^{ab}	3 ^a	2 ^{ab}	1 ^b	1 ^b
	min/max	1 – 3	2 – 3	1 – 3	1 – 2	1 – 2
	1Q/3Q	2 – 3	2 – 3	2 – 3	1 – 1	1 - 1
<i>Incidência de túbulos abertos</i>	média	26.86 ^{ab}	18.57 ^a	43.14 ^{bc}	45.29 ^{bc}	61.71 ^c
	sd	8.57	4.76	9.12	9.55	6.90

^{ab} Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significantes ($P < 0.05$). 1Q e 3Q, primeiro e terceiro quartil; min, valor mínimo; max, valor máximo; sd, desvio padrão, respectivamente. NP, Desensibilize NanoP; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF2%; CO, Controle negativo.

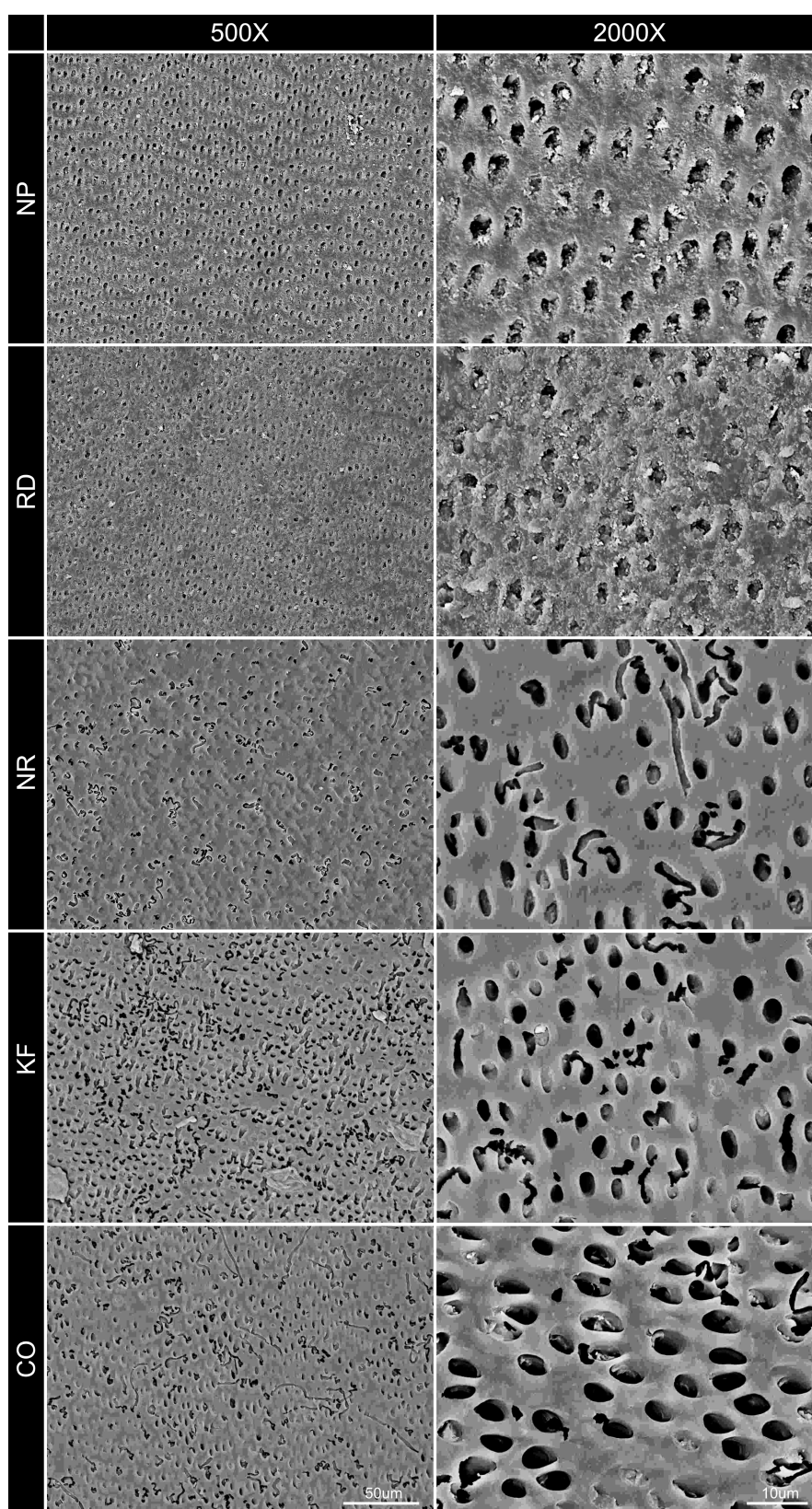
Figura 1

Fig. 1. Imagem representativa da superfície dentinária cervical após a aplicação dos protocolos e grupo controle, em 500x e 2000x. NP, Desensibilize NanoP; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF2%; CO, Controle negativo. Escala 50µm e 10µm.

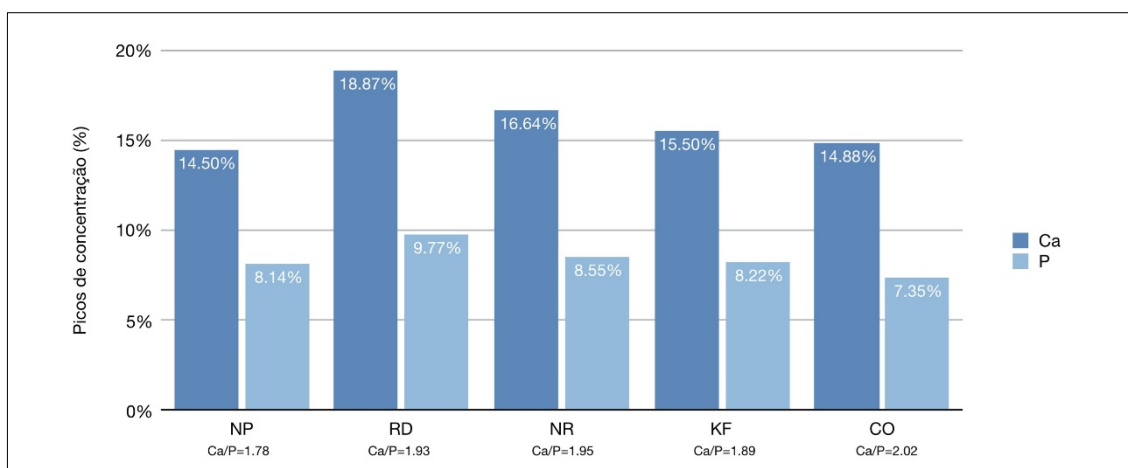
Figura 2

Fig. 2. Resultados da análise da dispersão de energia X-ray (EDX). Ca, cálcio; P, fosforo; Ca/P atomic ratio. NP, Desensibilize NanoP; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF2%; CO, Controle negativo.

Figura 3

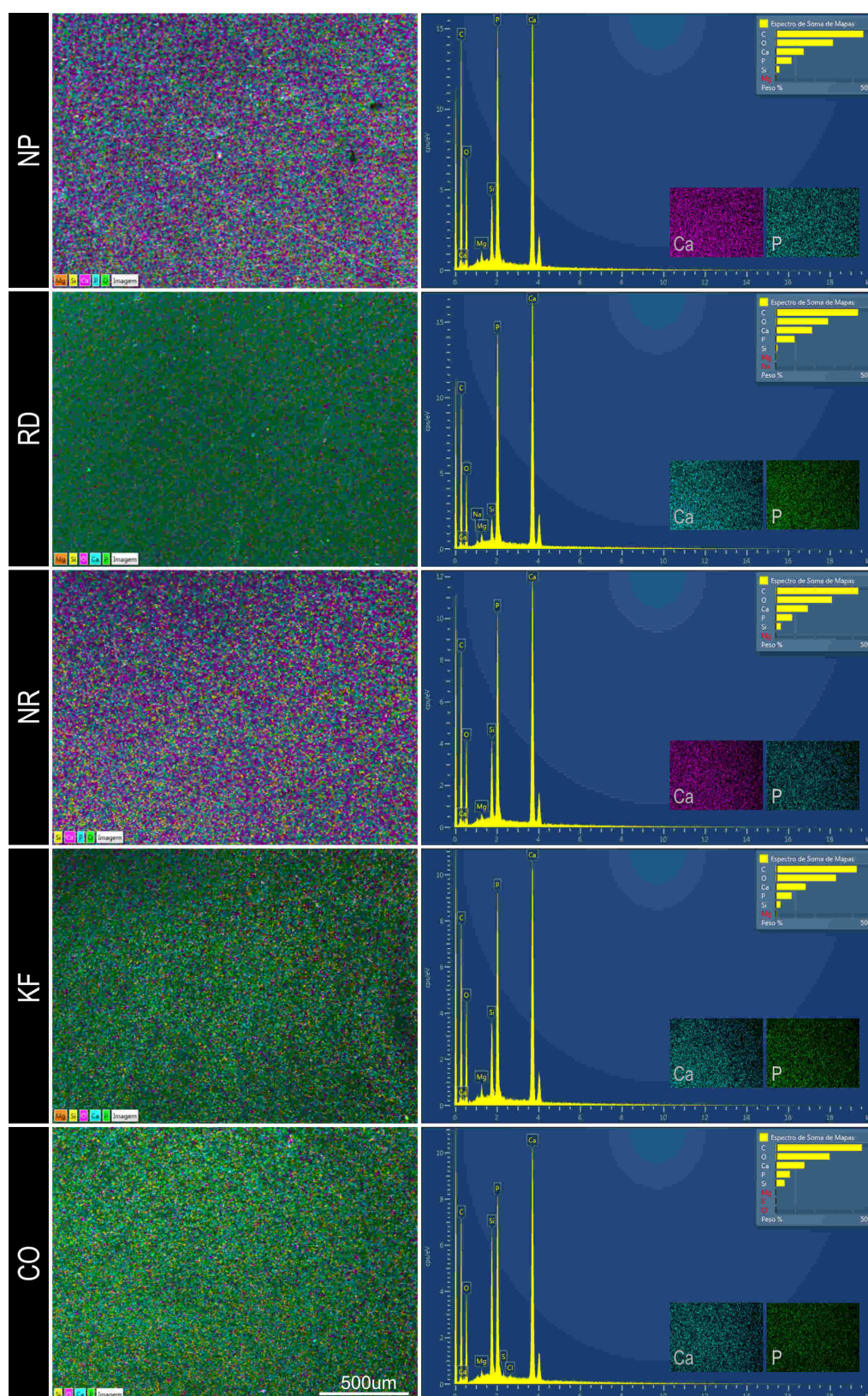


Fig. 3. Imagem representativa da análise da dispersão de energia X-ray (EDX) da superfície dentinária cervical após a aplicação dos protocolos e grupo controle. NP, Desensibilize NanoP; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF2%; CO, Controle negativo. Escala 500µm.

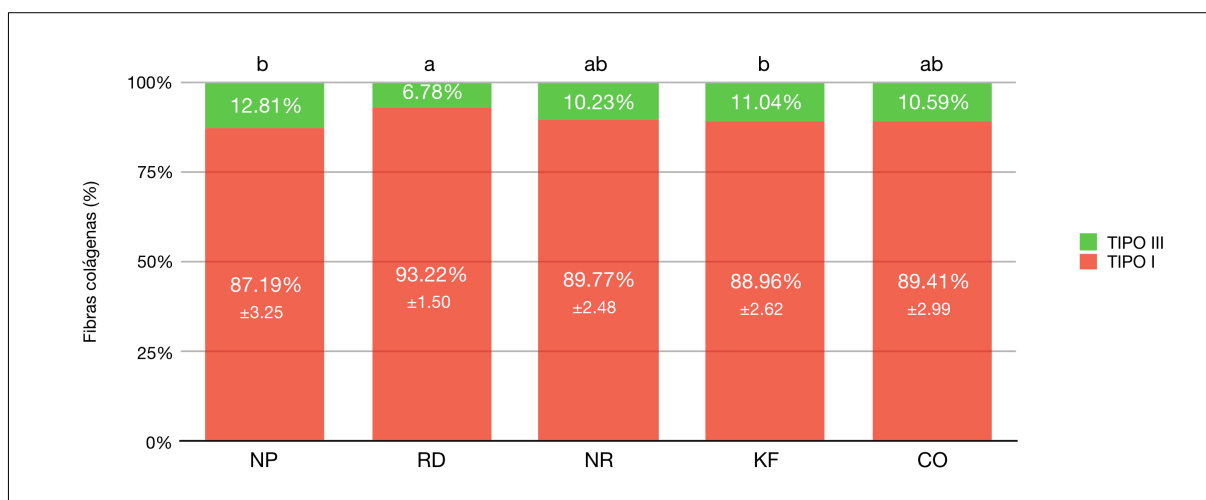
Figura 4

Fig. 4. Resultados da avaliação da matriz orgânica dentinária. ^{ab} Diferentes letras indicam diferenças significantes ($p < 0.05$). $\pm$ Desvio padrão. NP, Desensibilize Nano P; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF 2%; CO, Controle negativo.

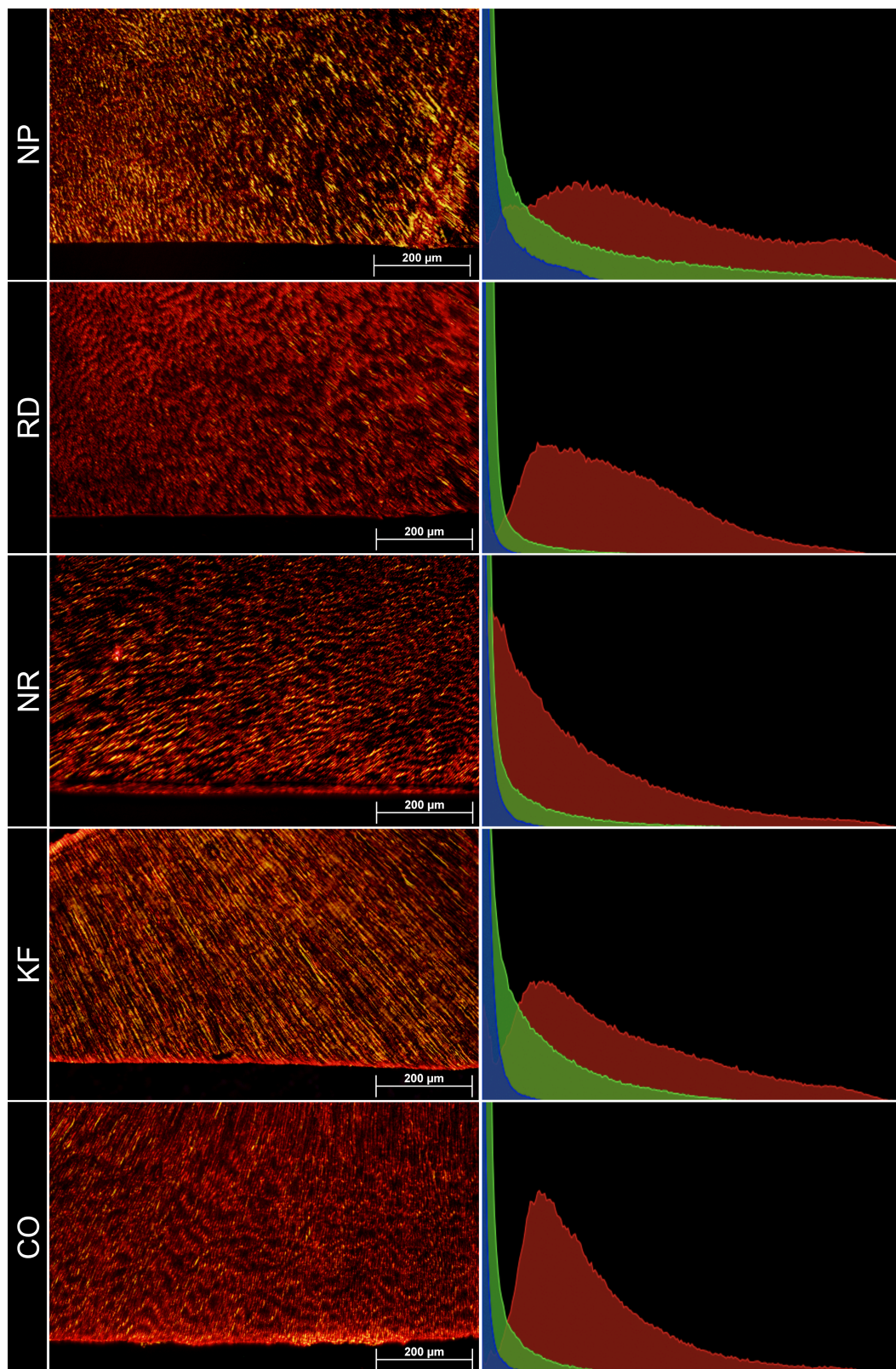
Figura 5

Fig. 5. Imagem representativa da análise da matriz orgânica da dentina cervical após a aplicação dos protocolos e grupo controle. NP, Desensibilize NanoP; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF2%; CO, Controle negativo. Escala 200µm.

4. Discussão

Os agentes mais utilizados para a remineralizar o esmalte dental, pela dinâmica da redução da desmineralização e ativação da mineralização [13], proporcionam a deposição de uma película sobre o substrato dentário, envolvendo a hidroxiapatita e a matriz de colágeno [3, 13].

Como os tratamentos mais aceitos para a temível hipersensibilidade dentinária tem como objetivos a obstrução dos túbulos dentinários e, se possível, a proteção da dentina intertubular, associado ao bloqueio da neurotransmissão pelos nociceptores das fibras tipo A delta, localizados na interface dentina e polpa dentária, os agentes remineralizantes representam uma estratégia de tratamento interessante [2, 4]. No presente estudo, o protocolo RD demonstrou maior formação de precipitados sobre a superfície dentinária e menor incidência de túbulos dentinários abertos que o proporcionado pelo KF e CO. Portanto a hipótese nula foi rejeitada.

Por meio da análise obtida em EDX, onde se observa que o precipitado formado sobre a dentina previamente erodida, após o tratamento com os protocolos com agentes remineralizantes proporcionam aumento na concentração de cálcio e fósforo, inclusive maior que a demonstrada em CO, é deduzível que existe uma relação direta entre a estabilidade química da película de precipitado formado em relação à sua dissolução e/ou solubilização frente a alterações ácidas do meio [3, 21, 27]. Ou seja, dependendo da característica e do mecanismo de remineralização envolvido, um determinado agente remineralizante pode ser mais ou menos efetivo que o outro [26, 28].

O RD contém em sua composição química o fosfopeptídeo CCP-ACP (casein phosphopeptídeo-amorphus calcium-phosphate) e 900 ppm de flúor [10, 11]. Quando ele é utilizado no substrato dental, proporciona a formação de alta concentração de fluorapatita, que é um mineral mais estável e insolúvel que a hidroxiapatita [13, 14] e, consequentemente também mais resistente à dissolução pelo desafio ácido [20, 21].

A análise em EDX demonstra a maior incidência de cálcio e fósforo na superfície dentinária após o protocolo com RD, caracterizando uma formação de precipitados mais estáveis e resistentes às alterações ácidas [26, 28], motivo pelo qual foi observado na microscopia eletrônica de varredura a maior incidência e persistência de precipitado na superfície dentinária, principalmente em relação ao KF e CO.

O NP também possui similar mecanismo de ação ao RD [15, 16], porém mais relacionado à deposição precipitados de Ca e P, com características amorfas, do que a fluorapatita propriamente dita, sobre a estrutura dental [14-18]. Entretanto, também

possui o nitrato de potássio em sua formulação química [17, 18]. Isto reduz o percentual de substâncias bioativas no composto, consequentemente reduzindo a concentração de Ca e P na superfície dentinária, conforme observado em EDX e, também dando origem a formação de precipitados mais sensíveis à dissolução química pelo desafio ácido, conforme também observado nas imagens em microscopia eletrônica de varredura.

Muito embora o composto com silicato de cálcio e fosfato de sódio (NR) tenha induzido a formação de precipitados, o NR demonstrou elevado número de túbulos dentinários abertos. Isto pode ser devido à estratégia de tratamento utilizada neste estudo, pois o fabricante recomenda também o uso caseiro do agente remineralizante, sob a forma de gel dental [26, 27]. Portanto, devido a esta estratégia, é possível que os precipitados formados tenham sido constituídos por ligações químicas fracas e de alta sensibilidade ao desafio ácido.

Ainda que um determinado material tenha boas propriedades remineralizantes e/ou de formação de precipitados sobre a superfície dentinária, é crucial que eles não tenham efeitos deletérios da matriz de colágeno, pois futuramente isto poderá ocasionar comprometimento da longevidade das restaurações estéticas [9, 33].

No presente estudo optamos por avaliar os efeitos dos protocolos sobre o substrato dentinário, por meio da microscopia de luz polarizada e coloração com o sistema picrosirius red, onde a pigmentação vermelho/amarelo é o colágeno tipo I e a pigmentação amarelo/verde é o colágeno tipo III [31, 32]. As análises demonstraram que o substrato dentinário após o uso de RD apresenta maior incidência de colágeno tipo I, ao passo que, em KF e NP houve maior incidência de colágeno tipo III, provavelmente devido à presença do nitrato de potássio, que pode desencadear alterações moleculares na matriz orgânica do substrato dental.

Uma vez que o RD e NP são agentes remineralizantes, com mecanismo e ação similares, e proporcionam satisfatória formação de precipitados na dentina intertubular e com bom potencial de obstrução das embocaduras dos túbulos dentinários, podem ser uma alternativa interessante para auxiliar no tratamento da HD.

Por outro lado, como o NP possui ação sobre a matriz de colágeno, ainda são necessários outros estudos complementares para avaliar os efeitos dos protocolos com agentes remineralizantes, com a aplicabilidade no tratamento da DH, na dentina cervical e sua repercussão sobre a interface adesiva com os sistemas adesivos *etch-and-rinse* e/ou *self-etching*.

5. Conclusão

Os agentes RD e NP são alternativas viáveis para promover a formação de precipitados imediatos e obstruir a embocadura dos túbulos dentinários, sem efeitos deletérios sobre a matriz de colágeno da dentina previamente erodida, podendo ser útil no tratamento da hipersensibilidade dentinária.

Referências

- [1] D.G. Gillam, N.J. Mordan, H.N. Newman, The Dentin Disc surface: a plausible model for dentin physiology and dentin sensitivity evaluation, *Advances in dental research* 11(4) (1997) 487-501.
- [2] M. Brannstrom, The hydrodynamic theory of dentinal pain: sensation in preparations, caries, and the dentinal crack syndrome, *Journal of endodontics* 12(10) (1986) 453-7.
- [3] M. Berkathullah, M.S. Farook, O. Mahmoud, The Effectiveness of Remineralizing Agents on Dentinal Permeability, *BioMed research international* 2018 (2018) 4072815.
- [4] P.A. Walters, Dentinal hypersensitivity: a review, *The journal of contemporary dental practice* 6(2) (2005) 107-17.
- [5] T.S. Carvalho, P. Colon, C. Ganss, M.C. Huysmans, A. Lussi, N. Schlueter, G. Schmalz, R.P. Shellis, A.B. Tveit, A. Wiegand, Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear--diagnosis and management, *Clinical oral investigations* 19(7) (2015) 1557-61.
- [6] R.P. Shellis, M. Addy, The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear, *Monographs in oral science* 25 (2014) 32-45.
- [7] A. Corica, A. Caprioglio, Meta-analysis of the prevalence of tooth wear in primary dentition, *European journal of paediatric dentistry* 15(4) (2014) 385-8.
- [8] R. Moazzez, D. Bartlett, Intrinsic causes of erosion, *Monographs in oral science* 25 (2014) 180-96.
- [9] W.G. Escalante-Otarola, G.M. Castro-Nunez, K.C.F. Jordao-Basso, B.M. Guimaraes, R.G. Palma-Dibb, M.C. Kuga, Evaluation of dentin desensitization protocols on the dentinal surface and their effects on the dentin bond interface, *Journal of dentistry* 75 (2018) 98-104.
- [10] D. Mehta, V. Gowda, W.J. Finger, K. Sasaki, Randomized, placebo-controlled study of the efficacy of a calcium phosphate containing paste on dentin hypersensitivity, *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 31(11) (2015) 1298-303.
- [11] T. Komabayashi, Y. Imai, C. Ahn, L.C. Chow, S. Takagi, Dentin permeability reduction by a sequential application of calcium and fluoride-phosphate solutions, *Journal of dentistry* 38(9) (2010) 736-41.
- [12] T. Suge, K. Ishikawa, A. Kawasaki, K. Suzuki, T. Matsuo, S. Ebisu, Evaluation of post-treatment solutions for clinical use with the calcium phosphate precipitation method, *Journal of dentistry* 27(7) (1999) 487-96.
- [13] L.M. Tenuta, J.A. Cury, Fluoride: its role in dentistry, *Brazilian oral research* 24 Suppl 1 (2010) 9-17.
- [14] F.G. Carvalho, V.L. Brasil, T.J. Silva Filho, H.L. Carlo, R.L. Santos, B.A. Lima, Protective effect of calcium nanophosphate and CPP-ACP agents on enamel erosion, *Brazilian oral research* 27(6) (2013) 463-70.

- [15] L.P. Comar, B.M. Souza, L.F. Gracindo, M.A. Buzalaf, A.C. Magalhaes, Impact of experimental nano-HAP pastes on bovine enamel and dentin submitted to a pH cycling model, *Brazilian dental journal* 24(3) (2013) 273-8.
- [16] B.M. Souza, L.P. Comar, M. Vertuan, C. Fernandes Neto, M.A. Buzalaf, A.C. Magalhaes, Effect of an Experimental Paste with Hydroxyapatite Nanoparticles and Fluoride on Dental Demineralisation and Remineralisation in situ, *Caries research* 49(5) (2015) 499-507.
- [17] L.F. Santos, C.R. Torres, T.M. Caneppele, A.C. Magalhaes, A.B. Borges, Effect of home-bleaching gels modified by calcium and/or fluoride and the application of nano-hydroxyapatite paste on in vitro enamel erosion susceptibility, *Acta odontologica Scandinavica* 74(2) (2016) 121-6.
- [18] I.C. Medeiros, V.L. Brasil, H.L. Carlo, R.L. Santos, B.A. De Lima, F.G. De Carvalho, In vitro effect of calcium nanophosphate and high-concentrated fluoride agents on enamel erosion: an AFM study, *International journal of paediatric dentistry* 24(3) (2014) 168-74.
- [19] K.J. Cross, N.L. Huq, E.C. Reynolds, Casein phosphopeptides in oral health--chemistry and clinical applications, *Current pharmaceutical design* 13(8) (2007) 793-800.
- [20] E.C. Reynolds, Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: the scientific evidence, *Advances in dental research* 21(1) (2009) 25-9.
- [21] N.J. Cochrane, E.C. Reynolds, Calcium phosphopeptides -- mechanisms of action and evidence for clinical efficacy, *Advances in dental research* 24(2) (2012) 41-7.
- [22] M. Ghafournia, M.H. Tehrani, A. Nekouei, R. Faghihian, M. Mohammadpour, A. Feiz, In vitro evaluation of dentin tubule occlusion by three bioactive materials: A scanning electron microscopic study, *Dental research journal* 16(3) (2019) 166-171.
- [23] F. Bou Chebel, C.M. Zogheib, N.Z. Baba, K.A. Corbani, Clinical Comparative Evaluation of Nd:YAG Laser and a New Varnish Containing Casein Phosphopeptides-Amorphous Calcium Phosphate for the Treatment of Dentin Hypersensitivity: A Prospective Study, *Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists* 27(9) (2018) 860-867.
- [24] A. Mahesuti, Y.L. Duan, G. Wang, X.R. Cheng, B.A. Matis, Short-term Efficacy of Agents Containing KNO₃ or CPP-ACP in Treatment of Dentin Hypersensitivity, *The Chinese journal of dental research : the official journal of the Scientific Section of the Chinese Stomatological Association* 17(1) (2014) 43-7.
- [25] C. Poggio, C. Gulino, M. Mirando, M. Colombo, G. Pietrocola, Preventive effects of different protective agents on dentin erosion: An in vitro investigation, *Journal of clinical and experimental dentistry* 9(1) (2017) e7-e12.
- [26] K. Hornby, S.R. Ricketts, C.J. Philpotts, A. Joiner, B. Schemehorn, R. Willson, Enhanced enamel benefits from a novel toothpaste and dual phase gel containing calcium silicate and sodium phosphate salts, *Journal of dentistry* 42 Suppl 1 (2014) S39-45.
- [27] Y. Sun, X. Li, Y. Deng, J.N. Sun, D. Tao, H. Chen, Q. Hu, R. Liu, W. Liu, X. Feng, J. Wang, M. Carvell, A. Joiner, Mode of action studies on the formation of enamel minerals from a novel toothpaste containing calcium silicate and sodium phosphate salts, *Journal of dentistry* 42 Suppl 1 (2014) S30-8.

- [28] S.H. Joao-Souza, T. Scaramucci, A. Buhler Borges, A. Lussi, T. Saads Carvalho, A.C. Correa Aranha, Influence of desensitizing and anti-erosive toothpastes on dentine permeability: An in vitro study, *Journal of dentistry* 89 (2019) 103176.
- [29] Z. Dong, J. Chang, Y. Deng, A. Joiner, Tricalcium silicate induced mineralization for occlusion of dentinal tubules, *Australian dental journal* 56(2) (2011) 175-80.
- [30] M.C. Kuga, M.V. So, N.B. De Faria-junior, K.C. Keine, G. Faria, S. Fabricio, M.A. Matsumoto, Persistence of resinous cement residues in dentin treated with different chemical removal protocols, *Microscopy research and technique* 75(7) (2012) 982-5.
- [31] C.C. Bigueti, F. Cavalla, C.R. Tim, P.P. Saraiva, W. Orcini, L. De Andrade Holgado, A.C.M. Renno, M.A. Matsumoto, Bioactive glass-ceramic bone repair associated or not with autogenous bone: a study of organic bone matrix organization in a rabbit critical-sized calvarial model, *Clinical oral investigations* 23(1) (2019) 413-421.
- [32] L.T.A. Cintra, L.L. Ferreira, F. Benetti, A.A. Gastelum, J.E. Gomes-Filho, E. Ervolino, A.L.F. Briso, The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model, *International endodontic journal* 50(8) (2017) 790-798.
- [33] M. Schroeder, I.C. Correa, J. Bauer, A.D. Loguercio, A. Reis, Influence of adhesive strategy on clinical parameters in cervical restorations: A systematic review and meta-analysis, *Journal of dentistry* 62 (2017) 36-53.

3.2 Publicação 2*

Efeitos de agentes remineralizantes à base de fosfato ou silicato de cálcio no sistema adesivo self-etch Clearfil SE Bond aplicado sobre dentina erodida e submetida a desafio ácido

RESUMO

Objetivos: Avaliar por meio de Teste de Microtração (μ TBS) a resistência de união, SEM a formação de camada híbrida e Microscopia Confocal a Laser (CLSM) a penetrabilidade dentinária do sistema adesivo *self-etch* Clearfil SE Bond aplicado sobre dentina cervical erodida e tratada com agentes remineralizantes à base de fosfato ou silicato de cálcio

Métodos: Cem espécimes foram obtidos do segmento cervical de incisivos bovinos e previamente submetidos à erosão dentinária. Os espécimes foram distribuídos em 5 protocolos (n=20): (NP), Desensibilize NanoP; (RD), MI Paste Plus Recaldent™; (NR), Regenerate NR-5™; (KF), Desensibilize KF 2% e CO, sem tratamento. Cada um dos protocolos foi aplicado no total de 4 sessões, com intervalos de 7 dias. Todos os espécimes foram diariamente submetidos ao desafio ácido, por imersão em suco de laranja, por 5 minutos e, posteriormente mantidos em saliva artificial. Na sequência, o sistema adesivo Clearfil SE Bond (Kuraray) foi aplicado no substrato dentinário erodido. Cinquenta espécimes (n=10) foram submetidos a μ TBS para avaliação da resistência de união e padrão de fratura (200N). Os cinquenta espécimes restantes foram analisados em SEM para avaliar a formação de camada híbrida, e em CLSM para avaliar a penetrabilidade dentinária do sistema adesivo, na dentina erodida.

Resultados: Em relação à resistência de união, NP e NR demonstraram os valores mais altos de resistência de união, no entanto, nenhum dos protocolos avaliados apresentaram diferenças significantes com CO ($P<0.05$). Em relação à formação de camada híbrida, NR demonstrou menor espessura de camada híbrida que o CO ($P<0.05$). Em relação à penetrabilidade dentinária, RD e NR demonstraram menor penetrabilidade do sistema adesivo *self-etch* que CO ($P<0.05$), na dentina erodida.

* Formatação de acordo com as normas do periódico *Journal of Dentistry*, periódico para o qual pretende-se submeter

Conclusões: A aplicação do NP evidenciou melhores características na interface adesiva, sem diminuir a resistência de união do sistema adesivo *self-etch*. Entretanto, a aplicação dos agentes RD e NR diminuiu sua penetrabilidade dentinária.

Relevância clínica: Como os agentes remineralizantes não diminuem a resistência de união do sistema adesivo *self-etch*, são alternativas viáveis de tratamento, previamente a restaurações em dentina erodida.

Keywords: Dentina. Erosão dentária. Microscopia eletrônica de varredura. Remineralização dentária. Adesivos dentinários

1. Introdução

Com o aumento da expectativa de vida e melhora na saúde bucal da população, é cada vez mais comum que pessoas procurem tratamento por hipersensibilidade dentinária (HD)[1, 2], que é geralmente associada ao desgaste dentário erosivo[3]. A erosão dental é considerada o único tipo de desgaste dentário que pode ser atribuído totalmente a um fenômeno químico sem envolvimento de microorganismos [4]. Bebidas ácidas em contato direto com a superfície dentária podem originar uma textura áspera e desgaste gradual dos dentes [5], por ter um valor de pH que facilita a destruição da composição mineral do esmalte [6, 7] e da dentina [8]. Assim, o desgaste dentário erosivo promove remoção de detritos, expondo túbulos dentinários e desenvolvendo HD [3, 9].

A HD é descrita clinicamente como a dor aguda causada pela excitação das fibras nervosas A delta conectadas à dentina exposta e seus túbulos, devido a estimulação química, térmica, osmótica, evaporativa ou tátil [10]. Atualmente são recomendados protocolos dessensibilizantes que possuam a capacidade de formar precipitados minerais insolúveis dentro dos túbulos dentinários utilizando agentes remineralizantes [11].

Diversos protocolos têm sido descritos na literatura, para o tratamento da HD como fluoreto de sódio [12], cloreto de estrôncio [13], nanopartículas de fosfato de cálcio [14], fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) [15], e silicato de cálcio [16], pela capacidade de obliterar túbulos dentinários. Embora muitos desses protocolos sejam eficazes no controle da HD, nenhum deles demonstrou ser o ideal [17], devido à fragilidade da obliteração de túbulos dentinários quando expostos ao desafio erosivo [18]. A obliteração de túbulos dentinários lograda com estes agentes é superficial com profundidade de infiltração limitada [19], sendo vulnerável ao desgaste dentário erosivo.

Assim, é comumente necessário a complementação do tratamento da HD com procedimentos restauradores adesivos que visam recuperar a estética e função dos dentes [20]. Embora sistemas adesivos atuais promovam uma adequada adesão no esmalte e na dentina, o mesmo não acontece quando a superfície dentaria é exposta a diferentes desafios químicos e/ou mecânicos, como no desgaste dentário erosivo [21, 22], ou aos tratamentos dessensibilizantes/remineralizantes [23]. Foi demonstrado que a aplicação do CPP-ACP e do fosfato de cálcio nanoparticulado, não interferem sobre a resistência de união do sistema adesivo *total-etch* na dentina [14, 24], porém não há estudos comparativos com sistemas autocondicionantes.

Sistemas adesivos autocondicionantes (*self-etch*), são os indicados para restaurações sobre dentina, por não precisar um condicionamento ácido agressivo, que poderia acentuar a HD, provocando dor pós-operatório [25]. Por ser um protocolo adesivo simplificado é considerado menos sensíveis à técnica [26]. Estes sistemas adesivos oferecem excelente adesão à estrutura dentária (esmalte e dentina) [27, 28], porém é pouco conhecida a qualidade da adesão a substratos dentinários afetados pela erosão ácida e tratados com protocolos remineralizantes.

Por tanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos dos protocolos remineralizantes dentários contendo nanopartículas de fosfato de cálcio (Desensibilize NanoP), fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo (MI Paste Plus Recaldent™ CPP-ACP) e silicato de cálcio associado com fosfato de sódio (Regenerate NR-5™) associados ao sistema adesivo *self-etch* Clearfil SE Bond aplicado sobre dentina erodida e submetida a desafio ácido diário, por meio da avaliação da resistência de união (μ TBS), formação de camada híbrida (SEM) e penetrabilidade dentinária (CLSM), em comparação com um protocolo dessensibilizante dentinário convencional, contendo nitrato de potássio com fluoreto de sódio (Desensibilize KF2%). A hipótese nula foi estabelecida como a inexistência de diferenças nos parâmetros avaliados em relação aos diferentes protocolos testados.

2. Material e métodos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (Proc. CEUA nº 30/2018). Cem incisivos bovinos com coroas e raízes anatomicamente similares foram armazenados em solução de timol a 0,1%, a 4 °C, até o momento de uso.

2.1. Preparo dos espécimes

Cem espécimes (10mm de comprimento x 10mm de largura x 5mm de espessura) foram obtidos do terço médio dos dentes usando máquina de corte de tecidos duros (Isomet 100, Buehler, Lake Bluff, IL) sob refrigeração com água corrente. A superfície vestibular dos fragmentos foi desgastada em politriz (DP-10; Panambra, Struers, Ballerup, DI) usando lixas de granulação #600 e #1200, por 20s cada (ISO 6344-1), para exposição dentinária e padronização da *smear layer*.

A superfície dentinária foi previamente condicionada usando ácido clorídrico (HCL) a 0,6% (Arte & Ciência, Araraquara, São Paulo, Brazil) por 5 min para simular o substrato dentinário erodido. Na sequência, os espécimes foram lavados com água destilada e armazenados em saliva artificial até o momento de uso.

2.2. Protocolos avaliados

Quatro protocolos com agentes remineralizantes foram utilizados neste estudo, com o propósito de avaliar a sua interferência na resistência de união, formação de camada híbrida e penetrabilidade do sistema adesivo Clearfil SE Bond (Kuraray; Okayama, Japan) aplicado sobre a dentina erodida. A tabela 1 demonstra a composição química dos protocolos avaliados.

Os protocolos avaliados foram (n = 20 espécimes por protocolo, sendo 10 para avaliação da resistência de união e 10 espécimes para avaliação da interface adesiva):

- (NP): O produto contendo nanopartículas de fosfato de cálcio (Dessensibilize NanoP; FGM, Joinville, SC, BR) foi friccionado sobre a superfície dentinária com taça de borracha (KG Sorensen, São Paulo, SP, BR), em baixa rotação, com 500 rpm, por 10s. Em seguida, os resíduos permaneceram sobre a dentina por 5 min e lavados com 10 mL de água deionizada;

- (RD): O produto contendo CPP-ACPF (MI Paste Plus Recaldent™; GC Company; JPN) foi aplicado sobre a superfície dentinária, similar ao descrito no protocolo anterior, porém o produto foi mantido sobre a dentina por 3 min;

- (NR): O produto contendo duas pastas (Regenerate NR-5™; Unilever, Wirral, UK), gel remineralizante e ativador, foram previamente misturados e utilizados identicamente ao protocolo anterior, também mantido sobre a dentina por 3 min;

- (KF): O produto utilizado foi a base de fluoreto de sódio a 2% (Dessensibilize KF2%; FGM, Joinville, SC, BR) foi apenas aplicado sobre a superfície dentinária com um aplicador específico para sistema adesivo (KG Sorensen, São Paulo, SP, BR), sem fricção, e mantido no local por 10 min;

- (CO): Os espécimes foram mantidos em saliva artificial e serviram como protocolo controle negativo.

Os espécimes foram submetidos a 4 sessões de tratamentos, com intervalos de 7 dias entre cada sessão. Durante a realização do tratamento, os espécimes foram submetidos ao desafio ácido, por imersão diária em suco de laranja (Minute Mais; Coca Cola®. SP, BR), com pH 3.80 ± 0.04 , por 5 min. Em seguida foram lavados com 10 mL de água deionizada e mantidos imersos individualmente em saliva artificial, a 37°C, trocada a cada 7 dias, imediatamente após a realização dos protocolos avaliados.

2.3. Protocolo adesivo

O sistema adesivo Clearfil SE Bond foi aplicado na superfície dentinária erodida segundo as recomendações do fabricante e fotoativado com fotopolimerizador LED (Valo™ Cordless; Ultradent, South Jordan, USA), com uma intensidade standard de 1000 mW / cm² por 10 s.

Nos cinquenta espécimes para avaliação da interface adesiva (penetrabilidade dentinária), Rodamina B (Synth, São Paulo, SP, Brazil) foi adicionada ao primer do sistema adesivo *self-etch* (Clearfil SE Bond; Kuraray, Okayama, Japan), na proporção de 16µL a cada 0.4mL.

2.4. Avaliação da resistência de união

Cinquenta espécimes foram divididos aleatoriamente de acordo com o protocolo avaliado e controle (n = 10). Após aplicação do sistema adesivo na dentina erodida, foram construídos blocos de resina composta (Filtek Z-350; 3 M, St. Paul, MN, USA) em três

incrementos de aproximadamente 1mm, sendo cada incremento fotoativado, utilizando o mesmo fotopolimerizador anteriormente descrito, durante 20 s. No final foi obtido um bloco de resina composta de 3mm de altura sobre os espécimes e armazenados em ambiente úmido a 37° C por 24 h.

Posteriormente, foram obtidos em média 12 palitos de cada espécime, com dimensões de aproximadamente 1,0 x 1,0 x 6,0 mm, usando máquina de corte de tecidos duros (Isomet 100, Buehler, Lake Bluff, IL) sob refrigeração como água corrente. Na sequência, os palitos foram fixados pelas suas extremidades ao dispositivo para teste de microtração com adesivo a base de cianocrilato (Loctite Superbonder Gel®, Henkel Adesivos LTDA, Itapevi, Brasil). Cada palito foi posicionado de maneira que a interface resina-dentina ficasse no centro do dispositivo e perpendicular à carga de tração aplicada durante o teste. Foram então submetidos ao ensaio de microtração em uma máquina universal de ensaios eletromecânicos EMIC DL2000 (EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brazil) com velocidade de 0,5 mm/min com adaptação de uma célula de carga de 200N.

No momento da fratura o movimento foi imediatamente cessado e os valores em newtons (N) coletados para posterior análise. Após a fratura dos corpos de prova, estes foram removidos do dispositivo e a seção transversal (medida das duas dimensões da superfície de fratura em mm) de cada um deles foi aferida utilizando-se um paquímetro digital (Vonder Paquímetro Eletrônico Digital, Curitiba, PR, Brasil) para posterior cálculo da área de união. Para expressar a resistência de união em megapascal (MPa), os valores em N foram divididos pela área de união, em mm². Uma média aritmética foi calculada para os palitos de cada espécime e considerada para análise estatístico.

2.5. Avaliação do padrão de fratura

O padrão de fratura foi analisado utilizando estereomicroscópio (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), com magnificação de 50x segundo a classificação de fratura: adesiva, quando a fratura foi na interface resina-dentina; coesiva em resina, quando a fratura foi na resina composta; coesiva em dentina, quando a fratura foi na dentina; e mista, quando os corpos apresentaram mais de um padrão de fratura [14, 29].

2.6. Avaliação da formação de camada híbrida

Após a aplicação do sistema adesivo na dentina erodida, um bloco de 4mm de altura de resina composta (Filtek Z-350; 3 M, St. Paul, MN, USA) foi reconstruído e a cada

incremento de 2mm foi fotoativado por 20 s. Na sequência, os espécimes foram armazenados em ambiente úmido. Após 24 h, os espécimes foram cortados longitudinalmente na metade utilizando máquina de corte de tecidos duros (Isomet; Buehler, Lake Bluff, IL) sob refrigeração de água corrente, e selecionada uma de cada corpo.

As faces foram desgastadas em politriz (DP-10; Panambra, Struers, Ballerup, DI) usando lixas de granulação #600 e #1200, por 20s cada. Uma das faces obtidas de cada espécimen, foi selecionada para avaliar a formação da camada híbrida. Na sequência, as faces selecionadas foram imersas em solução de ácido clorídrico 18% por 30 s, para remoção da *smear layer* superficial e posterior lavagem, por 30 s com água deionizada. Posteriormente, foram imersas em hipoclorito 5% por 5 min, para remoção de todo o colágeno não infiltrado pelo sistema adesivo, e posterior lavagem por 30 s.

As faces foram desidratadas em câmara fechada com sílica coloidal por 7 dias. Após a montagem dos espécimenes nos *stubs* metálicos, foram revestidos a ouro (ciclo simples – 120s) sob vacuum, em câmara de metalização (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) e examinados mediante microscopia eletrônica de varredura com JEOL 6060 (JEOL 6060; JEOL Ltda, Tokyo, Japan) operado a 20 kV, conforme descrito por Escalante-Otárola et al. [14].

Quatro campos distintos da interface adesiva foram inicialmente avaliados e do campo mais representativo do espécime foi obtida uma imagem com a magnificação de 500x, para avaliação da formação de tags de resina. A obtenção das imagens foi realizada por um único operador. Outra imagem foi obtida do mesmo local, com magnificação de 2000x, para mensuração da camada híbrida. Todas as imagens foram obtidas pelo mesmo operador.

Dois examinadores independentes e devidamente calibrados ($k = 0.82$) mesuraram a espessura da camada híbrida em 10 pontos com ajuda do software Image J. Os resultados obtidos pelos dois examinadores foram usados para calcular o valor da média que foi determinada para cada espécimen. Outros dois examinadores calibrados classificaram a formação de tags de resina segundo o descrito por Manicardi et al. [30]: Escore 0 – não houve formação de tags; Escore 2 – poucos e curtos tags; Escore 3 – tags longos e Escore 4 – tags longos e densos.

2.7. Avaliação da penetrabilidade dentinária

Após a aplicação do sistema adesivo na dentina erodida, um bloco de 4mm de altura de resina composta (Filtek Z-350; 3 M, St. Paul, MN, USA) com partículas de verde malaquita (Synth, São Paulo, SP, Brazil) foi reconstruído e a cada incremento de 2mm foi fotoativado por 20 s. Na sequência, os espécimes foram armazenados em ambiente úmido. Após 24h, os espécimes foram cortados longitudinalmente na metade utilizando máquina de corte de tecidos duros (Isomet; Buehler, Lake Bluff, IL) sob refrigeração de água corrente, e selecionada uma de cada corpo.

As faces foram desgastadas em politriz (DP-10; Panambra, Struers, Ballerup, DI) usando lixas de granulação #600 e #1200, por 20s cada. Uma das faces obtidas de cada espécimen, foi selecionada para avaliar a penetrabilidade dentinária do sistema adesivo.

Na sequência, foram lavadas em cuba ultrassônica por 5 min y secadas com papel absorvente. As faces foram analisadas usando microscopia confocal a laser CLSM (LSM5; Zeiss, Jena, Germany). Uma imagem foi obtida da interface adesiva, com 20x de aumento. Dez medidas da penetração do sistema adesivo nos túbulos dentinários foram obtidas por dois examinadores independentes e devidamente calibrados ($k = 0.82$), usando o programa Image J National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). A média aritmética das medidas foi considerado como a penetrabilidade dentinária do sistema adesivo em cada espécimen.

2.8. Análise estatística

Inicialmente todos os dados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para averiguação da homocedasticidade dos dados. Os dados de resistência de união, mensuração da camada híbrida e penetrabilidade dentinária foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey. Os dados de formação de tags de resina foram submetidos aos testes de Kruskal Wallis e Dunn. Todas as avaliações foram com um nível de significância de $\alpha = 5\%$.

Tabela 1. Composição dos agentes químicos utilizados nos protocolos avaliados.

Grupo	Composição	Fabricante
NP – Desensibilize NanoP	Calcium phosphate (nano-HAP), Potassium nitrate and 9000 ppm sodium fluoride.	FGM, Brasil
RD – MI Paste Plus <i>Recaldent</i> TM	CPP-ACPF (Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate Fluoride), Glycerol, D-Sorbitol, CMC-Na, Propylene glycol, Silicon dioxide, Titanium dioxide, Xylitol, Phosphoric acid, Flavoring, Sodium saccharin, Ethyl p-hydroxybenzoate, Propyl p-hydroxybenzoate, Butyl p-hydroxybenzoate. 900 ppm fluoride.	GC, Japão
NR – Regenerate <i>NR-5</i> TM	Glycerin, CalciumSilicate, PEG-8, Hydrated Silica, Trisodium Phosphate, SodiumPhosphate, Aqua, PEG-60, Sodium Lauryl Sulfate, Sodium Monofluorophosphate, Synthetic Fluorophlogopite, Sodium Saccharin, Polyacrylic Acid, Tin Oxide, Limonene, CI 77891. 1450 ppm fluoride.	Unilever, Reino Unido
KF – Desensibilize KF 2%	KNO ₃ (5%) + NaF (2%)	FGM, Brasil
CO – Controle negativo	Deionized water	–

KNO₃, nitrato de potássio; NaF, fluoreto de sódio.

3. Resultados

3.1. Avaliação da resistência de união

Os protocolos NP e NR apresentaram maior resistência de união à microtração que a demonstrada por RD ($P < 0.05$), porém não apresentaram diferenças significantes com KF e CO ($P > 0.05$). Em contrapartida, RD, KF e CO demonstraram similares valores entre si ($P > 0.05$). A figura 1 mostra o gráfico dos resultados de resistência de união (MPa) do sistema adesivo Clearfil SE Bond na dentina erodida, após o uso dos protocolos avaliados.

A avaliação do padrão de fratura foi realizada com estereomicroscópio, e os resultados são mostrados na figura 2. O padrão de fratura adesiva foi o mais encontrado em todos os grupos: NP (68%), RD (64%), NR (77%), KF (68%) e CO (71%).

3.2. Avaliação da formação de camada híbrida

Em relação à formação de tags de resina, todos os protocolos testados foram semelhantes entre si ($P > 0.05$). Em relação à formação de camada híbrida, NP mostrou camada híbrida mais espessa que NR ($P < 0.05$), porém não apresentou diferenças significantes com RD, KF e CO ($P > 0.05$). Entretanto, NR mostrou a camada híbrida menos espessa ($P < 0.05$).

A tabela 2 mostra a mediana, valores mínimo e máximo, e 1º e 3º quartil da formação de tags de resina, e a média e desvio padrão da mensuração da camada híbrida do sistema adesivo Clearfil SE Bond na dentina erodida, após aplicação dos protocolos avaliados. A figura 3 mostra uma imagem representativa da interface do sistema adesivo na dentina erodida, após o uso dos protocolos avaliados (500x e 2.000x).

3.3. Avaliação da penetrabilidade dentinária

Em relação à avaliação da penetrabilidade dentinária, NP mostrou a maior penetrabilidade do sistema adesivo Clearfil SE Bond em relação a RD e ($P < 0.05$), porém não apresentou diferenças significantes com KF e CO ($P > 0.05$). Entretanto, RD e NR foram semelhantes ($P > 0.05$), porém apresentaram menor penetrabilidade que CO ($P < 0.05$).

A tabela 3 mostra a média e desvio padrão da penetrabilidade do sistema adesivo Clearfil SE Bond na dentina erodida, após a aplicação dos protocolos avaliados. A Figura 4 mostra uma imagem representativa da penetrabilidade dentinária do sistema adesivo.

Figura 1

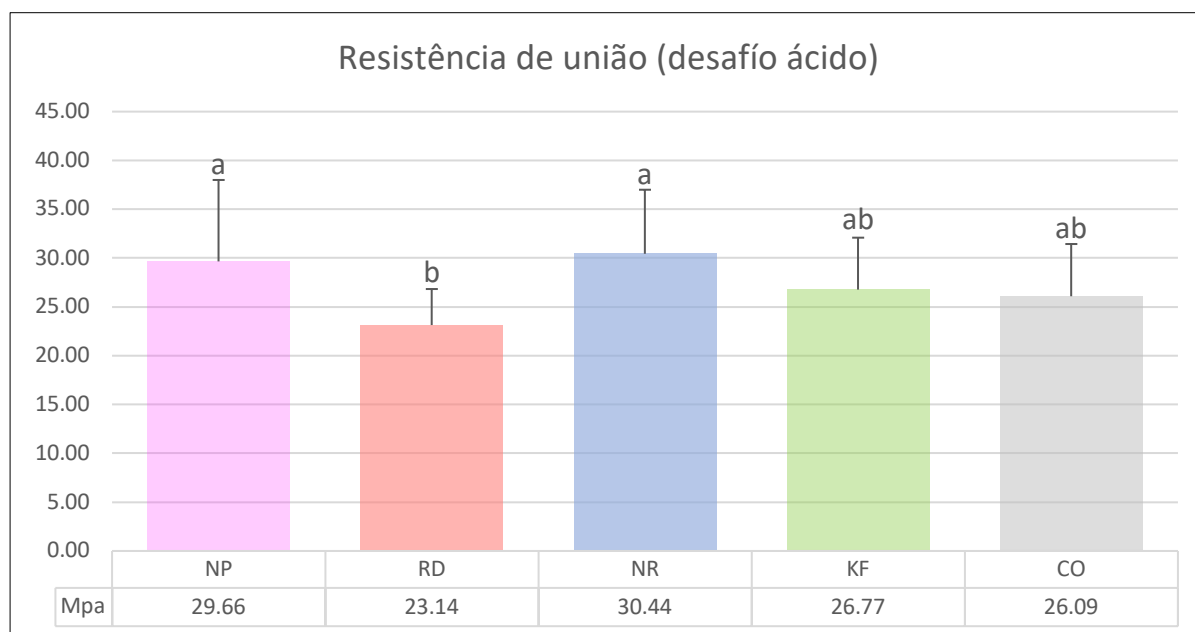


Fig. 1. Gráfico da avaliação da resistência de união (MPa) com teste eletromecânico de microtração, do sistema adesivo Clearfil SE Bond após a aplicação dos protocolos e grupo controle, na dentina cervical exposta a desafio ácido diário. NP, Desensibilize NanoP; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF2%; CO, Controle negativo.

Figura 2

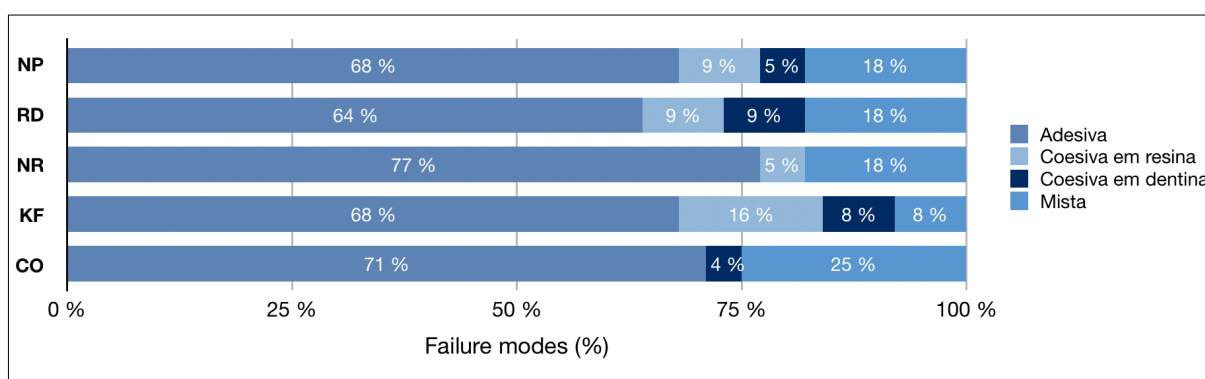


Fig 2. Incidência do padrão de fratura do sistema adesivo Clearfil SE Bond, demonstrado após a aplicação dos protocolos e grupo controle, na dentina cervical exposta a desafio ácido diário. NP, Desensibilize NanoP; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF2%; CO, Controle negativo.

Tabela 2

Formação de tags de resina e camada híbrida do sistema adesivo Clearfil SE Bond

		NP	RD	NR	KF	CO
<i>Presença de tags</i>	mediana	2	2	2	2	2
	min/máx	1 - 2	2 - 3	2 - 3	2 - 3	1 - 2
	1Q/3Q	2 - 2	2 - 3	2 - 2	2 - 2	2 - 2
<i>Camada híbrida</i>	média	1.78 ^a	1.48 ^{ab}	1.29 ^b	1.52 ^{ab}	1.76 ^a
	sd	0.12	0.11	0.29	0.20	0.23

^{ab} Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significantes ($p < 0.05$). 1Q e 3Q, primeiro e terceiro quartil; min, valor mínimo; máx, valor máximo; sd, desvio padrão, respectivamente. NP, Desensibilize NanoP; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF2%; CO, Controle negativo.

Tabela 3Penetrabilidade dentinária do sistema adesivo Clearfil SE Bond (μm)

	NP	RD	NR	KF	CO
média	148.62 ^a	96.53 ^c	117.51 ^{bc}	139.48 ^{ab}	152.62 ^a
sd	5.38	9.72	14.04	16.94	14.77

^{ab} Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significantes ($p < 0.05$). sd, desvio padrão. NP, Desensibilize NanoP; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF2%; CO, Controle negativo.

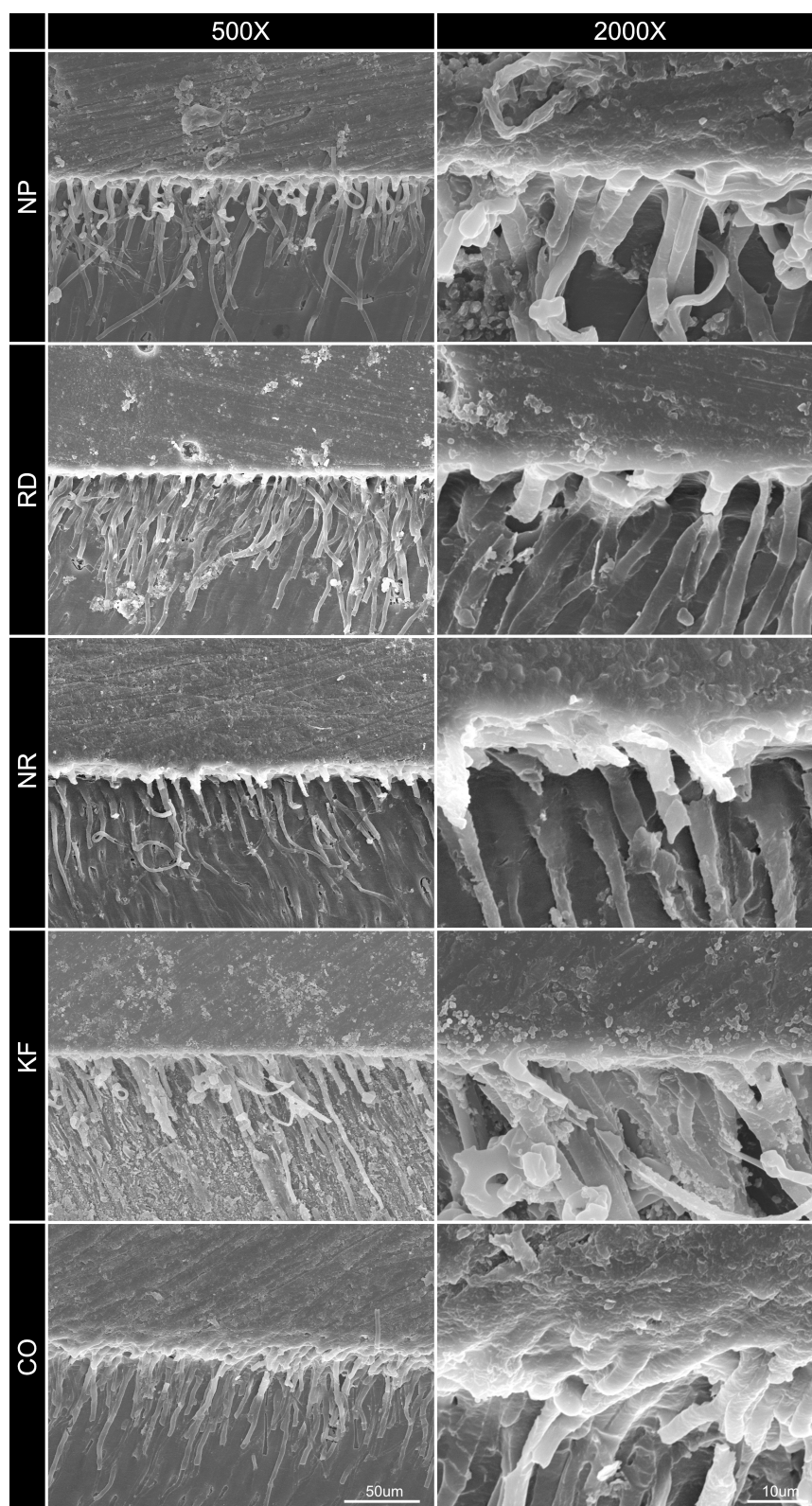
Figura 3

Fig. 3. Imagem representativa da interface adesiva do sistema adesivo do sistema adesivo Clearfil SE Bond, após a aplicação dos protocolos e grupo controle, na dentina erodida. NP, Desensibilize Nano P; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF 2%; CO, Controle negativo. Escala 50µm y 10µm.

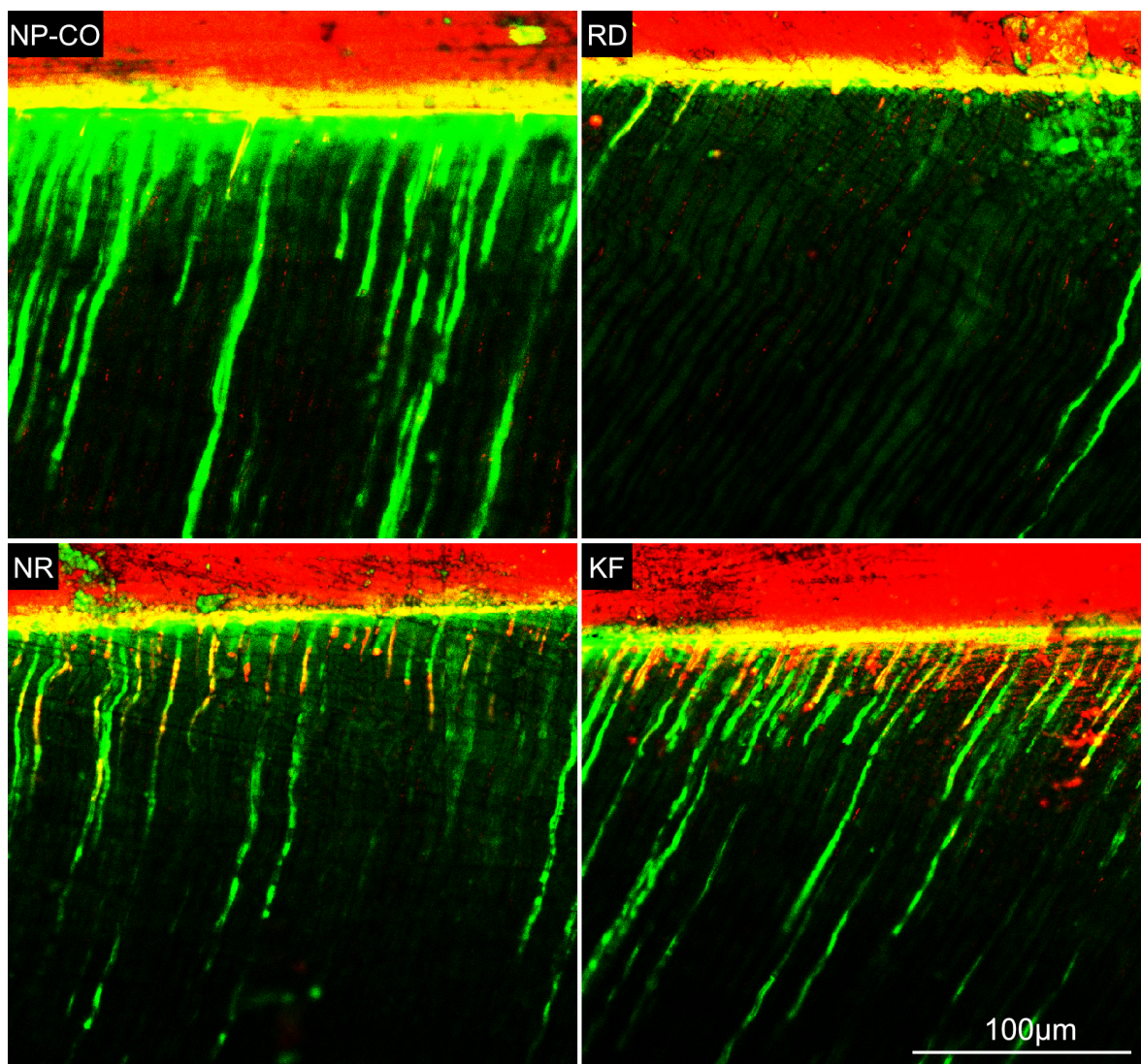
Figura 4

Fig. 4. Imagem representativa da penetrabilidade dentinária do sistema adesivo do sistema adesivo Clearfil SE Bond, após a aplicação dos protocolos e grupo controle, na dentina erodida. NP, Desensibilize Nano P; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF 2%; CO, Controle negativo. Escala 100µm.

4. Discussão

O presente estudo avaliou os efeitos de diferentes agentes remineralizantes NP, NR, RD, com a finalidade de auxiliar no tratamento da hipersensibilidade dentinária, sobre a interface adesiva com o sistema adesivo *self-etch* (Clearfil SE Bond), comparado a um protocolo convencional à base de nitrato de potássio e fluoreto de sódio (KF). A hipótese nula foi parcialmente rejeitada pois os protocolos avaliados não demonstraram efeitos sobre a resistência de união à microtração nem na interface com o sistema adesivo avaliado. Entretanto, algumas exceções ocorreram, tais como NP e NR demonstrar maior valor de resistência de união que RD e, também NP demonstrou formação de camada híbrida mais espessa e maior penetrabilidade dentinária em relação a NR.

O adesivo *self-etch* de dois passos (Clearfil SE) tem a interação química com a hidroxiapatita como seu principal mecanismo de adesão ao substrato dentinário, muito embora a microretenção mecânica, por meio da formação de camada híbrida, também contribuía, porém em menor magnitude [31]. Qualquer barreira física e/ou química que impeça essa interação, pode ter efeitos negativos na interface adesiva, que pode comprometer a longevidade das restaurações estéticas negativamente e/ou o tratamento da hipersensibilidade dentinária [32, 33].

Os protocolos NP e NR demonstraram maior resistência de união que RD, porém similares aos demonstrados por KF e CO. O protocolo NP contém nanopartículas de hidroxiapatita que precipitam sobre a superfície dentinária, formando um composto estável com o cálcio e fósforo sobre o substrato dental [34-37] e não possui efeitos deletérios sobre a interface adesiva com o adesivo *etch-and-rinse* [14]. Por outro lado, o NR é um composto de silicato de cálcio e fosfato de sódio (fosfato mono e trissódico) que ao precipitar sobre o substrato dentário induz a formação de hidroxiapatita [38]. Aparentemente, a diferença entre os dois mecanismos de remineralização está relacionado ao momento de formação da hidroxiapatita, uma vez que o NP já possui nanopartículas em sua composição [35, 38].

O RD é um fosfolípídeo derivado da caseína do leite (CPP), que após a sua degradação química libera resíduos de fosfoeril, proporcionando a estabilização do íon cálcio e fósforo, o fosfato de cálcio que está presente como um complexo molecular amorfo associado ao CPP, referido como *casein phosphopeptide-amorphous calcium-phosphate* (CPP-ACP), além de induzir a formação de fluoroapatita [39-44]. Nosso resultado com este protocolo está de acordo com um prévio estudo [45, 46], que também

demonstrou valores de resistência de união quando comparado ao CO. Entretanto, nossos resultados são divergentes de um outro estudo que observou um aumento da resistência de união do adesivo *self-etch* na dentina desmineralizada, após o uso do adesivo Clearfil SE Bond, porém em nosso estudo, a dentina foi submetida ao desafio ácido, que pode ter interferido negativamente sobre o processo de remineralização proporcionado pelo CPP-ACP [23].

Curiosamente, em nosso estudo, NP e NR também demonstraram similaridade de resultados com o KF e CO. Uma vez que a formação de tags, extensão de formação de camada híbrida e penetrabilidade do sistema adesivo no substrato dentinário entre NP, NR e RD foram similares, hipoteticamente deduzimos que apenas a estabilidade química e tipo de precipitado formados pelos protocolos sejam diferentes e, conseqüentemente, gerando influências sobre os resultados de microtração [14, 38, 47].

Os agentes remineralizantes proporcionam a deposição de precipitados sobre o substrato dentário e podem ser uma interessante estratégia para colaborar no tratamento da hipersensibilidade dentinária [14, 35, 37]. Entretanto, estes precipitados podem, devido a sua estabilidade química com a dentina ter efeitos, positivo ou negativos, sobre a interface adesiva, principalmente com o sistema adesivo *self-etch*, após a submissão do substrato dentinário ao desafio ácido [23, 46, 47].

Devido estas pressuposições abrirem novas estratégias de tratamento para as temíveis situações de hipersensibilidade dentinária, outros estudos ainda se fazem necessários para confirmar a viabilidade de agentes remineralizantes à base nanopartículas de hidroxiapatita, CPP-ACP ou silicato de cálcio como agentes dessensibilizantes da dentina hipersensível, previa restauração adesiva.

5. Conclusão

A aplicação do NP demonstrou melhores características na interface adesiva, sem diminuir a resistência de união do sistema adesivo *self-etch* Clearfil SE Bond. Entretanto, a aplicação dos agentes RD e NR diminuiu sua penetrabilidade dentinária.

Referências

- [1] H. Canadian Advisory Board on Dentin, Consensus-based recommendations for the diagnosis and management of dentin hypersensitivity, *Journal* 69(4) (2003) 221-6.
- [2] C.H. Splieth, A. Tachou, Epidemiology of dentin hypersensitivity, *Clinical oral investigations* 17 Suppl 1 (2013) S3-8.
- [3] K.T. Yoshizaki, L.F. Francisconi-Dos-Rios, M.A. Sobral, A.C. Aranha, F.M. Mendes, T. Scaramucci, Clinical features and factors associated with non-carious cervical lesions and dentin hypersensitivity, *Journal of oral rehabilitation* 44(2) (2017) 112-118.
- [4] A. Lussi, T.S. Carvalho, Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge, *Monographs in oral science* 25 (2014) 1-15.
- [5] L.M. Martins, L.F. Francisconi-dos-Rios, F. Meira Gde, V.P. Bertocco, L.M. Silva, M.A. Rebelo, Amazonian delicacy tucupi is as erosive as a cola-based soft drink, *Archives of oral biology* 61 (2016) 84-8.
- [6] M. Lombardini, M. Ceci, M. Colombo, S. Bianchi, C. Poggio, Preventive effect of different toothpastes on enamel erosion: AFM and SEM studies, *Scanning* 36(4) (2014) 401-10.
- [7] N.X. West, J. Seong, N. Hellin, H. Eynon, M.L. Barker, T. He, A clinical study to measure anti-erosion properties of a stabilized stannous fluoride dentifrice relative to a sodium fluoride/triclosan dentifrice, *International journal of dental hygiene* 15(2) (2017) 113-119.
- [8] A.V. Zavgorodniy, R. Rohanizadeh, M.V. Swain, Ultrastructure of dentine carious lesions, *Archives of oral biology* 53(2) (2008) 124-32.
- [9] R. McAndrew, S. Kourkouta, Effects of toothbrushing prior and/or subsequent to dietary acid application on smear layer formation and the patency of dentinal tubules: an SEM study, *Journal of periodontology* 66(6) (1995) 443-8.
- [10] D.G. Gillam, N.J. Mordan, H.N. Newman, The Dentin Disc surface: a plausible model for dentin physiology and dentin sensitivity evaluation, *Advances in dental research* 11(4) (1997) 487-501.
- [11] M. Berkathullah, M.S. Farook, O. Mahmoud, The Effectiveness of Remineralizing Agents on Dentinal Permeability, *BioMed research international* 2018 (2018) 4072815.
- [12] N. Pandit, R. Gupta, A. Bansal, Comparative evaluation of two commercially available desensitizing agents for the treatment of dentinal hypersensitivity, *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research* 23(6) (2012) 778-83.
- [13] K. Saeki, G.W. Marshall, S.A. Gansky, C.R. Parkinson, S.J. Marshall, Strontium effects on root dentin tubule occlusion and nanomechanical properties, *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 32(2) (2016) 240-51.
- [14] W.G. Escalante-Otarola, G.M. Castro-Nunez, K.C.F. Jordao-Basso, B.M. Guimaraes, R.G. Palma-Dibb, M.C. Kuga, Evaluation of dentin desensitization protocols on the dentinal surface and their effects on the dentin bond interface, *Journal of dentistry* 75 (2018) 98-104.

- [15] F.G. Carvalho, V.L. Brasil, T.J. Silva Filho, H.L. Carlo, R.L. Santos, B.A. Lima, Protective effect of calcium nanophosphate and CPP-ACP agents on enamel erosion, *Brazilian oral research* 27(6) (2013) 463-70.
- [16] S.B. Jones, M. Davies, N. Chapman, R. Willson, K. Hornby, A. Joiner, N.X. West, Introduction of an interproximal mineralisation model to measure remineralisation caused by novel formulations containing calcium silicate, sodium phosphate salts and fluoride, *Journal of dentistry* 42 Suppl 1 (2014) S46-52.
- [17] Y. Zhong, J. Liu, X. Li, W. Yin, T. He, D. Hu, Y. Liao, X. Yao, Y. Wang, Effect of a novel bioactive glass-ceramic on dentinal tubule occlusion: an in vitro study, *Australian dental journal* 60(1) (2015) 96-103.
- [18] A.D. Anastasiou, S. Strafford, O. Posada-Estefan, C.L. Thomson, S.A. Hussain, T.J. Edwards, M. Malinowski, N. Hondow, N.K. Metzger, C.T.A. Brown, M.N. Routledge, A.P. Brown, M.S. Duggal, A. Jha, beta-pyrophosphate: A potential biomaterial for dental applications, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 75 (2017) 885-894.
- [19] W.H. Arnold, M. Prange, E.A. Naumova, Effectiveness of various toothpastes on dentine tubule occlusion, *Journal of dentistry* 43(4) (2015) 440-9.
- [20] A. Reis, C. Higashi, A.D. Loguercio, Re-anatomization of anterior eroded teeth by stratification with direct composite resin, *Journal of esthetic and restorative dentistry : official publication of the American Academy of Esthetic Dentistry ... [et al.]* 21(5) (2009) 304-16.
- [21] L.C. Casas-Apayco, V.M. Dreibi, A.C. Hipolito, M.S. Graeff, D. Rios, A.C. Magalhaes, M.A. Buzalaf, L. Wang, Erosive cola-based drinks affect the bonding to enamel surface: an in vitro study, *Journal of applied oral science : revista FOB* 22(5) (2014) 434-41.
- [22] C. Yabuki, A. Rikuta, R. Murayama, S. Akiba, S. Suzuki, T. Takamizawa, H. Kurokawa, M. Miyazaki, Effect of acid erosion on enamel bond strength of self-etch adhesives and sonic velocity measurement of enamel, *Dental materials journal* 37(4) (2018) 542-548.
- [23] L.F. Barbosa-Martins, J.P. de Sousa, A.R.F. de Castilho, J. Puppini-Rontani, R.P.W. Davies, R.M. Puppini-Rontani, Enhancing bond strength on demineralized dentin by pre-treatment with selective remineralising agents, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 81 (2018) 214-221.
- [24] M. Doozandeh, M. Firouzmandi, M. Mirmohammadi, The Simultaneous Effect of Extended Etching Time and Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate containing Paste Application on Shear Bond Strength of Etch-and-rinse Adhesive to Caries-affected Dentin, *The journal of contemporary dental practice* 16(10) (2015) 794-9.
- [25] E. Carrilho, M. Cardoso, M. Marques Ferreira, C.M. Marto, A. Paula, A.S. Coelho, 10-MDP Based Dental Adhesives: Adhesive Interface Characterization and Adhesive Stability-A Systematic Review, *Materials* 12(5) (2019).
- [26] M. Peumans, J. De Munck, A. Mine, B. Van Meerbeek, Clinical effectiveness of contemporary adhesives for the restoration of non-carious cervical lesions. A systematic review, *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 30(10) (2014) 1089-103.

- [27] T. Suzuki, T. Takamizawa, W.W. Barkmeier, A. Tsujimoto, H. Endo, R.L. Erickson, M.A. Latta, M. Miyazaki, Influence of Etching Mode on Enamel Bond Durability of Universal Adhesive Systems, *Operative dentistry* 41(5) (2016) 520-530.
- [28] T. Takamizawa, W.W. Barkmeier, A. Tsujimoto, T.P. Berry, H. Watanabe, R.L. Erickson, M.A. Latta, M. Miyazaki, Influence of different etching modes on bond strength and fatigue strength to dentin using universal adhesive systems, *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 32(2) (2016) e9-21.
- [29] F.A. Curylofo-Zotti, D.L.S. Scheffel, A.P. Macedo, A.E. Souza-Gabriel, J. Hebling, S.A.M. Corona, Effect of Er:YAG laser irradiation and chitosan biomodification on the stability of resin/demineralized bovine dentin bond, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 91 (2019) 220-228.
- [30] C.A. Manicardi, M.A. Versiani, P.C. Saquy, J.D. Pecora, M.D. de Sousa-Neto, Influence of filling materials on the bonding interface of thin-walled roots reinforced with resin and quartz fiber posts, *Journal of endodontics* 37(4) (2011) 531-7.
- [31] T.K. Vaidyanathan, J. Vaidyanathan, Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 88(2) (2009) 558-78.
- [32] A. Mine, J. De Munck, M.V. Cardoso, K.L. Van Landuyt, A. Poitevin, A. Van Ende, M. Matsumoto, Y. Yoshida, T. Kuboki, H. Yatani, B. Van Meerbeek, Dentin-smear remains at self-etch adhesive interface, *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 30(10) (2014) 1147-53.
- [33] A. Mine, J. De Munck, M. Vivan Cardoso, K.L. Van Landuyt, A. Poitevin, T. Kuboki, Y. Yoshida, K. Suzuki, B. Van Meerbeek, Enamel-smear compromises bonding by mild self-etch adhesives, *Journal of dental research* 89(12) (2010) 1505-9.
- [34] B.M. Souza, L.P. Comar, M. Vertuan, C. Fernandes Neto, M.A. Buzalaf, A.C. Magalhaes, Effect of an Experimental Paste with Hydroxyapatite Nanoparticles and Fluoride on Dental Demineralisation and Remineralisation in situ, *Caries research* 49(5) (2015) 499-507.
- [35] L.P. Comar, B.M. Souza, L.F. Gracindo, M.A. Buzalaf, A.C. Magalhaes, Impact of experimental nano-HAP pastes on bovine enamel and dentin submitted to a pH cycling model, *Brazilian dental journal* 24(3) (2013) 273-8.
- [36] L.F. Santos, C.R. Torres, T.M. Caneppele, A.C. Magalhaes, A.B. Borges, Effect of home-bleaching gels modified by calcium and/or fluoride and the application of nano-hydroxyapatite paste on in vitro enamel erosion susceptibility, *Acta odontologica Scandinavica* 74(2) (2016) 121-6.
- [37] I.C. Medeiros, V.L. Brasil, H.L. Carlo, R.L. Santos, B.A. De Lima, F.G. De Carvalho, In vitro effect of calcium nanophosphate and high-concentrated fluoride agents on enamel erosion: an AFM study, *International journal of paediatric dentistry* 24(3) (2014) 168-74.
- [38] Y. Sun, X. Li, Y. Deng, J.N. Sun, D. Tao, H. Chen, Q. Hu, R. Liu, W. Liu, X. Feng, J. Wang, M. Carvell, A. Joiner, Mode of action studies on the formation of enamel minerals from a novel toothpaste containing calcium silicate and sodium phosphate salts, *Journal of dentistry* 42 Suppl 1 (2014) S30-8.

- [39] K.J. Cross, N.L. Huq, E.C. Reynolds, Casein phosphopeptides in oral health--chemistry and clinical applications, *Current pharmaceutical design* 13(8) (2007) 793-800.
- [40] E.C. Reynolds, Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: the scientific evidence, *Advances in dental research* 21(1) (2009) 25-9.
- [41] N.J. Cochrane, E.C. Reynolds, Calcium phosphopeptides -- mechanisms of action and evidence for clinical efficacy, *Advances in dental research* 24(2) (2012) 41-7.
- [42] M. Ghafournia, M.H. Tehrani, A. Nekouei, R. Faghihian, M. Mohammadpour, A. Feiz, In vitro evaluation of dentin tubule occlusion by three bioactive materials: A scanning electron microscopic study, *Dental research journal* 16(3) (2019) 166-171.
- [43] F. Bou Chebel, C.M. Zogheib, N.Z. Baba, K.A. Corbani, Clinical Comparative Evaluation of Nd:YAG Laser and a New Varnish Containing Casein Phosphopeptides-Amorphous Calcium Phosphate for the Treatment of Dentin Hypersensitivity: A Prospective Study, *Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists* 27(9) (2018) 860-867.
- [44] A. Mahesuti, Y.L. Duan, G. Wang, X.R. Cheng, B.A. Matis, Short-term Efficacy of Agents Containing KNO₃ or CPP-ACP in Treatment of Dentin Hypersensitivity, *The Chinese journal of dental research : the official journal of the Scientific Section of the Chinese Stomatological Association* 17(1) (2014) 43-7.
- [45] E. Uy, M. Ekambaram, G.H.M. Lee, C.K.Y. Yiu, Remineralization Potential of Calcium and Phosphate-based Agents and Their Effects on Bonding of Orthodontic Brackets, *The journal of adhesive dentistry* 21(3) (2019) 219-228.
- [46] E.H. Mobarak, N. Ali, L.E. Daifalla, Microshear Bond Strength of Adhesives to Enamel Remineralized Using Casein Phosphopeptide Agents, *Operative dentistry* 40(5) (2015) E180-8.
- [47] M.G. Gandolfi, F. Silvia, P.D. H, G. Gasparotto, P. Carlo, Calcium silicate coating derived from Portland cement as treatment for hypersensitive dentine, *Journal of dentistry* 36(8) (2008) 565-78.

3.3 Publicação 3*

Efeitos do fosfato ou silicato de cálcio no sistema adesivo self-etch Clearfil SE Bond aplicado sobre substrato dentinário erodido

RESUMO

Objetivo: Avaliar por meio de Teste de Microtração (μ TBS) a resistência de união, SEM a formação de camada híbrida e Microscopia Confocal a Laser (CLSM) a penetrabilidade dentinária do sistema adesivo *self-etch* Clearfil SE Bond aplicado sobre dentina cervical erodida e tratada com agentes remineralizantes à base de fosfato ou silicato de cálcio

Material e métodos: Cem espécimes foram obtidos do segmento cervical de incisivos bovinos e previamente submetidos à erosão dentinária. Os espécimes foram distribuídos em 5 protocolos (n=20): (NP), Desensibilize NanoP; (RD), MI Paste Plus Recaldent™; (NR), Regenerate NR-5™; (KF), Desensibilize KF 2% e CO, sem tratamento. Cada um dos protocolos foi aplicado no total de 4 sessões, com intervalos de 7 dias. Na sequência, o sistema adesivo Clearfil SE Bond (Kuraray) foi aplicado no substrato dentinário. Cinquenta espécimes (n=10) foram submetidos a μ TBS para avaliação da resistência de união e padrão de fratura (200N). Os cinquenta espécimes restantes foram analisados em SEM para avaliar a formação de camada híbrida, e em CLSM para avaliar a penetrabilidade dentinária do sistema adesivo, na dentina cervical.

Resultados: Em relação à resistência de união, NP demonstrou os valores mais altos de resistência de união, enquanto, NR e KF apresentaram menor resistência de união que CO ($P<0.05$). Em relação aos tags de resina, KF demonstrou menor formação de tags que NP ($P<0.05$). Em relação à formação de camada híbrida, KF demonstrou uma camada híbrida mais fina que RD e NR ($P<0.05$). Em relação à penetrabilidade dentinária, RD e NR demonstraram menor penetrabilidade do sistema adesivo que CO ($P<0.05$).

Conclusão: A aplicação do agente NP e RD evidenciou maior penetrabilidade dentinária, sem diminuição da resistência de união do sistema adesivo Clearfil SE Bond. Entretanto, a aplicação do NR diminuiu a resistência de união e penetrabilidade dentinária.

* Formatação de acordo com as normas do periódico *Operative Dentistry*, periódico para o qual pretende-se submeter

Relevância clínica: Como os agentes remineralizantes Desensibilize NanoP e CPP-ACP não diminuem a resistência de união do sistema adesivo Clearfil SE Bond, são alternativas viáveis de tratamento, previamente a restaurações em dentina erodida.

Keywords: Dentina. Erosão dentária. Microscopia eletrônica de varredura. Remineralização dentária. Adesivos dentinários

INTRODUÇÃO

A erosão dental é considerada o único tipo de desgaste dentário que pode ser atribuído totalmente a um fenômeno químico sem envolvimento de microorganismos¹. Este desgaste dos dentes é produzido pelo contato direto a ambientes ácidos², por ter um valor de pH que facilita a destruição da composição mineral do esmalte^{3,4} e pela remoção de detritos, expondo túbulos dentinários e desenvolvendo hipersensibilidade dentinária^{5,6}, que gera preocupação para dentistas e pesquisadores pela alta prevalência de casos^{7,8}.

Entretanto, a hipersensibilidade dentinária (HD) é descrita clinicamente como a dor aguda causada pela excitação das fibras nervosas A delta conectadas à dentina exposta e seus túbulos, devido a estimulação química, térmica, osmótica, evaporativa ou tátil⁹. Diversos protocolos físicos e químicos têm sido descritos na literatura, para o tratamento da HD como fluoreto de sódio¹⁰, cloreto de estrôncio¹¹, nanopartículas de fosfato de cálcio¹², fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP)¹³ e silicato de cálcio¹⁴ pela capacidade de obliterar túbulos dentinários. Embora muitos desses protocolos sejam eficazes no controle da HD, nenhum deles demonstrou ser o ideal¹⁵,

Assim, é comumente necessário a complementação do tratamento da HD com procedimentos restauradores adesivos que visam recuperar a estética e função dos dentes¹⁶. Foi demonstrado que a aplicação do CPP-ACP¹⁷⁻¹⁹ e do fosfato de cálcio nanoparticulado¹², não interferem sobre a resistência de união do sistema adesivo *total-etch* na dentina, porém não há estudos comparativos com sistemas autocondicionantes (*self-etch*).

Embora sistemas adesivos atuais promovem uma adequada adesão no esmalte e na dentina, o mesmo não acontece no substrato dentinário erodido^{20,21}, e tratado com agentes dessensibilizantes/remineralizantes²². Foi demonstrado que a aplicação do CPP-ACP e do fosfato de cálcio nanoparticulado, não interferem sobre a resistência de união do sistema adesivo *total-etch* na dentina^{12,18}, porém não há estudos comparativos com sistemas autocondicionantes.

Sistemas adesivos *self-etch* são os indicados para restaurações sobre dentina, por não precisar um condicionamento ácido agressivo que poderia acentuar a HD, provocando dor pós operatório²³. Por ser um protocolo adesivo simplificado é considerado menos sensível à técnica²⁴. Estes sistemas adesivos oferecem excelente adesão à estrutura dentária (esmalte e dentina)^{25,26}, porém é pouco conhecida a qualidade da adesão a substratos dentários afetados pela erosão ácida. O sistema adesivo *self-etch*

proporciona a desmineralização parcial da dentina, deixando cristais de hidroxiapatita ao redor das fibras colágenas²⁶. Os monômeros funcionais (4-MET e 10-MDP) presentes no Clearfil SE Bond (Kuraray) interagem quimicamente com o íon cálcio da hidroxiapatita residual que permanece dentro da camada híbrida, criando um duplo mecanismo de adesão à dentina²³.

Por tanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos dos protocolos remineralizantes dentários contendo nanopartículas de fosfato de cálcio (Desensibilize NanoP), fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo (MI Paste Plus RecaldentTM CPP-ACP) e silicato de cálcio associado com fosfato de sódio (Regenerate NR-5TM) associados ao sistema adesivo *self-etch* Clearfil SE Bond aplicado sobre dentina erodida, por meio da avaliação da resistência de união (μ TBS), formação de camada híbrida (SEM) e penetrabilidade dentinária (CLSM), em comparação com um protocolo dessensibilizante dentinário convencional, contendo nitrato de potássio com fluoreto de sódio (Desensibilize KF2%). A hipótese nula foi estabelecida como a inexistência de diferenças nos parâmetros avaliados em relação aos diferentes protocolos testados.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (Proc. CEUA n° 30/2018). Cem incisivos bovinos com coroas e raízes anatomicamente similares foram armazenados em solução de timol a 0,1%, a 4 °C, até o momento de uso.

Preparo dos espécimes

Cem espécimes (10mm de comprimento x 10mm de largura x 5mm de espessura) foram obtidos do terço médio dos dentes usando máquina de corte de tecidos duros (Isomet 100, Buehler, Lake Bluff, IL) sob refrigeração com água corrente. A superfície vestibular dos fragmentos foi desgastada em politriz (DP-10; Panambra, Struers, Ballerup, DI) usando lixas de granulação #600 e #1200, por 20s cada (ISO 6344-1), para exposição dentinária e padronização da *smear layer*.

A superfície dentinária foi previamente condicionada usando ácido clorídrico (HCL) a 0,6% (Arte & Ciência, Araraquara, São Paulo, Brazil) por 5 min para simular o substrato dentinário erodido. Na sequência, os espécimes foram lavados com água destilada e armazenados em saliva artificial até o momento de uso.

Protocolos avaliados

Quatro protocolos com agentes remineralizantes foram utilizados neste estudo, com o propósito de avaliar a sua interferência na resistência de união, formação de camada híbrida e penetrabilidade do sistema adesivo Clearfil SE Bond (Kuraray; Okayama, Japan) aplicado sobre a dentina erodida. A tabela 1 demonstra a composição química dos protocolos avaliados.

Os protocolos avaliados foram (n = 20 espécimes por protocolo, sendo 10 para avaliação da resistência de união e 10 espécimes para avaliação da interface adesiva):

- (NP): O produto contendo nanopartículas de fosfato de cálcio (Dessensibilize NanoP; FGM, Joinville, SC, BR) foi friccionado sobre a superfície dentinária com taça de borracha (KG Sorensen, São Paulo, SP, BR), em baixa rotação, com 500 rpm, por 10s. Em seguida, os resíduos permaneceram sobre a dentina por 5 min e lavados com 10 mL de água deionizada;

- (RD): O produto contendo CPP-ACPF (MI Paste Plus Recaldent™; GC Company; JPN) foi aplicado sobre a superfície dentinária, similar ao descrito no protocolo anterior, porém o produto foi mantido sobre a dentina por 3 min;

- (NR): O produto contendo duas pastas (Regenerate NR-5™; Unilever, Wirral, UK), gel remineralizante e ativador, foram previamente misturados e utilizados identicamente ao protocolo anterior, também mantido sobre a dentina por 3 min;

- (KF): O produto utilizado foi a base de fluoreto de sódio a 2% (Dessensibilize KF2%; FGM, Joinville, SC, BR) foi apenas aplicado sobre a superfície dentinária com um aplicador específico para sistema adesivo (KG Sorensen, São Paulo, SP, BR), sem fricção, e mantido no local por 10 min;

- (CO): Os espécimes foram mantidos em saliva artificial e serviram como protocolo controle negativo.

Os espécimes foram submetidos a 4 sessões de tratamentos, com intervalos de 7 dias entre cada sessão. Durante a realização do tratamento, os espécimes foram mantidos imersos individualmente em saliva artificial, a 37°C, trocada a cada 7 dias, imediatamente após a realização dos protocolos avaliados.

Protocolo adesivo

O sistema adesivo Clearfil SE Bond foi aplicado na superfície dentinária erodido segundo as recomendações do fabricante e fotoativado com fotopolimerizador LED (Valo™ Cordless; Ultradent, South Jordan, USA), com uma intensidade standard de 1000 mW/cm² por 10s.

Nos cinquenta espécimes para avaliação da interface adesiva (penetrabilidade dentinária), Rodamina B (Synth, São Paulo, SP, Brazil) foi adicionada ao primer do sistema adesivo *self-etch* (Clearfil SE Bond; Kuraray, Okayama, Japan), na proporção de 16µL a cada 0.4mL.

Avaliação da resistência de união

Cinquenta espécimes foram divididos aleatoriamente de acordo com o protocolo avaliado e controle (n = 10). Após aplicação do sistema adesivo na dentina erodida, foram construídos blocos de resina composta (Filtek Z-350; 3 M, St. Paul, MN, USA) em três incrementos de aproximadamente 1mm, sendo cada incremento fotoativado, utilizando o mesmo fotopolimerizador anteriormente descrito, durante 20 s. No final foi obtido um

bloco de resina composta de 3mm de altura sobre os espécimes e armazenados em ambiente úmido a 37° C por 24 h.

Posteriormente, foram obtidos em média 12 palitos de cada espécime, com dimensões de aproximadamente 1,0 x 1,0 x 6,0 mm, usando máquina de corte de tecidos duros (Isomet 100, Buehler, Lake Bluff, IL) sob refrigeração como água corrente. Na sequência, os palitos foram fixados pelas suas extremidades ao dispositivo para teste de microtração com adesivo a base de cianocrilato (Loctite Superbonder Gel®, Henkel Adesivos LTDA, Itapevi, Brasil). Cada palito foi posicionado de maneira que a interface resina-dentina ficasse no centro do dispositivo e perpendicular à carga de tração aplicada durante o teste. Foram então submetidos ao ensaio de microtração em uma máquina universal de ensaios eletromecânicos EMIC DL2000 (EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brazil) com velocidade de 0,5 mm/min com adaptação de uma célula de carga de 200N.

No momento da fratura o movimento foi imediatamente cessado e os valores em newtons (N) coletados para posterior análise. Após a fratura dos corpos de prova, estes foram removidos do dispositivo e a secção transversal (medida das duas dimensões da superfície de fratura em mm) de cada um deles foi aferida utilizando-se um paquímetro digital (Vonder Paquímetro Eletrônico Digital, Curitiba, PR, Brasil) para posterior cálculo da área de união. Para expressar a resistência de união em megapascal (MPa), os valores em N foram divididos pela área de união, em mm². Uma média aritmética foi calculada para os palitos de cada espécime e considerada para análise estatístico.

Avaliação do padrão de fratura

O padrão de fratura foi analisado utilizando estereomicroscópio (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), com magnificação de 50x segundo a classificação de fratura: adesiva, quando a fratura foi na interface resina-dentina; coesiva em resina, quando a fratura foi na resina composta; coesiva em dentina, quando a fratura foi na dentina; e mista, quando os corpos apresentaram mais de um padrão de fratura^{12,27}

Avaliação da formação de camada híbrida

Após a aplicação do sistema adesivo na dentina erodida, um bloco de 4mm de altura de resina composta (Filtek Z-350; 3 M, St. Paul, MN, USA) foi reconstruído e a cada incremento de 2mm foi fotoativado por 20 s. Na sequência, os espécimes foram armazenados em ambiente úmido. Após 24h, os espécimes foram cortados

longitudinalmente na metade utilizando máquina de corte de tecidos duros (Isomet; Buehler, Lake Bluff, IL) sob refrigeração de água corrente, e selecionada uma de cada corpo.

As faces foram desgastadas em politriz (DP-10; Panambra, Struers, Ballerup, DI) usando lixas de granulação #600 e #1200, por 20s cada. Uma das faces obtidas de cada espécimen, foi selecionada para avaliar a espessura da camada híbrida. Na sequência, as faces selecionadas foram imersas em solução de ácido clorídrico 18% por 30 s, para remoção da *smear layer* superficial e posterior lavagem, por 30 s com água deionizada. Posteriormente, foram imersas em hipoclorito 5% por 5 min, para remoção de todo o colágeno não infiltrado pelo sistema adesivo, e posterior lavagem por 30 s.

As faces foram desidratadas em câmara fechada com sílica coloidal por 7 dias. Após a montagem dos espécimenes nos *stubs* metálicos, foram revestidos a ouro (ciclo simples – 120s) sob vacuum, em câmara de metalização (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) e examinados mediante microscopia eletrônica de varredura com JEOL 6060 (JEOL 6060; JEOL Ltda, Tokyo, Japan) operado a 20 kV, conforme descrito por Escalante-Otárola et al.¹².

Quatro campos distintos da interface adesiva foram inicialmente avaliados e do campo mais representativo do espécime foi obtida uma imagem com a magnificação de 500x, para avaliação da formação de tags de resina. A obtenção das imagens foi realizada por um único operador. Outra imagem foi obtida do mesmo local, com magnificação de 2,000x, para mensuração da camada híbrida. Todas as imagens foram obtidas pelo mesmo operador.

Dois examinadores independentes e devidamente calibrados ($k = 0.82$) mesuraram a camada híbrida em 10 pontos com ajuda do software Image J. Os resultados obtidos pelos dois examinadores foram usados para calcular o valor da média que foi determinada para cada espécimen. Outros dois examinadores calibrados classificaram a formação de tags de resina segundo o descrito por Manicardi et al.²⁸: Escore 0 – não houve formação de tags; Escore 2 – poucos e curtos tags; Escore 3 – tags longos e Escore 4 – tags longos e densos.

Avaliação da penetrabilidade dentinária

Após a aplicação do sistema adesivo na dentina erodida, um bloco de 4mm de altura de resina composta (Filtek Z-350; 3 M, St. Paul, MN, USA) com partículas de verde malaquita (Synth, São Paulo, SP, Brazil) foi reconstruído e a cada incremento de 2mm

foi fotoativado por 20 s. Na sequência, os espécimes foram armazenados em ambiente úmido. Após 24h, os espécimes foram cortados longitudinalmente na metade utilizando máquina de corte de tecidos duros (Isomet; Buehler, Lake Bluff, IL) sob refrigeração de água corrente, e selecionada uma de cada corpo.

As faces foram desgastadas em politriz (DP-10; Panambra, Struers, Ballerup, DI) usando lixas de granulação #600 e #1200, por 20s cada. Uma das faces obtidas de cada espécimen, foi selecionada para avaliar a penetrabilidade dentinária do sistema adesivo.

Na sequência, foram lavadas em cuba ultrassônica por 5 min y secadas com papel absorvente. As faces foram analisadas usando microscopia confocal a laser CLSM (LSM5; Zeiss, Jena, Germany). Uma imagem foi obtida da interface adesiva, com 20x de aumento. Dez medidas da penetração do sistema adesivo nos túbulos dentinários foram obtidas por dois examinadores independentes e devidamente calibrados ($k = 0.82$), usando o programa Image J National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). A média aritmética das medidas foi considerado como a penetrabilidade dentinária do sistema adesivo em cada espécimen.

Análise estatística

Inicialmente todos os dados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para averiguação da homocedasticidade dos dados. Os dados de resistência de união, mensuração da camada híbrida e penetrabilidade dentinária foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey. Os dados de formação de tags de resina foram submetidos aos testes de Kruskal Wallis e Dunn. Todas as avaliações foram com um nível de significância de $\alpha = 5\%$.

Tabela 1. Composição dos agentes químicos utilizados nos protocolos avaliados.

Grupo	Composição	Fabricante
NP – Desensibilize NanoP	Calcium phosphate (nano-HAP), Potassium nitrate and 9000 ppm sodium fluoride.	FGM, Brasil
RD – MI Paste Plus <i>Recaldent</i> TM	CPP-ACPF (Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate Fluoride), Glycerol, D-Sorbitol, CMC-Na, Propylene glycol, Silicon dioxide, Titanium dioxide, Xylitol, Phosphoric acid, Flavoring, Sodium saccharin, Ethyl p-hydroxybenzoate, Propyl p-hydroxybenzoate, Butyl p-hydroxybenzoate. 900 ppm fluoride.	GC, Japão
NR – Regenerate <i>NR-5</i> TM	Glycerin, CalciumSilicate, PEG-8, Hydrated Silica, Trisodium Phosphate, SodiumPhosphate, Aqua, PEG-60, Sodium Lauryl Sulfate, Sodium Monofluorophosphate, Synthetic Fluorphlogopite, Sodium Saccharin, Polyacrylic Acid, Tin Oxide, Limonene, CI 77891. 1450 ppm fluoride.	Unilever, Reino Unido
KF – Desensibilize KF 2%	KNO ₃ (5%) + NaF (2%)	FGM, Brasil
CO – Controle negativo	Deionized water	–

KNO₃, nitrato de potássio; NaF, fluoreto de sódio.

RESULTADOS

Avaliação da resistência de união

O protocolo NP apresentou maior resistência de união à microtração, que a demonstrada por NR e KF ($P < 0.05$), porém sem diferenças significantes com RD e CO ($P > 0.05$). O protocolo RD apresentou maior resistência de união à microtração que a demonstrada por NR ($P < 0.05$). Por outro lado, NR e KF não apresentaram diferenças significantes entre si ($P > 0.05$).

A figura 1 mostra o gráfico dos resultados de resistência de união (MPa) do sistema adesivo Clearfil SE Bond na dentina erodida, após o uso dos protocolos avaliados.

A avaliação do padrão de fratura foi realizada com estereomicroscópio, e os resultados são mostrados na figura 2. O padrão de fratura adesiva foi o mais encontrado em todos os grupos: NP (75%), RD (60%), NR (78%), KF (89%) e CO (68%).

Avaliação da formação de camada híbrida

Em relação aos tags de resina, o protocolo NP apresentou maior formação de tags de resina que o demonstrado por KF ($P < 0.05$), porém não apresentou diferenças significantes com RD, NR e CO ($P > 0.05$). Entretanto, RD, NR, KF e CO não apresentaram diferenças significantes entre si ($P > 0.05$).

Em relação à formação de camada híbrida, os protocolos RD e NR apresentaram camada híbrida mais espessa que KF ($P < 0.05$), porém não apresentaram diferenças significantes com NP e CO ($P > 0.05$). Entretanto, NP, KF e CO não apresentaram diferenças significantes entre si ($P > 0.05$).

A tabela 2 mostra a mediana, valores mínimo e máximo, e 1º e 3º quartil da formação de tags de resina, e a média e desvio padrão da mensuração da camada híbrida do sistema adesivo Clearfil SE Bond na dentina erodida, após aplicação os protocolos avaliados. A figura 3 mostra uma imagem representativa da interface do sistema adesivo Clearfil SE Bond na dentina erodida, após o uso dos protocolos avaliados (500x e 2.000x).

Avaliação da penetrabilidade dentinária

Em relação à avaliação da penetrabilidade dentinária, os protocolos NP e KF apresentaram maior penetrabilidade que a demonstrada por NR ($P < 0.05$), porém sem

diferenças significantes com RD ($P > 0.05$). Por outro lado, os protocolos RD e NR foram semelhantes entre si ($P > 0.05$), demonstrando menor penetrabilidade que CO ($P < 0.05$).

A tabela 3 mostra a média e desvio padrão da penetrabilidade do sistema adesivo Clearfil SE Bond na dentina erodida, após a aplicação dos protocolos avaliados. A Figura 4 mostra uma imagem representativa da penetrabilidade dentinária do sistema adesivo.

Figura 1

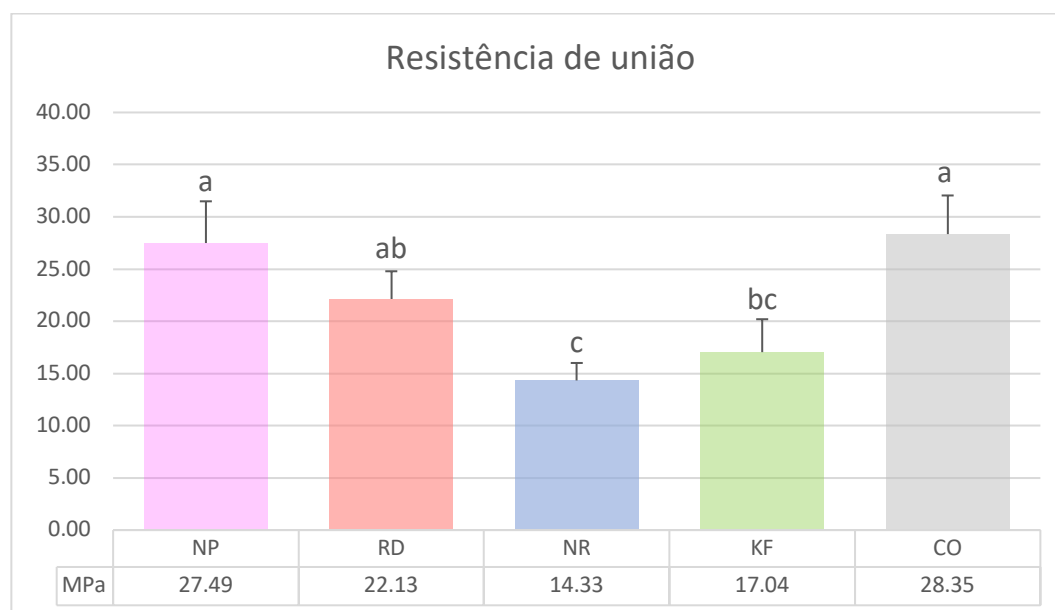


Fig. 1. Gráfico da avaliação da resistência de união (MPa) com teste eletromecânico de microtração, do sistema adesivo Clearfil SE Bond após a aplicação dos protocolos e grupo controle, na dentina erodida. NP, Desensibilize Nano P; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF 2%; CO, Controle negativo.

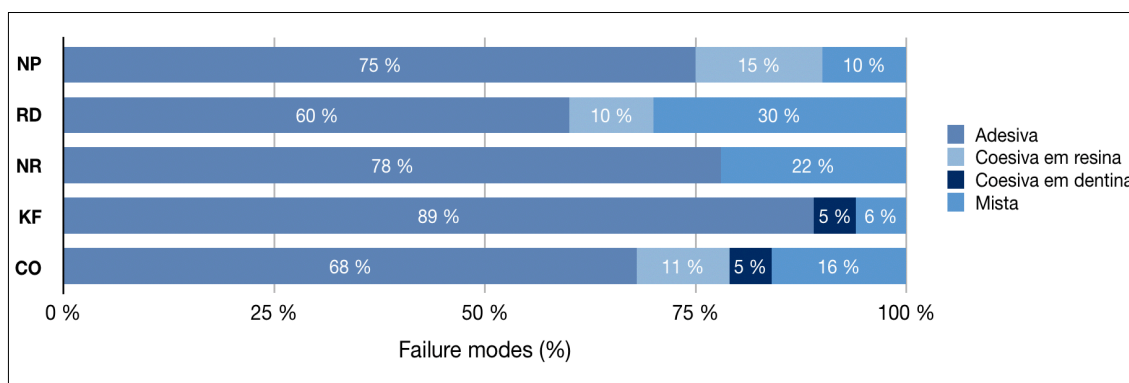
Figura 2

Fig 2. Incidência do padrão de fratura do sistema adesivo Clearfil SE Bond, demonstrado após a aplicação dos protocolos e grupo controle, na dentina cervical. NP, Desensibilize Nano P; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF 2%; CO, Controle negativo.

Tabela 2

Formação de tags de resina e camada híbrida do sistema adesivo Clearfil SE Bond

		NP	RD	NR	KF	CO
<i>Presença de tags</i>	mediana	3 ^a	2 ^{ab}	3 ^{ab}	2 ^b	3 ^{ab}
	min/max	2 - 3	2 - 3	2 - 3	1 - 3	2 - 3
	1Q/3Q	3 - 3	2 - 3	2 - 3	2 - 2	2 - 3
<i>Camada híbrida</i>	média	1.57 ^{ab}	1.63 ^a	1.61 ^a	1.47 ^b	1.52 ^{ab}
	sd	0.08	0.07	0.09	0.04	0.09

^{ab} Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significantes ($p < 0.05$). 1Q e 3Q, primeiro e terceiro quartil; min, valor mínimo; max, valor máximo; sd, desvio padrão, respectivamente. NP, Desensibilize Nano P; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF 2%; CO, Controle negativo.

Tabela 3Penetrabilidade dentinária do sistema adesivo Clearfil SE Bond (μm)

	NP	RD	NR	KF	CO
média	122.31 ^{ab}	97.63 ^{bc}	87.82 ^c	119.27 ^{ab}	127.34 ^a
sd	17.27	17.27	13.33	14.84	11.62

^{ab} Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significantes ($p < 0.05$). sd, desvio padrão. NP, Desensibilize Nano P; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF 2%; CO, Controle negativo.

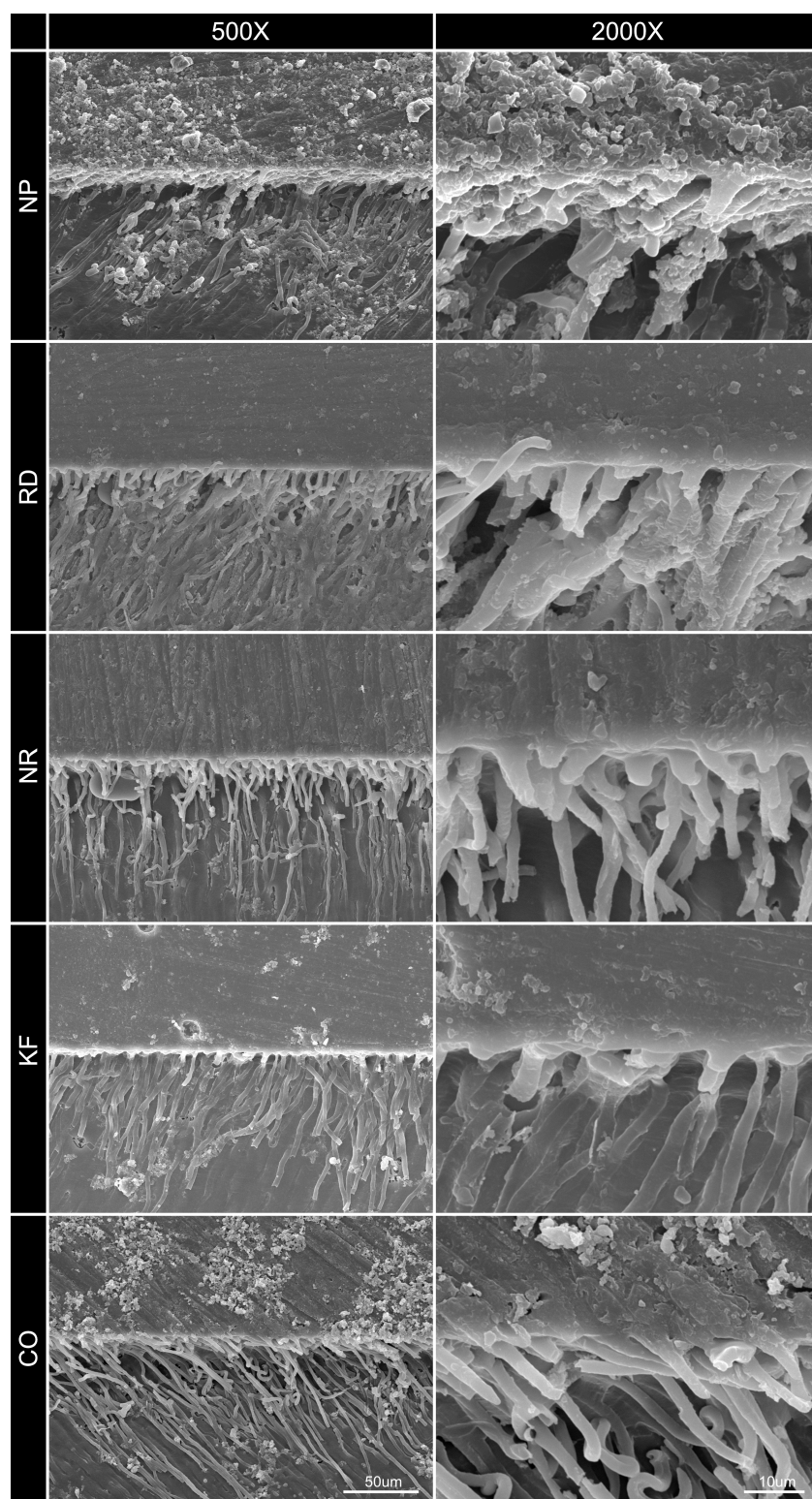
Figura 3

Fig. 3. Imagem representativa da interface adesiva do sistema adesivo Clearfil SE Bond após a aplicação dos protocolos e grupo controle, na dentina erosionada. NP, Desensibilize Nano P; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF 2%; CO, Controle negativo. Escala 50µm y 10µm.

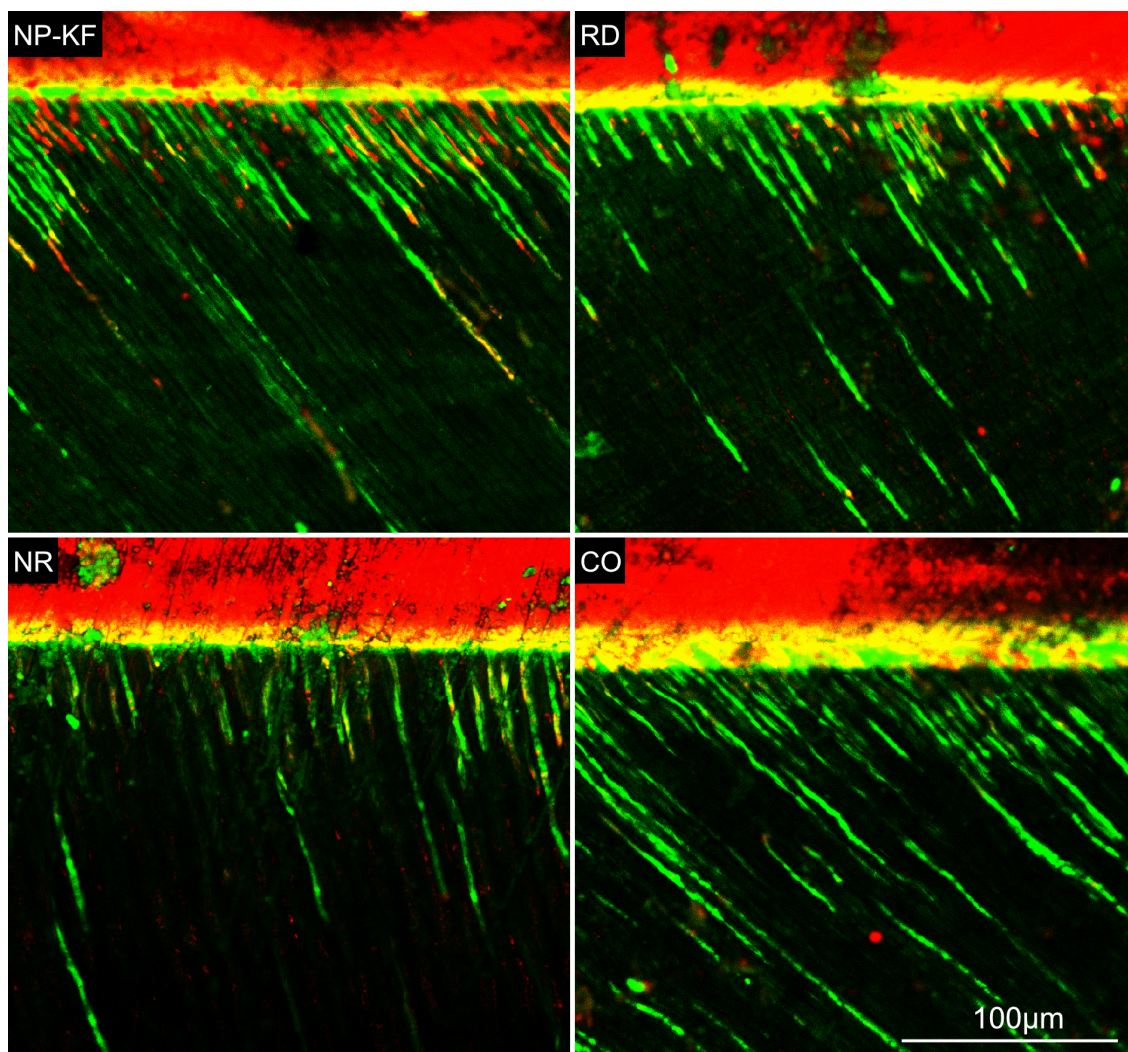
Figura 4

Fig. 4. Imagem representativa da penetrabilidade dentinária do sistema adesivo Clearfil SE Bond após a aplicação dos protocolos e grupo controle, na dentina erosionada. NP, Desensibilize Nano P; RD, MI Paste Plus Recaldent; NR, Regenerate NR-5; KF, Desensibilize KF 2%; CO, Controle negativo. Escala 100µm.

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos de diferentes agentes remineralizantes NP, NR, RD, com a finalidade de auxiliar no tratamento da hipersensibilidade dentinária, sobre a interface adesiva com o sistema adesivo *self-etch* (Clearfil SE Bond), comparado a um protocolo convencional à base de nitrato de potássio e fluoreto de sódio (KF). A hipótese nula foi rejeitada pois os protocolos avaliados demonstram efeitos sobre a resistência de união e na interface adesiva com o sistema adesivo Clearfil SE Bond. Assim, NP e RD demonstraram maior valor de resistência de união e penetrabilidade dentinária que NR.

O adesivo autocondicionante de dois passos Clearfil SE Bond, tem a interação química com a hidroxiapatita como seu principal mecanismo de adesão ao substrato dentinário, muito embora a microretenção mecânica, por meio da formação de camada híbrida, também contribui, porém em menor magnitude²⁹. Qualquer barreira física e/ou química que impeça essa interação, pode ter efeitos negativos na interface adesiva, que pode comprometer a longevidade das restaurações estéticas negativamente e/ou o tratamento da hipersensibilidade dentinária^{30,31}.

Os protocolos NP e RD demonstraram maior resistência de união e penetrabilidade dentinária que NR, porém similares aos demonstrados por KF e CO. O protocolo NP contém nanopartículas de hidroxiapatita que precipitam sobre a superfície dentinária, formando um composto estável com o cálcio e fósforo sobre a substrato dental³²⁻³⁵ e não possui efeitos deletérios sobre a interface adesiva com o adesivo *etch-and-rinse*¹².

Entretanto, o RD é um fosfolípídeo derivado da caseína do leite (CPP), que após a sua degradação química libera resíduos de fosfoseril, proporcionando a estabilização do íon cálcio e fósforo, o fosfato de cálcio que está presente como um complexo molecular amorfo associado ao CPP, referido como *casein phosphopeptide-amorphous calcium-phosphate* (CPP-ACP), além de induzir a formação de fluoroapatita³⁶⁻⁴¹. Nossos resultados com os protocolos a base de fosfato de cálcio (NP e RD), estão de acordo com um outro estudo que observou um aumento da resistência de união do adesivo *self-etch* Clearfil SE Bond na dentina desmineralizada.²²

Por outro lado, NR é um composto de silicato de cálcio e fosfato de sódio (fosfato mono e trissódico) que ao precipitar sobre o substrato dentário induzem a formação de hidroxiapatita⁴². Nossos resultados mostraram que o protocolo NR diminuiu a resistência de união e a penetrabilidade dentinária do adesivo Clearfil SE Bond, provavelmente pela incidência de precipitados no substrato dentinário, que podem reduzir as forças adesivas

de sistemas que contém o monômero funcional 10-MDP²³. Assim mesmo, os monômeros funcionais que tem a capacidade de condicionar o substrato dentinário ao dissolver parcialmente a camada de detritos e desmineralizar hidroxiapatita²³, tiveram ação limitada no substrato dentinário tratado com NR.

Os agentes remineralizantes proporcionam a deposição de precipitados sobre o substrato dentário e podem ser uma interessante estratégia para colaborar no tratamento da hipersensibilidade dentinária^{12, 33, 35}. Entretanto, estes precipitados podem, devido a sua estabilidade química com a dentina ter efeitos, positivo ou negativos, na interface adesiva, principalmente com a aplicação do sistema adesivo *self-etch*, sobre substrato dentinário erodido^{22, 43, 44}.

Devido estas pressuposições abrirem novas estratégias de tratamento para as temíveis situações de hipersensibilidade dentinária, outros estudos ainda se fazem necessários para confirmar a viabilidade de agentes remineralizantes à base nanopartículas de hidroxiapatita, CPP-ACP ou silicato de cálcio como agentes dessensibilizantes da dentina hipersensível, e previamente a uma restauração adesivo sobre substrato dentinário erodido.

CONCLUSÃO

A aplicação dos agentes NP e RD demonstrou melhor penetrabilidade dentinária, sem diminuição da resistência de união do sistema adesivo Clearfil SE Bond. Entretanto, a aplicação do NR diminuiu sua resistência de união e penetrabilidade dentinária.

REFERÊNCIAS

1. Lussi A & Carvalho TS (2014) Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge *Monogr Oral Sci* **25** 1-15, 10.1159/000360380.
2. Martins LM, Francisconi-dos-Rios LF, Meira Gde F, Bertocco VP, Silva LM & Rebelo MA (2016) Amazonian delicacy tucupi is as erosive as a cola-based soft drink *Arch Oral Biol* **61** 84-88, 10.1016/j.archoralbio.2015.10.021.
3. Lombardini M, Ceci M, Colombo M, Bianchi S & Poggio C (2014) Preventive effect of different toothpastes on enamel erosion: AFM and SEM studies *Scanning* **36(4)** 401-410, 10.1002/sca.21132.
4. West NX, Seong J, Hellin N, Eynon H, Barker ML & He T (2017) A clinical study to measure anti-erosion properties of a stabilized stannous fluoride dentifrice relative to a sodium fluoride/triclosan dentifrice *Int J Dent Hyg* **15(2)** 113-119, 10.1111/idh.12159.
5. McAndrew R & Kourkouta S (1995) Effects of toothbrushing prior and/or subsequent to dietary acid application on smear layer formation and the patency of dentinal tubules: an SEM study *J Periodontol* **66(6)** 443-448, 10.1902/jop.1995.66.6.443.
6. Yoshizaki KT, Francisconi-Dos-Rios LF, Sobral MA, Aranha AC, Mendes FM & Scaramucci T (2017) Clinical features and factors associated with non-carious cervical lesions and dentin hypersensitivity *J Oral Rehabil* **44(2)** 112-118, 10.1111/joor.12469.
7. Jaeggi T & Lussi A (2014) Prevalence, incidence and distribution of erosion *Monogr Oral Sci* **25** 55-73, 10.1159/000360973.
8. Salas MM, Nascimento GG, Huysmans MC & Demarco FF (2015) Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis *J Dent* **43(1)** 42-50, 10.1016/j.jdent.2014.10.012.
9. Gillam DG, Mordan NJ & Newman HN (1997) The Dentin Disc surface: a plausible model for dentin physiology and dentin sensitivity evaluation *Adv Dent Res* **11(4)** 487-501, 10.1177/08959374970110041701.
10. Pandit N, Gupta R & Bansal A (2012) Comparative evaluation of two commercially available desensitizing agents for the treatment of dentinal hypersensitivity *Indian J Dent Res* **23(6)** 778-783, 10.4103/0970-9290.111259.
11. Saeki K, Marshall GW, Gansky SA, Parkinson CR & Marshall SJ (2016) Strontium effects on root dentin tubule occlusion and nanomechanical properties *Dent Mater* **32(2)** 240-251, 10.1016/j.dental.2015.11.020.
12. Escalante-Otarola WG, Castro-Nunez GM, Jordao-Basso KCF, Guimaraes BM, Palma-Dibb RG & Kuga MC (2018) Evaluation of dentin desensitization protocols on the dentinal surface and their effects on the dentin bond interface *J Dent* **75** 98-104, 10.1016/j.jdent.2018.06.002.

13. Carvalho FG, Brasil VL, Silva Filho TJ, Carlo HL, Santos RL & Lima BA (2013) Protective effect of calcium nanophosphate and CPP-ACP agents on enamel erosion *Braz Oral Res* **27(6)** 463-470, 10.1590/S1806-83242013000600004.
14. Jones SB, Davies M, Chapman N, Willson R, Hornby K, Joiner A & West NX (2014) Introduction of an interproximal mineralisation model to measure remineralisation caused by novel formulations containing calcium silicate, sodium phosphate salts and fluoride *J Dent* **42 Suppl 1** S46-52, 10.1016/S0300-5712(14)50007-3.
15. Zhong Y, Liu J, Li X, Yin W, He T, Hu D, Liao Y, Yao X & Wang Y (2015) Effect of a novel bioactive glass-ceramic on dentinal tubule occlusion: an in vitro study *Aust Dent J* **60(1)** 96-103, 10.1111/adj.12241.
16. Reis A, Higashi C & Loguercio AD (2009) Re-anatomization of anterior eroded teeth by stratification with direct composite resin *J Esthet Restor Dent* **21(5)** 304-316, 10.1111/j.1708-8240.2009.00281.x.
17. Bahari M, Savadi Oskoei S, Kimyai S, Pouralibaba F, Farhadi F & Norouzi M (2014) Effect of Casein Phosphopeptide-amorphous Calcium Phosphate Treatment on Microtensile Bond Strength to Carious Affected Dentin Using Two Adhesive Strategies *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* **8(3)** 141-147, 10.5681/joddd.2014.026.
18. Doozandeh M, Firouzmandi M & Mirmohammadi M (2015) The Simultaneous Effect of Extended Etching Time and Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate containing Paste Application on Shear Bond Strength of Etch-and-rinse Adhesive to Caries-affected Dentin *J Contemp Dent Pract* **16(10)** 794-799.
19. Zero DT & Lussi A (2005) Erosion--chemical and biological factors of importance to the dental practitioner *Int Dent J* **55(4 Suppl 1)** 285-290.
20. Casas-Apayco LC, Dreibi VM, Hipolito AC, Graeff MS, Rios D, Magalhaes AC, Buzalaf MA & Wang L (2014) Erosive cola-based drinks affect the bonding to enamel surface: an in vitro study *J Appl Oral Sci* **22(5)** 434-441, 10.1590/1678-775720130468.
21. Yabuki C, Rikuta A, Murayama R, Akiba S, Suzuki S, Takamizawa T, Kurokawa H & Miyazaki M (2018) Effect of acid erosion on enamel bond strength of self-etch adhesives and sonic velocity measurement of enamel *Dent Mater J* **37(4)** 542-548, 10.4012/dmj.2017-117.
22. Barbosa-Martins LF, de Sousa JP, de Castilho ARF, Puppini-Rontani J, Davies RPW & Puppini-Rontani RM (2018) Enhancing bond strength on demineralized dentin by pre-treatment with selective remineralising agents *J Mech Behav Biomed Mater* **81** 214-221, 10.1016/j.jmbbm.2018.03.007.
23. Carrilho E, Cardoso M, Marques Ferreira M, Marto CM, Paula A & Coelho AS (2019) 10-MDP Based Dental Adhesives: Adhesive Interface Characterization and Adhesive Stability-A Systematic Review *Materials (Basel)* **12(5)**, 10.3390/ma12050790.

24. Peumans M, De Munck J, Mine A & Van Meerbeek B (2014) Clinical effectiveness of contemporary adhesives for the restoration of non-carious cervical lesions. A systematic review *Dent Mater* **30(10)** 1089-1103, 10.1016/j.dental.2014.07.007.
25. Suzuki T, Takamizawa T, Barkmeier WW, Tsujimoto A, Endo H, Erickson RL, Latta MA & Miyazaki M (2016) Influence of Etching Mode on Enamel Bond Durability of Universal Adhesive Systems *Oper Dent* **41(5)** 520-530, 10.2341/15-347-L.
26. Takamizawa T, Barkmeier WW, Tsujimoto A, Berry TP, Watanabe H, Erickson RL, Latta MA & Miyazaki M (2016) Influence of different etching modes on bond strength and fatigue strength to dentin using universal adhesive systems *Dent Mater* **32(2)** e9-21, 10.1016/j.dental.2015.11.005.
27. Curylofo-Zotti FA, Scheffel DLS, Macedo AP, Souza-Gabriel AE, Hebling J & Corona SAM (2019) Effect of Er:YAG laser irradiation and chitosan biomodification on the stability of resin/demineralized bovine dentin bond *J Mech Behav Biomed Mater* **91** 220-228, 10.1016/j.jmbbm.2018.12.022.
28. Manicardi CA, Versiani MA, Saquy PC, Pecora JD & de Sousa-Neto MD (2011) Influence of filling materials on the bonding interface of thin-walled roots reinforced with resin and quartz fiber posts *J Endod* **37(4)** 531-537, 10.1016/j.joen.2010.12.009.
29. Vaidyanathan TK & Vaidyanathan J (2009) Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **88(2)** 558-578, 10.1002/jbm.b.31253.
30. Mine A, De Munck J, Vivan Cardoso M, Van Landuyt KL, Poitevin A, Kuboki T, Yoshida Y, Suzuki K & Van Meerbeek B (2010) Enamel-smear compromises bonding by mild self-etch adhesives *J Dent Res* **89(12)** 1505-1509, 10.1177/0022034510384871.
31. Mine A, De Munck J, Cardoso MV, Van Landuyt KL, Poitevin A, Van Ende A, Matsumoto M, Yoshida Y, Kuboki T, Yatani H & Van Meerbeek B (2014) Dentin-smear remains at self-etch adhesive interface *Dent Mater* **30(10)** 1147-1153, 10.1016/j.dental.2014.07.006.
32. Souza BM, Comar LP, Vertuan M, Fernandes Neto C, Buzalaf MA & Magalhaes AC (2015) Effect of an Experimental Paste with Hydroxyapatite Nanoparticles and Fluoride on Dental Demineralisation and Remineralisation in situ *Caries Res* **49(5)** 499-507, 10.1159/000438466.
33. Comar LP, Souza BM, Gracindo LF, Buzalaf MA & Magalhaes AC (2013) Impact of experimental nano-HAP pastes on bovine enamel and dentin submitted to a pH cycling model *Braz Dent J* **24(3)** 273-278, 10.1590/0103-6440201302175.
34. Santos LF, Torres CR, Caneppele TM, Magalhaes AC & Borges AB (2016) Effect of home-bleaching gels modified by calcium and/or fluoride and the application of nano-hydroxyapatite paste on in vitro enamel erosion susceptibility *Acta Odontol Scand* **74(2)** 121-126, 10.3109/00016357.2015.1053150.
35. Medeiros IC, Brasil VL, Carlo HL, Santos RL, De Lima BA & De Carvalho FG (2014) In vitro effect of calcium nanophosphate and high-concentrated fluoride agents

- on enamel erosion: an AFM study *Int J Paediatr Dent* **24(3)** 168-174, 10.1111/ipd.12046.
36. Cross KJ, Huq NL & Reynolds EC (2007) Casein phosphopeptides in oral health--chemistry and clinical applications *Curr Pharm Des* **13(8)** 793-800, 10.2174/138161207780363086.
 37. Reynolds EC (2009) Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: the scientific evidence *Adv Dent Res* **21(1)** 25-29, 10.1177/0895937409335619.
 38. Cochrane NJ & Reynolds EC (2012) Calcium phosphopeptides -- mechanisms of action and evidence for clinical efficacy *Adv Dent Res* **24(2)** 41-47, 10.1177/0022034512454294.
 39. Ghafournia M, Tehrani MH, Nekouei A, Faghihian R, Mohammadpour M & Feiz A (2019) In vitro evaluation of dentin tubule occlusion by three bioactive materials: A scanning electron microscopic study *Dent Res J (Isfahan)* **16(3)** 166-171.
 40. Bou Chebel F, Zogheib CM, Baba NZ & Corbani KA (2018) Clinical Comparative Evaluation of Nd:YAG Laser and a New Varnish Containing Casein Phosphopeptides-Amorphous Calcium Phosphate for the Treatment of Dentin Hypersensitivity: A Prospective Study *J Prosthodont* **27(9)** 860-867, 10.1111/jopr.12984.
 41. Mahesuti A, Duan YL, Wang G, Cheng XR & Matis BA (2014) Short-term Efficacy of Agents Containing KNO₃ or CPP-ACP in Treatment of Dentin Hypersensitivity *Chin J Dent Res* **17(1)** 43-47.
 42. Sun Y, Li X, Deng Y, Sun JN, Tao D, Chen H, Hu Q, Liu R, Liu W, Feng X, Wang J, Carvell M & Joiner A (2014) Mode of action studies on the formation of enamel minerals from a novel toothpaste containing calcium silicate and sodium phosphate salts *J Dent* **42 Suppl 1** S30-38, 10.1016/S0300-5712(14)50005-X.
 43. Mobarak EH, Ali N & Daifalla LE (2015) Microshear Bond Strength of Adhesives to Enamel Remineralized Using Casein Phosphopeptide Agents *Oper Dent* **40(5)** E180-188, 10.2341/13-220-L.
 44. Gandolfi MG, Silvia F, H PD, Gasparotto G & Carlo P (2008) Calcium silicate coating derived from Portland cement as treatment for hypersensitive dentine *J Dent* **36(8)** 565-578, 10.1016/j.jdent.2008.03.012.

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a dentina foi submetida a desafio ácido simples, com uma aplicação inicial de ácido clorídrico (erosão intrínseca), ou desafio ácido duplo, incluindo aplicações diárias de ácido cítrico (erosão extrínseca), simulando uma situação clínica de exposição erosiva^{1,9}. O ácido cítrico possui um grande potencial erosivo devido a sua capacidade de quelar o cálcio dos tecidos dentários e da saliva⁴⁶. Sendo importante a avaliação do efeito dos agentes remineralizantes estudados sobre a dentina erodida, assim como na interface do sistema adesivo Clearfil SE Bond (Kuraray).

Os protocolos avaliados neste trabalho foram o Desensibilize NanoP, MI Paste Plus Recaldent™ CPP-ACP (os dois à base de fosfato de cálcio) e Regenerate NR-5™ (à base de silicato de cálcio) que são indicados para remineralização dos tecidos dentários assim como para o tratamento da hipersensibilidade dentinária^{28,37,47}. Além disso, como controle positivo foi utilizado o protocolo dessensibilizante Desensibilize KF2% (à base de nitrato de potássio e fluoreto de sódio) por ser um gel hidrossolúvel e de fácil remoção, o que dificulta a precipitação de detritos no substrato dentinário²⁷.

A aplicação do Desensibilize NanoP assim como do CPP-ACP, mostraram capacidade para obliterar túbulos da dentina erodida e desafiada diariamente. Assim mesmo, CPP-ACP formou uma camada mais homogênea de detritos sobre a superfície dentinária, isso pode sugerir maior solubilidade das partículas do Desensibilize NanoP ao ácido cítrico (desafio ácido). Regenerate mostrou precipitação de resíduos na superfície dentinária, porém não conseguiu obliterar túbulos. O análise EDX mostrou altos picos de concentração Ca – P na superfície dentinária tratada com CPP-ACP, provavelmente devido a sua capacidade de estabilizar íons cálcio e fosfato em um estado amorfo sobre a estrutura dental³⁶.

A coloração *picrosirius red* tingiu de vermelho amarelado o colágeno tipo I (maturo) e de amarelo esverdeado o colágeno tipo III (imaturo)^{48,49}. A matriz orgânica da dentina tratada com CPP-ACP evidenciou maior quantidade de colágeno tipo I, que a dentina tratada com Desensibilize Nano P ou Desensibilize KF2%, ambos protocolos contendo nitrato de potássio na sua composição. No entanto, nenhum dos protocolos

avaliados modificou significativamente a composição orgânica da dentina, quando comparados ao controle negativo.

Neste estudo foi utilizado o sistema adesivo autocondicionante de dois passos Clearfil SE Bond (Kuraray), que contém os monômeros funcionais 10-MDP e 4-MET na sua composição⁵⁰. Este sistema adesivo desmineraliza parcialmente a dentina, deixando cristais de hidroxiapatita ao redor das fibras colágenas⁵⁰. Na sequência, os monômeros funcionais interagem quimicamente com o íon cálcio da hidroxiapatita residual que permanece dentro da camada híbrida, criando um duplo mecanismo de adesão à dentina⁴⁵.

Embora nenhum dos protocolos submetidos ao desafio ácido diário tenha influenciado na resistência de união do sistema adesivo Clearfil SE Bond, os protocolos Desensibilize NanoP e Regenerate demonstraram maior resistência de união que o CPP-ACP. Curiosamente, nos grupos avaliados sem o desafio ácido diário, Desensibilize NanoP e CPP-ACP, demonstraram maior resistência de união que o Regenerate. É sabido que a presença de detritos pode reduzir as forças adesivas de sistemas contendo monômero funcional 10-MDP⁵¹. Isto sugere que os monômeros funcionais (moléculas ácidas) que têm a capacidade de condicionar o substrato dentinário⁴⁵, tiveram ação limitada, assim, o MDP pode ter se ligado ao cálcio dos detritos residuais do CPP-ACP ou Regenerate, presentes sobre a superfície dentinária, dependendo da presença, ou não, de desafio ácido diário.

As características da interface adesiva foram avaliadas, mostrando que tanto a aplicação do CPP-ACP como do Regenerate, diminuíram a penetrabilidade dentinária do sistema adesivo *self-etch*, nos grupos submetidos ao desafio ácido diário. Por outro lado, nos grupos sem desafio ácido, foi o Regenerate quem diminuiu a penetrabilidade dentinária do sistema adesivo. No entanto, Desensibilize Nano P, que obliterou túbulos dentinários, evidenciou boa formação de camada híbrida e permitiu uma boa penetrabilidade dentinária em ambos grupos (com ou sem desafio ácido diário), com valores similares ao controle (sem tratamento). Provavelmente porque as nanopartículas permitiram que os monômeros funcionais penetrem e condicionem efetivamente o substrato dentinário, conseguindo uma adequada interação química^{45,51}.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados desta tese, podemos concluir que:

- Os protocolos remineralizantes contendo fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo (MI Paste Plus Recaldent™ CPP-ACP) e nanopartículas de fosfato de cálcio (Desensibilize NanoP), são alternativas viáveis para promover a formação de precipitados imediatos e obstruir a embocadura dos túbulos dentinários, sem efeitos deletérios sobre a matriz de colágeno da dentina previamente erodida, podendo ser útil no tratamento da hipersensibilidade dentinária.
- A aplicação do protocolo contendo nanopartículas de fosfato de cálcio (Desensibilize NanoP) na dentina erodida e submetida a desafio ácido diário, mostrou melhores características na interface adesiva, sem diminuir a resistência de união do sistema adesivo Clearfil SE Bond. Por outro lado, os protocolos contendo fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo (MI Paste Plus Recaldent™ CPP-ACP) e silicato de cálcio associado com fosfato de sódio (Regenerate NR-5™), diminuíram a penetrabilidade dentinária do sistema adesivo Clearfil Se Bond.
- A aplicação dos protocolos contendo nanopartículas de fosfato de cálcio (Desensibilize NanoP) e fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo (MI Paste Plus Recaldent™ CPP-ACP) na dentina erodida, mostraram penetrabilidade dentinária, sem diminuição da resistência de união do sistema adesivo Clearfil SE Bond. Por outro lado, o protocolo contendo silicato de cálcio associado com fosfato de sódio (Regenerate NR-5™), diminuiu a resistência de união e penetrabilidade dentinária do sistema adesivo Clearfil SE Bond.

REFERÊNCIAS*

1. Carvalho TS, Colon P, Ganss C, Huysmans MC, Lussi A, Schlueter N et al. Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear--diagnosis and management. *Clin Oral Investig*. 2015; 19(7): 1557-61.
2. Shellis RP, Addy M. The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. *Monogr Oral Sci*. 2014; 25: 32-45.
3. Corica A, Caprioglio A. Meta-analysis of the prevalence of tooth wear in primary dentition. *Eur J Paediatr Dent*. 2014; 15(4): 385-8.
4. Moazzez R, Bartlett D. Intrinsic causes of erosion. *Monogr Oral Sci*. 2014; 25: 180-96.
5. Huysmans MC, Chew HP, Ellwood RP. Clinical studies of dental erosion and erosive wear. *Caries Res*. 2011; 45 Suppl 1: 60-8.
6. Martins LM, Francisconi-dos-Rios LF, Meira Gde F, Bertocco VP, Silva LM, Rebelo MA. Amazonian delicacy tucupi is as erosive as a cola-based soft drink. *Arch Oral Biol*. 2016; 61: 84-8.
7. Lombardini M, Ceci M, Colombo M, Bianchi S, Poggio C. Preventive effect of different toothpastes on enamel erosion: AFM and SEM studies. *Scanning*. 2014; 36(4): 401-10.
8. West NX, Seong J, Hellin N, Eynon H, Barker ML, He T. A clinical study to measure anti-erosion properties of a stabilized stannous fluoride dentifrice relative to a sodium fluoride/triclosan dentifrice. *Int J Dent Hyg*. 2017; 15(2): 113-9.
9. Shellis RP, Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2014; 25: 163-79.
10. Lussi A, Jaeggi T. Erosion, diagnosis and risk factors. *Clin Oral Investig*. 2008; 12 Suppl 1: S5-13.
11. Xue J, Zavgorodniy AV, Kennedy BJ, Swain MV, Li W. X-ray microdiffraction, TEM characterization and texture analysis of human dentin and enamel. *J Microsc*. 2013; 251(2): 144-53.
12. Zavgorodniy AV, Rohanizadeh R, Swain MV. Ultrastructure of dentine carious lesions. *Arch Oral Biol*. 2008; 53(2): 124-32.
13. McAndrew R, Kourkouta S. Effects of toothbrushing prior and/or subsequent to dietary acid application on smear layer formation and the patency of dentinal tubules: an SEM study. *J Periodontol*. 1995; 66(6): 443-8.
14. Yoshizaki KT, Francisconi-Dos-Rios LF, Sobral MA, Aranha AC, Mendes FM, Scaramucci T. Clinical features and factors associated with non-carious cervical lesions and dentin hypersensitivity. *J Oral Rehabil*. 2017; 44(2): 112-8.
15. Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci*. 2014; 25: 55-73.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

16. Salas MM, Nascimento GG, Huysmans MC, Demarco FF. Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis. *J Dent.* 2015; 43(1): 42-50.
17. Gillam DG, Mordan NJ, Newman HN. The dentin disc surface: a plausible model for dentin physiology and dentin sensitivity evaluation. *Adv Dent Res.* 1997; 11(4): 487-501.
18. West NX, Lussi A, Seong J, Hellwig E. Dentin hypersensitivity: pain mechanisms and aetiology of exposed cervical dentin. *Clin Oral Investig.* 2013; 17 Suppl 1: S9-19.
19. Canadian Advisory Board on Dentin H. Consensus-based recommendations for the diagnosis and management of dentin hypersensitivity. *J Can Dent Assoc.* 2003; 69(4): 221-6.
20. Spigset O. Oral symptoms in bulimia nervosa: a survey of 34 cases. *Acta Odontol Scand.* 1991; 49(6): 335-9.
21. Splieth CH, Tachou A. Epidemiology of dentin hypersensitivity. *Clin Oral Investig.* 2013; 17 Suppl 1: S3-8.
22. Brannstrom M. The hydrodynamic theory of dentinal pain: sensation in preparations, caries, and the dentinal crack syndrome. *J Endod.* 1986; 12(10): 453-7.
23. Berkathullah M, Farook MS, Mahmoud O. The Effectiveness of remineralizing agents on dentinal permeability. *Biomed Res Int.* 2018; 2018: 4072815.
24. Fernando D, Attik N, Pradelle-Plasse N, Jackson P, Grosogeat B, Colon P. Bioactive glass for dentin remineralization: a systematic review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 76: 1369-77.
25. Pandit N, Gupta R, Bansal A. Comparative evaluation of two commercially available desensitizing agents for the treatment of dentinal hypersensitivity. *Indian J Dent Res.* 2012; 23(6): 778-83.
26. Saeki K, Marshall GW, Gansky SA, Parkinson CR, Marshall SJ. Strontium effects on root dentin tubule occlusion and nanomechanical properties. *Dent Mater.* 2016; 32(2): 240-51.
27. Escalante-Otarola WG, Castro-Nunez GM, Jordao-Basso KCF, Guimaraes BM, Palma-Dibb RG, Kuga MC. Evaluation of dentin desensitization protocols on the dentinal surface and their effects on the dentin bond interface. *J Dent.* 2018; 75: 98-104.
28. Carvalho FG, Brasil VL, Silva Filho TJ, Carlo HL, Santos RL, Lima BA. Protective effect of calcium nanophosphate and CPP-ACP agents on enamel erosion. *Braz Oral Res.* 2013; 27(6): 463-70.
29. Jones SB, Davies M, Chapman N, Willson R, Hornby K, Joiner A et al. Introduction of an interproximal mineralisation model to measure remineralisation caused by novel formulations containing calcium silicate, sodium phosphate salts and fluoride. *J Dent.* 2014; 42 Suppl 1: S46-52.
30. Zhong Y, Liu J, Li X, Yin W, He T, Hu D et al. Effect of a novel bioactive glass-ceramic on dentinal tubule occlusion: an in vitro study. *Aust Dent J.* 2015; 60(1): 96-103.

31. Anastasiou AD, Strafford S, Posada-Estefan O, Thomson CL, Hussain SA, Edwards TJ et al. Beta-pyrophosphate: a potential biomaterial for dental applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017; 75: 885-94.
32. Arnold WH, Prange M, Naumova EA. Effectiveness of various toothpastes on dentine tubule occlusion. *J Dent*. 2015; 43(4): 440-9.
33. Reynolds EC. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: the scientific evidence. *Adv Dent Res*. 2009; 21(1): 25-9.
34. Azarpazhooh A, Limeback H. Clinical efficacy of casein derivatives: a systematic review of the literature. *J Am Dent Assoc*. 2008; 139(7): 915-24; quiz 94-5.
35. Bahari M, Savadi Oskoe S, Kimyai S, Pouralibaba F, Farhadi F, Norouzi M. Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate treatment on microtensile bond strength to carious affected dentin using two adhesive strategies. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2014; 8(3): 141-7.
36. Comar LP, Souza BM, Gracindo LF, Buzalaf MA, Magalhaes AC. Impact of experimental nano-HAP pastes on bovine enamel and dentin submitted to a pH cycling model. *Braz Dent J*. 2013; 24(3): 273-8.
37. Joiner A, Schafer F, Naeeni MM, Gupta AK, Zero DT. Remineralisation effect of a dual-phase calcium silicate/phosphate gel combined with calcium silicate/phosphate toothpaste on acid-challenged enamel in situ. *J Dent*. 2014; 42 Suppl 1: S53-9.
38. Reis A, Higashi C, Loguercio AD. Re-anatomization of anterior eroded teeth by stratification with direct composite resin. *J Esthet Restor Dent*. 2009; 21(5): 304-16.
39. Casas-Apayco LC, Dreibi VM, Hipolito AC, Graeff MS, Rios D, Magalhaes AC et al. Erosive cola-based drinks affect the bonding to enamel surface: an in vitro study. *J Appl Oral Sci*. 2014; 22(5): 434-41.
40. Yabuki C, Rikuta A, Murayama R, Akiba S, Suzuki S, Takamizawa T et al. Effect of acid erosion on enamel bond strength of self-etch adhesives and sonic velocity measurement of enamel. *Dent Mater J*. 2018; 37(4): 542-8.
41. Doozandeh M, Firouzmandi M, Mirmohammadi M. The Simultaneous Effect of extended etching time and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate containing paste application on shear bond strength of etch-and-rinse adhesive to caries-affected dentin. *J Contemp Dent Pract*. 2015; 16(10): 794-9.
42. Peumans M, De Munck J, Mine A, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives for the restoration of non-carious cervical lesions. A systematic review. *Dent Mater*. 2014; 30(10): 1089-103.
43. Suzuki T, Takamizawa T, Barkmeier WW, Tsujimoto A, Endo H, Erickson RL et al. influence of etching mode on enamel bond durability of universal adhesive systems. *Oper Dent*. 2016; 41(5): 520-30.
44. Takamizawa T, Barkmeier WW, Tsujimoto A, Berry TP, Watanabe H, Erickson RL et al. Influence of different etching modes on bond strength and fatigue strength to dentin using universal adhesive systems. *Dent Mater*. 2016; 32(2): e9-21.
45. Carrilho E, Cardoso M, Marques Ferreira M, Marto CM, Paula A, Coelho AS. 10-MDP based dental adhesives: adhesive interface characterization and adhesive stability-a systematic review. *Materials (Basel)*. 2019; 12(5): 790.

46. Pinto SC, Bandeca MC, Silva CN, Cavassim R, Borges AH, Sampaio JE. Erosive potential of energy drinks on the dentine surface. *BMC Res Notes*. 2013; 6: 67.
47. Schmidlin PR, Sahrman P. Current management of dentin hypersensitivity. *Clin Oral Investig*. 2013; 17 Suppl 1: S55-9.
48. Cintra LTA, Ferreira LL, Benetti F, Gastelum AA, Gomes-Filho JE, Ervolino E et al. The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model. *Int Endod J*. 2017; 50(8): 790-8.
49. Bigueti CC, Cavalla F, Tim CR, Saraiva PP, Orcini W, De Andrade Holgado L et al. Bioactive glass-ceramic bone repair associated or not with autogenous bone: a study of organic bone matrix organization in a rabbit critical-sized calvarial model. *Clin Oral Investig*. 2019; 23(1): 413-21.
50. He Z, Chen L, Shimada Y, Tagami J, Ruan S. Evaluation of sub-surface penetration and bonding durability of self-etching primer systems to Er:YAG laser treated cervical dentin. *Dent Mater J*. 2017; 36(2): 174-81.
51. Yoshihara K, Hayakawa S, Nagaoka N, Okihara T, Yoshida Y, Van Meerbeek B. Etching efficacy of self-etching functional monomers. *J Dent Res*. 2018; 97(9): 1010-6.

APÊNDICE A – METODOLOGIA EXPANDIDA

1 PROTOCOLOS AVALIADOS

Os protocolos avaliados foram:

- (NP): O produto contendo nanopartículas de fosfato de cálcio (Dessensibilize NanoP; FGM, Joinville, SC, BR) foi friccionado sobre a superfície dentinária com taça de borracha (KG Sorensen, São Paulo, SP, BR), em baixa rotação, com 500 rpm, por 10s. Em seguida, os resíduos permaneceram sobre a dentina por 5 min e lavados com 10 mL de água deionizada;
- (RD): O produto contendo CPP-ACPF (MI Paste Plus Recaldent™; GC Company; JPN) foi aplicado sobre a superfície dentinária, similar ao descrito no protocolo anterior, porém o produto foi mantido sobre a dentina por 3 min;
- (NR): O produto contendo duas pastas (Regenerate NR-5™; Unilever, Wirral, UK), gel remineralizante e ativador, foram previamente misturados e utilizados identicamente ao protocolo anterior, também mantido sobre a dentina por 3 min;
- (KF): O produto utilizado foi a base de fluoreto de sódio a 2% (Dessensibilize KF 2%; FGM, Joinville, SC, BR) foi apenas aplicado sobre a superfície dentinária com um aplicador específico para sistema adesivo (KG Sorensen, São Paulo, SP, BR), sem fricção, e mantido no local por 10 min;
- (CO): Os espécimes foram mantidos em saliva artificial e serviram como protocolo controle negativo.

Os espécimes foram submetidos a 4 sessões de tratamentos, com intervalos de 7 dias entre cada sessão.

Figura 1 – Protocolos remineralizantes avaliados

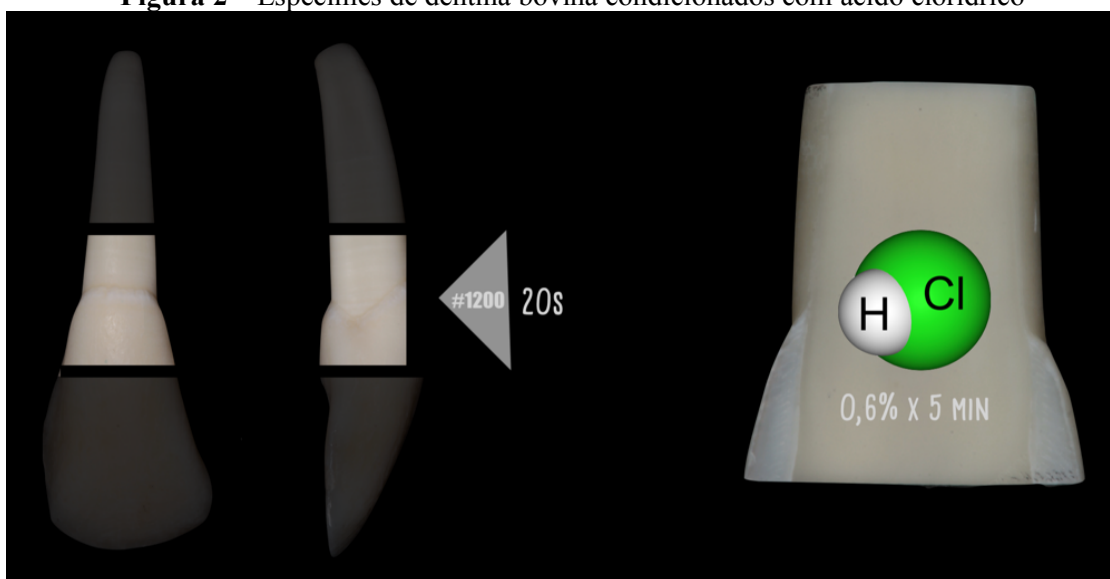
 NP Desensibilize NanoP nanopartículas de fosfato de cálcio nitrato de potássio ao 5% fluoreto de sódio ao 0,9% 1. Fricção com baixa rotação por 10s 2. Repouso por 5min 3. Lavado com água destilada 	 RD MI Paste Plus Recaldent™ fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo CPP-ACP fluoreto de sódio ao 0,2% W/W fluor 900 ppm (0,09%) 1. Aplicação e repouso por 3min 2. Lavado com água destilada 	 NR Regenerate NR-5™ silicato de cálcio monofluorofosfato de sódio fluoreto de sódio 1. Mistura de agentes 2. Aplicação e repouso por 3min 3. Lavado com água destilada 	 KF Desensibilize KF 2% nitrato de potássio ao 5% fluoreto de sódio ao 2% 1. Aplicação e repouso por 10min 2. Lavado com água destilada 
---	--	---	--

Fonte: Elaboração própria.

2 PREPARO DE ESPÉCIMES

Cem espécimes (10mm de comprimento x 10mm de largura x 5mm de espessura) foram obtidos do terço médio dos dentes usando máquina de corte de tecidos duros (Isomet 100, Buehler, Lake Bluff, IL) sob refrigeração como água corrente. A superfície vestibular dos fragmentos foi desgastada em politriz (DP-10; Panambra, Struers, Ballerup, DI) usando sequencialmente lixas de granulação #600 e #1200, por 20s cada (ISO 6344-1), para a exposição da dentina cervical e padronização da *smear layer*. A superfície dentinária foi previamente condicionada com ácido clorídrico (HCl) a 0,6% (Arte & Ciência, Araraquara, São Paulo, Brazil), por imersão durante 5 min para simular o substrato dentinário erodido. Em seguida, os espécimes foram lavados com água destilada e armazenados em saliva artificial (0.375 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.125 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.2g/l KCl, 0.85g/l NaCl, 2.5g/l $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1g/l sorbic acid, 5 g/l hydroxyethyl cellulose-sodium, e 43 g/l sorbitol solution) (Arte & Ciência, Araraquara, São Paulo, BR), a 37 °C, em pH 7, até o momento de uso.

Figura 2 – Espécimes de dentina bovina condicionados com ácido clorídrico



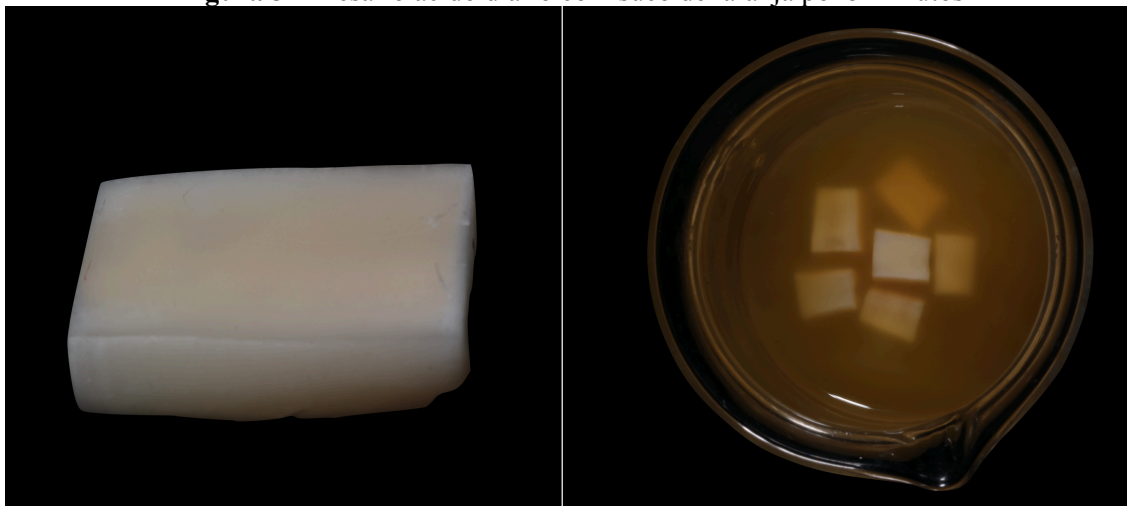
Fonte: Elaboração própria.

3 DESAFIO ÁCIDO

Durante a realização do tratamento, os espécimes foram submetidos ao desafio ácido, por imersão diária em suco de laranja (Minute Mais; Coca Cola®. SP, BR), com $\text{pH } 3.80 \pm 0.04$, por 5 min. Em seguida foram lavados com 10 mL de água deionizada e mantidos imersos individualmente em saliva artificial, a 37°C. A saliva artificial, cuja

composição química foi igual a anteriormente descrita, foi trocada a cada 7 dias, imediatamente após a realização dos protocolos avaliados.

Figura 3 – Desafio ácido diário com suco de laranja por 5 minutos



Fonte: Elaboração própria.

4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Cinquenta espécimes foram divididos aleatoriamente de acordo com o protocolo avaliado e controle ($n = 10$). Após a conclusão dos tratamentos descritos, os espécimes foram armazenados em saliva artificial por 24 h. Em seguida, os espécimes foram desidratados em câmara fechada com sílica coloidal por 7 dias. Após a montagem dos espécimes nos *stubs* metálicos, foram metalizados com ouro coloidal (ciclo simples – 120s) sob vacuum, em câmara de metalização (MED 010; Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) e examinados mediante microscopia eletrônica de varredura com JEOL 6060 (JEOL 6060; JEOL Ltda, Tokyo, Japan), operado a 20 kV. Quatro campos distintos foram inicialmente avaliados e do campo mais representativo do espécime foi obtida uma imagem com a magnificação de 500x, para avaliação e quantificação dos precipitados formados sobre a superfície dentinária. A obtenção das imagens foi realizada por um único operador. Outra imagem foi obtida do mesmo local, com magnificação de 2000x, para a contagem de túbulos dentinários abertos. Todas as imagens foram obtidas pelo mesmo operador.

Figura 4 – Avaliação do substrato dentinário com microscopia eletrônica de varredura



Fonte: Elaboração própria.

5 DISPERSÃO DE ENERGIA X-RAY (EDX)

Quatro espécimes de cada um dos protocolos foram submetidos à cobertura com carbono (BalTec SCD 004 Sputter Coater; Balzers, Vaduz, LI), em 15 kV, por 180 s. Em seguida, foram analisados em EDX (JEOL 6060; JEOL Cia., Tokyo, Japan) para avaliar os principais componentes químicos presentes sobre a superfície dentinária após a realização dos protocolos avaliados e qualificar a composição química dos precipitados formados.

Figura 5 – Análise de dispersão de energia X-ray (EDX)



Fonte: Elaboração própria.

6 MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

Cinquenta espécimes foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos avaliados (n=10). Após a conclusão dos protocolos avaliados, os espécimes foram armazenados por 24h em saliva artificial. Em seguida, foram acondicionados em solução de ácido etilenodiaminotetracético a 10% (EDTA) (Merck, Darmstadt, GER), tamponado com pH 7,0, com trocas realizadas duas vezes por semana, por 90 dias. Os espécimes foram novamente copiosamente lavados com água destilada, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Histosec; Merck, Darmstadt, Alemanha). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados de 5 µm de espessura e submetidos à técnica de coloração com Picrosirius Red. Uma vez concluído

o processamento histológico, cada lâmina foi analisada em microscópio de luz polarizada a fim de se avaliar a organização e quantidade de feixes de fibras colágenas considerando-se a intensidade de birrefringência da matriz de colágeno. A quantificação da intensidade do brilho de birrefringência foi realizada com o software KS 300/400 com AxioVision versão 4.8 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Inicialmente foram definidos os espectros de cor verde, amarela e vermelha, seguindo valores de RGB (red, green, blue), os quais foram padronizados para todas as imagens. De acordo com a organização da orientação das fibras de colágeno, a cor do espectro pode variar de esverdeado (colágeno tipo III) a vermelho (colágeno tipo I). Para quantificar apenas fibras esverdeadas e vermelhas, correspondente à matriz colágena, as imagens foram analisadas no Adobe Photoshop CS6 Software, calculando a quantidade de pixels de cada cor. Na sequência, foram calculadas as medias dos valores em pixels, expressadas em porcentagem e submetidas a análise estatística.

Figura 6 – Avaliação da matriz orgânica dentinária (picrosirius red)

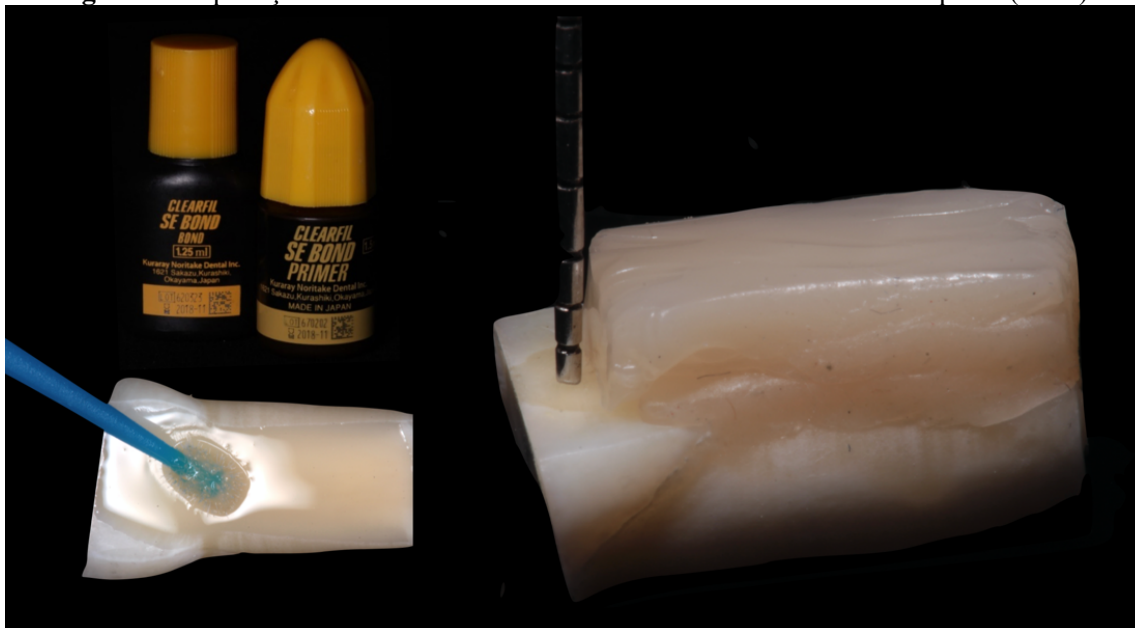


Fonte: Elaboração própria.

7 SISTEMA ADESIVO

O sistema adesivo Clearfil SE Bond foi aplicado na superfície dentinária erodida segundo as recomendações do fabricante e fotoativado com fotopolimerizador LED (Valo™ Cordless; Ultradent, South Jordan, USA), com uma intensidade standard de 1000 mW / cm² por 10 s. Após aplicação do sistema adesivo na dentina erodida, foram construídos blocos de resina composta (Filtek Z-350; 3 M, St. Paul, MN, USA) em três incrementos de aproximadamente 1mm, sendo cada incremento fotoativado, utilizando o mesmo fotopolimerizador anteriormente descrito, durante 20 s. No final foi obtido um bloco de resina composta de 3mm de altura sobre os espécimes e armazenados em ambiente úmido a 37° C por 24 h.

Figura 7 – Aplicação do sistema adesivo Clearfil SE Bond e da resina composta (3mm)



Fonte: Elaboração própria.

8 MICROTRAÇÃO

Foram obtidos em média 12 palitos de cada espécime, com dimensões de aproximadamente 1,0 x 1,0 x 6,0 mm, usando máquina de corte de tecidos duros (Isomet 100, Buehler, Lake Bluff, IL) sob refrigeração como água corrente. Na sequência, os palitos foram fixados pelas suas extremidades ao dispositivo para teste de microtração com adesivo a base de cianocrilato (Loctite Superbond Gel®, Henkel Adesivos LTDA, Itapevi, Brasil).

Figura 8 – Preparo dos corpos de prova para o teste de microtração



Fonte: Elaboração própria.

Cada palito foi posicionado de maneira que a interface resina-dentina ficasse no centro do dispositivo e perpendicular à carga de tração aplicada durante o teste. Foram

então submetidos ao ensaio de microtração em uma máquina universal de ensaios eletromecânicos EMIC DL2000 (EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brazil) com velocidade de 0,5 mm/min com adaptação de uma célula de carga de 200N. No momento da fratura o movimento foi imediatamente cessado e os valores em newtons (N) coletados para posterior análise. Após a fratura dos corpos de prova, estes foram removidos do dispositivo e a secção transversal (medida das duas dimensões da superfície de fratura em mm) de cada um deles foi aferida utilizando-se um paquímetro digital (Vonder Paquímetro Eletrônico Digital, Curitiba, PR, Brasil) para posterior cálculo da área de união. Para expressar a resistência de união em megapascal (MPa), os valores em N foram divididos pela área de união, em mm². Uma média aritmética foi calculada para os palitos de cada espécime e considerada para análise estatístico.

Figura 9 – Teste de microtração – 0,5 mm/min - 200N



Fonte: Elaboração própria.

9 CAMADA HIBRIDA

Após a aplicação do sistema adesivo na dentina erosionada, um bloco de 4mm de altura de resina composta (Filtek Z-250; 3 M, St. Paul, MN, USA) foi reconstruído e a cada incremento de 2mm foi fotoativado por 20 s. Na sequência, os espécimes foram armazenados em ambiente úmido. Após 24h, os espécimes foram cortados longitudinalmente na metade utilizando máquina de corte de tecidos duros (Isomet; Buehler, Lake Bluff, IL) sob refrigeração de água corrente, e selecionada uma de cada

corpo. As faces foram desgastadas em politriz (DP-10; Panambra, Struers, Ballerup, DI) usando lixas de granulação #600 e #1200, por 20s cada. Uma das faces obtidas de cada espécimen, foi selecionada para avaliar a formação da camada híbrida. Na sequência, as faces selecionadas foram imersas em solução de ácido clorídrico 18% por 30 s, para remoção da *smear layer* superficial e posterior lavagem, por 30 s com água deionizada. Posteriormente, foram imersas em hipoclorito 5% por 5 min, para remoção de todo o colágeno não infiltrado pelo sistema adesivo, e posterior lavagem por 30 s. As faces foram desidratadas em câmara fechada com sílica coloidal por 7 dias. Após a montagem dos espécimes nos *stubs* metálicos, foram revestidos a ouro (ciclo simples – 120s) sob vacuum, em câmara de metalização (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) e examinados mediante microscopia eletrônica de varredura com JEOL 6060 (JEOL 6060; JEOL Ltda, Tokyo, Japan) operado a 20 kV. Quatro campos distintos da interface adesiva foram inicialmente avaliados e do campo mais representativo do espécime foi obtida uma imagem com a magnificação de 500x, para avaliação da formação de tags de resina. A obtenção das imagens foi realizada por um único operador. Outra imagem foi obtida do mesmo local, com magnificação de 2000x, para mensuração da camada híbrida. Todas as imagens foram obtidas pelo mesmo operador.

Figura 10 – Avaliação da camada híbrida por meio de microscopia eletrônica de varredura



Fonte: Elaboração própria

10 PENETRABILIDADE DENTINÁRIA

Após a aplicação do sistema adesivo na dentina erodida, um bloco de 4mm de altura de resina composta (Filtek Z-250; 3 M, St. Paul, MN, USA) com partículas de verde malaquita (Synth, São Paulo, SP, Brazil) foi reconstruído e a cada incremento de 2mm foi fotoativado por 20 s. Na sequência, os espécimes foram armazenados em ambiente úmido. Após 24h, os espécimes foram cortados longitudinalmente na metade utilizando máquina de corte de tecidos duros (Isomet; Buehler, Lake Bluff, IL) sob refrigeração de água corrente, e selecionada uma de cada corpo. As faces foram

desgastadas em politriz (DP-10; Panambra, Struers, Ballerup, DI) usando lixas de granulação #600 e #1200, por 20s cada. Uma das faces obtidas de cada espécimen, foi selecionada para avaliar a penetrabilidade dentinária do sistema adesivo. Na sequência, foram lavadas em cuba ultrassônica por 5 min e secadas com papel absorvente. As faces foram analisadas usando microscopia confocal a laser CLSM (LSM5; Zeiss, Jena, Germany). Uma imagem foi obtida da interface adesiva, com 20x de aumento.

Figura 11 – Avaliação da penetrabilidade dentinária por meio de microscopia laser confocal



Fonte: Elaboração própria.

ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

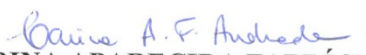


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada ***"EFEITOS DO FOSFATO OU SILICATO DE CÁLCIO NO SUBSTRATO DENTINÁRIO EROSIONADO E NO SISTEMA ADESIVO SELF-ETCH"***, registrada com o nº 30/2018, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Milton Carlos Kuga** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 14/12/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Setembro/2019
Espécie/linhagem	Gado
Nº de animais	300 dentes bovinos
Peso/Idade	-
Sexo	-
Origem	Délbio Ximenes Verdan


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

**Não autorizo a reprodução deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data da
defesa**

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 25 de março de 2020

Wilfredo Gustavo Escalante Otárola