



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

TÂNIA MARA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA INTERFACE ADESIVA EM DENTINA SADIA E
AFETADA POR CÁRIE SOB PRESSÃO PULPAR SIMULADA E APÓS
DESAFIO EM SOLVENTES**

2018

TÂNIA MARA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA INTERFACE ADESIVA EM DENTINA SADIA E AFETADA POR
CÁRIE SOB PRESSÃO PULPAR SIMULADA E APÓS DESAFIO EM SOLVENTES**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Área de Dentística.

Orientador: Prof. Adj. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Silva, Tânia Mara

Avaliação da interface adesiva em dentina sadia e afetada por cárie sob pressão pulpar simulada e após desafio em solventes / Tânia Mara Silva. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
119 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientador: Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves.

1. Adesão. 2. Dentina. 3. Cárie. 4. Pressão intrapulpar. 5. Solventes. I. Gonçalves, Sérgio Eduardo de Paiva, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adjunto Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Titular Adriana Bona Matos

Universidade de São Paulo (USP)

Faculdade de Odontologia

Campus de São Paulo

Profa. Dra. Roberta Tarkany Basting Höfling

Faculdade São Leopoldo Mandic

Curso de Odontologia

Campus de Campinas

Profa. Dra. Maria Filomena Rocha Lima Huhtala

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Adjunto Carlos Rocha Gomes Torres

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 06 de fevereiro de 2018.

DEDICATÓRIA

*“Só não vê anjos aquele que não presta atenção
nas pessoas que Deus coloca em nossas vidas”
(Daní Santos)*

É com muito respeito que dedico esta tese ao meu orientador **Prof. Adj. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves**, que tenho orgulho de citá-lo como um dos responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela oportunidade de tê-lo como orientador de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado. Ser professor é “saber ensinar”, e o senhor é o exemplo do que a palavra “mestre” representa.

Obrigada pelos ensinamentos transmitidos, pela dedicação, confiança e oportunidades durante esses nove anos de orientação e amizade. Tenha certeza que aprendi e cresci muito. Sou uma “Sergete” com orgulho! Obrigada por todo incentivo, mostrando-me que a cada dia posso ser capaz de aprender mais. Muitíssimo OBRIGADA por tudo! E, que eu possa sempre contar com o privilégio da sua amizade. À você minha eterna gratidão!

Dedico com todo meu amor, à minha mãe **Maura Ribeiro de Oliveira Silva**, a toda minha família, **Hélio Antonio da Silva**, **Aline Christine da Silva**, **Átila Correia Leite Galdini** e meu dog **Peter**, que me incentivaram a cada dia para eu chegar aqui. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês tiveram por mim. Sempre acreditando nos meus sonhos. Ensinando-me a agir com respeito, simplicidade e honestidade. Vibrando comigo em cada conquista.

Dedico esta vitória a vocês, pois não é só minha, mas nossa.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

*“Chega um momento da vida, que você sabe:
Quem é imprescindível para você,
Quem nunca foi,
Quem não é mais
Quem sempre será!”
(Charles Chaplin)*

À **Deus** por ter abençoado todos os dias da minha vida, iluminar meu caminho e me dar forças para seguir em frente, mostrando-me que sempre há algo melhor por vir.

Aos meus professores do Departamento de Odontologia Restauradora - Dentística, **Carlos Rocha Gomes Torres, Alessandra Bühler Borges, Maria Filomena Rocha Lima Huhtala, César Rogerio Pucci, Eduardo Bresciani, Clóvis Pagani e Taciana Marco Ferraz Canepelle**, por todo ensinamento transmitido e pela contribuição no meu aprendizado. Agradeço o apoio, o incentivo e a oportunidade de aprender com pessoas que tanto admiro. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao Prof. **Ivan Balducci**, pela disposição em me ajudar a entender a Estatística. Obrigada pelo auxílio nas análises estatísticas, não somente para a tese como também para diferentes trabalhos realizados durante o período da Pós-graduação.

À **University of Kansas** e ao **Bioengineering Research Center**, na pessoa da **Profa. Paulette Spencer** e **Dr. Ye Wang**, que possibilitaram não somente a realização do período do meu doutorado

sanduíche, como a realização do meu sonho em estudar no exterior. Por toda a disponibilidade e gentileza nos ensinamentos de novas metodologias e aprofundamento no conhecimento na área da adesão e propriedades dos materiais adesivos.

À toda família “Gonçalves et al.”, **Daphne Barcellos**, **Karen Yui**, **Beatriz Fonseca**, **Maria Ângela Esper**, **Stella Esteves**, **Érika Siqueira**, pela ajuda durante o desenvolvimento da tese, pelos felizes momentos compartilhados, pelo incentivo constante durante toda jornada e a amizade construída. E, em especial, à minha “scientific sister” **Lucélia Lemes Gonçalves**, com o dom da palavra amiga e divina que só ela tem, além do ombro amigo. Presente que Deus me deu para todos os momentos, mostrando-me a alegria e bênçãos que é a vida.

Às “irmãs” de alma e coração que a vida me deu, **Monique Costa Moreira França** e **Paloma Costa Moreira**, e que estão presentes em tudo. Amigas que estão ao meu lado, torcendo, vibrando, apoiando e acreditando em mim. Vocês são exemplos de determinação, força, generosidade e bondade. Obrigada por todo companheirismo e carinho. E para o **Dudu** e **Sofia**, meus amigos mirins que me mostram a superação e a alegria de viver, pois nada é tão especial como ver o sorriso no rosto de uma criança.

Aos meus amigos, **Rodnei Dennis Rossoni** e **Evelyn Luzia de Souza Santos**, pela forte amizade construída. Amigos que levarei para a vida. Amigos que estão ao meu lado, independentemente do que aconteça, que apoiam, criticam e incentivam. Agradeço pela confiança e presença constante em todas as etapas da minha vida.

Aos amigos **Rosemary Soares de Santana** e **Felipe Eduardo Oliveira**, pessoas especiais que
alegram meus dias com muito carinho!

Às amigas que participaram indiretamente, **Juliana Souza**, **Roberta Oliveira**, **Anelize Condino**,
Catharina Santos e **Raquel Oliveira**. Amigas fraternas que sempre torceram e acreditaram em mim.
Com certeza essa jornada foi mais fácil junto a vocês. Fico muito feliz pela convivência nestes
anos!

Às amigas, **Cassia Cestari**, **Marina Gullo**, **Laura Souto**, **Débora Dantas** pela ajuda essencial durante
a vida de Pós-graduação e momentos de descontração. Sabemos as dificuldades que passamos e
espero que todas alcancem seus objetivos. Foi um prazer conhecê-las melhor. Formamos um grupo
ótimo e desejo muita sorte a todas!

Aos amigos de pós-graduação, **Odair Bim Junior** (Bauru-Kansas), **Patrícia Pimentel** (Microbiologia),
Esteban Orozco, **Amjad Hasna** (Endodontia), **Erica Crastequini**, **Fernanda Feitosa**, **Maria Beatriz**,
Letícia Perote, **Heleine Rego**, **Natália Gutierrez**, **Graziela Batista**, **Rayssa Zanatta**, **Danielle Ávila**,
Laura Meireles, **Ana Luiza Barbosa**, **Mariane Mailart**, **Luiza Campello**, **Danilo Andrade**, **Fernanda**
Tessarín, **Thais Mesquita**, **Ana Paula Mafetano**, **Ayla Correia**, entre tantos outros. Pelas trocas de
conhecimento e experiências da Pós-graduação, e da amizade além dos laboratórios de pesquisa.

Às funcionárias do Departamento de Odontologia Restauradora, **Josiane**, **Fernanda** e **Liliane**, por
toda a ajuda e colaboração, sendo sempre solícitas e disponíveis.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT/ UNESP, na pessoa do diretor Prof Dr. Estevão Kimpara e da vice-diretora Prof. Adj. Rebeca Di Nicoló, por proporcionar a estrutura, suporte e aprendizado à minha formação.

À CAPES e ao PDSE pela concessão das bolsas de estudo, que me auxiliaram durante a realização do doutorado.

A todos que de forma direta e indireta contribuíram para a execução deste trabalho, colaboraram e incentivaram para que eu chegasse até aqui. Obrigada!

Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas, para que vocês possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua, para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes, para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações.

Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática, você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber quando aprende a se doar.

(Augusto Cury)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Dentina	16
2.2 Degradação da interface.....	24
2.3 Análises longitudinais	29
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Comitê de ética.....	34
4.2 Delineamento experimental.....	34
4.3 Divisão dos grupos	35
4.4 Preparo das amostras.....	36
4.4.1 Dentina sadia	36
4.4.2 Dentina artificialmente afetada	38
4.4.3 Dentina naturalmente afetada	40
4.5 Análise química da dentina por espectroscopia - FTIR	42
4.6 Análise da microdureza Knoop (KHN).....	43
4.7 Procedimento restaurador.....	44
4.7.1 Pressão pulpar simulada	44
4.7.2 Restauração adesiva.....	47
4.7.3 Preparo para armazenamento	49
4.8 Degradação em solventes	50
4.9 Teste de resistência adesiva à microtração.....	51
4.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
4.11 Análises físico-mecânicas do sistema adesivo.....	54
4.11.1 Teste de resistência flexural em três pontos e módulo de elasticidade	54
4.11.2 Teste de sorção (A) e solubilidade (S) em solventes	56
4.12 Planejamento estatístico	58
5 RESULTADOS.....	60

5.1 Dentina artificialmente afetada por cárie	60
5.1.1 DIAGNOdent	60
5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	61
5.2. Análise química dos substratos em espectroscopia – FTIR	62
5.3 Análise da microdureza superficial (KHN)	66
5.4 Resistência adesiva à microtração	67
5.4.1 Estatística descritiva	67
5.4.2 Estatística Inferencial	68
5.4.2.1 Análise de variância sob 3- fatores	68
5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	72
5.6 Resistência flexural em três pontos (RF) e módulo de elasticidade (ME) do sistema adesivo	76
5.7 Sorção (A) e solubilidade (S) do sistema adesivo	78
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS	95
APÊNDICES	114
ANEXOS	117

Silva TM. Avaliação da interface adesiva em dentina sadia e afetada por cárie sob pressão pulpar simulada e após desafio em solventes [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a resistência de união (RU) e características da interface adesiva em dentina sadia e afetada por cárie, na presença de pressão pulpar simulada e após desafio em solventes. Setenta e dois molares humanos hígidos (SD) e outros trinta e seis molares humanos cariados (NCAD) foram seccionados para obtenção de 2 mm de espessura de dentina, a partir do corno pulpar mais alto. Dentre as amostras sadias, trinta e seis foram submetidas à formação artificial de dentina afetada por cárie pelo processo de ciclagem de pH (ACAD). Previamente ao procedimento restaurador, a análise química da superfície oclusal de cinco amostras de cada dentina foi avaliada em espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e microdureza de superfície (KHN). Todas as amostras foram tratadas, sob pressão pulpar simulada (20 cm H₂O), sequencialmente com: ácido fosfórico 37%, sistema adesivo (Scotchbond Universal, 3M/ESPE), fotopolimerização (10 s), confecção de um bloco de resina composta (Filtek Z350 XT; 3M/ESPE) e fotopolimerização (20 s). Após 48 h, palitos retangulares de resina-dentina (1mm²) foram obtidos e aleatoriamente divididos em grupos, de acordo com o tempo de envelhecimento (24 h e 30 dias) e solventes: água deionizada (A), etanol a 99% (E) e metiletilcetona (MEK). As amostras foram submetidas aos testes de resistência adesiva à microtração (0,5 mm/min; 10 kgf), e a interface adesiva avaliada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os sistemas adesivos foram avaliados frente ao desafio dos solventes, por análise da resistência flexural (RF), módulo de elasticidade (ME), sorção (SO) e solubilidade (SL). Os resultados de RU foram submetidos aos testes ANOVA de medidas repetidas sob 3-fatores (dentina, solvente e tempo de armazenamento), seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey ($p<0,05$). FTIR: diferenças químicas foram observadas entre os substratos, pela perda do conteúdo mineral na NCAD (maior) e ACAD (intermediário) em relação à SD. KHN: NCAD mostrou as menores médias, diferindo significativamente da SD. RU: dentina, tempos, interação dentina-tempo e interação dentina-tempo-solvente mostraram efeitos estatisticamente significantes: SD apresentou diferenças significativas quando armazenada 24 h em A; diferenças significantes foram observadas no grupo NCAD para o solvente E após 30 dias. MEV: as características da interface adesiva diferiram entre os substratos e solventes: A degradou a interface entre dentina e camada de sistema adesivo; E e MEK entre camada de adesivo e resina composta. RF/ME: solvente e tempo foram estatisticamente significantes, com as menores médias para E. SO/SL: A apresentou as menores médias, diferindo significativamente dos demais solventes. Pode-se concluir que o tipo de dentina, o solvente e o tempo de armazenamento interferiram negativamente nos valores de RU, com as menores médias para: NCAD, E em 30 dias; e, as propriedades físico-mecânicas do sistema adesivo foram diretamente afetadas pelo E.

Palavras-chave: Adesão. Dentina. Cárie. Pressão intrapulpar. Solventes.

Silva TM. *Evaluation of sound and caries-affected dentin interface under simulated pulpal pressure and aging in food-simulating solvents* [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University, Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the bond strength (BS) and adhesive interface characteristics of sound and caries-affected dentin under presence of simulated pulpal pressure (SPP) and after aging in solvents. Seventy-two sound human molars (SD) and thirty-six caries-affected human molars (NCAD) were sectioned to obtain 2-mm dentin thickness from the highest pulp horn. Among the sound dentin samples, thirty-six were submitted to artificial formation of caries by the pH cycling (ACAD). Prior to restorative procedures, chemical analysis of the dentin occlusal surface of five selected samples was performed in Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and surface microhardness (KHN). All samples were treated, under simulated SPP (20 cm H₂O), sequentially with: 37% phosphoric acid, adhesive system (Scotchbond Universal, 3M/ESPE), light-cured (10 s), a composite resin build up (Filtek Z350 XT; 3M/ESPE) and light-cured (20 s). After 48 h, tooth-resin sticks (1mm²) were obtained and randomly divided into groups, according to storage time (24 h and 30 days) and solvents: deionized water (W), 99% ethanol (E) and methyl ethyl ketone (MEK). Samples were submitted to microtensile bond strength test (0.5 mm/min; 10 kgf), and the adhesive interface was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). The adhesive system was evaluated, against the solvents challenge, by flexural strength (FS), modulus of elasticity (ME), sorption (SO) and solubility (SL). Data were submitted to 3-way ANOVA (dentin, solvent and storage times) followed by Tukey ($p < 0.05$). FTIR: Chemical differences in dentin were observed through mineral content loss in NCAD (higher) and ACAD (intermediate) in relation to SD. KHN: NCAD showed the lowest mean, differing significantly from SD. BS: Dentin, time, interaction dentin-time and interaction dentin-time-solvent had a statistically significant effect: SD showed significant differences when storage 24h in W; statistically significant differences were observed in group NCAD storage 30 days in E. SEM: the characteristics of adhesive interface differs among substrates and aging solvents: W degraded the interface between dentin and adhesive; E and MEK between adhesive and composite resin. FS/ME: solvent and time were statistically significant, with the lowest mean for E. SO/SL: A showed lower means, differing significantly from the other solvents. It can be concluded that the type of dentin, aging solvents and storage time interfered negatively on BS values, with lowest values for: NCAD, E for 30 days; and the physico-mechanical adhesive properties were directly affected by E.

Keywords: Adhesion. Dentin. Caries. Intrapulpal pressure. Solvents.

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária continua a ser uma das doenças orais mais prevalentes na população mundial (Selwitz et al., 2007; Azevedo et al., 2011), sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um grave problema de Saúde Pública que afeta pessoas de todas as idades (Melo et al., 2008), com um dramático impacto financeiro aos órgãos governamentais.

O tratamento restaurador dos dentes afetados por cárie somente está indicado quando esta já atingiu o tecido dentinário. No entanto, nem toda dentina cariada deverá ser removida durante o preparo cavitário. A literatura recomenda a remoção apenas da dentina irreversivelmente comprometida ou infectada (camada mais externa da zona cariada caracterizada pela presença de bactérias, altamente desmineralizada e com fibras colágenas desnaturadas) e a preservação da dentina afetada (camada mais interna da zona cariada, sem a presença de bactérias, com poucas alterações nas fibras colágenas e passível de remineralização) (Fusayama et al., 1966; Fusayama, Terachima, 1972; Fusayama, 1988). Assim, após a escavação da cárie em um preparo conservador, a superfície será composta basicamente por dentina afetada (Fusayama, 1979; Marshall et al., 1997)

A despeito dessa característica, a maioria dos estudos sobre adesão ainda é realizada sobre dentina hígida (Perdigão, 2010). Comparativamente, há pouca informação sobre as características da interface de adesão quando se utiliza como substrato a dentina afetada por cárie. Algumas das investigações já realizadas evidenciaram que a dentina afetada exibe menor conteúdo mineral e dureza, formação de uma camada híbrida de maior espessura, porosa e com resistência coesiva e adesiva significativamente inferiores, quando comparada à dentina hígida, em um mesmo dente e a uma mesma profundidade (Nakajima et al., 1995; Yoshiyama et al., 2000; Ceballos et al., 2003; Wang et al., 2007; Nakajima et al., 2011; Shibata et al., 2016). Entretanto, ainda permanece sem esclarecimento a não correlação entre a espessura da camada híbrida e a resistência adesiva em qualquer dos substratos (Wang et al., 2007).

Diante das características irregulares da dentina afetada por cárie, a literatura vem desenvolvendo metodologias para indução *in vitro* de lesão de cárie em dentina,

a fim de aproximar os estudos laboratoriais de adesão das condições clínicas (Erhardt et al., 2008b; Marquezan et al., 2009; de Azevedo et al., 2014; Lenzi et al., 2015). Estudos apresentaram valores de resistência de união para o substrato artificialmente afetado por cárie semelhantes ao substrato naturalmente afetado e inferiores ao substrato sadio (Erhardt et al., 2008a, 2008b; Joves et al., 2013; Rocha et al., 2014). Entretanto, a comparação entre esses estudos é dificultada na medida que as metodologias para promover a lesão de cárie artificial sofrem variações nas composições e tempos de indução.

Outro fator que ainda não foi completamente elucidado é a influência da umidade durante e após o procedimento adesivo. A presença da umidade na superfície dentinária, fruto da perfusão de fluidos provenientes da pressão hidrostática intrapulpar e das manobras de lavagem durante os procedimentos restauradores adesivos, pode induzir a separação de fases do adesivo (hidrofílico/hidrofóbico), propiciar a incorporação de bolhas de água, falhas e porosidades na interface, e dificultar a polimerização dos monômeros resinosos (Spencer, Wang, 2002; Park et al., 2010), interferindo negativamente na resistência adesiva em substrato dentinário sadio (Yiu et al., 2006; Hosaka et al., 2007; Sauro et al., 2007; Cardoso et al., 2008; Mazzitelli et al., 2008; Silva et al., 2016). Contudo, até o momento, poucos relatos foram encontrados na literatura em relação aos efeitos da simulação de pressão sobre os procedimentos restauradores adesivos em dentina afetada por cárie (Mobarak, 2011; Mohamed et al., 2015).

Na fase pós-restauração, a sorção de fluidos provenientes da cavidade bucal pode promover plasticização dos polímeros, solubilização dos monômeros resinosos (Ferracane, 2006) e aumento de falhas na interface dente-restauração (Ferracane, 2006; De Munck et al., 2012). Os agentes provenientes das dietas alimentares podem agir como solventes, aumentando o potencial de degradação diante desse ambiente úmido sobre as restaurações e interface adesiva (Valinoti et al., 2008; Yesilyurt et al., 2009; Hengtrakool et al., 2011; Reis et al., 2015; Silva et al., 2017). Vários solventes podem simular o envelhecimento acelerado da interface adesiva, como a água destilada (Pashley et al., 1999; De Munck et al., 2012) e os solventes orgânicos, como etanol, ácido cítrico e heptano, presentes nas bebidas alcoólicas e alimentos (Lee et al., 1996; Yap et al., 2001; Yesilyurt et al., 2009; Hengtrakool et al., 2011; Vouvoudi, Sideridou, 2012; Reis et al., 2015).

Desta forma, tanto a água endógena, proveniente da câmara pulpar, como a água exógena, proveniente da cavidade bucal na qual a restauração permanecerá imersa, têm papel fundamental na estruturação e no comportamento da interface adesiva *in vivo*. Como a adesão representa o principal mecanismo de união entre material restaurador e substrato dental e ainda se mostra um elo frágil de estabilidade longitudinal, o conhecimento do comportamento dos procedimentos adesivos em ambiente úmido e em dentina afetada por cárie é de extrema importância para a prática clínica atual.

Por isso, este estudo espera contribuir na compreensão dos fatores que promovem a degradação da interface adesiva diante do efeito da água e solventes (que não contenham água em sua composição) e influenciam nos resultados de resistência de união longitudinal em dentina sadia e em dentina afetada (naturalmente e artificialmente) por cárie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para melhor organização e compreensão pelo leitor, os dados bibliográficos sobre adesão foram divididos em três tópicos principais: **dentina**, no qual foram abordados estudos relacionados com adesão à dentina sadia, cariada e artificialmente desmineralizada; **degradação da interface**, com estudos referentes à degradação e envelhecimento da interface adesiva; **análises longitudinais**, em que se abordou estudos referentes às análises da interface adesiva em diferentes tempos.

2.1 Dentina

Para compreender os problemas envolvidos na adesão em dentina, é necessário considerar a complexidade da estrutura e composição do substrato.

A dentina é um tecido mineralizado, formado por cristais de hidroxiapatita em meio à matriz de colágeno. É uma estrutura hidratada, composta por aproximadamente 50% de material inorgânico (cristais de hidroxiapatita), 30% de material orgânico (fibras colágenas) e 20% de água (Linde, Goldberg, 1993; Goldberg et al., 2011). O substrato dentinário apresenta ainda diferentes proporções de dentina peritubular, intertubular e esclerosada, variações na permeabilidade e comunicação com o tecido pulpar. Essas propriedades podem afetar direta ou indiretamente a resistência de união dos materiais adesivos no substrato (Pashley, 1992; Escribano et al., 2001; Özok et al., 2004; Hosaka et al., 2007; Sauro et al., 2007).

Uma característica única da dentina é a presença de uma densa rede de túbulos que proporcionam a comunicação com a cavidade pulpar. Os túbulos dentinários convergem em direção à superfície externa e, como consequência, a densidade e diâmetro tubulares variam em função da profundidade do substrato, sendo maiores na dentina profunda. Estudos mostram ainda, que a adesão varia de acordo com a face dental, onde a dentina oclusal representa um maior desafio em comparação às faces vestibular e proximais, devido à variabilidade no número,

tamanho e orientação dos túbulos (Garberoglio, Brannstrom, 1976; Pashley, 1989; Oilo, Olsson, 1990; Prati, Pashley, 1992; Perdigão, 2010).

Pela teoria hidrodinâmica proposta por Brännstrom na década de 1960, um estímulo aplicado na dentina provoca o deslocamento de fluido dentro dos túbulos (Brännstrom et al., 1967). Esse deslocamento, que ocorre por capilaridade impulsionado pela pressão hidrostática intrapulpar, proveniente da polpa para o meio externo, é responsável pela umidade na superfície dentinária.

Essa característica do substrato dentinário se tornou relevante nas pesquisas *in vitro*, uma vez que a simulação da pressão intrapulpar reproduz as condições de umidade dentinária durante os procedimentos clínicos. De acordo com a literatura, pode haver uma variação da pressão pulpar de 15 a 40 cm de água, dependendo da metodologia empregada e das características dos substratos envolvidos (Pashley, Carvalho, 1997; Escribano et al., 2001; Schmalz et al., 2001; Özok et al., 2004; Hosaka et al., 2007; Sauro et al., 2007; Belli et al., 2010; Silva et al., 2016; Santis et al., 2017). Gerzina e Hume (1995) alertaram que uma pressão intrapulpar acima de 36 cm de água somente deveria ser utilizada para simular uma condição de inflamação pulpar (Gerzina, Hume, 1995). Estudos prévios *in vivo* (Ciucchi et al., 1995; Woolley, Wilson, 2005), referenciam a perfusão dentinária em torno de 1,3 KPa, correspondente à pressão intrapulpar. Ainda, Özok et al. (2004) descreveram a simulação da pressão fisiológica dental humana de 1,47 KPa, com o uso de uma coluna de água de 15 cm (Özok et al., 2004). Diante disso, a literatura preconiza a pressão de 15 cm (Sengun et al., 2003; Özok et al., 2004; Hosaka et al., 2007; Mazzitelli et al., 2008; Belli et al., 2010; de Alexandre et al., 2014; Mohamed et al., 2015; Silva et al., 2016; Santis et al., 2017) a 20 cm (Sauro et al., 2007; Mobarak, 2011; Feitosa et al., 2012; Feitosa et al., 2014; Bacchi et al., 2015; Sartori et al., 2015; Sartori et al., 2016) da coluna de água, a partir da câmara pulpar, para os estudos com simulação da pressão intrapulpar.

Outra característica a se considerar é a composição do fluido dentinário. Os túbulos dentinários são preenchidos por fluido intersticial semelhante ao plasma sanguíneo (Haldi et al., 1961; Haldi, Wynn, 1963), constituído por 95% de água e 5% de proteínas (Perdigão, 2010). Para simular uma pressão pulpar próximas as condições *in vivo*, estudos recentes utilizaram soro fetal bovino por conter 25% de proteínas semelhantes ao fluido dentinário (Goodis et al., 1997; Camps et al., 1998; Jain et al., 2000; Woolley, Wilson, 2005; Gonçalves, 2014). Schaller et al. (1997)

aplicaram uma pressão hidrostática com solução de Ringer (solução isotônica ao plasma sanguíneo) (Schaller et al., 1997). Há, ainda, outros relatos que empregaram a pressão pulpar simulada com água deionizada (Özok et al., 2004; Mazzitelli et al., 2008; Gonçalves, 2014; Silva et al., 2016; Santis et al., 2017), solução salina fisiológica (Prati, Pashley, 1992; Schmalz et al., 2001; Gernhardt et al., 2008) ou água destilada (Escribano et al., 2001; Hosaka et al., 2007; Cardoso et al., 2008; de Alexandre et al., 2014; Bacchi et al., 2015). Tanto a composição como a viscosidade do fluido dentinário na condição *in vivo*, diferem das condições laboratoriais. Contudo, a simulação do ambiente oral com o molhamento da superfície de dentina e a presença da pressão pulpar, tornam-se variáveis críticas durante os procedimentos adesivos, especialmente por se aproximarem das condições *in vivo*.

A presença da pressão intrapulpar nos estudos comparativos com grupos sem simulação da pressão, resulta em redução significativa na resistência de união entre material restaurador e dentina (Sengun et al., 2003; Özok et al., 2004; Moll et al., 2005; Hosaka et al., 2007; Sauro et al., 2007; Cardoso et al., 2008; Gernhardt et al., 2008; de Alexandre et al., 2014; Kim et al., 2014; Silva et al., 2016). A umidade característica do substrato pode interferir fisicamente e quimicamente no processo de adesão e na qualidade da interface adesiva (Pashley, Carvalho, 1997). Por isso, para uma melhor reprodutibilidade das condições *in vivo*, torna-se relevante para os estudos de adesão em dentina a simulação do fluxo de fluido e a presença da umidade superficial.

Um outro aspecto da superfície da dentina que afeta a interação dos materiais com a superfície dentinária é a presença da *smear layer*. A *smear layer* é formada por resíduos orgânicos e inorgânicos derivados dos preparos cavitários, sendo composta, basicamente, por hidroxiapatita e colágeno desnaturado, com espessura inferior a 2 µm (Eick, 1992; Spencer et al., 2010). Nos estudos laboratoriais, a *smear layer* é rotineiramente criada por desgaste nas amostras de dentes humanos sadios com lixas abrasivas de carboneto de silício de granulação 600 (Nakajima et al., 2000; Yoshiyama et al., 2000; Sattabanasuk et al., 2006; Perdigão, 2010), sendo facilmente removida por ácidos durante o procedimento adesivo (Oliveira et al., 2003; Zhou et al., 2016).

A *smear layer* promove uma redução da permeabilidade da dentina em torno de 86% (Pashley et al., 1978; Perdigão, 2010) pelo vedamento dos túbulos dentinários. Duas opções são preconizadas para o tratamento da superfície dentinária

e aumento da resistência de união: a remoção total da *smear layer* pelo condicionamento ácido total ou remoção parcial por meio de monômeros resinosos ácidos (Watanabe et al., 1994; Pashley, Carvalho, 1997; Van Meerbeek et al., 2003).

Na técnica do condicionamento ácido total da dentina *in vivo*, a *smear layer* é removida e a dentina é desmineralizada, promovendo um aumento do volume intrínseco de água de 22% para 70% (Spencer et al., 2012) e, conseqüentemente, o aumento do fluxo de fluido sobre a superfície (Pashley, 1984; Özok et al., 2004; Gernhardt et al., 2008; Perdigão, 2010). Esse aumento no fluxo de fluido interfere na adesão, na medida que dificulta a infiltração dos monômeros adesivos no interior dos túbulos e na rede de colágeno desmineralizado, prejudicando a formação dos *tags* resinosos e da camada híbrida (Escribano et al., 2001; Özok et al., 2004; Hosaka et al., 2007; Sauro et al., 2007; Cardoso et al., 2008; Gernhardt et al., 2008).

A hibridização da dentina é obtida através do condicionamento ácido total ou parcial, que promove a remoção de minerais e exposição das fibrilas de colágeno da matriz dentinária, que são preenchidas em sequência por monômeros adesivos, estabelecendo uma interação entre os polímeros e a matriz colágena (Nakabayashi et al., 1982). A formação da camada híbrida revela-se como o principal mecanismo de retenção dos sistemas adesivos atuais (Eick, 1992; Pashley, Carvalho, 1997; Escribano et al., 2001; Özok et al., 2004; Hosaka et al., 2007; Sauro et al., 2007; Gernhardt et al., 2008; Ferreira et al., 2009; Ghiggi et al., 2010; Marimoto et al., 2012; Spencer et al., 2012). Contudo, por não ser uma estrutura estável, a camada híbrida é ainda considerada o elo mais frágil da união adesivo-dentina (Spencer et al., 2010).

A durabilidade e qualidade da adesão são, atualmente, investigadas na maioria dos estudos sob dentina sadia hígida, o que pode não ser um substrato clinicamente relevante (Erhardt et al., 2008a). Nos ambientes clínicos, o substrato de união adesiva comumente encontrado é a dentina afetada por cárie, apresentando características diferentes da dentina sadia. É importante reconhecer que a composição da dentina não é estática, sendo influenciada pela idade, localização e presença e/ou ausência de doença. Marshall et. al. (1997), afirmaram que os componentes estruturais e as propriedades da dentina, bem como fatores biológicos e clínicos, podem afetar diretamente a união adesiva (Marshall et al., 1997).

A cárie dentária é o desafio patológico mais comum à dentina, tornando-a uma das doenças crônicas mais prevalentes na cavidade oral (Perdigão, 2010; Azevedo et

al., 2011; Nakajima et al., 2011). De acordo com os trabalhos de Fusayama, Terachima, 1972; Fusayama, 1979), a dentina cariada é constituída em duas camadas distintas: a infectada e a afetada por cárie.

A dentina infectada - camada externa - é altamente desmineralizada com as fibrilas do colágeno irreversivelmente desnaturadas e presença de bactérias no interior dos túbulos (Perdigão, 2010; Nakajima et al., 2011; Joves et al., 2014; Pinna et al., 2015). Devido à baixa capacidade de adesão, a dentina infectada é removida durante o preparo cavitário (Tjäderhane, 2015). Por outro lado, a dentina afetada - a camada interna – é um tecido passível de remineralização, não apresenta bactérias, mostra-se parcialmente desmineralizado e sem desnaturação das fibrilas colágenas (Perdigão, 2010; Nakajima et al., 2011; Joves et al., 2014; Pinna et al., 2015), devendo ser preservado durante o tratamento clínico. Por isso, muitos procedimentos restauradores são realizados sobre a dentina afetada por cárie, tornando-o um substrato de relevância clínica nos estudos *in vitro*.

Diferentes métodos são clinicamente utilizados para a remoção da dentina infectada: remoção por meio de brocas do tipo carbide, pelo uso de lasers e curetas; e a detecção realizada pela dor, pela cor, por agentes corantes e dureza tátil (Fusayama, 1988; Itoh et al., 2009; Pugach et al., 2009; Joves et al., 2013, 2014). Pelos estudos *in vitro*, observa-se que a dentina infectada é diferenciada da afetada e removida dependendo da metodologia empregada.

Há estudos que realizam a remoção do tecido infectado com auxílio de curetas, seguida do uso de solução corante à base de propileno-glicol (Pereira et al., 2006; Joves et al., 2013, 2014; Shibata et al., 2016). Outros estudos fazem o acabamento da superfície com lixas abrasivas, análise tátil com sonda exploratória e solução corante (Nakajima et al., 1995, 2000; Yoshiyama et al., 2003; Xuan et al., 2010). Metodologias que diferenciam tecido infectado do afetado por aparelhos de fluorescência, tais como DIAGNOdent (Kavo, Alemanha) (Celiberti et al., 2012; Shibata et al., 2016) ou por agentes químicos (Carisolv gel, Suécia) (Almahdy et al., 2015); ou ainda, somente pelo método visual e pela textura de superfície (Omar et al., 2007; Mohamed et al., 2015). No entanto, não existe um “padrão-ouro” estabelecido a ser seguido, comprometendo a comparação entre os resultados. Alguns estudos mostraram que o método de remoção da cárie não afetaria a união em dentina afetada (Cehreli et al., 2003; Sattabanasuk et al., 2006). Em contrapartida, estudos anteriores

relataram que a resistência de união em dentina afetada pode ser influenciada tanto pelo método de remoção da dentina infectada como pelo sistema adesivo utilizado (Nakajima et al., 2011).

A dentina afetada por cárie sofre modificações químicas, biológicas e físicas durante o desenvolvimento da lesão, dificultando a adesão dos materiais restauradores. Primeiramente, pelo processo dinâmico de “DES-RE”, os túbulos dentinários são obliterados por depósitos minerais (Nakajima et al., 2011; Joves et al., 2014). Estes depósitos são constituídos de fosfato beta-tricálcio, também conhecidos como “*Whitlockite*”, que são menos solúveis que a hidroxiapatita (Daculsi et al., 1987; Duke, Lindemuth, 1991; Perdigão, 2010; Pinna et al., 2015). A presença desses depósitos minerais nos túbulos da matriz intratubular pode reduzir a permeabilidade e interferir na infiltração dos monômeros adesivos durante o procedimento adesivo (Nakajima et al., 1995; Yoshiyama et al., 2002; Ceballos et al., 2003; Wang et al., 2007; Erhardt et al., 2008a, 2008b).

Em contrapartida, o conteúdo mineral da matriz intertubular é perdido durante o processo carioso, e o seu volume é preenchido pela água advinda da câmara pulpar. O baixo conteúdo de fosfato e carbonato, possibilita um condicionamento ácido mais profundo neste substrato (Nakajima et al., 1995; Erhardt et al., 2008c), resultando em maior quantidade de água intrínseca na matriz de colágeno exposta (Ito et al., 2005b; Tjäderhane, 2015). Consequentemente, o conteúdo de água pós-condicionamento na dentina afetada aumenta de 14% a 53% em comparação com a dentina sadia, com somente 10% (Ito et al., 2005b; Pinna et al., 2015). Essa quantidade de água advinda da matriz desmineralizada interfere na adequada infiltração dos monômeros adesivos, levando à separação de fases do adesivo (Spencer et al., 2010) e prejudicando a completa penetração do sistema adesivo na matriz exposta (Haj-Ali et al., 2006; Erhardt et al., 2008c; Spencer et al., 2010). Pela análise em espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), um estudo prévio mostrou que o grau de conversão do sistema adesivo na matriz desmineralizada da dentina afetada foi menor que nas amostras de dentina sadia (Spencer et al., 2005). Por isso, o segundo fator característico que acomete a estrutura da dentina afetada é a permeabilidade maior que a dentina sadia (Wang et al., 2007; Shibata et al., 2016).

Além disso, a terceira característica da dentina afetada é a perda da qualidade de suas propriedades mecânicas. Pela perda de minerais da matriz intertubular, a

resistência de união, a microdureza e o módulo de elasticidade da dentina afetada apresentam médias inferiores à dentina sadia (Nakajima et al., 1995; Ceballos et al., 2003; Yoshiyama et al., 2003; Pereira et al., 2006; Erhardt et al., 2008b, 2008c; Joves et al., 2013, 2014; Rocha et al., 2014; Pinna et al., 2015; Shibata et al., 2016).

Essas modificações do substrato afetado por cárie levam à formação de uma camada híbrida diferenciada e com qualidade inferior em relação à dentina sadia. Fusayama relata que a dentina afetada é mais porosa e hipomineralizada, favorecendo uma zona desmineralizada mais extensa após o condicionamento ácido (Fusayama, 1991). Estudos prévios apresentaram, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), uma camada híbrida em dentina afetada, geralmente mais espessa e mais porosa (Yoshiyama et al., 2002) tanto para adesivo de condicionamento total como para autocondicionante. Acrescenta-se ainda, que para adesivo autocondicionante, observa-se em torno de 6-8 μm de espessura, diferentemente de 1 μm de espessura observada em dentina sadia (Yoshiyama et al., 2003).

As diferentes intensidades de lesões de cárie levam a uma grande variabilidade na estrutura da dentina afetada, dificultando sua utilização como substrato padronizado para as pesquisas laboratoriais. Diante das características irregulares da dentina naturalmente cariada, estudos recentes propuseram o desenvolvimento de metodologias para indução de lesões de cárie *in vitro*, a fim de simular o tecido afetado de forma mais padronizada.

A literatura apresenta diferentes métodos, microbiológicos e químicos, para criar *in vitro* as lesões de cárie em dentina. O método microbiológico simula o processo da cárie por culturas bacterianas, como *Streptococcus mutans*, de maneira que o produto ácido da metabolização do micro-organismo desmineralize a estrutura dentária (Marquezan et al., 2009; Azevedo et al., 2011; Steiner-Oliveira et al., 2011; Carvalho FG et al., 2013; de Azevedo et al., 2014). Segundo alguns autores, este método reproduz morfollogicamente algumas características semelhantes à lesão natural de cárie, como a cor e a presença de duas camadas distintas (Clarkson et al., 1984; Deng DM, ten Cate, 2004; Azevedo et al., 2011; de Azevedo et al., 2014), acreditando-se ser o modelo mais próximo às condições *in vivo* (Gilmour et al., 1990; Azevedo et al., 2011). Por outro lado, embora o método microbiológico tenha algumas vantagens para os estudos morfológicos, seus valores de dureza são mais baixos

devido ao excessivo amolecimento da superfície da dentina (Marquezan et al., 2009). Ainda, a reprodução microbiológica requer um período de tempo maior, pois a desmineralização progride lentamente (Joves et al., 2013); como também exige um maior custo pela especificidade dos equipamentos (Azevedo et al., 2011; Steiner-Oliveira et al., 2011).

Nos métodos químicos, incluem-se as técnicas do gel acidificado e ciclagem de pH. Relatos com o uso do gel acidificado mostram lesões histologicamente semelhantes às naturalmente desenvolvidas em esmalte e dentina radicular (Silverstone, 1968; McIntyre et al., 2000). Contudo, esse método tem sido criticado por ser estritamente um modelo de desmineralização, fornecendo lesões com extensão de desmineralização não significativas (Marquezan et al., 2009; Moron et al., 2013). Dentre os métodos químicos, a ciclagem de pH mostra-se mais efetiva que o gel acidificado, pois produz uma camada mais espessa de desmineralização.

A ciclagem de pH consiste em um modelo dinâmico, realizado em ausência de micro-organismos, em que as amostras são imersas em soluções de desmineralização e remineralização. Marquezan et al. (2009) verificaram que o ciclo de pH promove a formação de uma dentina artificialmente afetada com desmineralização da superfície e valores de dureza semelhantes à naturalmente afetada. Contudo, este estudo foi realizado em dentes decíduos, os quais podem apresentar diferenças químicas e estruturais em relação aos dentes permanentes. Por isso, Lenzi et al. em 2015, compararam essa mesma metodologia entre dentes decíduos e permanentes, e concluíram que a perda mineral da dentina artificialmente criada foi similar à dentina naturalmente afetada, independente do tipo de dente (Lenzi et al., 2015).

Em outros estudos, Erhardt et al. obtiveram a dentina artificialmente afetada por 8 ciclos de desmineralização e remineralização (Erhardt et al., 2008b, 2014). Segundo os autores, a dureza foi menor que o substrato sadio e, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), observaram ainda a obliteração dos túbulos dentinários por minerais que dificultaram a formação dos *tags* resinosos quando comparada à estrutura sadia (Erhardt et al., 2008b). Mesmo que os estudos *in vitro* de ciclagem de pH se mostrem capazes de simular as mudanças químicas pela desmineralização da superfície da dentina, os modelos não foram capazes de

reproduzir as respostas biológicas (White et al., 1992; Marquezan et al., 2009; Joves et al., 2013, 2014) em dentina desmineralizada artificial.

As soluções DES-RE sofrem variações nas composições e tempo de imersão dependendo do estudo, dificultando a comparação entre os resultados. A principal vantagem na utilização desse método é a possibilidade de formação rápida e confiável de lesões cariosas (Perdigão et al., 1994; Erhardt et al., 2008b; Lenzi et al., 2015); proporcionando uma superfície padronizada para análises das propriedades mecânicas (Haj-Ali et al., 2006). Apesar das diferenças estruturais entre dentina naturalmente e artificialmente afetada, estudos prévios não apresentaram diferenças significativas nos valores de resistência adesiva quando comparadas entre si (Erhardt et al., 2008b, 2008c; Joves et al., 2013; Rocha et al., 2014). Ambos substratos mostraram resultados de resistência adesiva inferiores somente quando comparados à dentina sadia.

Portanto, conforme o trabalho de Marquezan et al. (2009), para simular a dentina afetada após a remoção de cárie, a ciclagem de pH é mais apropriada que os demais métodos. Por outro lado, para simular a lesão cariosa com uma camada de dentina infectada, o método microbiológico parece mais indicado, apesar das lesões serem mais amolecidas que as naturalmente cariadas. Assim, a seleção do método para produção de uma dentina artificialmente afetada dependerá da proposta do estudo.

2.2 Degradação da interface

Com o aprimoramento dos materiais restauradores estéticos, os sistemas adesivos tornaram-se fundamentais nas aplicações clínicas, possibilitando a união entre material restaurador e os tecidos dentais. Contudo, a longevidade e manutenção da adesão continuam a ser um desafio à comunidade científica, uma vez que as restaurações adesivas são continuamente expostas ao meio bucal. Torna-se importante ressaltar que diante da cavidade oral, os materiais são rotineiramente submetidos aos estresses mecânicos derivados das cargas mastigatórias e oclusais, aos estresses térmicos, às enzimas e, continuamente, aos agentes químicos, os quais

afetam a interface adesiva, comprometendo a integridade da restauração (Nakajima et al., 2011).

Em longo prazo, os valores de resistência de união à dentina sofrem redução significativa e a interface adesiva se torna passível de degradação. A perda da resistência de união entre dente e restauração, pode ser resultado de intemperes durante o procedimento adesivo e formação da camada híbrida (intrínseca) e/ou da degradação da interface adesiva exposta às condições da cavidade oral (extrínseca).

Atualmente, o principal fator de degradação na união adesivo-dentina é a presença de água. A água é necessária para evitar o colapso da rede de colágeno desmineralizado, auxiliando na difusão dos monômeros hidrofílicos durante o procedimento adesivo. Entretanto, a hidrólise é considerada razão primária para a degradação adesiva na camada híbrida, contribuindo para a redução da resistência de união ao longo do tempo (Carrilho et al., 2005; Nakajima et al., 2011; Mazzoni et al., 2015; Pinna et al., 2015; Frassetto et al., 2016). A adesão à dentina pode sofrer dois mecanismos de degradação hidrolítica nos componentes da camada híbrida: degradação do sistema adesivo e degradação das fibrilas colágenas (Tjäderhane, 2015; Carvalho RM, Manso, 2016).

Estudos *in vitro* e *in vivo* relataram diferentes fatores que interferem na longevidade da união adesiva pela ação da umidade sobre o sistema adesivo, como: a absorção de água e hidrólise do adesivo não-polimerizado, inadequada conversão monômero/polímero e presença de solventes residuais pela evaporação incompleta (Pashley, Carvalho, 1997; Spencer et al., 2010, 2012; Sartori et al., 2015). As consequências de uma incompleta polimerização dos monômeros adesivos infiltrados e a presença de monômeros residuais podem afetar a estabilidade químico-mecânica da camada híbrida (Eliades et al., 2001; Wang et al., 2007) e reduzir a durabilidade da interface (Loguercio et al., 2009; Tjäderhane et al., 2013).

Como mencionado no tópico anterior, a permeabilidade dentinária aumenta consideravelmente após o condicionamento ácido, e o fluxo de fluido favorece a constante umidade na superfície durante o procedimento adesivo. O molhamento do substrato dentinário pode afetar a estrutura do sistema adesivo, promovendo a separação de fases do adesivo (hidrofílicos e hidrofóbicos), diluindo e/ou impedindo a polimerização dos monômeros resinosos, levando à infiltração irregular do adesivo na interface (Spencer, Wang, 2002; Sartori et al., 2015; Tjäderhane, 2015).

Paralelamente, a infiltração do sistema adesivo pode não preencher toda a região de dentina desmineralizada. Esta diferença entre a desmineralização e infiltração dos monômeros adesivos resulta na formação da camada híbrida com zonas de colágenos expostos, sendo denominada zona de fragilidade (Van Meerbeek et al., 2010; Reis et al., 2013; Frassetto et al., 2016). Pashley et al. (2004) demonstraram que a degradação do colágeno exposto, após condicionamento ácido e incompleta infiltração dos monômeros adesivos pode ser promovida pela ação das enzimas metaloproteinases (MMPs) (Pashley et al., 2004). A ação das enzimas endógenas (endopeptidases) e degradação proteolítica das fibrilas de colágeno reduz a integridade estrutural da interface adesiva a longo prazo (Pashley et al., 2004; Kostoryz et al., 2009; Park et al., 2010; Mobarak, 2011; Sartori et al., 2015).

A lise estrutural das fibrilas do colágeno expostas por falha durante o procedimento na formação da camada híbrida representa, como já mencionado, outra razão para a degradação da interface adesiva (Pashley, 1991). Acredita-se que a degradação do colágeno é resultado da ação de várias enzimas endógenas, denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs) e enzimas catepsinas de cisteína, presentes na matriz dentinária.

As MMPs são enzimas cálcio e zinco-dependentes, produzidas pelos odontoblastos durante a secreção da matriz dentinária (Palosaari et al., 2003; Reis et al., 2013; Mazzoni et al., 2015; Tjäderhane, 2015). O papel fisiológico das MMPs na dentina ainda não está totalmente esclarecido na literatura, mas os estudos sugerem que estas enzimas auxiliam na formação da dentina peritubular e da dentina terciária durante o processo de cárie, o que regularia as reações defensivas do complexo dentino-pulpar (Tjäderhane et al., 2013, 2015).

Além disso, as enzimas MMPs também requerem água para hidrolisar as ligações peptídicas no colágeno exposto (Pashley et al., 2004) e necessitam de ambiente ácido para serem ativadas (Reis et al., 2013; Tjäderhane et al., 2013, 2015; Mazzoni et al., 2015; Pinna et al., 2015). Desta forma, as MMPs podem ser ativadas tanto pelas propriedades acidícas dos sistemas adesivos (Hebling et al., 2005; Pinna et al., 2015) quanto pela metabolização bacteriana durante o processo da cárie.

Na dentina sadia, há relatos sobre a presença das enzimas catepsinas de cisteínas B e K; e das enzimas 2-MMP e 9-MMP (gelatinases), 3-MMP (estromelisina) e 8-MMP (colagenases) (Tjäderhane et al., 2013, 2015; Mazzoni et al., 2015). Ainda, o

fluido dentinário apresenta-se como outra fonte importante de MMPs, tanto para dentina sadia como para dentina cariada, contendo a 20-MMP, derivada da intensa atividade gelatinolítica no interior dos túbulos (Sulkala et al., 2002; Mazzoni et al., 2012, 2015).

A dentina cariada foi relatada contendo formas latentes e ativas de 2-MMP, 9-MMP, 8-MMP e 3-MMP (Mazzoni et al., 2015; Tjäderhane, 2015). As catepsinas de cisteínas aumentam significativamente sua atividade em dentina cariada conforme a profundidade da lesão (Nascimento et al., 2011; Vidal et al., 2014). Os estudos de Tersariol et al. (2010) e Nascimento et al. (2011) mostraram significativa correlação da atividade de MMPs (2-MMP e 9-MMP) e catepsinas (K e B) entre a dentina sadia e cariada (Tersariol et al., 2010; Nascimento et al., 2011), sendo a atividade em lesão cariosa cerca de 10 vezes maior que no substrato sadio (Vidal et al., 2014; Frassetto et al., 2016). Essa intensa atividade enzimática em dentina afetada pode induzir à degradação da interface de forma mais acelerada quando comparada à dentina sadia (Joves et al., 2013).

Em ambiente oral, pode-se afirmar que a saliva, alimentos, bebidas e a interação entre estes, também podem degradar e envelhecer a interface das restaurações adesivas (Sideridou et al., 2007; Marghalani, Watts, 2013). Tais condições intra-orais dificultam a identificação dos fatores específicos relacionados à degradação ao longo do tempo. Diante disso, modelos *in vitro* de envelhecimento artificial foram estabelecidos em estudos anteriores a fim de esclarecer o comportamento e a duração das restaurações adesivas. Um dos modelos mais empregados nos estudos longitudinais de resistência de união é a imersão em líquidos simuladores de alimentos (Lee et al., 1995; Vicente et al., 2012; Vouvoudi, Sideridou, 2012; Deng D et al., 2014; Sideridou et al., 2015).

Estes líquidos são comumente solventes ou soluções recomendadas pela *Food and Drug Administration* (FDA). Alguns estão presentes na cavidade bucal (água, saliva) e outros presentes em agentes externos (água, bebidas gaseificadas, bebidas alcoólicas), com diferentes ingredientes, pH, viscosidade (Vouvoudi, Sideridou, 2012). Os mais utilizados pela literatura são: água para simular o ambiente oral proporcionado pela saliva; heptano simulando óleos vegetais, manteiga e carnes; azeite ou óleo mineral presente em alimentos gordurosos; ácido acético, ácido cítrico e ácido láctico simulando os alimentos ácidos, frutas e doces; metiletilcetona presente

em pequenas quantidades em frutas e vegetais; solução aquosa de etanol e o etanol absoluto simulando bebidas, incluindo bebidas alcoólicas, doces, legumes e frutas (Lee et al., 1995; Yap et al., 2001; Carrilho et al., 2005; Akova et al., 2006; Zhang, Xu, 2008; Vicente et al., 2012; Vouvoudi, Sideridou, 2012; Marghalani, Watts, 2013; Sideridou et al., 2015; Silva et al., 2017).

O efeito sobre as propriedades dos materiais varia com os diferentes meios de imersão e tempo de armazenamento (Zhang, Xu, 2008). Segundo os trabalhos de Marghalani e Watts (2013), a ação de determinado solvente dependerá da semelhança ou diferença de polaridade entre as substâncias, ou seja, polaridades semelhantes indica solubilidade recíproca, mas polaridades diferentes dificulta a solubilidade (Van Landuyt et al., 2011; Marghalani, Watts, 2013).

A água é um solvente polar, bem conhecido pelas interações com os componentes hidrofílicos dos sistemas adesivos e materiais restauradores na adesão (Wang, Spencer, 2003; Spencer et al., 2010; Marghalani, Watts, 2013; Sartori et al., 2015). Por isso, o armazenamento em água é o modelo de degradação artificial frequentemente utilizado para análises longitudinais sobre a interface adesivo-dentina, sendo particularmente um modelo simples e de baixo custo (De Munck et al., 2005; Van Meerbeek et al., 2010; Carvalho FG et al., 2013; Deng D et al., 2014).

A importância da água é evidenciada pelos estudos que mostram redução dos valores de resistência adesiva ao longo do tempo quando amostras são armazenadas em meio aquoso (Pashley et al., 2004; Carrilho et al., 2005; Erhardt et al., 2008a; Carvalho FG et al., 2013; Pinna et al., 2015). A sorção de água pode acelerar a degradação dos materiais resinosos e prejudicar suas propriedades físico-mecânicas, como resistência à tração, à flexão e ao desgaste (Pashley, Carvalho, 1997; Zhang, Xu, 2008).

Além do uso da água nas pesquisas longitudinais, destacam-se o uso de solventes orgânicos, como etanol. Solventes orgânicos alcoólicos promovem maior liberação dos componentes resinosos (como HEMA e BisGMA), quando comparados à água. A exposição da interface ao etanol resulta na perda adesiva possivelmente por dissolução dos componentes resinosos (Lee et al., 1996). Em 2011, Van Landuyt et al. avaliaram o etanol como potente solvente dos monômeros resinosos, sendo capaz de penetrar entre os polímeros resinosos, favorecendo maior sorção de água, dilatação e plasticização da matriz resinosa (Van Landuyt et al., 2011).

Consequentemente, este fato resulta em maior eluição dos monômeros adesivos e redução da resistência à flexão (Lee et al., 1995; Zhang, Xu, 2008; Polydorou et al., 2009).

Se as propriedades mecânicas dos sistemas adesivos forem reduzidas na interface devido aos fluidos orais e sorção de água, a resistência de união também diminuirá (Pashley, Carvalho, 1997; Yasuda et al., 2008). Vários autores observaram que as propriedades mecânicas dos materiais restauradores são afetadas pelo envelhecimento com exposição aos líquidos simuladores de alimentos (McKinney, Wu, 1985; De Munck et al., 2005; Akova et al., 2006; Vicente et al., 2012), mostrando efeito mais significativo quando imersos em etanol (Lee et al., 1996; Zhang, Xu, 2008; Vouvoudi, Sideridou, 2012; Holleben, 2013).

A utilização desses líquidos simuladores de alimentos permite um rápido desgaste dos materiais em curto período de tempo (Vouvoudi, Sideridou, 2012). No entanto, é importante ressaltar que cada modelo de envelhecimento *in vitro* tem suas próprias características e mecanismos de ação, conforme cada material, teste e tempo de avaliação.

2.3 Análises longitudinais

Para avaliar a eficácia da união adesiva e o sucesso clínico do procedimento restaurador, é importante considerar não apenas o comportamento imediato, mas também a durabilidade a longo prazo diante das condições orais (Toledano et al., 2007; Skovron et al., 2010). Frequentemente, os estudos avaliam a qualidade da restauração adesiva por testes de resistência adesiva por cisalhamento ou por microtração (Carrilho et al., 2005; Toledano et al., 2007; Abdalla, Feilzer, 2008; Erhardt et al., 2008c, 2014 Taniguchi et al., 2009; Armstrong S et al., 2010; Xuan et al., 2010; Deng D et al., 2014; Feitosa et al., 2014; Marchesi et al., 2014; Reis et al., 2015; Sartori et al., 2015; Shibata et al., 2016), os quais aplicam uma carga até ocorrer a falha. Assim, quanto maior a adesão entre dente e material, melhor será a resistência nas funções orais.

O desenvolvimento do ensaio de resistência adesiva à microtração por Sano et al. (1994) permitiu a análise em espécimes com pequena área de superfície (cerca de 1 mm²), possibilitando a obtenção de múltiplos espécimes a partir de um único dente e melhor distribuição da tensão na interface (Sano et al., 1994). Isto tornou o teste de microtração o mais utilizado nos estudos de adesão, sendo vantajoso, dada a escassez de dentes devido ao rigor ético atual; e confiável por estar correlacionado com a prática clínica (Loguercio et al., 2005; Van Meerbeek et al., 2010; De Munck et al., 2013; Fu et al., 2013; Armstrong S et al., 2017).

Além de medir a resistência adesiva imediata, ou seja, após 24 h do procedimento restaurador; 35% dos modelos de delineamento dos estudos relacionados à adesão, estão relacionados à degradação artificial e acelerada das amostras (Van Meerbeek et al., 2010), a fim de prever a eficácia clínica do sistema adesivo. De fato, a longevidade das restaurações adesivas está em grande parte relacionada à degradação dos sistemas adesivos.

Um método bem validado para investigar *in vitro* a durabilidade da adesão a longo prazo é o armazenamento das amostras em solventes, tais como água e/ou etanol (Van Meerbeek et al., 2010; Takamizawa et al., 2015). A literatura apresenta duas formas de armazenamento para determinar a longevidade adesiva: técnica de armazenagem indireta e armazenagem direta.

A técnica do armazenamento indireto consiste em realizar os procedimentos adesivo e restaurador, armazená-los por determinado período de tempo em solvente à 37°C para, posteriormente, seccioná-los em palitos e submetê-los ao ensaio de microtração (Loguercio et al., 2005; Toledano et al., 2007; Abdalla, Feilzer, 2008). Por outro lado, o armazenamento direto consiste em realizar os procedimentos adesivo e restaurador, seccioná-los em palitos, armazená-los em solvente à 37°C por determinado período de tempo para, posteriormente, submetê-los ao ensaio de microtração (Hashimoto et al., 2002; Loguercio et al., 2005; Toledano et al., 2007).

De acordo com diversos autores, o armazenamento direto reduz significativamente a resistência adesiva e aumenta a nanoinfiltração, quando comparado ao armazenamento indireto (Hashimoto et al., 2002, 2003; Abdalla, Feilzer, 2008; Marchesi et al., 2014). Devido à redução da área transversal da amostra, a degradação ocorre de forma mais acelerada, pois a distância e o tempo de

difusão do solvente através das partes expostas da interface da restauração são reduzidos, em comparação às superfícies maiores (Hashimoto et al., 2002).

Além disso, pela variabilidade anatômica da dentina, o armazenamento direto possibilita melhor controle e comparação dos resultados. Isto significa que para o mesmo dente, os palitos poderão ser aleatoriamente divididos em duas metades, os quais metade poderão ser avaliados imediatamente e outra metade após o período de armazenamento, reduzindo o número necessário de dentes individuais para as análises.

Contudo, não há um consenso sobre o período mínimo em que os espécimes restaurados precisam ser armazenados para observar a degradação da interface. Os espécimes são normalmente armazenados em solventes por 7 dias a 10 dias, algumas semanas, 1 a 12 meses e até 4-5 anos (Toledano et al., 2007; Abdalla, Feilzer, 2008; de Moraes et al., 2008; Erhardt et al., 2008a, 2008b; Skovron et al., 2010; Mobarak, 2011; De Munck et al., 2013; Marghalani, Watts, 2013; Leme et al., 2015; Sideridou et al., 2015), dependendo do estudo.

Kostoryz et al. observaram que degradação de sistemas adesivos à base de HEMA e BisGMA foi mais acelerada nos primeiros 8 dias de armazenamento (Kostoryz et al., 2009). Também há relatos que o tempo crítico de degradação após armazenamento em etanol ocorre entre os primeiros 7 dias (Lee et al., 1995; Akova et al., 2006). Ainda, segundo os trabalhos de Reis et al., uma degradação mais acelerada da interface adesiva foi observada após uma semana de imersão em ácido acético e etanol; e os valores de resistência adesiva sofreram redução significativa após um mês e seis meses de armazenamento (Reis et al., 2015).

Durante 4 anos de armazenamento em água, De Munck et al. (2003) observaram o envelhecimento da interface dentina-resina com o desaparecimento quase completo da camada híbrida formada (De Munck et al., 2003). Há relatos que em cerca de 3 meses, todas as classes de sistemas adesivos exibiam evidências mecânicas e morfológicas de degradação, semelhantes ao envelhecimento *in vivo* (Kato, Nakabayashi, 1998; Shono et al., 1999; Skovron et al., 2010; Van Meerbeek et al., 2010).

Os principais fatores envolvidos no processo da degradação derivado da hidrólise dos componentes da interface, ocorre devido à absorção do solvente e subsequente eluição dos produtos da degradação. Assim, o período de imersão em

solventes, bem como o solvente utilizado podem ser variáveis determinantes no processo de degradação.

A frequência da troca do solvente é bem questionada nos estudos prévios, pois alguns autores relataram que quando não há troca do meio de armazenagem, ocorre um equilíbrio de transferência de íons de cálcio entre dentina e solução de armazenamento, o que reduziria o processo de degradação longitudinal (Kitasako et al., 2000). Trocas diárias possibilitaram um método de envelhecimento para degradação da interface adesiva em um curto período de tempo; contudo, nenhuma diferença significativa foi observada entre trocas semanais e mensais nos estudos de Skovron et al. (2010).

Com isso, observa-se que outros fatores relacionados aos protocolos de armazenamento são importantes nos estudos de longevidade adesiva. Diante das diferentes formas de envelhecimento *in vitro*, e dependendo do período e das formas de armazenamento das amostras, a literatura mostra que é possível uma avaliação longitudinal de resistência adesiva à microtração imediatos, e a partir de 7 dias a anos de avaliação, dependendo da proposta do estudo.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a resistência de união à microtração de sistema adesivo universal (etch-and-rinse) em dentina sadia, afetada natural e artificialmente por cárie, na presença de pressão pulpar simulada (20 cm H₂O) e após armazenamento em solventes (água, etanol e metiletilcetona) por 24 h e 30 dias.

Análises complementares foram feitas para avaliar os diferentes substratos (espectroscopia por FTIR e microdureza Knoop), as características das interfaces adesivas (MEV) e a degradação do adesivo (resistência flexural, módulo de elasticidade, sorção e solubilidade).

As hipóteses de nulidade testadas foram:

H₀A – o tipo de substrato dentinário não resulta em influência significativa nos valores de resistência de união e microdureza de superfície;

H₀B – os diferentes tipos de solventes utilizados para envelhecimento, não apresentam diferenças significativas entre si, quando analisada a influência dos mesmos na resistência de união à dentina;

H₀C – os diferentes tempos de armazenamento não resultam em influência significativa sobre os valores de resistência de união à dentina;

H₀D – os diferentes solventes não resultam em influência significativa sobre as propriedades físico-mecânicas do sistema adesivo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética

Este estudo foi submetido ao CEP/CONEP sob o número CAAE 44831415.8.0000.0077 e aprovado pelo parecer número 1.079.299 (ANEXO A).

Foram utilizados molares humanos hígidos e cariados, extraídos, por indicações terapêuticas, junto às clínicas e consultórios particulares. Os cirurgiões-dentistas foram informados sobre o uso dos dentes para fins de pesquisa científica em Odontologia, e os de acordo assinaram o Termo de Doação de Material Biológico (ANEXO B).

4.2 Delineamento experimental

Este experimento seguiu um esquema fatorial do tipo 3 x 3 x 2. As variáveis experimentais foram: tipo de substrato, solventes e tempo. O primeiro fator, relativo ao tipo de substrato, apresenta três categorias: dentina sadia, dentina artificialmente afetada e dentina naturalmente afetada. O segundo fator, relativo aos solventes, apresentando três categorias: água deionizada, etanol a 99% e metiletilcetona (MEK). O terceiro fator, relativo ao tempo de avaliação, apresentando duas categorias: 24 h e 30 dias.

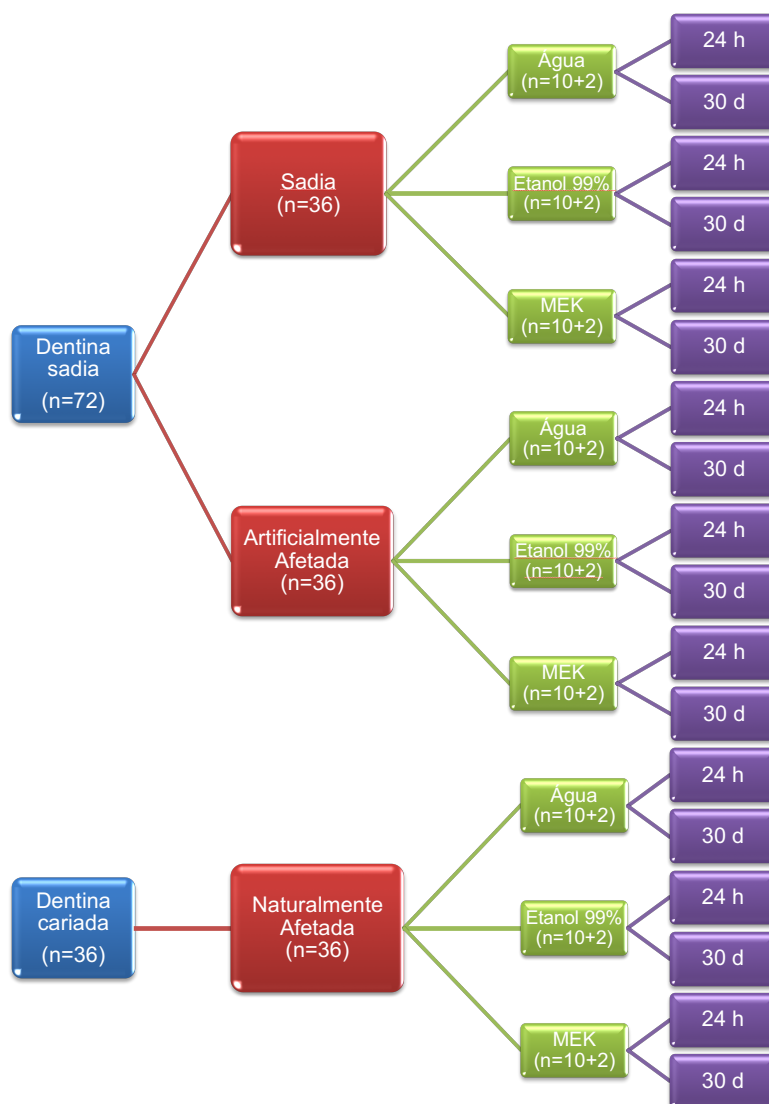
A variável resposta foi o valor, em MPa, obtido no teste de resistência adesiva à microtração. A unidade experimental foi a dentina do molar humano (n=10), sendo que, para um mesmo dente, metade dos 'palitos' obtidos foram avaliados após 24 h e, outra metade, após 30 dias. As amostras foram aleatoriamente designadas às condições experimentais.

4.3 Divisão dos grupos

Três tipos de dentina – sadia, artificialmente afetada e naturalmente afetada (n=108) – foram divididas aleatoriamente em 3 subgrupos (n=12), conforme o solvente para armazenamento: água deionizada, etanol a 99% e metiletilcetona (MEK) (Marghalani, Watts, 2013).

Cada amostra foi avaliada em 2 períodos: após 24 h e 30 dias (Figura 1). Duas amostras de cada grupo foram utilizadas para análise em microscopia eletrônica de varredura.

Figura 1 – Distribuição das amostras, de acordo com as condições experimentais



Fonte: Elaborada pelo autor.

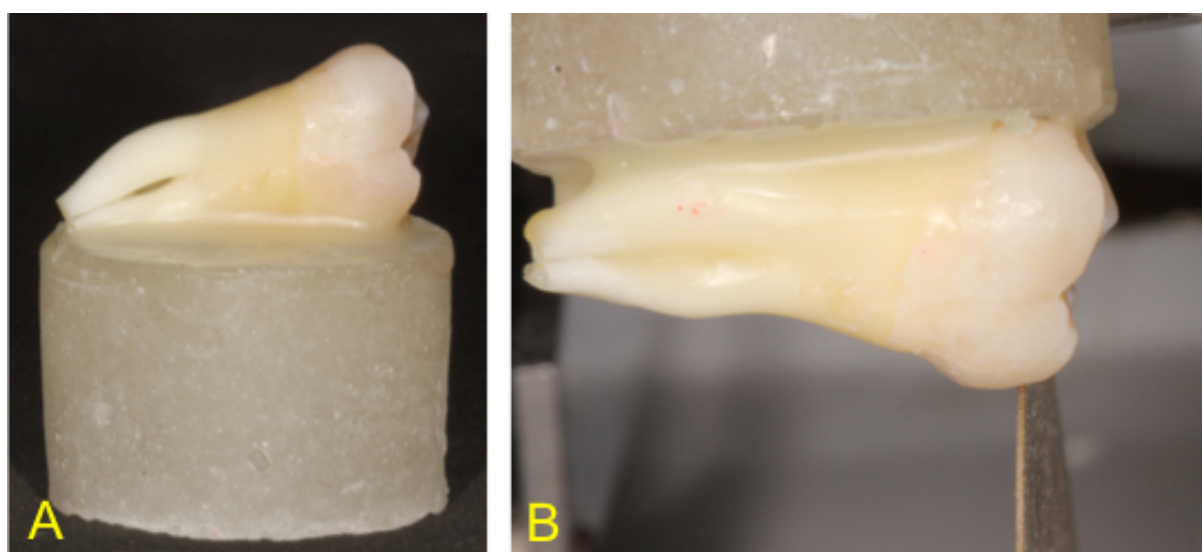
4.4 Preparo das amostras

4.4.1 Dentina sadia

Foram adquiridos 72 molares humanos hígidos, limpos com auxílio de curetas periodontais de Gracey e armazenados em água deionizada a 4°C, por um período máximo de seis meses (Cardoso et al., 2008; Ghiggi et al., 2010).

Suportes de resina acrílica incolor quimicamente ativada (Jet, Artigos Odontológicos Clássicos, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil) com 2,5 cm de diâmetro e 2,0 cm de altura foram confeccionados com o auxílio de molde de silicone para uso odontológico (Rhodorsil, Artigos Odontológicos Clássico, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil). Fixou-se cada dente neste suporte acrílico por meio de cera pegajosa e o conjunto foi posicionado em uma máquina para corte (Labcut 1010, Extec Technologies Inc., Enfield, CT, EUA) em baixa rotação sob refrigeração de água, com disco diamantado posicionado paralelo à junção esmalte-cimento. (Figura 2a, 2b).

Figura 2 – Preparo para corte das amostras de dentina

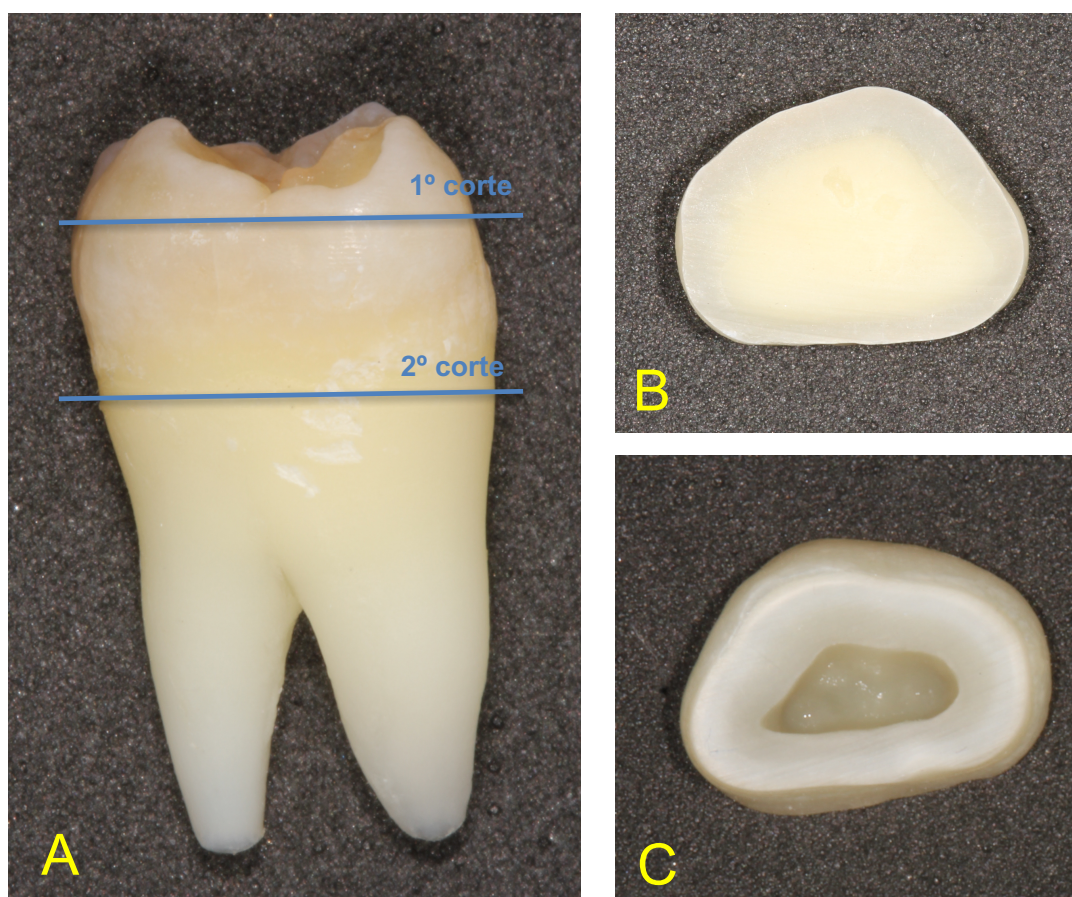


Legenda: a) dente fixado no suporte de resina acrílica com cera pegajosa; b) suporte posicionado na máquina de corte com o disco diamantado paralelo à superfície oclusal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Realizaram-se duas secções horizontais: a primeira paralela à superfície oclusal, para exposição da dentina; e a segunda a 1 mm abaixo da junção amelocementária, para separação da coroa da porção radicular, a qual foi desprezada. (Figura 3a, 3b, 3c).

Figura 3 – Recorte das amostras

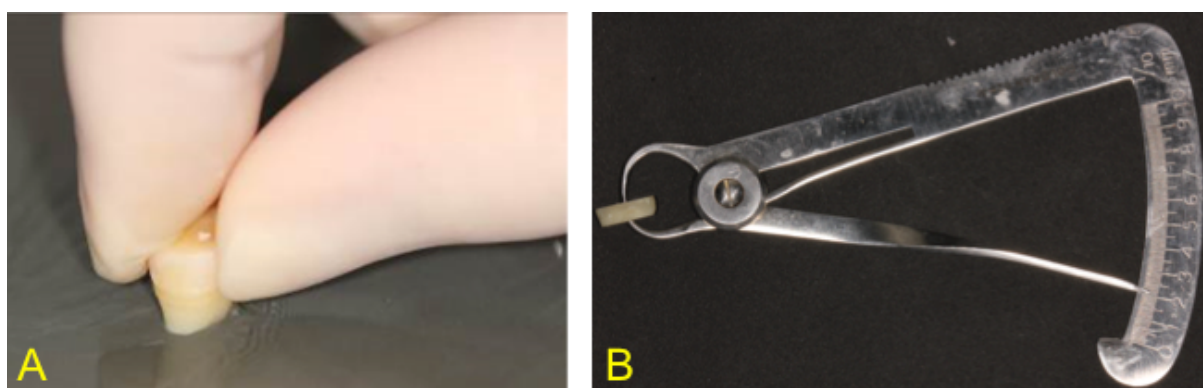


Legenda: a) representação dos cortes; b) secção do esmalte oclusal e exposição da dentina; c) secção das raízes e exposição da câmara pulpar.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Em seguida, a amostra foi levada a uma politriz circular (PoliPan-2, Pantec, São Bernardo do Campo, SP, Brasil), para desgaste do esmalte remanescente sobre a dentina oclusal, e desgaste de remanescente radicular. O desgaste foi realizado com discos de lixas de carboneto de silício (Extec Corp., Enfield, CT, EUA) de granulação 600, a 300 rpm, sob refrigeração com água. O remanescente dentinário

foi padronizado em $2 \pm 0,1$ mm de espessura, a partir do corno pulpar mais alto (Belli et al., 2010; Silva et al., 2016), medido através de um espessímetro (Otto-Arminger & Cia Ltda., RS, Brasil). (Figura 4a, 4b).

Figura 4 – Padronização da superfície de dentina



Legenda: a) desgaste em lixa d'água sob refrigeração com água; b) padronização da espessura de dentina em 2 mm a partir do espessímetro.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os tecidos pulparem remanescentes foram removidos com auxílio de curetas de dentina. As câmaras pulparem foram cuidadosamente lavadas com água deionizada até a completa remoção dos resíduos teciduais, e secos com jatos descontínuos de ar, a fim de se evitar o ressecamento da dentina exposta.

Após a padronização, as amostras foram armazenadas em solução salina fisiológica (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil), a 4°C, até o momento da continuidade do estudo.

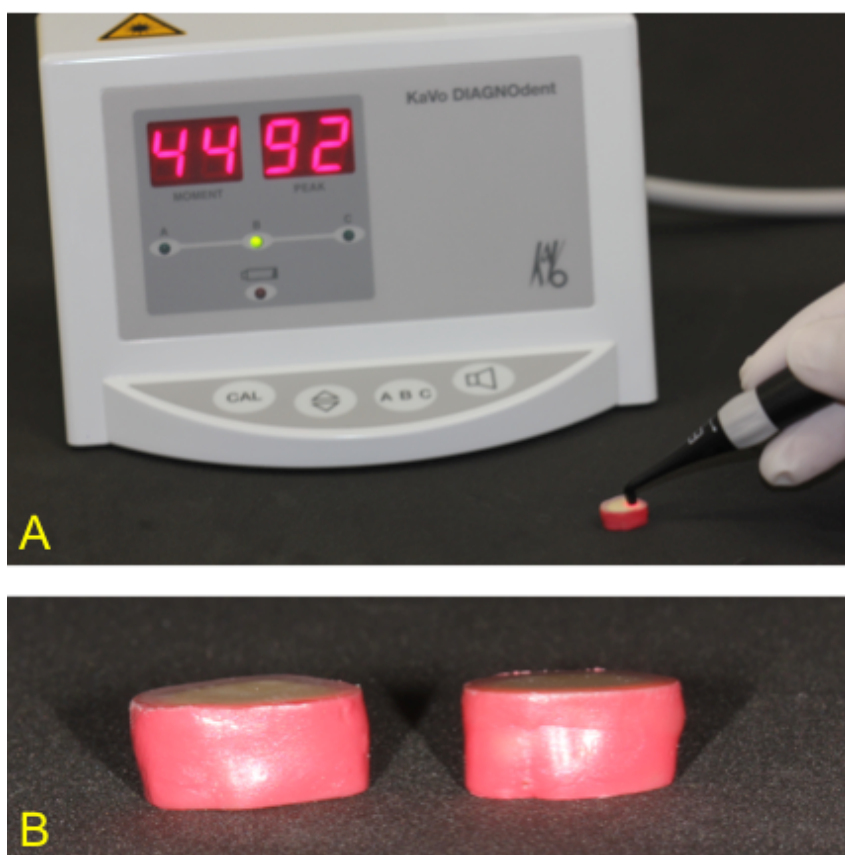
4.4.2 Dentina artificialmente afetada

Trinta e seis amostras de dentina sadia foram submetidas à formação de dentina afetada por cárie. Primeiramente, as faces oclusais dos remanescentes dentais foram avaliadas por fluorescência a laser utilizando o aparelho DIAGNOdent

Pen 2190 (Kavo, Biberach, Alemanha) a fim de verificar a ausência de qualquer processo de desmineralização. O aparelho foi calibrado segundo as recomendações do fabricante.

A superfície oclusal da amostra foi seca com auxílio de seringa tríplice por 5 s, e a ponta da sonda do aparelho foi posicionada perpendicularmente sobre a região para a realização de três leituras, confirmando a ausência de desmineralização pelos valores de sensibilidade do aparelho. Em seguida, as amostras foram impermeabilizadas com duas camadas de verniz (Colorama Maybelline Ltda., São Paulo, Brasil), com exceção da superfície de dentina oclusal exposta (Figura 5a, 5b).

Figura 5 – Preparo para a desmineralização da amostra de dentina



Legenda: a) DIAGNOdent posicionado para leitura da superfície oclusal da dentina sadia; b) amostras de dentina sadia previamente preparada e impermeabilizada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a indução artificial de lesão cáriosa em dentina foi utilizado o processo de ciclagem de pH, de acordo com o protocolo proposto nos estudos de Erhardt et al. (2008b). A ciclagem de pH consistiu na imersão das amostras em recipientes individuais por 3 h em solução desmineralizadora e 45 h em solução mineralizadora, realizados em 8 ciclos à 37°C, sem agitação.

A solução desmineralizadora continha 2,2 mM de CaCl_2 , 2,2 mM de NaH_2PO_4 , 0,05 M de ácido acético, 0,05 M de acetato de sódio e 1 ppm de NaF, ajustada a um pH 4,5. A solução mineralizadora compreendeu 1,5 mM de CaCl_2 , 0,9 mM de NaH_2PO_4 , 0,15 M de KCl, 0,1 M de solução Tris buffer e 10 ppm de NaF, ajustada a um pH 7,0. A verificação do pH foi realizada em pHmetro digital (DM-20 Digimed, São Paulo, Brasil). O modo de preparo de cada solução encontra-se especificado no APÊNDICE A. Durante os ciclos, a solução desmineralizadora foi trocada após a realização do quarto ciclo, e a solução mineralizadora foi renovada a cada novo ciclo.

Após o período de ciclagem, as amostras foram lavadas abundantemente com água deionizada e novamente avaliadas com laser fluorescente (DIAGNOdent Pen 2190; Kavo, Biberach, Alemanha), com o objetivo de confirmar as alterações pela formação da dentina afetada. A superfície oclusal da amostra foi seca por 5 s e, em seguida, foi posicionada ponta da sonda do aparelho, perpendicularmente à região oclusal da formação de dentina afetada, para realização de três leituras. Ainda, duas amostras foram preparadas e avaliadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV), a fim de verificar a efetividade do processo de ciclagem de pH.

4.4.3 Dentina naturalmente afetada

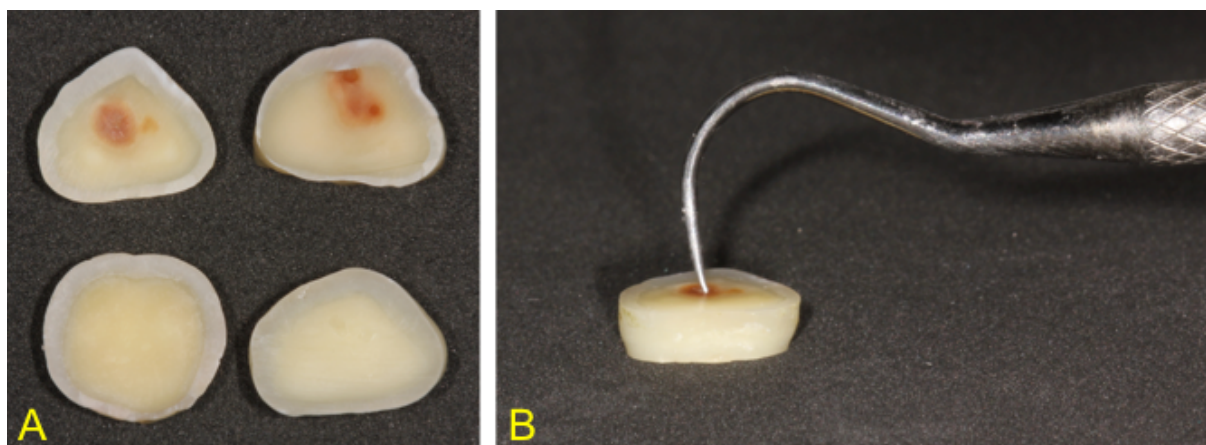
Outros trinta e seis molares humanos, agora com lesão de cárie coronais foram obtidos e armazenados em água deionizada a 4°C por um período máximo de seis meses após a extração (Sattabanasuk et al., 2006). Os critérios de inclusão foram de que a cárie fosse limitada à face oclusal, com envolvimento de pelo menos metade da distância da junção esmalte-dentina e sem envolvimento da câmara pulpar (Nakajima et al., 1995; Taniguchi et al., 2009).

Fixou-se cada dente no suporte acrílico por meio de cera pegajosa para cortes paralelo à superfície oclusal, para exposição da dentina e a 1 mm abaixo da junção amelocementária, para separação da coroa da porção radicular, como descrito anteriormente no item 4.3.1.

A dentina infectada foi removida com curetas de dentina e, a amostra foi levada a uma politriz circular (PoliPan-2, Pantec, São Bernardo do Campo, SP, Brasil), para desgaste da superfície oclusal com discos de lixas de carboneto de silício (Extec Corp., Enfield, CT, EUA) de granulação 600, sob refrigeração com água, a fim de obter uma dentina afetada por cárie clinicamente relevante e padronizar a *smear layer*.

A dentina naturalmente afetada por cárie foi distinguida da dentina sadia usando critérios combinados, incluindo a alteração de cor (exame visual) e dureza superficial usando a sonda exploradora nº5 (exame tátil) (Nakajima et al., 1995; Yoshiyama et al., 2003; Xuan et al., 2010; Joves et al., 2013, 2014); como observado nas Figuras 6a e 6b.

Figura 6 – Diferenciação da dentina naturalmente afetada por cárie



Legenda: a) exame visual pela alteração da cor; b) exame tátil pela dureza de superfície.
Fonte: Elaborada pelo autor.

O remanescente dentinário foi padronizado em, aproximadamente, $2 \pm 0,1$ mm de espessura a partir do corno pulpar mais alto (Joves et al., 2014), medido através de um espessímetro (Otto-Arminger & Cia Ltda., RS, Brasil). Atentou-se para

as amostras que, após a padronização, ficassem com espessuras maiores ou menores diante da dentina com lesão cariosa serem excluídas do estudo.

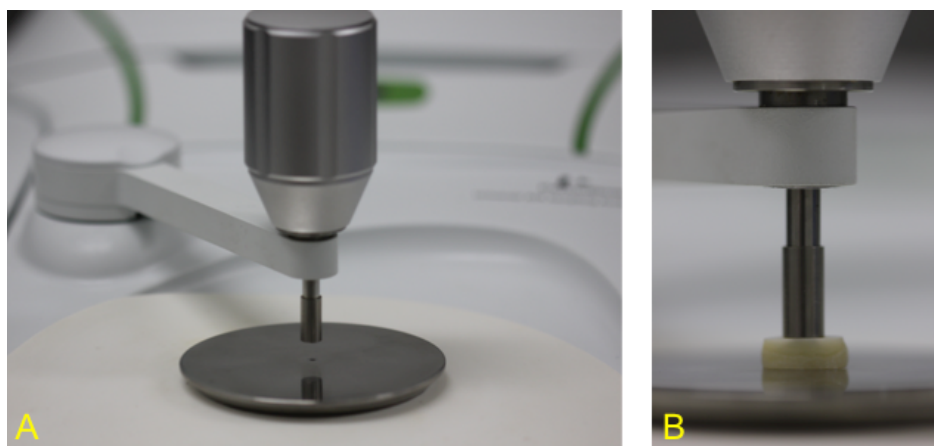
Os tecidos pulparem remanescentes foram removidos e as câmaras pulpares cuidadosamente lavadas com água deionizada. As amostras foram armazenadas em solução salina fisiológica (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil), a 4°C, até o momento do uso.

4.5 Análise química da dentina por espectroscopia - FTIR

Após o preparo e padronização da superfície da dentina, previamente ao procedimento restaurador, cinco amostras de cada tipo de dentina (sadia, artificialmente afetada e naturalmente afetada) foram aleatoriamente escolhidas para análise das possíveis mudanças na composição química.

A análise química foi avaliada em espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR, PerkinElmer Waltham, Massachusetts, EUA), equipado com um acessório de reflexão total atenuada (ATR). A superfície de dentina de cada amostra foi posicionada sobre a superfície do ATR e pressionada com auxílio de célula de carga plana de aço inoxidável (100 g/F), a fim de obter o máximo contato da amostra com o cristal de diamante do ATR (Figura 7a, 7b).

Figura 7 – Posicionamento da amostra para análise em FTIR



Legenda: a) cristal de diamante ATR-FTIR; b) amostra de dentina pressionada sobre o ATR.
Fonte: Elaborada pelo autor.

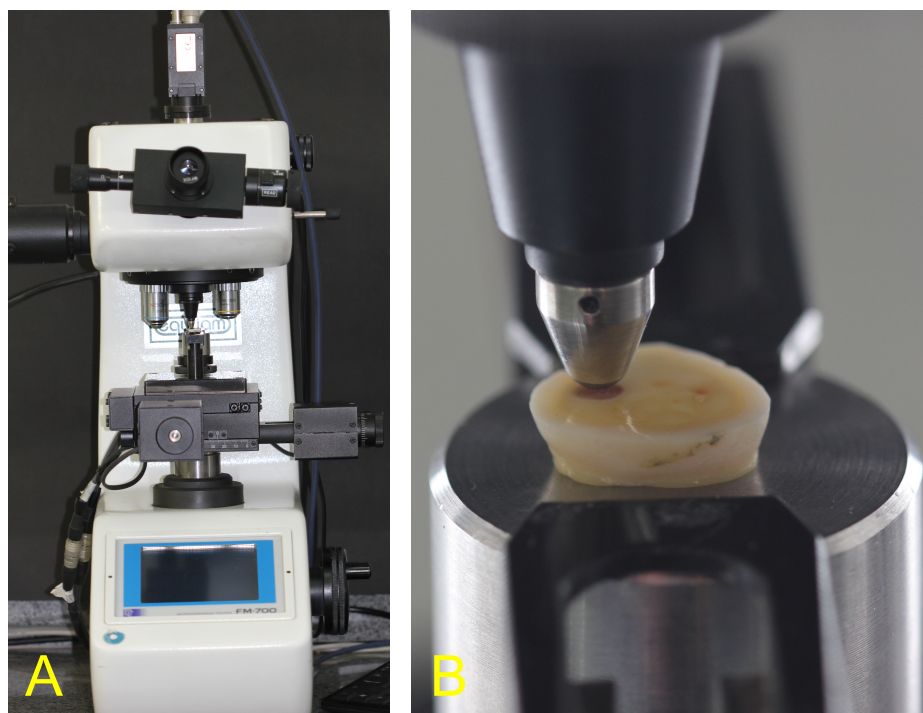
Os espectros de infravermelho foram registrados automaticamente pelo equipamento, por um computador acoplado para mapeamento do ensaio, utilizando o software Spectrum (versão 10.4.3, PerkinElmer Waltham, Massachusetts, EUA). Os espectros foram adquiridos no modo de absorbância, com faixa de transmissão entre 4000 e 650 cm^{-1} , 32 varreduras, a uma resolução de 4 cm^{-1} . Após a correção da linha de base e normalização, picos de absorbância do grupo fosfato (entre 900-1200 cm^{-1}), grupo carbonato (870-1070 cm^{-1}) e grupo amida presente na matriz de colágeno da dentina (entre 1600-1700 cm^{-1}) foram comparados entre os tipos de substratos (Maske et al., 2015). As diferenças entre as características minerais dos espectros foram observados conforme a relação mineral: (fosfato e carbonato)/ colágeno = (961 cm^{-1} e 1070 cm^{-1})/1452 cm^{-1} (Wang et al., 2007).

4.6 Análise da microdureza Knoop (KHN)

Após a análise química em espectroscopia, as cinco amostras de cada tipo de dentina (sadia, artificialmente afetada e naturalmente afetada), previamente padronizadas, foram avaliadas segundo à microdureza de superfície.

O ensaio de microdureza superficial foi realizado por meio de microdurômetro (FM-700, Future Tech Company, Tóquio, Japão), acoplado ao software para análise de imagem (FT-ARS 900 HDPS-ARS, versão 1.31.4). Por meio de uma ponta diamantada piramidal tipo Knoop e aplicação de carga estática de 10 g por 30 s (Marquezan et al., 2009), foram realizadas três indentações na superfície de cada amostra, com 100 μm de distância entre si (Figura 8a, 8b). Uma média dos valores das três leituras foi obtida e submetidas à análise estatística.

Figura 8 – Análise da microdureza de superfície



Legenda: a) amostra posicionada no microdurômetro; b) amostra de dentina posicionada e pressionada com a ponta endentadora.

Fonte: Elaborada pelo autor.

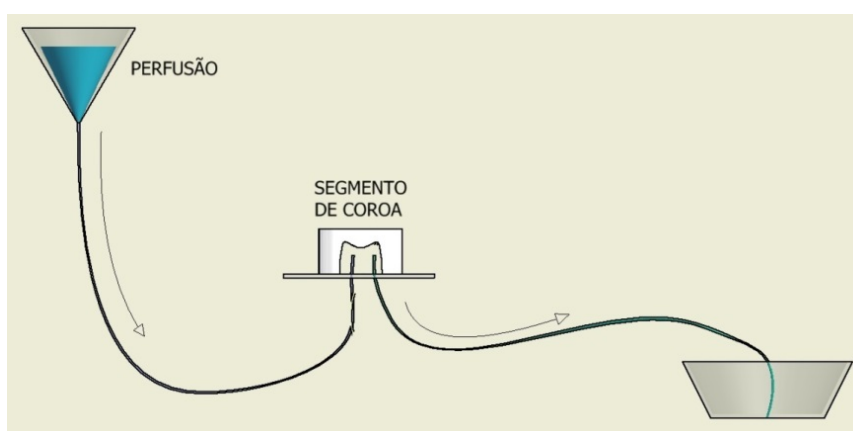
4.7 Procedimento restaurador

4.7.1 Pressão pulpar simulada

Para simulação de pressão intrapulpar, suportes de resina acrílica incolor quimicamente ativada (Jet, Artigos Odontológico Clássico, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil) foram confeccionados com dimensões de 4,5 cm x 2,5 cm x 0,5 cm. Nestes suportes foram feitas duas aberturas para simular a entrada e saída do fluxo de água dentro da câmara pulpar (Figura 9). Duas agulhas hipodérmicas (0,7 x 10 mm) foram posicionadas ao centro do suporte acrílico, perpendicular à base. A primeira agulha foi posicionada de modo que, a ponta superior comunicava com o interior da câmara pulpar, e a ponta inferior anexada a um dispositivo de pressão hidrostática (Goodis et

al., 1997; Silva et al., 2016; Santis et al., 2017). A segunda agulha foi posicionada com sua ponta superior no interior da câmara pulpar, e a ponta inferior anexada a cânulas de silicone (Mark Med Indústria e Comércio LTDA, Bragança Paulista, São Paulo, Brasil) que possibilitaram o fluxo de água para outro reservatório. Para permitir o fluxo de água entre as cânulas, removeu-se bolhas de ar do seu interior por meio de sucção com auxílio de seringa.

Figura 9 – Esquema representativo da pressão pulpar simulada

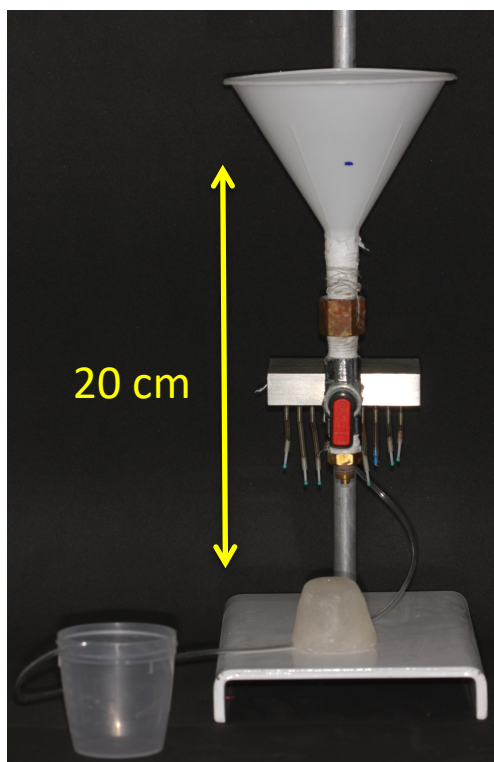


Fonte: Elaborada pelo autor.

O dispositivo para simulação da pressão intrapulpar é uma adaptação do dispositivo da Universidade de Zurique (Suíça). Este dispositivo contém um reservatório que foi preenchido com água deionizada (Goodis et al., 1997; Gonçalves, 2014; Silva et al., 2016; Santis et al., 2017), posicionado a 20 cm do nível da câmara pulpar (Sauro et al., 2007; Mobarak, 2011; Feitosa et al., 2012, 2014; Bacchi et al., 2015; Sartori et al., 2016; Zhou et al., 2016). Contém ainda, cânulas de silicone que permitiram o fluxo de água do reservatório ao interior da câmara pulpar durante o procedimento adesivo (Figura 10).

Antes da simulação de pressão pulpar, através do suporte acrílico e com auxílio de seringas, foi injetada água deionizada na cavidade pulpar para evitar a introdução de bolhas de ar no interior da câmara e garantir seu total preenchimento pelo líquido.

Figura 10 – Dispositivo utilizado para simulação de pressão pulpar

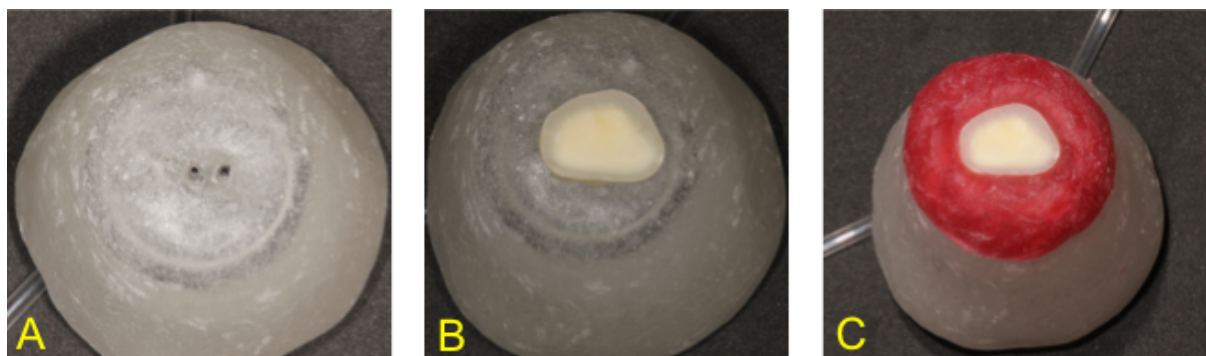


Legenda: dispositivo para simulação de pressão intrapulpar, posicionado a 20 cm da superfície oclusal da amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As amostras foram fixadas nos suportes acrílicos com cola de cianoacrilato gel (SuperBonder Loctite, Henkel Ltda., São Paulo, Brasil) e com cera 7 (rosa) ao redor de todo espécime, para posicionar as perfurações ao centro da câmara, o que permitiu o deslocamento do fluido pelo gradiente de pressão gerado (Figura 11a, 11b, 11c). A cola de cianoacrilato também foi utilizada para impedir o vazamento de água pela interface amostra-suporte e garantir o completo vedamento da câmara pulpar (Özok et al., 2004).

Figura 11 – Adaptação da amostra para simulação de pressão pulpar



Legenda: a) duas agulhas hipodérmicas para simular a entrada e saída do fluxo de água no interior da câmara pulpar; b) dente posicionado sobre o suporte acrílico, com as agulhas no interior da câmara pulpar; c) dente fixado no suporte com cola de cianoacrilato e cera 7.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.7.2 Restauração adesiva

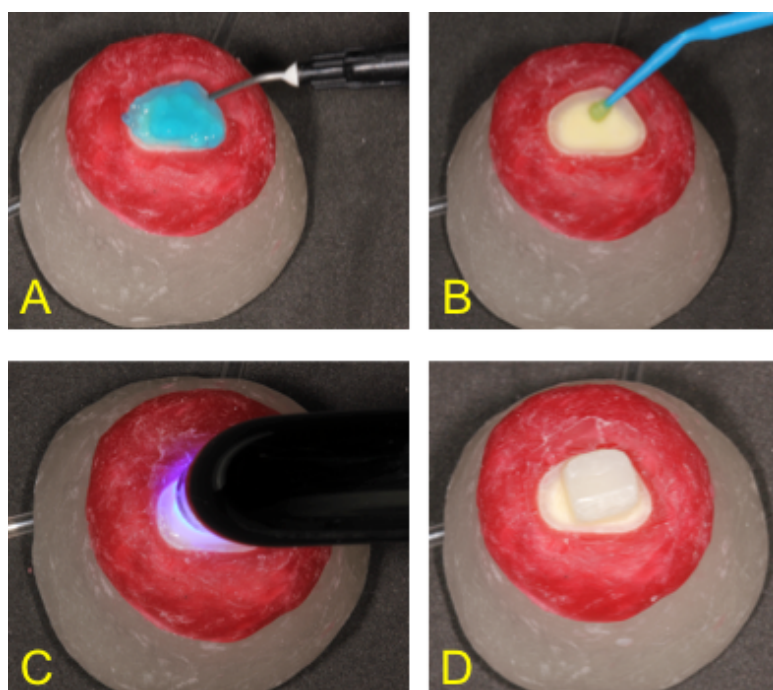
Sob pressão pulpar simulada, as superfícies de dentina sadia, dentina artificialmente afetada e dentina naturalmente afetada por cárie, foram condicionadas com ácido fosfórico 37% (Condac 37, FGM, Joinville, SC, Brasil), pela técnica do condicionamento ácido total, por 15 s, seguido de lavagem por 20 s, remoção do excesso de umidade com breves jatos de ar (10 s), mantendo-se o substrato dentinário levemente umedecido; aplicação do sistema adesivo por 20 s (Scotchbond Universal, 3M ESPE Dental Products, Saint Paul, MN, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Em sequência, foi realizada a fotopolimerização do sistema adesivo (LED Light Curing System, Demi Plus, Kerr Corporation, Middleton, WI, EUA), com potência de 1200 mW/cm^2 , pelo período de 10 s. A densidade de potência foi verificada a cada 10 fotopolimerizações por um radiômetro LED (Kondortech, São Carlos, SP, Brasil.).

Após os procedimentos adesivos, um bloco de resina composta (Z350 XT, 3M do Brasil Ltda., Sumaré, SP, Brasil) com 2 mm de altura foi confeccionado sobre toda face oclusal de dentina exposta, ou somente sobre a região da dentina afetada naturalmente por cárie. A resina foi inserida em incrementos de 2 mm, com auxílio de uma matriz de silicone (4 mm x 4 mm x 4 mm), seguido de fotopolimerização por 20 s. Para complementar a polimerização da resina, após a remoção da matriz de

silicone, o bloco foi fotopolimerizado por mais 20 s em cada face (Figura 12a, 12b, 12c, 12d).

Finalizado o procedimento restaurador, as amostras confeccionadas foram armazenadas em água deionizada a 37°C por 48 h, a fim de proporcionar o tempo adequado para polimerização (Singh et al., 2010; De Munck et al., 2013).

Figura 12 – Procedimento adesivo e restaurador



Legenda: a) condicionamento ácido da superfície oclusal; b) aplicação do sistema adesivo; c) fotopolimerização do sistema adesivo; d) dente restaurado com resina composta.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os materiais para este estudo encontram-se especificados no Quadro 1.

Quadro 1 – Composição e especificações dos materiais

MATERIAL	FABRICANTE	COMPOSIÇÃO	LOTE
Condac 37	FGM, Joinville, SC, Brasil.	37% ácido orto-fosfórico, espessante, corante e água deionizada.	050716
Scotchbond™ Universal.	3M ESPE Dental Products, Saint Paul, MN, EUA.	15-25% BisGMA, 15-25% HEMA, 5-15% resinas dimetacrilato, 5-15% silano, 1-10% monômero fosfato MDP, 1-5% copolímero do Vitrebond™ (ácido polialcenóico), 10-15% etanol, 10-15% água.	509806
Filtek Z350 XT.	3M ESPE Dental Products, Saint Paul, MN, EUA.	BisGMA, BisEMA UDMA, TEGDMA, PEGDMA, nanopartículas de zircônia/sílica.	591639

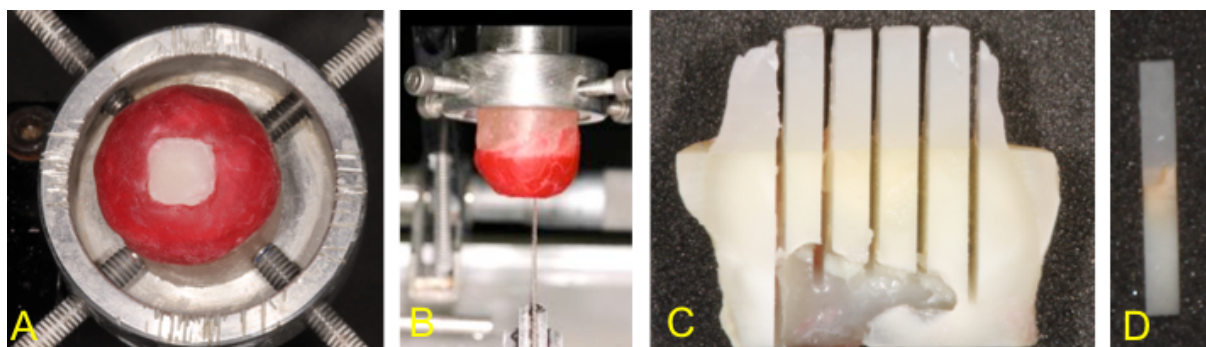
Fonte: Fabricantes.

4.7.3 Preparo para armazenamento

Após o período de 48 h, as amostras foram fixadas nos suportes de resina acrílica (2,5 cm de diâmetro x 2 cm de altura) com cola de cianoacrilato em gel (Super Bonder Loctite, Henkel Ltda., São Paulo, Brasil) e com cera 7 (rosa) ao redor de toda amostra.

Em seguida, o suporte foi posicionado em uma máquina para corte (Labcut 1010, Extec Technologies Inc., CT, EUA) para a realização de secções paralelas no longo eixo da coroa, em baixa velocidade e sob refrigeração abundante. Realizaram-se secções perpendiculares à interface adesiva, nos sentidos mésio-distal e vestibulo-lingual, possibilitando a obtenção de palitos retangulares de resina composta e estrutura dental com secções de aproximadamente 1 mm² de área (Sano et al., 1994) (Figura 13a, 13b, 13c, 13d).

Figura 13 – Corte das amostras para armazenamento



Legenda: a) amostra restaurada posicionada em cortadeira de precisão (vista oclusal); b) amostra posicionada para corte e obtenção dos 'palitos'; c) representação das secções perpendiculares à interface adesiva realizada nos sentidos méso-distal e vestibulo-lingual; d) corpo-de-prova na forma de paralelogramo de resina composta e dentina naturalmente afetada por cárie.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.8 Degradação em solventes

Os corpos-de-prova ('palitos') obtidos em cada amostra restaurada foram aleatoriamente divididos em duas metades para avaliação após 24 h e 30 dias de armazenamento. Ou seja, para um mesmo dente, metade dos 'palitos' foram avaliados após 24 h, e a outra metade avaliada após 30 dias. Deste modo, houve uma menor variação do substrato para a avaliação dos solventes sobre a interface adesiva (Loguercio et al., 2005; Van Meerbeek et al., 2010).

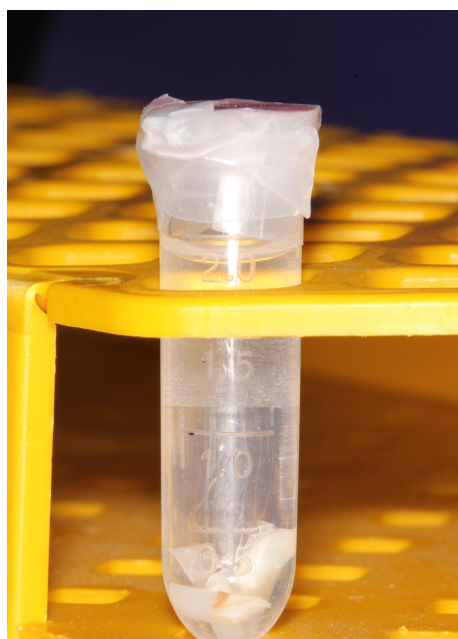
Para o envelhecimento (Marghalani, Watts, 2013), utilizaram-se os solventes:

- S1 – água deionizada como grupo controle;
- S2 – etanol 99% (LioSerum Produtos Laboratoriais e Hospitalares Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil);
- S3 – metiletilcetona 99% (LioSerum Produtos Laboratoriais e Hospitalares Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Os corpos-de-prova ('palitos') foram armazenados em recipientes individuais identificados (Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil), contendo 2 ml do solvente correspondente, em estufa a 37°C, pelos períodos de 24 h e 30 dias. Para evitar a

volatilização dos solventes, os recipientes foram vedados individualmente com Parafilm (Parafilm M® Laboratory Film, OShKosh, WI, EUA), a fim de garantir seu completo fechamento (Figura 14).

Figura 14 – Armazenamento da amostra para envelhecimento



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.9 Teste de resistência adesiva à microtração

Após os períodos de 24 h e 30 dias de armazenamento em solventes para envelhecimento, os corpos-de-prova ('palitos') foram submetidos ao teste de resistência adesiva à microtração. Antes do ensaio mecânico, a área de todos os palitos foi medida utilizando um paquímetro eletrônico digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., SP, Brasil).

Cada corpo-de-prova foi fixado individualmente em um dispositivo metálico para teste de microtração (OD03d, Odeme Equipamentos Médicos e Odontológicos Ltda., Joaçaba, SC, Brasil) com cola de cianoacrilato em gel (454 Loctite, Henkel Ltda.,

São Paulo, Brasil) em suas extremidades, de modo a posicionar a área adesiva perpendicularmente ao longo eixo da força de tração (Figura 15a, 15b, 15c).

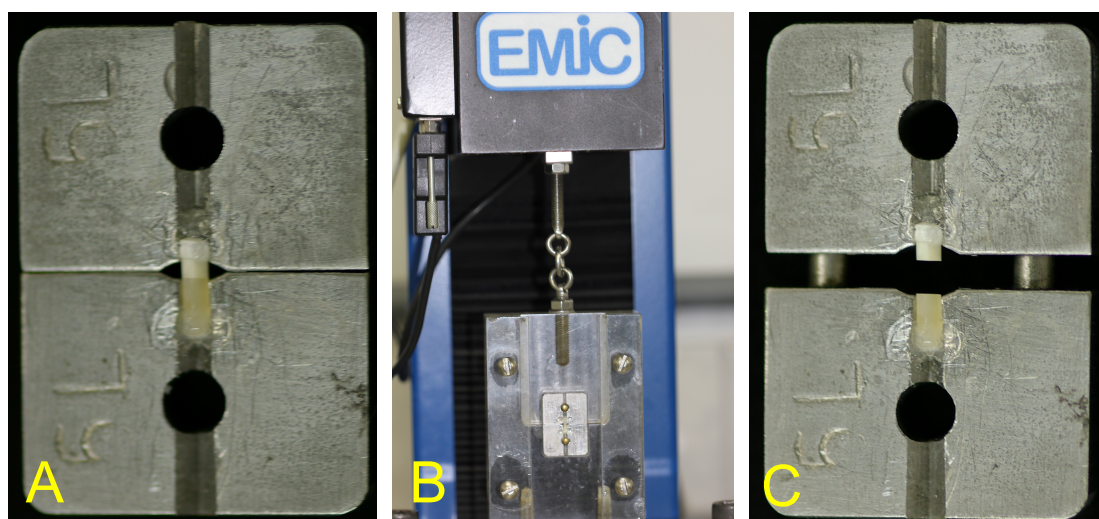
O ensaio de microtração foi realizado em uma máquina de ensaio universal (EMIC DL-200, Equipamentos e Sistemas Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil), com célula de carga de 10 kgf, a uma velocidade de 0,5 mm/min, preconizada pela ISO/TR 11405:1994. No momento da fratura, o ensaio era interrompido automaticamente, e os valores referentes à resistência de união coletados e tabulados para a análise estatística.

A resistência de união foi calculada, em megapascal (MPa), através da fórmula:

$$R_m = F/A$$

Onde: R_m é a resistência à microtração; F é a força aplicada, ou seja, o valor da carga (min/mm²) para rompimento da união adesiva; e A é a área de união (mm²).

Figura 15 – Teste de resistência adesiva à microtração



Legenda: a) palito fixado no dispositivo para teste de microtração; b) dispositivo posicionado na máquina EMIC para realização do ensaio; c) palito fraturado após o teste de microtração.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a realização do ensaio de microtração, os corpos-de-prova fraturados foram classificados de acordo com o tipo de falha:

- coesiva em resina composta – predominantemente ($\geq 75\%$) no interior da resina composta;
- coesiva em dentina – predominantemente ($\geq 75\%$) no interior da estrutura dental;
- adesiva - predominantemente ($\leq 75\%$) na interface adesiva;
- mista – sem predominância de qualquer tipo de falha.

Os dados resultantes de fraturas coesivas em dentina ou em resina composta foram desprezados, assim como os espécimes que apresentaram falhas pré-teste. Apenas os dados das fraturas adesivas e mistas foram utilizados para a análise estatística (Loguercio et al., 2005; Eckert, Platt, 2007; Sadek et al., 2010; Scherrer et al., 2010).

4.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise da interface adesiva frente às diferentes condições experimentais, prepararam-se duas amostras de cada grupo para análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). As amostras foram restauradas de forma similar à técnica empregada para o ensaio mecânico de microtração. Em sequência, as amostras foram seccionadas perpendicularmente a interface adesiva através de uma máquina para corte (Labcut 1010, Extec Technologies Inc., CT, EUA).

Para observação da interface adesiva, cada espécime obtido teve sua interface polida com discos de lixas d'água de granulação 1200 e 4000 (Extec Corp., Enfield, CT, EUA), em politriz circular, sob refrigeração. Em seguida, os espécimes foram condicionados com ácido fosfórico 37% sem sílica (Ataque Gel 37%, Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, Ibioporã, PR, Brasil) durante 15 s e lavados com água durante 10 s, promovendo a remoção da *smear layer* e facilitando a visualização da interface adesiva em MEV. Os espécimes foram mantidos em

campânulas de vidro com sílica por sete dias para desidratação. Em sequência, os espécimes foram montados em *stubs* de alumínio, e foi depositada, em vácuo, uma camada de 4 nm de liga Au-Pd sobre a superfície (Emitech SC7620 Sputter Coater, Moorestown, NJ, EUA) (Marimoto et al., 2013; Barcellos et al., 2015).

Os espécimes foram observados em microscópio eletrônico de varredura (Inspect S50, FEI, Hillsboro, Oregon, EUA), com 12,5 KV de potência, empregando aumentos de 2000 vezes, considerando a interface adesiva. As imagens foram coletadas através de um computador acoplado ao MEV.

4.11 Análises físico-mecânicas do sistema adesivo

4.11.1 Teste de resistência flexural em três pontos e módulo de elasticidade

Sessenta amostras retangulares do sistema adesivo foram confeccionadas para desafio em cada solvente, avaliados após 24 h e 30 dias de armazenamento (n=10). Uma matriz de silicone (Odeme Equipamentos Médicos e Odontológicos LTDA, Luzerna, SC, Brasil) com dimensões retangulares (10 mm de comprimento x 2 mm de largura x 2 mm de altura) foi utilizada para confecção das amostras retangulares.

O sistema adesivo foi inserido com auxílio de uma micropipeta (Digipet, Curitiba, PR, Brasil), e uma tira de poliéster transparente (FAVA, São Paulo, SP, Brasil) foi posicionada sobre a matriz. Em sequência, realizou-se a fotopolimerização do sistema adesivo (LED Light Curing System, Demi Plus, Kerr Corporation, Middleton, WI, EUA), com potência de 1200 mW/cm², pelo período de 20 s, no centro e nas duas extremidades. As amostras foram armazenadas em recipientes individuais identificados (Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil), em câmara escura, em estufa a 37°C, por 48 h em água deionizada.

Após 48 h, as amostras foram submetidas ao desafio nos respectivos solventes (n=20): água deionizada, etanol a 99% e metiletilcetona 99%. Para isso, cada amostra foi armazenada em recipientes individuais identificados contendo 2 ml

do solvente correspondente, em estufa a 37°C, pelos períodos de 24 h e 30 dias (n=10).

Após os períodos de 24 h e 30 dias de armazenamento, as amostras foram submetidas ao teste de resistência flexural em três pontos e módulo de elasticidade. Antes do ensaio mecânico, a área de todas as amostras foi medida utilizando um paquímetro eletrônico digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., Itú, SP, Brasil).

Cada amostra foi posicionada individualmente em um dispositivo metálico para teste de flexão (Odeme Equipamentos Médicos e Odontológicos Ltda., Joaçaba, SC, Brasil), fixado na base da máquina de ensaio universal (EMIC DL-1000, Equipamentos e Sistemas Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil), com célula de carga de 10 kgf, a uma velocidade de 0,5 mm/min, conforme norma ISO 4049. Esse suporte contém duas superfícies paralelas distantes entre si, o que proporciona dois apoios nas extremidades; e um pino metálico fixado na parte superior da máquina de ensaio universal, que exerce uma força de 0,5 Nm/s no centro da amostra, equidistante aos pontos de apoio, gerando assim a força de flexão até o momento da fratura (Figura 16a, 16b, 16c).

No momento da fratura, o ensaio era interrompido automaticamente, e os valores referentes à resistência flexural em três pontos foram coletados por um computador acoplado para mapeamento do ensaio, em N e convertidos em MPa, seguindo a fórmula da especificação ISO 4049:

$$RF=3FI / 2bh^2$$

Onde RF é a resistência flexural (MPa), F é a carga suportada (N), I é o comprimento entre os pontos de apoio (9 mm), b é a largura da amostra (2 mm) e h é a espessura da amostra (2 mm).

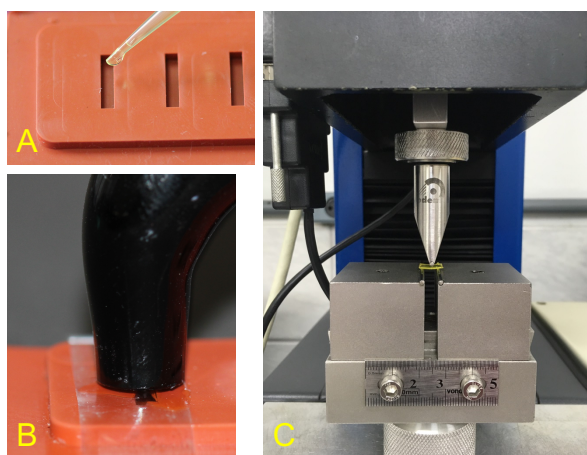
O cálculo do módulo de elasticidade foi realizado a partir das curvas de deflexão da carga registrada, seguindo a fórmula:

$$ME=3I \times 1F / 4fbh^3$$

Onde, I é a distância entre os apoios, F é a carga suportada (N), f é deflexão da barra (mm), b é a largura da amostra (2 mm) e h é a espessura da amostra (2 mm).

Em sequência, todos os valores referentes aos testes RF e ME foram coletados e tabulados para a análise estatística (Peutzfeldt, Asmussen, 1992; Condon, Ferracane, 1998; Arcis et al., 2002).

Figura 16 – Teste de resistência flexural em três pontos e módulos de elasticidade



Legenda: a) inserção do adesivo com auxílio de micropipeta; b) fotopolimerização do sistema adesivo; c) amostra posicionada sobre o suporte metálico para realização dos testes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.11.2 Teste de sorção (A) e solubilidade (S) em solventes

Quinze amostras circulares (7 mm de diâmetro x 2 mm de altura) do sistema adesivo foram confeccionadas por meio de uma matriz de silicone. Esse diâmetro foi utilizado de modo a padronizar a fotopolimerização das amostras em relação ao diâmetro da ponta do fotopolimerizador. O sistema adesivo foi inserido na matriz de silicone com auxílio de uma micropipeta (Digipet, Curitiba, PR, Brasil), e uma tira de poliéster transparente (FAVA, São Paulo, SP, Brasil) foi posicionada sobre a matriz. Em sequência, realizou-se a fotopolimerização do sistema adesivo (LED Light Curing System, Demi Plus, Kerr Corporation, Middleton, WI, EUA), com potência de 1200 mW/cm², pelo período de 20 s (Figura 17a, 17b).

As amostras foram pesadas em uma balança analítica eletrônica de precisão (Mettler, Toledo, OH, EUA) para registro do peso inicial. Em seguida, as amostras foram

armazenadas individualmente em recipientes identificados (Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil), secos, em câmara escura, a 37°C. Após ciclos de 24 h, as amostras foram pesadas repetidas vezes até que uma massa constante (M1) fosse obtida, de modo que a diferença entre as pesagens não fosse maior que 0,1 mg (ISO 4049:2000).

O diâmetro e a espessura de cada amostra foram medidos utilizando um paquímetro eletrônico digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., Itú, SP, Brasil). Através das médias do diâmetro e da espessura, calculou-se a área (em mm²) e o volume (em mm³) da amostra, onde

$$V = \pi r^2 h$$

em que r corresponde ao raio e h à espessura.

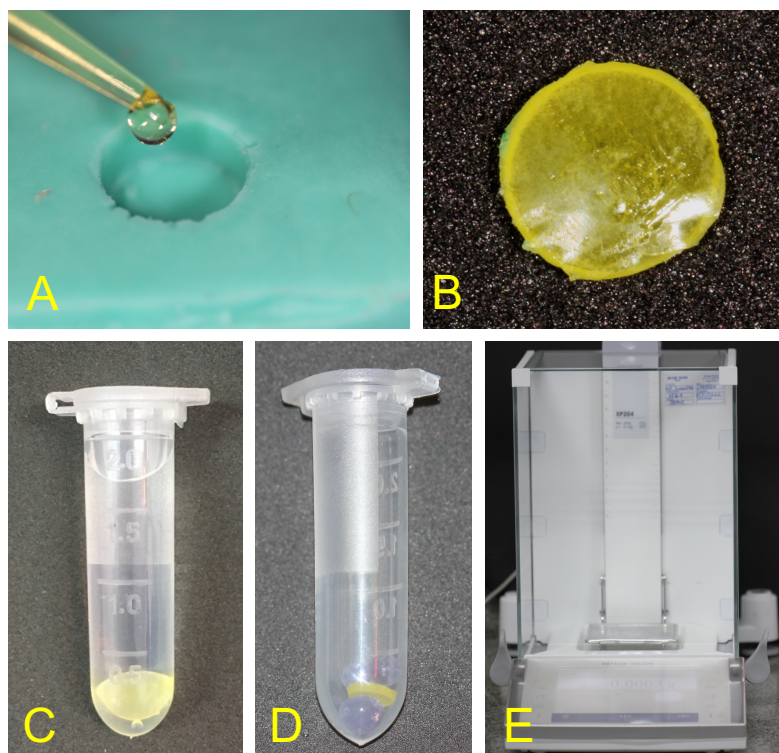
Após obtenção da massa constante, as amostras foram submetidas ao desafio nos respectivos solventes (n=5): água deionizada, etanol a 99% e metiletilcetona 99%. Para isso, cada amostra foi imersa em 2 ml do solvente correspondente, em estufa a 37°C, por um total de 28 dias. Após o 28º dia, as amostras foram removidas da estufa, retiradas do solvente, cuidadosamente limpas em papel absorvente por 15 s (Figura 17c). Em seguida, todas as amostras foram novamente pesadas (M2) em balança analítica de precisão. Assim, a porcentagem de sorção (A), em µg/mm³, foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$A = 100 (M2 - M1 / V)$$

Em sequência, as amostras foram colocadas individualmente em recipientes individuais identificados, sem solvente, contendo géis de sílica, em estufa a 37°C, para desidratação (Figura 17d, 17e). Cada amostra foi pesada em ciclos de 24 h, até obter uma massa constante (M3), de modo que a diferença das pesagens entre os ciclos não fosse maior que 0,1 mg. Assim, porcentagem de solubilidade, em µg/mm³, foi calculada usando a seguinte equação (Yiu et al., 2006; Hiraishi et al., 2008):

$$S = 100 (M1 - M3 / V)$$

Figura 17 – Teste de sorção e solubilidade nos solventes



Legenda: a) inserção do adesivo com auxílio de micropipeta na matriz de teflon; b) amostra circular de adesivo; c) amostra imersa individualmente em 2 ml de solvente; d) amostra armazenada sem água com géis de sílica para desidratação; e) balança eletrônica analítica de precisão para pesagem da amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.12 Planejamento estatístico

Para avaliar a efetividade do processo de ciclagem de pH, foi realizada a mensuração da sensibilidade do laser fluorescente (DIAGNOdent) sobre a superfície oclusal das amostras, antes e após a ciclagem. A análise descritiva consistiu nos valores de média e desvio-padrão. Os dados obtidos foram analisados segundo o teste t-Student para dados pareados paramétricos (teste de Wilcoxon), com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Ainda, duas amostras foram preparadas e avaliadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para análise química da dentina em espectroscopia (FTIR), os picos de absorvância do grupo fosfato (entre 900 e 1200 cm^{-1}), do grupo carbonato (870 e 1070

cm^{-1}) e do grupo amida (entre 1400 e 1700 cm^{-1}) presente na matriz de colágeno da dentina foram comparados entre os tipos de substratos.

Para os dados de microdureza de superfície, uma média foi obtida a partir das três leituras realizadas em cada amostra de dentina. A análise descritiva consistiu nos valores de média e desvio-padrão e, a análise inferencial, compreendeu o teste de análise de variância sob um fator (substrato), seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Para o teste de resistência de adesiva à microtração, a variável em estudo foi a média dos 'palitos' de cada dente (Eckert, Platt, 2007), para cada tempo em análise. A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvio-padrão. Os dados de resistência adesiva foram analisados, estatisticamente, quanto à sua normalidade por meio do teste de Ryan-Joiner (APÊNDICE B).

A estatística inferencial consistiu nos testes: análise de variância (ANOVA) sob 2 fatores (tipos de substratos e solventes) para cada tempo de avaliação (24 h e 30 dias); e o teste de múltiplas comparações de Tukey, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Para os testes de resistência flexural e módulo de elasticidade, os dados obtidos foram submetidos à análise descritiva com valores de média e desvio-padrão, e à análise de variância (ANOVA) sob 2 fatores (solventes e tempos de armazenamento), seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey ($\alpha=0,05$).

Sorção e solubilidade, os dados obtidos foram submetidos à análise descritiva com valores de média e desvio-padrão, e teste ANOVA sob um fator (solventes), seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey ($\alpha=0,05$).

Os dados foram submetidos à análise estatística por meio dos programas computacionais: Minitab for Windows (versão 17, 2010, College State, PA, EUA) e GraphPad Prism (versão 6, 2010; La Jolla, CA, EUA).

5 RESULTADOS

Os dados obtidos estão apresentados em quatro partes para melhor compreensão do leitor. Na primeira parte, apresentam-se os resultados referentes ao preparo da dentina artificialmente afetada por cárie. Na segunda parte estão a análise química dos substratos (dentina sadia, artificialmente afetada e naturalmente afetada) realizada em espectroscopia – FTIR e a análise da microdureza superficial dos mesmos substratos. Na terceira parte, a estatística descritiva e inferencial dos resultados obtidos no ensaio de microtração (em MPa), e as imagens da interface adesiva obtidas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). E, na quarta parte, estão apresentados os resultados dos testes de resistência flexural e módulo de elasticidade (em MPa), sorção e solubilidade (em %) do sistema adesivo.

5.1 Dentina artificialmente afetada por cárie

5.1.1 DIAGNOdent

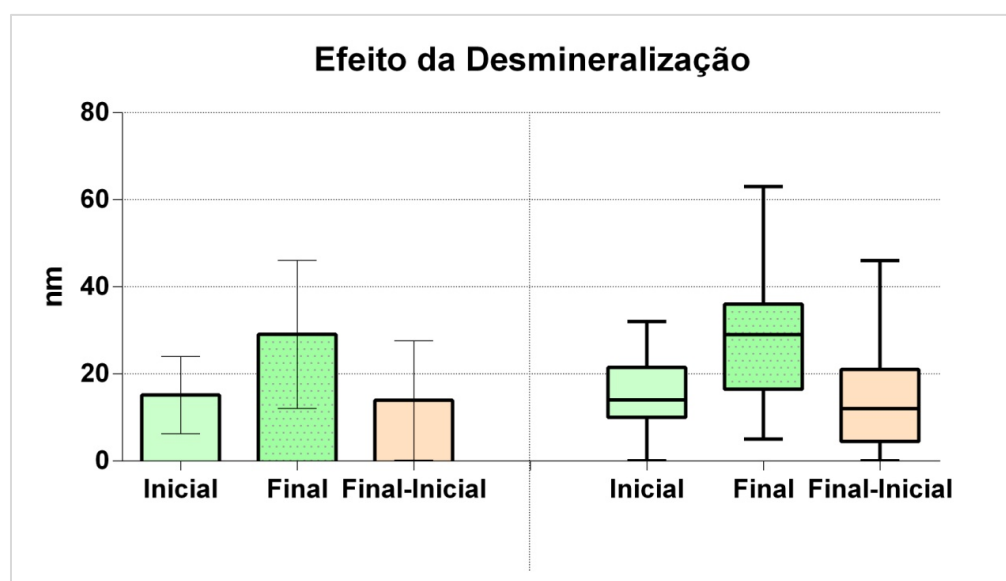
Na Tabela 1 e na Figura 18, apresentam-se os valores de média do grau de desmineralização obtidos pelo aparelho de laser fluorescente DIAGNOdent, antes e após a desmineralização da superfície da dentina. De acordo com os resultados obtidos, houve diferença estatisticamente significativa na superfície das amostras após a submissão ao processo de ciclagem de pH. Mostrando assim, que o tratamento foi efetivo na desmineralização da dentina.

Tabela 1 – Resultados do teste t-Student de dados pareados para os valores do grau de desmineralização do DIAGNOdent

Dentina	Média ± DP	p-valor*	t-valor
Dentina sadia (Inicial)	15,15±8,86		
Dentina afetada (Final)	29,09±17,01	0,001	5,85
Diferença (Final-Inicial)	13,94±13,69		

Legenda: DP:Desvio-padrão. * p-valor<0,05 apresentam diferenças estatisticamente significantes.
Fonte: GraphPad Prism.

Figura 18 – Gráfico de médias e desvio-padrão e box-plot das medianas dos valores do grau de desmineralização do DIAGNOdent



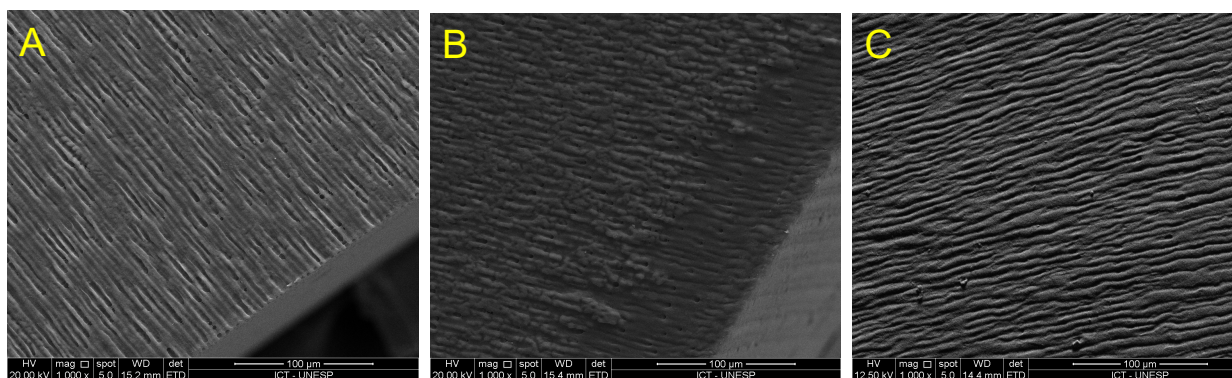
Fonte:GraphPad Prism.

5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Imagens em MEV foram obtidas com o propósito de realizar análise complementar da característica do substrato após o processo DES-RE, conforme a ciclagem de pH preconizada na literatura. A Figura 19 ilustra a superfície oclusal da dentina sadia e, as diferenças obtidas na superfície após o período de formação da

dentina artificial por cárie, comparando-as com a superfície de uma amostra de dentina naturalmente afetada por cárie.

Figura 19 – Análise ilustrativa de microscopia eletrônica de varredura de uma amostra de dentina sadia, dentina submetida à ciclagem de pH e dentina naturalmente afetada por cárie



Legenda: a) dentina sadia (aumento 1000x); b) dentina após ciclagem de pH (aumento 1000x); c) dentina naturalmente afetada por cárie (aumento 1000x).

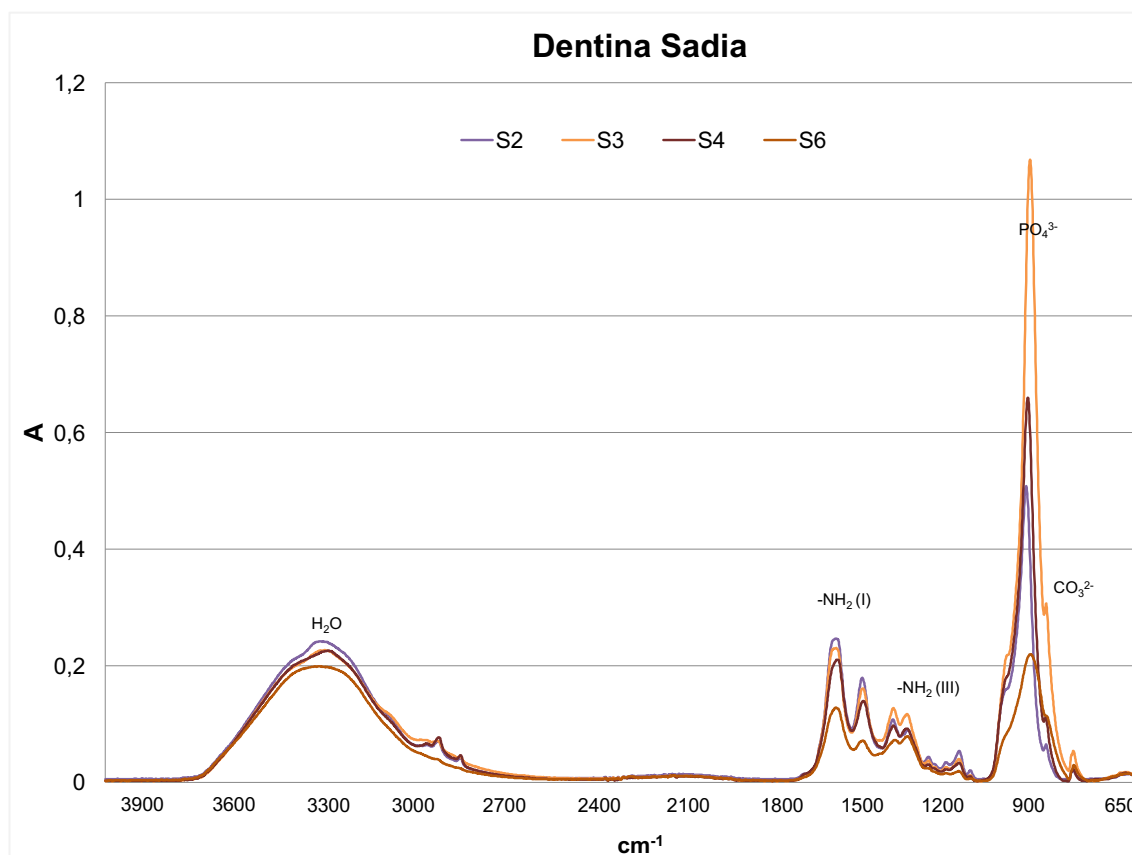
Fonte: MEV.

5.2. Análise química dos substratos em espectroscopia – FTIR

Gráficos dos picos de absorbância referentes aos diferentes tipos de dentina estão representados nas Figuras 20, 21 e 22, bem como os picos de absorbância do grupo fosfato (entre 900 e 1200 cm^{-1}), do grupo carbonato (870 e 1070 cm^{-1}) e do grupo amida (entre 1400 e 1700 cm^{-1}).

Para dentina sadia, os picos de absorbância do grupo fosfato e carbonato apresentam intensidades acima de 0,4 A; enquanto os picos do grupo amida, em torno de 0,2 A.

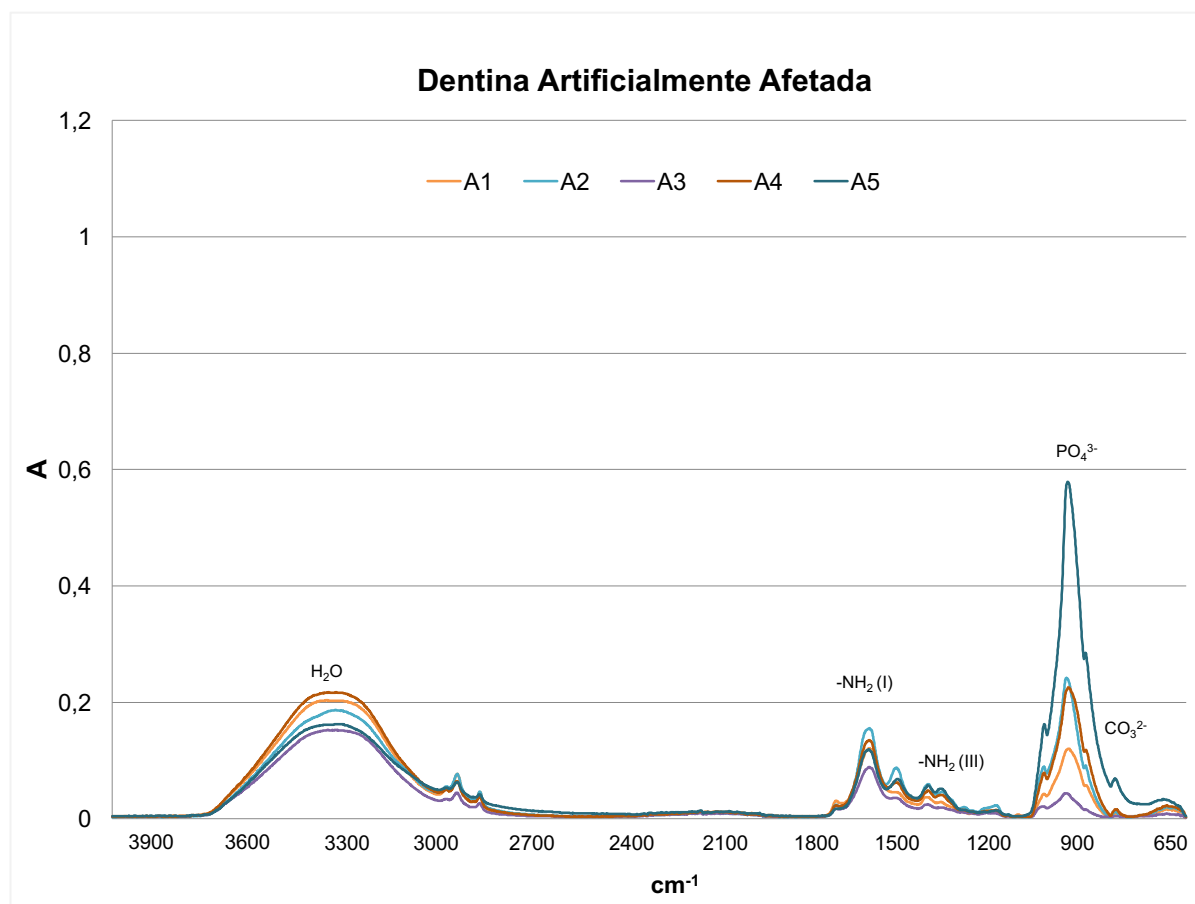
Figura 20 – Gráfico dos picos de absorvência (A) para dentina sadia



Legenda: $-\text{NH}_2$: grupo amida; PO_4^{3-} : grupo fosfato; CO_3^{2-} : grupo carbonato; H_2O : água.
 Fonte: Elaborada pelo autor (Microsoft Excel).

Para dentina artificialmente afetada, os picos de absorvência mostraram uma redução das intensidades quando comparada à dentina sadia. O grupo fosfato e carbonato apresentam intensidades menores que 0,4 A; enquanto os picos do grupo amida, menores que 0,2 A.

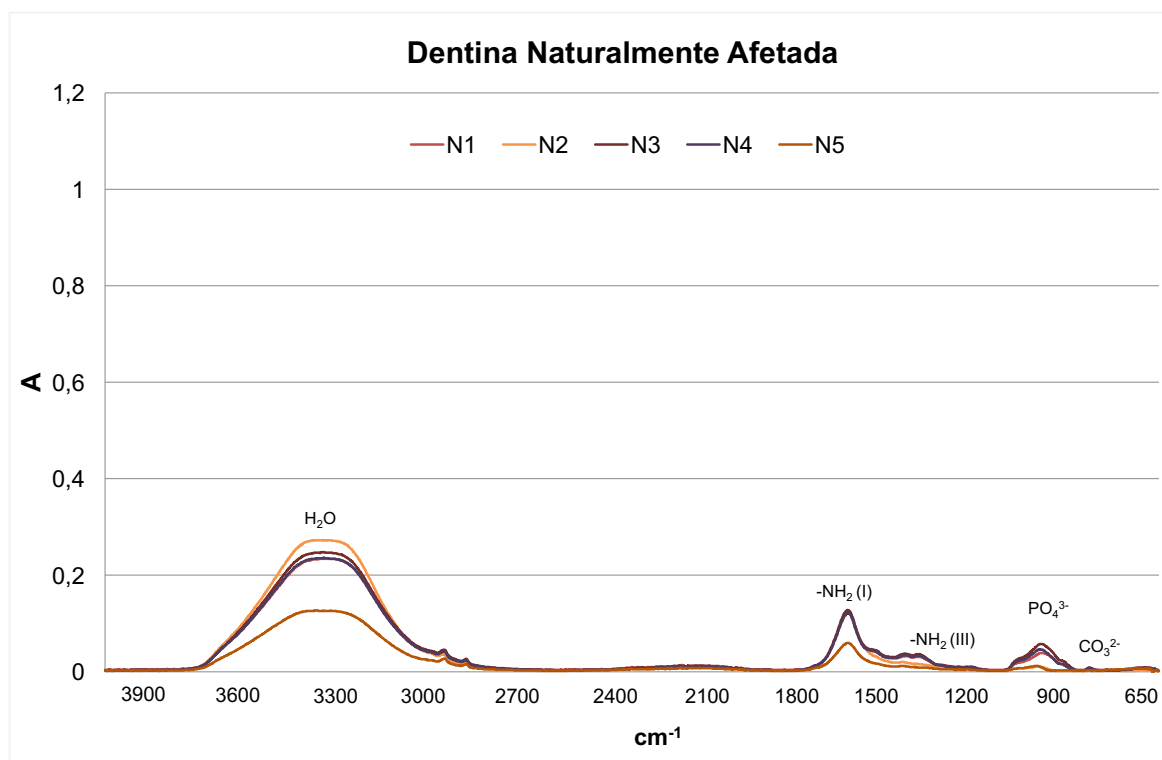
Figura 21 – Gráfico dos picos de absorvência (A) para dentina artificialmente afetada



Legenda: -NH₂: grupo amida; PO₄³⁻: grupo fosfato; CO₃²⁻: grupo carbonato; H₂O: água.
 Fonte: Elaborada pelo autor (Microsoft Excel).

Para dentina naturalmente afetada, os picos de absorvência foram bem inferiores aos outros substratos. O grupo fosfato apresentou intensidades em torno de 0,04 A, o grupo carbonato em torno 0,01 A, enquanto os picos do grupo amida, em torno de 0,01 a 0,03 A.

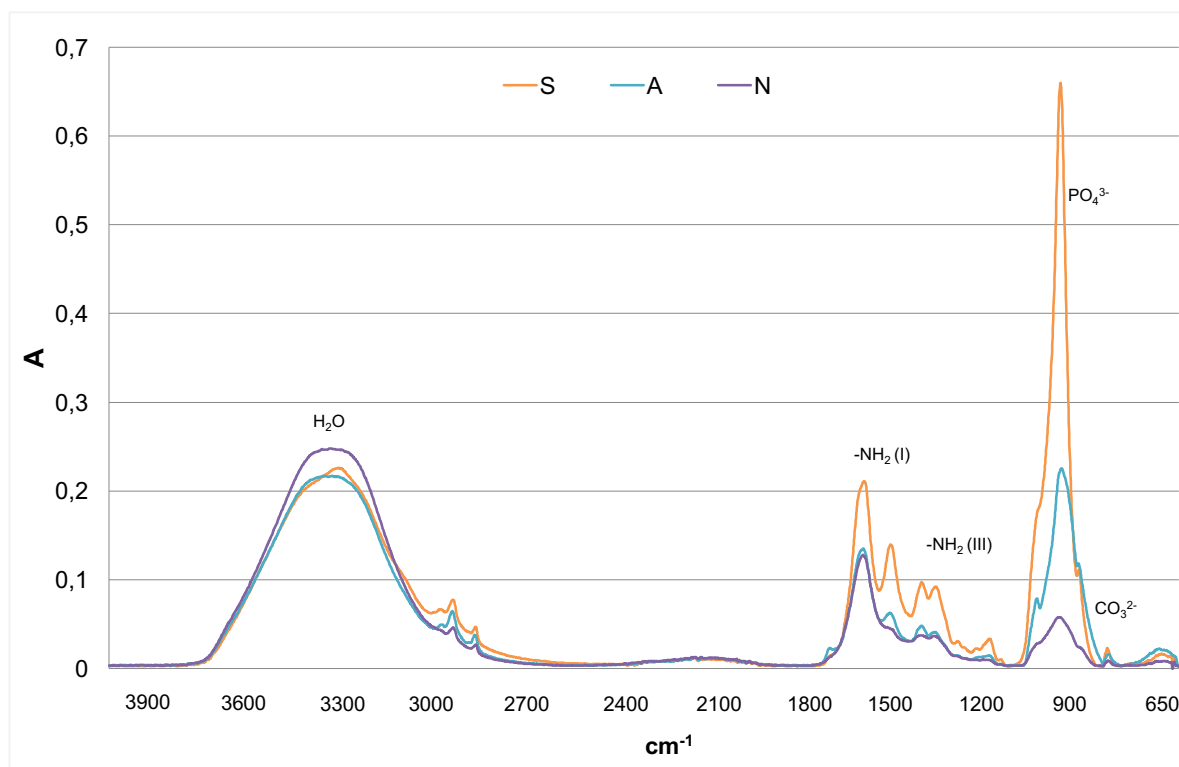
Figura 22 – Gráfico dos picos de absorvência (A) para dentina naturalmente afetada



Legenda: $-\text{NH}_2$: grupo amida; PO_4^{3-} : grupo fosfato; CO_3^{2-} : grupo carbonato; H_2O : água.
 Fonte: Elaborada pelo autor (Microsoft Excel).

A Figura 23 apresenta graficamente os picos de absorvência (A) em relação ao número de onda (cm^{-1}) da espectroscopia de infravermelho, comparando os diferentes substratos. Observa-se a perda do conteúdo mineral da dentina naturalmente afetada por cárie em relação à dentina sadia, tanto pela redução dos picos dos grupos fosfato e carbonato, como pela redução nos picos do grupo amida presente na matriz colágena. Ainda, verifica-se maior conteúdo de água no substrato naturalmente afetado por cárie, em relação aos demais substratos. Mostrando assim, a diferença química e estrutural nos diferentes tipos de dentina.

Figura 23 - Gráfico dos picos de absorbância (A) diante dos diferentes substratos



Legenda: -NH₂: grupo amida; PO₄³⁻: grupo fosfato; CO₃²⁻: grupo carbonato; H₂O: água; S: dentina sadia; A: dentina artificialmente afetada; N: dentina naturalmente afetada.
 Fonte: Elaborada pelo autor (Microsoft Excel).

5.3 Análise da microdureza superficial (KHN)

Segundo a análise de variância (ANOVA) sob um fator, o fator Dentina apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,0002 < 0,05$). De acordo com as médias, em KHN, obtidas a partir das três leituras na superfície, observa-se que a dentina sadia obteve os maiores valores ($52,81 \pm 10,66$)^A de microdureza, diferindo significativamente dos substratos artificialmente ($22,62 \pm 6,58$)^B e naturalmente ($18,40 \pm 10,93$)^B afetados por cárie (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de média $\pm$ desvio padrão da microdureza de superfície (KHN) e resultados do teste Tukey (5%) para o fator dentina

Dentina	Média $\pm$ DP	Grupos Homogêneos*
Sadia	52,81 $\pm$ 10,66	A
Artificialmente afetada	22,62 $\pm$ 6,58	B
Naturalmente afetada	18,40 $\pm$ 10,93	B

Legenda: *As médias acompanhadas da mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism.

5.4 Resistência adesiva à microtração

5.4.1 Estatística descritiva

Na Tabela 3 apresentam-se os valores, em MPa, de média e desvio-padrão de resistência adesiva obtidos nos 9 grupos estudados. A maior média (22,66 $\pm$ 8,03) foi observada no grupo restaurado em dentina sadia e envelhecido em água por 24 h. A menor média (5,64 $\pm$ 3,62) foi apresentada pelo grupo restaurado em dentina naturalmente afetada e envelhecidos em etanol por 30 dias. Observa-se que os grupos restaurados em dentina afetada (naturalmente ou artificialmente) apresentaram as menores médias de resistência de união, com redução dos seus valores médios após o período de envelhecimento de 30 dias. Verifica-se ainda que os envelhecimentos em etanol e água foram os que mostraram as menores médias após 30 dias.

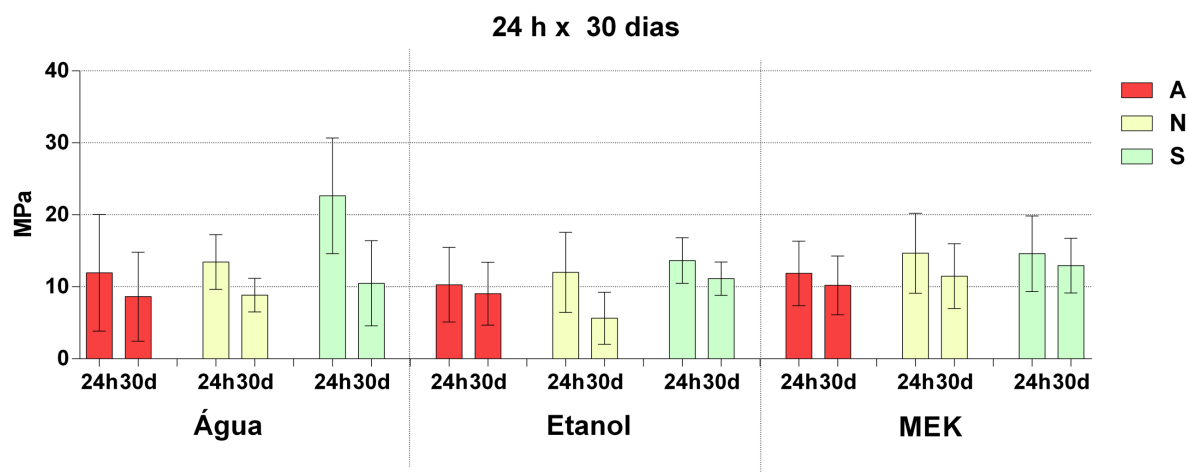
Tabela 3 – Valores de média $\pm$ desvio padrão da resistência adesiva (MPa) em cada grupo

Envelhecimento	Dentina					
	Sadia (S)		Artificialmente afetada (A)		Naturalmente afetada (N)	
	24 h	30 dias	24 h	30 dias	24 h	30 dias
Água	22,66 $\pm$ 8,03	10,49 $\pm$ 5,92	11,95 $\pm$ 8,09	8,63 $\pm$ 6,18	13,44 $\pm$ 3,80	8,84 $\pm$ 2,34
Etanol	13,64 $\pm$ 3,16	11,14 $\pm$ 2,30	10,30 $\pm$ 5,19	9,05 $\pm$ 4,35	12,02 $\pm$ 5,57	5,64 $\pm$ 3,62
MEK	14,60 $\pm$ 5,25	12,94 $\pm$ 3,81	11,88 $\pm$ 4,47	10,20 $\pm$ 4,08	14,67 $\pm$ 5,54	11,48 $\pm$ 4,49

Fonte: Elaborada pelo autor, segundo o software Minitab.

A Figura 25 apresenta graficamente a análise descritiva das médias e desvio-padrão de resistência de união (MPa), evidenciando as diferenças obtidas entre os grupos experimentais.

Figura 25 - Gráfico das médias e desvio-padrão em cada grupo



Fonte: GraphPad Prism.

5.4.2 Estatística Inferencial

5.4.2.1 Análise de variância sob 3- fatores

Na Tabela 4, apresentam-se os resultados do teste ANOVA sob 3-fatores. Segundo o teste, os fatores Dentina, Tempo de armazenamento, a interação entre dentina-tempo, a interação entre solvente-tempo e a interação entre dentina-solvente-tempo apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) na resistência de união. O resultado do fator Solvente e a interação dentina-solvente não foram estatisticamente significativos.

Tabela 4 – Resultados do teste ANOVA para os três fatores em estudo

Fatores	GL	SQ	MQ	F	<i>p</i>
Dentina (D)	2	582,9	291,45	6,98	0,002*
Solvente (S)	2	202,2	101,09	2,42	0,095
Tempo (T)	1	598,2	598,2	46,11	0,001*
D x S	4	131,0	32,75	0,78	0,538
D x T	2	138,1	69,06	5,32	0,007*
S x T	2	175,9	87,95	6,78	0,002*
D x S x T	4	221,7	55,43	4,27	0,003*
Resíduo	81	3381,6	41,75		
Error	81	1050,7	12,97		
Total	179	6482,3			

Legenda: GL: grau de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; F: razão; *p*: p-valor;
*Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: Minitab.

Na Tabela 5 são apresentados os valores (MPa) de média e desvio-padrão da resistência à microtração e os resultados do teste Tukey para a interação entre os fatores dentina-solvente-tempo. Observa-se que a maior média ($22,66 \pm 8,03$)^A foi apresentada pelos grupos da dentina sadia, que diferiu significativamente dos grupos com substrato alterado. A menor média ($5,64 \pm 3,62$)^C foi obtida pelo grupo da dentina naturalmente afetada após 30 dias de armazenamento em etanol, diferindo significativamente dos grupos de dentina naturalmente afetada armazenados nos solventes em 24 h, e dos substratos sadios armazenados em etanol (24 h) e em MEK (24 h e 30 dias). O grupo da dentina artificialmente afetada não mostrou diferenças significativas entre os solventes e os tempos de armazenamentos.

Tabela 5 – Valores de média $\pm$ desvio-padrão da resistência adesiva (MPa) e resultado do teste Tukey para a interação entre os fatores dentina-solvente-tempo

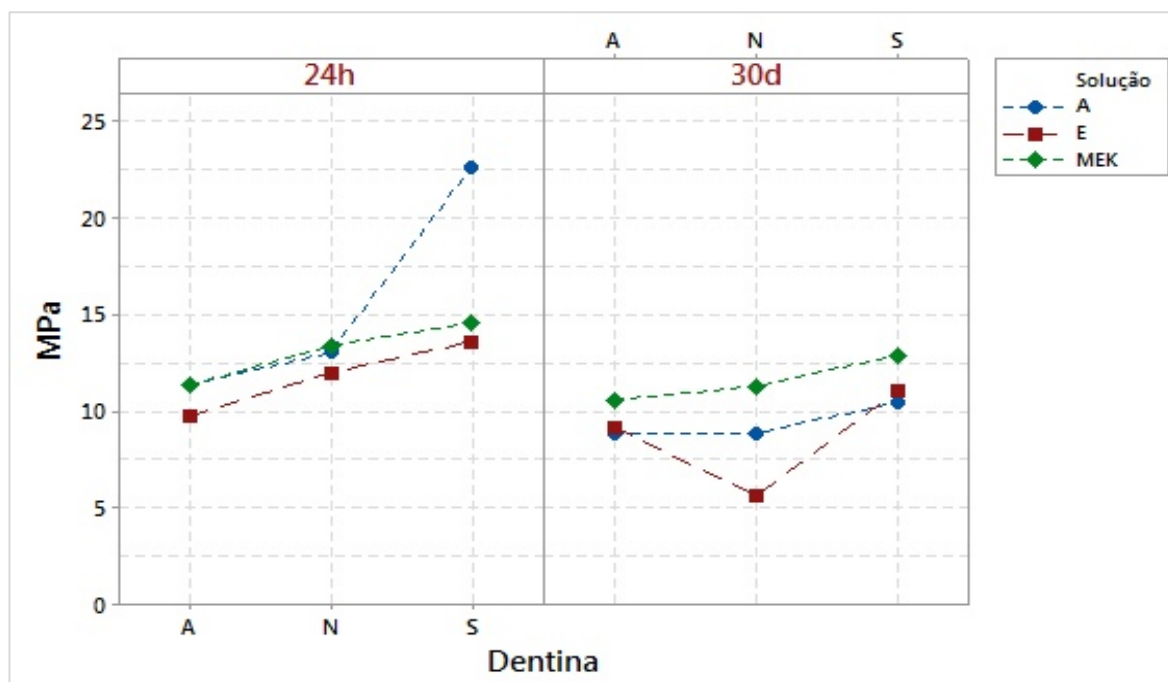
Tempo	Dentina	Solvente	Média $\pm$ DP	Grupos Homogêneos*	
24 h	Sadia	Água	22,66 $\pm$ 8,03	A	
		Etanol	13,64 $\pm$ 3,16	B	
		MEK	14,60 $\pm$ 5,25	B	
	Artificialmente afetada	Água	11,95 $\pm$ 8,09	B	C
		Etanol	10,30 $\pm$ 5,19	B	C
		MEK	11,88 $\pm$ 4,47	B	C
	Naturalmente afetada	Água	13,44 $\pm$ 3,80	B	
		Etanol	12,02 $\pm$ 5,57	B	
		MEK	14,67 $\pm$ 5,54	B	
30 dias	Sadia	Água	10,49 $\pm$ 5,92	B	C
		Etanol	11,14 $\pm$ 2,30	B	C
		MEK	12,94 $\pm$ 3,81	B	
	Artificialmente afetada	Água	8,63 $\pm$ 6,18	B	C
		Etanol	9,05 $\pm$ 4,35	B	C
		MEK	10,20 $\pm$ 4,08	B	C
	Naturalmente afetada	Água	8,84 $\pm$ 2,34	B	C
		Etanol	5,64 $\pm$ 3,62	C	
		MEK	11,48 $\pm$ 4,49	B	C

Legenda: *As médias acompanhadas da mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: Minitab.

A Figura 26 apresenta graficamente as médias ilustrando o efeito interação entre os fatores dentina-solvente-tempo.

Figura 26 – Gráfico de médias do efeito interação entre os três fatores em estudo



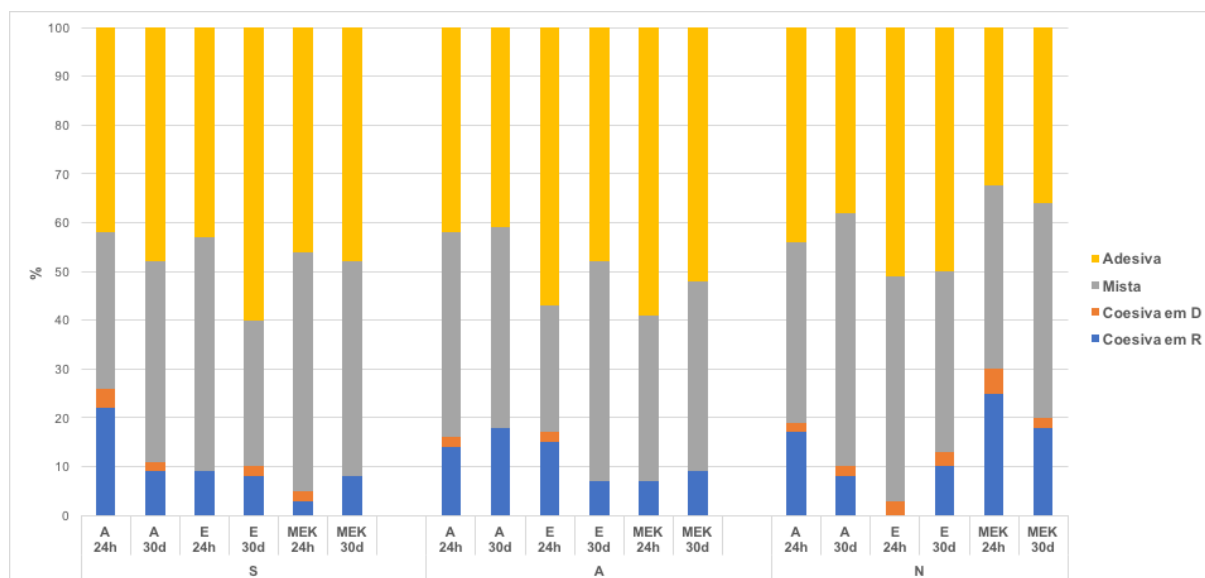
Legenda: A: artificialmente afetada; N: naturalmente afetada; S: sadia; A: água; E: etanol; MEK: metiletilcetona.

Fonte: Minitab.

5.4.3 Análise do tipo de falha

A Figura 27 ilustra graficamente a frequência, em porcentagem, dos tipos de falhas ocorridas em cada grupo. Observa-se que a falha adesiva foi mais frequente em todos os grupos. Nos grupos de dentina sadia e artificialmente afetada predominaram falhas adesivas (47 e 49%, respectivamente). O grupo da dentina naturalmente afetada apresentou maior frequência de falhas mistas (42%). Falhas coesivas ocorreram em todos os grupos, sendo mais frequentes nos grupos de dentina naturalmente afetada, principalmente armazenados em água e MEK por 24 h; e dentina sadia em água por 24 h.

Figura 27 – Gráfico de colunas da frequência (%) do padrão de fratura dos grupos experimentais



Legenda: A: água; E: etanol; MEK: metiletilcetona; S: sadia; A: artificialmente afetada; N: naturalmente afetada; D: dentina; R: resina composta.

Fonte: Elaborada pelo autor (Microsoft Excel).

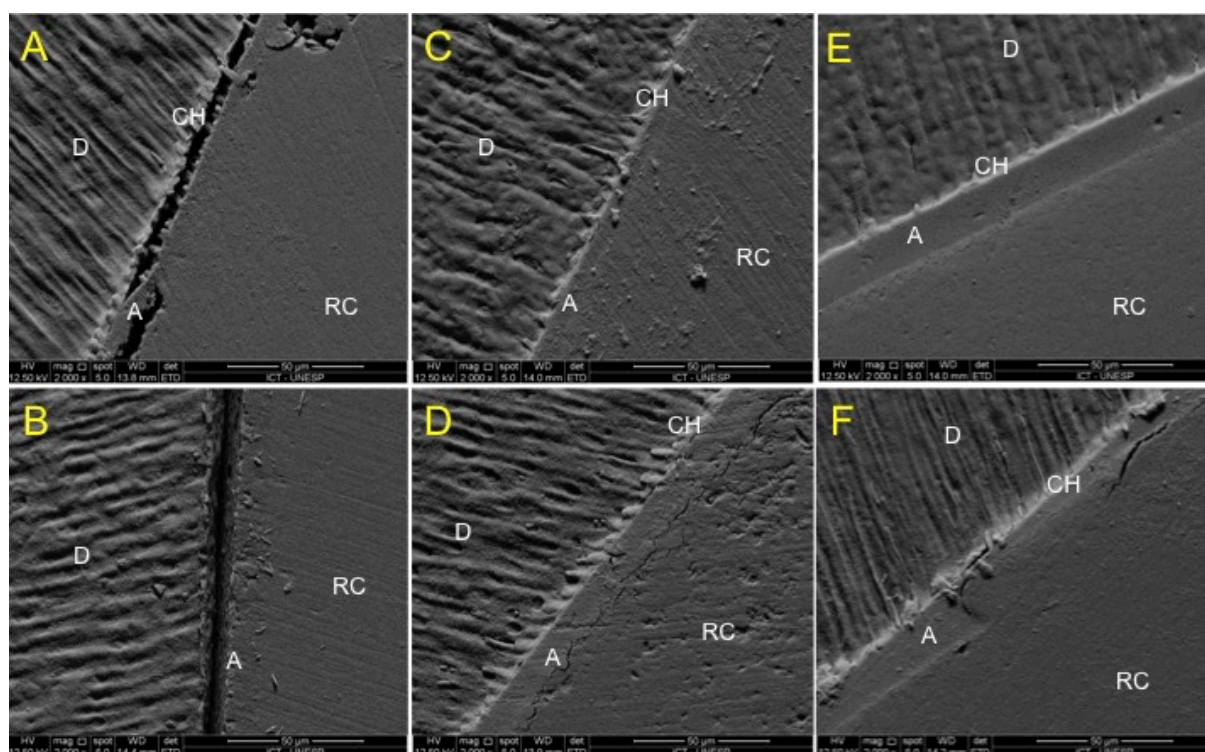
5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens ilustrativas da interface adesiva entre resina-dentina, a seguir, representam a camada híbrida (CH), camada de sistema adesivo (A), parte da dentina (D) e parte da resina composta (RC), para os respectivos solventes, de acordo com o tempo de avaliação: 24 h (acima) e 30 dias (abaixo).

Verifica-se que na Figura 28 em dentina sadia, a água proporcionou falhas na união adesiva, formação de uma fina camada híbrida com presença de poucos *tags* resinosos (Figura 28a). Com o armazenamento de 30 dias em água (Figura 28b), observa-se a falha na interface dente-restauração, com a degradação da camada híbrida, sem a presença da camada de adesivo e *tags* resinosos. No etanol, para o período 24 h (Figura 28c), mostra-se a camada híbrida formada, com significativa espessura da camada de adesivo, presença de maior quantidade de *tags* resinosos, sem tanto efeito da degradação. Contudo, para o período 30 dias (Figura 28d), observa-se a presença dos túbulos dentinários e da camada híbrida formada com

presença de *tags* resinosos, porém com trincas entre a camada de adesivo e a resina composta; mostrando assim, o efeito do etanol sobre os monômeros resinosos presentes no sistema adesivo e resina composta. Para a MEK, observa-se pouco efeito da degradação sob a interface adesiva com a formação de uma camada híbrida sem falhas e presença de poucos *tags* resinosos (Figura 28e). Após 30 dias de armazenamento, a MEK proporcionou a formação de falhas na interface e na camada de adesivo, sem interferências na camada híbrida formada (Figura 28f).

Figura 28 – Análise em MEV (2000x) para o substrato dentina sadia



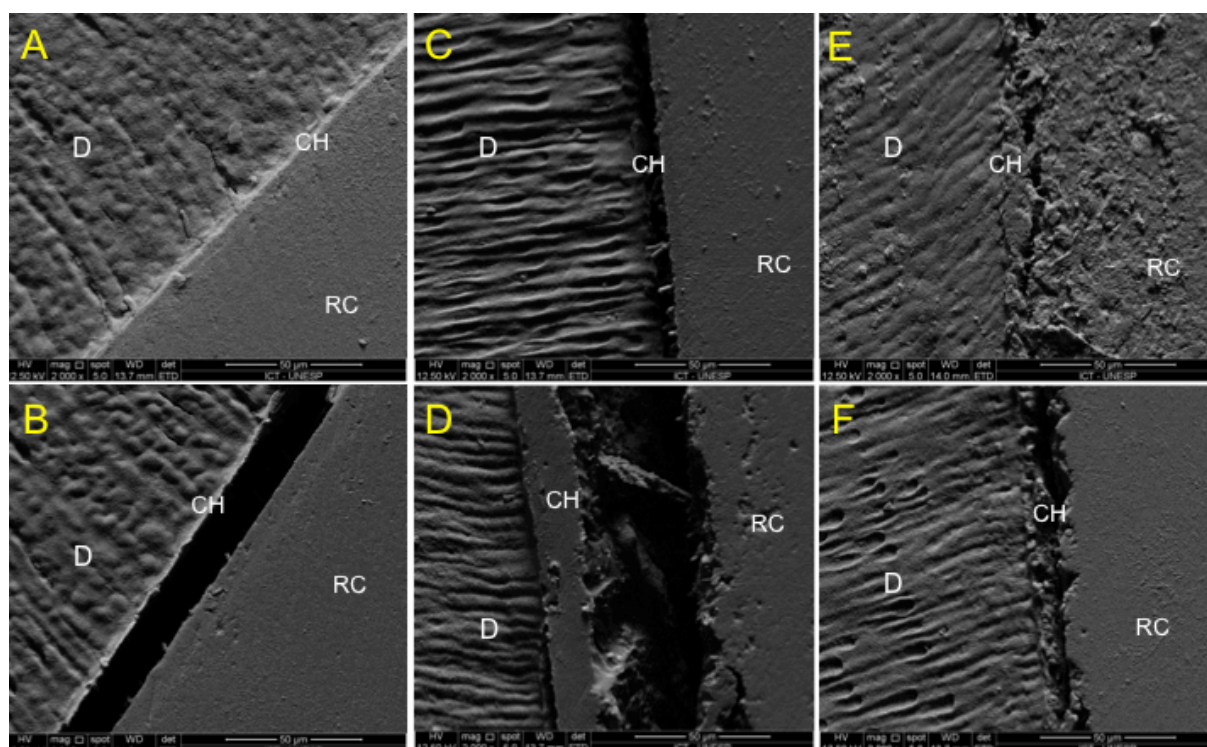
Legenda: RC: resina composta; CH: camada híbrida; D: dentina; A: camada de adesivo. a) interface adesiva armazenada em água por 24 h; b) interface adesiva armazenada em água por 30 dias; c) interface adesiva armazenada em etanol por 24 h; d) interface adesiva armazenada em etanol por 30 dias; e) interface adesiva armazenada em MEK por 24 h; f) interface adesiva armazenada em MEK por 30 dias.

Fonte: MEV.

A Figura 29 ilustra a camada híbrida formada entre o substrato dentina artificialmente afetada. A micromorfologia da dentina, mostra-se com obliteração de alguns túbulos dentinários e alteração da estrutura sadia do substrato. Para o grupo

água, observa-se a formação de uma fina e uniforme camada híbrida com a presença de alguns *tags* resinosos (Figura 29a). Após 30 dias, notam-se falhas na interface adesiva, com a presença de fenda entre substrato e material restaurador, pela separação da camada de adesivo em relação à dentina e camada híbrida formada (Figura 29b), mostrando o efeito da degradação da água sobre a interface. Para o etanol, nota-se a formação de *tags* e camada híbrida, com efeito da degradação sobre a interface adesiva (Figura 29c). No período 30 dias, há nítida falha entre a camada de adesivo e a resina composta, ilustrando o efeito da degradação gerada pelo etanol sobre o sistema adesivo e material restaurador (Figura 29d) sem, contudo, danificar a base da camada híbrida. Para a MEK, verifica-se a camada híbrida formada com a presença de alguns *tags* resinosos, contudo, pode-se observar o efeito do solvente sobre a interface adesiva com a presença de falhas e trincas, tanto no período de 24 h como para 30 dias, aparentemente de forma ainda mais agressiva (Figura 29e, 29f).

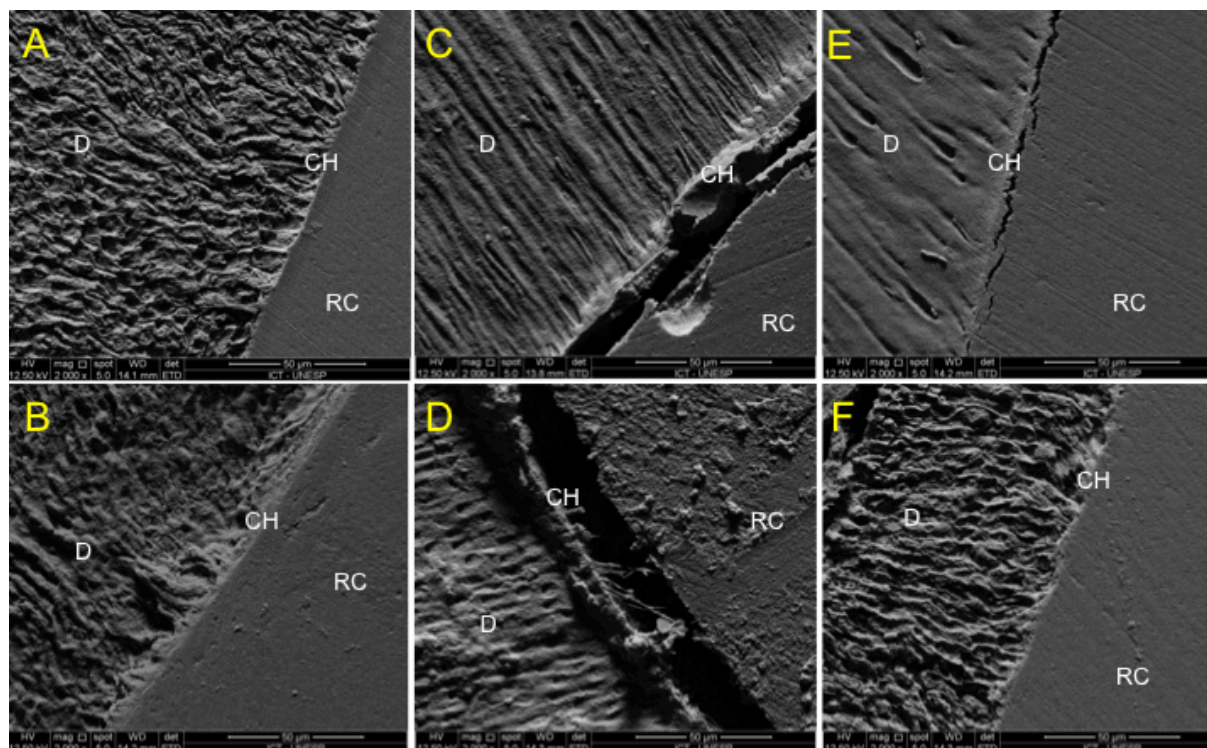
Figura 29 – Análise em MEV (2000x) para o substrato dentina artificialmente afetada



Legenda: RC: resina composta; CH: camada híbrida; D: dentina. a) interface adesiva armazenada em água por 24 h; b) interface adesiva armazenada em água por 30 dias; c) interface adesiva armazenada em etanol por 24 h; d) interface adesiva armazenada em etanol por 30 dias; e) interface adesiva armazenada em MEK por 24 h; f) interface adesiva armazenada em MEK por 30 dias.

Fonte: MEV.

Figura 30 – Análise em MEV (2000x) para o substrato dentina naturalmente afetada



Legenda: RC: resina composta; CH: camada híbrida; D: dentina. a) interface adesiva armazenada em água por 24 h; b) interface adesiva armazenada em água por 30 dias; c) interface adesiva armazenada em etanol por 24 h; d) interface adesiva armazenada em etanol por 30 dias; e) interface adesiva armazenada em MEK por 24 h; f) interface adesiva armazenada em MEK por 30 dias.

Fonte: MEV.

A Figura 30 ilustra a camada híbrida formada entre o substrato dentina naturalmente afetada, diante dos solventes e tempos de armazenamento. A micromorfologia da interface e a espessura da camada híbrida se mostram diferentes quando comparadas aos demais substratos. Diferenças foram observadas diante à estrutura da dentina naturalmente afetada com a obliteração dos túbulos dentinários. Em água, observa-se a estrutura da dentina cariada, da camada híbrida formada e da camada de adesivo de maneira uniforme e sem falhas (Figura 30a). Após o período de 30 dias em água, não houve modificações sobre a interface adesiva (Figura 30b). Diferentemente, em etanol, nota-se maior efeito do solvente, com grandes falhas na camada híbrida formada e na camada de adesivo, apesar da união adesiva e presença de *tags* resinosos (Figura 30c). Com o tempo, verifica-se maior efeito da degradação sobre a camada híbrida, com falhas na interface (Figura 30d). Para MEK, observa-se a fina camada híbrida formada com trincas entre a camada de adesivo e a resina

composta, ilustrando o possível efeito do solvente sobre as propriedades do material polimérico (Figura 30e). Para o período de 30 dias, pouca modificação sobre interface adesiva foi observada (Figura 30f).

5.6 Resistência flexural em três pontos (RF) e módulo de elasticidade (ME) do sistema adesivo

A Tabela 6 apresenta os resultados do teste ANOVA sob 2-fatores para os valores de resistência flexural em três pontos. Os fatores Solvente e Tempo apresentaram efeito estatisticamente significativos ($p < 0,05$), o que não ocorreu com o fator interação solvente-tempo ($p = 0,4013$).

Tabela 6 – Resultados do teste ANOVA 2-fatores para RF

Fatores	GL	SQ	MQ	F	<i>p</i>
Solvente (S)	2	296,3	148,2	23,99	0,0001*
Tempo (T)	1	110,1	110,1	17,82	0,0001*
Interação (S X T)	2	11,5	5,752	0,93	0,4013
Resíduo	46	284,1	6,176		

Legenda: GL: grau de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; F: razão; *p*: p-valor;
*Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: GraphPad Prism.

A Tabela 7 apresenta os valores (em MPa) de média $\pm$ desvio-padrão da resistência flexural e os resultados do teste de múltiplas comparações de Tukey para cada tempo e solvente. Observa-se que para o tempo de 24 h, a maior média ($6,51 \pm 3,00$)^A foi apresentada pelo grupo da água, que diferiu significativamente da MEK ($2,25 \pm 1,27$)^B e do etanol ($1,37 \pm 0,86$)^B. Para o tempo de 30 dias, todos os solventes apresentaram diferenças significantes entre si. Quando comparado os tempos em relação a cada solvente, verifica-se que o etanol e água não apresentaram diferenças significativas, enquanto a MEK diferiu significativamente entre 24 h e 30 dias.

Tabela 7 – Valores de média $\pm$ desvio-padrão da resistência flexural (MPa) e resultados do teste Tukey (5%) para cada solvente e tempo

Solvente	Tempo	
	24 h	30 dias
Água	6,51 $\pm$ 3,00 A a	9,49 $\pm$ 4,19 A a
MEK	2,25 $\pm$ 1,27 B a	6,33 $\pm$ 2,10 B b
Etanol	1,37 $\pm$ 0,86 B a	3,10 $\pm$ 1,73 C a

Legenda: Letras maiúsculas referem-se a coluna; letras minúsculas referem-se a linha; letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: GraphPad Prism.

Na Tabela 8, apresentam-se os efeitos dos fatores Solvente, Tempo e de sua interação sobre os valores de módulo de elasticidade. Segundo o teste ANOVA 2-fatores, os fatores Solvente, Tempo e a interação apresentaram efeito estatisticamente significantes ($p < 0,05$) no módulo de elasticidade.

Tabela 8 – Resultados do teste ANOVA 2-fatores para ME

Fatores	GL	SQ	MQ	F	p
Solvente (S)	2	11246	5623	49,09	0,0001*
Tempo (T)	1	10579	10579	92,36	0,0001*
Interação (S X T)	2	1503	751,3	6,559	0,0034*
Resíduo	40	4582	114,5		

Legenda: GL: grau de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; F: razão; p : p-valor; *Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: GraphPad Prism.

Na Tabela 9, apresentam-se os valores (em MPa) de média $\pm$ desvio-padrão do módulo de elasticidade e os resultados do teste Tukey para a interação dos fatores solvente-tempo. Verifica-se que os maiores valores médios foram apresentados pela água em 30 dias (77,67 $\pm$ 13,94)^A, que diferiu significativamente dos demais grupos. O etanol e a MEK em 24 h foram os que mostraram os menores valores de módulo de elasticidade, sem diferenças significativas entre si.

Tabela 9 – Valores de média $\pm$ desvio-padrão do módulo de elasticidade (MPa) e resultados do teste Tukey (5%)

Solvente	Tempo	
	24 h	30 dias
Água	30,86 $\pm$ 14,78 Aa	77,67 $\pm$ 13,94 Ab
MEK	11,18 $\pm$ 4,62 Ba	41,80 $\pm$ 13,94 Bb
Etanol	6,63 $\pm$ 2,80 Ba	24,25 $\pm$ 10,55 Cb

Legenda: Letras maiúsculas referem-se a coluna; letras minúsculas referem-se a linha; letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: GraphPad Prism.

5.7 Sorção (A) e solubilidade (S) do sistema adesivo

Para os dados de sorção, segundo a análise de variância (ANOVA) sob um fator, o fator Solvente apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0001 < 0,05$). De acordo com as médias obtidas, em %, observa-se que a água obteve os menores valores ($3,25 \pm 0,59$)^A de sorção do sistema adesivo, diferindo significativamente do etanol ($13,93 \pm 1,96$)^B e MEK ($15,88 \pm 1,36$)^B, como apresentado na tabela abaixo.

Tabela 10 – Valores de média $\pm$ desvio padrão da sorção (%A) e resultados do teste Tukey (5%) para o fator solvente

Solvente	Média $\pm$ DP	Grupos Homogêneos*
Água	3,25 $\pm$ 0,59	A
Etanol	13,93 $\pm$ 1,96	B
MEK	15,88 $\pm$ 1,36	B

Legenda: *As médias acompanhadas da mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism.

Com relação à solubilidade, segundo o teste ANOVA sob um fator, o fator Solvente apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,0161 < 0,05$). Conforme as médias obtidas, em %, e o teste de múltiplas comparações de Tukey, verifica-se que a água obteve os menores valores médios ($7,07 \pm 0,22$)^A em relação à solubilidade do sistema adesivo, diferindo significativamente do etanol ($12,14 \pm 3,12$)^B. Enquanto, a MEK ($9,92 \pm 2,55$)^{AB} apresentou um comportamento intermediário, sem diferenças significativas entre água e etanol (Tabela 11).

Tabela 11 – Valores de média $\pm$ desvio padrão da solubilidade (%S) e resultados do teste de múltiplas comparações de Tukey (5%) para o fator solvente

Solvente	Média $\pm$ DP	Grupos Homogêneos*	
Água	$7,07 \pm 0,22$	A	
MEK	$9,92 \pm 2,55$	A	B
Etanol	$12,14 \pm 3,12$		B

Legenda: *As médias acompanhadas da mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism.

6 DISCUSSÃO

Apesar dos avanços obtidos nos sistemas adesivos, a interface de união adesiva continua a ser o elo frágil para estabilidade e longevidade de uma restauração adesiva em dentina (Spencer et al., 2010, 2012; Amaral et al., 2016). O principal fator que está diretamente ligado a este processo de degradação na interface de união é a água (Ferracane, 2006; Kostoryz et al., 2009; Mobarak, Daifalla, 2012). Tanto a água advinda da estrutura do substrato dentinário quanto a água presente na cavidade bucal e dieta alimentar. Dentro deste contexto, este estudo propôs avaliar a interface adesiva em diferentes substratos sob pressão pulpar simulada e frente ao desafio de diferentes solventes, com o intuito de elucidar seus efeitos diante dos procedimentos restauradores adesivos.

Neste estudo, utilizou-se três tipos de dentina (sadia, artificialmente afetada e naturalmente afetada), a fim de se verificar como as diferenças químicas e físicas afetam a estabilidade da interface adesiva. A dentina sadia é utilizada na maioria dos métodos laboratoriais para estudos de adesão, e possui características próprias, como: composição, morfologia ultra-estrutural, presença de fluido dentinário, diferenças de diâmetro e densidade dos túbulos, comunicação com a polpa; os quais interferem diretamente sobre a resistência de união (Pashley, 1989, 1992; Pashley, Carvalho, 1997; Perdigão, 2010; Bedran-Russo et al., 2017). Contudo, na prática clínica, não é o real substrato onde se realizam restaurações adesivas. Este real substrato é a dentina afetada por cárie, que difere da sadia no tangente ao conteúdo mineral, permeabilidade e propriedades mecânicas (Fusayama et al., 1966; Fusayama, 1979; Nakajima et al., 1995; Shibata et al., 2016). Diante dessas diferenças, diversas metodologias para indução e/ou produção de um substrato artificialmente afetado, próximo às condições clínicas, estão relatadas na literatura (Erhardt et al., 2008b; Marquezan et al., 2009; Azevedo et al., 2011; Steiner-Oliveira et al., 2011; Carvalho FG et al., 2013; Joves et al., 2013, 2014; de Azevedo et al., 2014). Neste estudo, avaliou-se o protocolo de ciclagem de pH, proposto por Erhardt et al. (2008b, 2008c) para criação da dentina artificialmente afetada (processo DES-RE), comparando-o à dentina sadia e naturalmente cariada como diferentes substratos adesivos.

Para verificar a efetividade do processo de desmineralização na produção da dentina artificialmente afetada por cárie, utilizou-se a fluorescência a laser, visto que esta metodologia está presente na literatura e se mostra eficaz na detecção de lesões de cárie (Rodrigues et al., 2009; Celiberti et al., 2012; de Azevedo et al., 2014). De acordo com os resultados obtidos, diferenças significantes foram observadas entre os valores numéricos obtidos no momento inicial e após o processo de ciclagem de pH (Tabela 1). De forma conjunta, análises em MEV foram realizadas para comparar o substrato sadio e artificialmente afetado, demonstrando o nível de desmineralização a que a dentina foi submetida, bem como a alteração produzida na superfície diante da ciclagem de pH (Figura 19). Estas observações estão em acordo com os estudos prévios apresentados por Erhardt et al. (2008a, 2014) que mostraram que o uso do modelo de lesão artificial de cárie por pH, proporcionou alterações específicas na dentina (como túbulos obliterados) e nos valores de microtração, evidenciando ser um método eficaz na produção de um substrato diferente do sadio. Com isso, pode-se afirmar que a proposta do protocolo de uma dentina afetada por cárie, produzida artificialmente através da ciclagem de pH, mostrou-se efetiva e possibilitou a utilização deste substrato nos testes de resistência adesiva corroborando os achados de Erhardt et al. (2008b, 2008c).

Ao se avaliar o substrato sob o qual a restauração adesiva será realizada, constata-se que as características da superfície também serão diferentes, podendo assim, interferir diretamente sobre os resultados de resistência de união. Tais diferenças entre os substratos foram comprovadas por este presente estudo.

Primeiramente, pelas análises em espectroscopia, pode-se verificar quimicamente os espectros de absorbância dos conteúdos de fosfato, carbonato, amida e água, presentes nos diferentes substratos dentinários. Diante dos resultados apresentados (Figura 23), o substrato sadio mostrou picos de maior intensidade, principalmente, para o fosfato, carbonato e amida, e menor conteúdo de água quando comparado à dentina naturalmente cariada. Este fato também foi observado por Maske et al. (2005) e Wang et al. (2007). Todavia, a literatura ainda possui informações limitadas sobre a estrutura química dos substratos sadios e afetados pela cárie, e nenhum relato sobre espectroscopia em dentina artificialmente afetada foi encontrado. No presente estudo, a dentina produzida artificialmente promoveu redução nos picos de amida, aproximando-se das características do substrato

naturalmente afetado. Em contrapartida, os picos dos grupos fosfato e carbonato sofreram redução em suas intensidades em relação à dentina sadia, mas não se aproximando das características da dentina naturalmente afetada. Nota-se assim, que a estrutura química da dentina diferiu entre si, e que o protocolo de produção artificial promoveu a alteração do substrato, mas não se igualou às condições naturais.

A redução observada no pico do grupo amida para o substrato afetado por cárie em relação ao substrato sadio pode estar relacionada com a degradação das fibrilas de colágeno durante o processo carioso, fato também observado nos estudos de Maske et al. (2015). Enquanto que, a redução do conteúdo mineral (grupos fosfato e carbonato) associa-se ao processo cíclico da desmineralização-rem mineralização, indicando que estes grupos são dissolvidos durante o processo carioso (Wang et al., 2007). Assim, o conteúdo mineral da matriz intertubular é perdido durante o processo da cárie, e o seu volume é preenchido pela água advinda da câmara pulpar. Diante disso, maior quantidade de água intrínseca na matriz de colágeno exposta (Ito et al., 2005b; Tjäderhane, 2015) é observada, justificando o aumento do pico referente à água para os substratos afetados.

Além disso, pela microdureza da superfície, as médias sofreram redução significativas no substrato afetado por cárie, diferenciando significativamente do substrato sadio. A dentina artificialmente afetada apresentou um comportamento intermediário, semelhante ao observado na análise de espectroscopia por FTIR. As médias de microdureza foram similares entre a dentina naturalmente afetada e artificialmente afetada, apesar do desvio-padrão alto. Alguns estudos relatam o fato da diferença do desvio-padrão entre os substratos estar relacionado à variabilidade estrutural desenvolvida durante o processo natural da cárie, contrastando com o protocolo artificial, onde a lesão é criada em curto período de tempo e sob condições controladas (Joves et al., 2013, 2014; Lenzi et al., 2015). Os resultados apresentados na Tabela 2 corroboram estudos anteriores (Fusayama et al., 1966; Perdigão, 2010; Joves et al., 2013; Lenzi et al., 2015), em que a dentina sadia apresentou maiores valores de dureza, diferindo da dentina afetada e, os tecidos afetados naturais e artificiais foram semelhantes (Marquezan et al., 2009; Joves et al., 2013, 2014; Lenzi et al., 2015). Ainda, os valores de dureza obtidos para dentina sadia (em torno de 52 KHN) e dentina artificialmente afetada (18 KHN) foram similares aos apresentados por Erhardt et al., em 2008a.

Nas imagens da interface de união em MEV, mostra-se claramente a morfologia e as características estruturais das diferentes dentinas. Ao se comparar, verifica-se a uniformidade e direcionamento dos túbulos dentinários em dentina sadia; alteração da morfologia pela desmineralização superficial de maneira uniforme em dentina artificialmente produzida; e, diferenças morfológicas com obliteração de túbulos em dentina naturalmente afetada (Figuras 30, 31, 32). O processo natural da cárie envolve alterações biofisiológicas em toda dentina, que não são induzidas e reproduzidas por protocolos *in vitro* (Joves et al., 2014). Para todos os grupos testados, a camada híbrida, a camada de adesivo e os *tags* resinosos formados nos substratos afetados exibiram diferenças morfológicas em relação ao substrato sadio.

Diante do presente estudo, pode-se observar que o substrato afetado obtido por ciclagem de pH foi favorável em termos de mimetizar as propriedades mecânicas de um substrato naturalmente afetado, diferindo ambos do substrato sadio (Tabela 2 e Figura 23).

Uma vez que a camada híbrida continua a ser o principal mecanismo de retenção dos sistemas adesivos à dentina, sua adequada formação se constitui em uma variável importante na durabilidade e eficácia da adesão. Como já relatado na literatura, a camada híbrida formada e a profundidade dos *tags* resinosos não se correlacionam com os valores de resistência de união (Finger et al., 1994; Nakajima et al., 1995; Prati et al., 1998; Xuan et al., 2010). Alguns autores sugerem uma possível relação entre qualidade da hibridização e resistência adesiva (Finger et al., 1994). No presente estudo, o procedimento restaurador adesivo foi realizado sob mesmo protocolo para todas as amostras. Ou seja, todas as amostras foram restauradas, na técnica adesiva “etch-and-rinse”, sob simulação de pressão pulpar com água, a fim de garantir a presença da umidade na dentina. Com isso, a resistência de união apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os tipos de dentina, bem como diferenças na camada híbrida formada (Figuras 28, 29 e 30).

De acordo com relatos prévios, a resistência de união em dentina afetada por cárie é tipicamente menor do que a dentina sadia, independentemente do protocolo adesivo (Yoshiyama et al., 2002; Ceballos et al., 2003; Shibata et al., 2016). O mesmo foi observado neste estudo, com redução significativa na resistência de união, tanto da dentina naturalmente quanto artificialmente afetada, rejeitando, desta forma, a primeira hipótese de nulidade testada.

A técnica do condicionamento ácido total sobre a dentina naturalmente afetada pode ter permitido uma desmineralização mais profunda pelo fato de apresentar uma matriz intertubular já altamente desmineralizada. Ainda, devido à oclusão dos túbulos por cristais minerais, observou-se menor permeabilidade intratubular do sistema adesivo, interferindo diretamente na morfologia da zona da interface de união. Este fato pode ser observado pelas imagens em MEV (Figura 30), em que houve a formação de uma fina camada híbrida, sem evidências de *tags* resinosos. O mesmo pode ter ocorrido na dentina artificialmente afetada que, pela obliteração dos túbulos e alteração da morfologia de superfície, dificultou a adequada união adesivo-substrato, diminuindo a resistência adesiva quando comparados à dentina sadia. Observando-se as imagens em MEV (Figura 29), constata-se que houve a formação da camada híbrida com evidência de poucos *tags* resinosos neste substrato, enquanto que, na dentina sadia, houve a formação de uma fina camada híbrida.

Além disso, as propriedades físico-mecânicas e químicas da dentina, expressas através das análises de dureza e espectroscopia, mostram uma correlação significativa com os resultados de resistência de união apresentados. O baixo conteúdo mineral de fosfato e carbonato na estrutura da dentina afetada, reflete a redução na microdureza e, conseqüentemente, os menores valores de resistência de união. Esta correlação corrobora com os achados de Yoshiyama et al. (2002), Perdigão (2010) e Rocha et al. (2014).

Entretanto, a longevidade da resistência de união entre dentina e restauração tem sido cada vez mais questionada. Estudos mostram que a durabilidade da adesão dentinária pode ser afetada, entre diversos fatores, pela umidade durante o procedimento adesivo e pela absorção de água na interface (inerente a longos períodos em meio bucal). Por estas razões, estudos *in vitro* são conduzidos de forma a simular tais condições de umidade. Tais estudos mostram que os procedimentos adesivos realizados sob simulação de pressão e armazenados longitudinalmente em diferentes meios, apresentam resistência de união significativamente menores, quando comparados às condições laboratoriais de dentina “desidratada” e curtos períodos de armazenamento (Özok et al., 2004; Sauro et al., 2007; Belli et al., 2010; Holleben, 2013; Gonçalves, 2014).

Deve-se considerar que a remoção do tecido pulpar e a ausência de fluidos dentinários promove uma condição diferente da dentina vital. A diferença entre dentes vitais e não-vitais foi observada no estudo de Helfer et al., realizado em cães, que constatou que dentes com remoção dos tecidos pulparem continham 9% a menos de umidade do que dentes com polpa vital (Helfer et al., 1972). Por isso, este estudo preconizou a presença da simulação de pressão em todos os grupos, a fim de reproduzir as condições de dentes vitais. Para simular a pressão intrapulpar e uma perfusão dentinária semelhante ao fluxo fisiológico, utilizou-se um mecanismo de entrada e saída de água no interior da câmara pulpar. Esse mecanismo foi baseado em estudos prévios que já realizaram este protocolo para simulação (Silva et al., 2016; Santis et al., 2017).

Assim, o molhamento da superfície da dentina e a presença de pressão pulpar representam variáveis críticas durante os procedimentos adesivos, especialmente nos estudos *in vitro* com a intenção de simular as condições *in vivo* (Pashley, 1992; Sauro et al., 2007). A perfusão dentinária dificulta e/ou impede a infiltração de monômeros resinosos no interior dos túbulos e na rede de colágeno desmineralizado, prejudicando a formação de *tags* resinosos e da camada híbrida (Özok et al., 2004; Sauro et al., 2007; Spencer et al., 2010), especialmente na dentina afetada por cárie, que contém significativamente mais água (cerca de 2,7 vezes) quando comparada à dentina sadia (Ito et al., 2005b). A presença da pressão pulpar através da camada de adesivo e camada híbrida, pode proporcionar mais hidrólise e plastificação dos polímeros, comprometendo a durabilidade a longo prazo das interfaces adesivas. As características hidrolíticas promovidas pela simulação de pressão intrapulpar também podem ser encontradas em pesquisas anteriores (Sauro et al., 2008; Feitosa et al., 2012).

No entanto, a maioria dos trabalhos em adesão com simulação de pressão pulpar foram realizadas em substrato sadio e, portanto, poucos são os relatos em dentina afetada por cárie (Mobarak, 2011; Mohamed et al., 2015). Mohamed et al. (2015) avaliaram a durabilidade adesiva de cimentos resinosos em dentina sadia e afetada por cárie, com e sem simulação de pressão pulpar e observaram efeito significativo na resistência adesiva, tanto pelo tipo de substrato, como pela presença da simulação de pressão. Semelhantemente, o presente estudo mostrou redução significativa na resistência de união para dentina afetada por cárie na presença de

pressão pulpar simulada. Contudo, não se realizaram comparações dos resultados com grupo sem simulação de pressão pulpar, uma vez que a maioria dos relatos da literatura preconizaram o estudo da resistência adesiva em dentina sadia e afetada por cárie sem pressão pulpar simulada. Sendo assim, pode-se considerar que a simulação de pressão intrapulpar não foi um fator de análise do presente estudo.

Carvalho et al. relatam em seus estudos que a degradação da interface adesiva pode ocorrer de forma mais acelerada em estudos laboratoriais do que em situações clínicas reais (Carvalho RM et al., 2012). Esta degradação acelerada se deve às formas e aos tempos de armazenamento avaliados. Os espécimes seccionados em palitos promovem o envelhecimento acelerado da interface adesiva, pois facilita a difusão da água (Pashley et al., 1999) diretamente sobre área restaurada. A pequena área adesiva dos palitos (aproximadamente 1 mm²) constitui-se em uma vantagem, no sentido de que apresenta menos falhas e, conseqüentemente, maior resistência (Goracci et al., 2004; Armstrong S et al., 2010). Por isso, neste estudo foram armazenados palitos para degradação de interface, a fim de possibilitar o desafio dos solventes diretamente sobre a área restaurada, de maneira uniforme para todas as amostras.

Quando a resistência adesiva dentinária é estudada *in vitro*, por meio do teste de microtração, o meio de armazenamento comumente utilizado nos estudos de degradação da interface adesivo-dentina é a água deionizada, a 37°C (Van Landuyt et al., 2011; De Munck et al., 2012), pois imita o ambiente intraoral úmido em cuja restauração permanece imersa (De Munck et al., 2005). A água age na hidrólise das ligações peptídicas da matriz colágena, sendo acelerada pela ação enzimática, resultando na diminuição progressiva das propriedades mecânicas da interface, favorecendo a degradação ao longo do tempo (Carrilho et al., 2005). Além disso, atua na solubilidade dos componentes da camada híbrida e do sistema adesivo (Mobarak, Daifalla, 2012).

O armazenamento direto por até 6 meses em água diminuiu significativamente os valores de resistência de união em estudos prévios (Deng D et al., 2014; Reis et al., 2015). No presente estudo, os palitos foram armazenados diretamente em água por 30 dias, e diferenças estatisticamente significativas foram evidenciadas na resistência adesiva, porém somente em dentina sadia. Este dado é suportado pelos estudos de Reis et al. (2015) e Skovron et al. (2010), que também armazenaram

palitos em água e verificaram redução da resistência adesiva após um mês de armazenamento em água. Diferentemente, a dentina artificialmente afetada e naturalmente afetada, sofreram redução nas médias já na avaliação imediata, mas sem diferenças significantes ao se comparar ao maior tempo de degradação. Provavelmente isto se deva a uma maior susceptibilidade de ambos substratos à degradação, quando comparados ao substrato sadio.

Nas imagens de MEV, verifica-se o efeito do armazenamento em água sobre a interface, onde se observam falhas e fendas entre a camada híbrida e substrato. Concordando com a literatura, nota-se que pela exposição direta ao meio úmido, a sorção de água acelerou a degradação dos materiais resinosos e aumentou a desintegração das fibrilas de colágeno da camada híbrida (Hashimoto et al., 2003).

A água também facilita a degradação química dos sistemas adesivos. Frente à umidade proveniente da dentina condicionada e desmineralizada, o adesivo exibe a separação de fases, onde pela característica hidrófoba inerente, o BisGMA tende a migrar para a fase resinosa e o HEMA (hidrófila) para a fase aquosa. Devido a isso, a fase resinosa exibe uma eficiente polimerização, o que não ocorre na fase aquosa. Quando não ocorre a polimerização completa da fase hidrófila, os grupos funcionais tornam-se presos como monômeros residuais ou radicais não reativos. Assim, a água se difunde entre os domínios hidrófilos pouco polimerizados, solubilizando os monômeros não reagidos, fragilizando a união adesiva. Nestas condições, a combinação da degradação e a separação dos componentes resinosos acarretam um processo que prejudica a integridade e durabilidade adesiva (Kostoryz et al., 2009; Park et al., 2009a; Abedin et al., 2014).

O sistema adesivo assemelha-se a uma ponte, a qual promove a transferência de carga entre resina composta e dentina (Barcellos et al., 2016). São materiais viscoelásticos que devem ter propriedades mecânicas e físicas para suportar as variações de tensões frente aos esforços mastigatórios (Singh et al., 2013). A redução nas suas propriedades físico-mecânicas pode levar à degradação da interface de união à dentina, favorecendo à falha prematura da restauração (Barcellos et al., 2016).

Assim, a água, como solvente, age como um plasticizador, diminuindo o módulo de elasticidade e resistência dos sistemas adesivos (Singh et al., 2013). A ação de determinado solvente dependerá da polaridade entre as substâncias (Marghalani, Watts, 2013). As resinas altamente polares, como os adesivos

comerciais atuais, absorvem mais água (Reis et al., 2015), visto que a água é um solvente polar bem conhecido pelas interações com os componentes hidrofílicos dos materiais resinosos. A consequência desse aumento da absorção de água é a diminuição das propriedades mecânicas (Spencer et al., 2010).

A sorção e solubilidade são importantes propriedades físicas que afetam as propriedades mecânicas, produzindo efeitos deletérios sobre a estrutura da matriz resinosa (Park et al., 2009b; Zankuli et al., 2014). A sorção é um processo de difusão na fase orgânica do material resinoso, relacionando com a hidrofiliidade e composição química. Assim, a cinética do processo pode ser mais lenta ou mais rápida dependendo da composição do material (Dietschi et al., 1994). Como a composição exata do sistema adesivo comercial é desconhecida devido ao segredo industrial da empresa, dificulta-se correlacionar e determinar a hidrofiliidade dos respectivos componentes com os testes apresentados.

Os resultados deste estudo evidenciaram que a água foi o solvente que promoveu menor sorção e solubilidade do sistema adesivo avaliado (Tabelas 8 e 9). Observa-se que o adesivo avaliado contém uma composição mais hidrófoba (Quadro 1), diferindo a polaridade entre os componentes, o que pode ter promovido a sorção e solubilidade somente na parte hidrofílica. Ainda, de acordo com Reis et al. (2015) e Marghalani e Watts (2013), o parâmetro de solubilidade da água é maior que dos monômeros metacrilatos, tornando-a um solvente “fraco”. Ou seja, mais tempo seria necessário para promover maior plastificação e degradação dos polímeros.

A sorção pode deteriorar as propriedades mecânicas dos monômeros resinosos, como o módulo de elasticidade, produzir alterações no mecanismo de deformação, afetando negativamente a distribuição do estresse sobre a interface adesiva (Ito et al., 2005a). Embora diferenças significativas tenham sido observadas nos valores médios de resistência flexural e módulo de elasticidade no presente estudo (Tabelas 7 e 9), a água promoveu menor influência sobre as propriedades mecânicas conforme os tempos de avaliação. Na literatura, há uma tendência conflitante entre os estudos sobre o efeito do armazenamento em água, pois apresentam-se aumentos e reduções das propriedades mecânicas (como resistência e módulo de elasticidade) ao longo do tempo (Sabbagh et al., 2002; Singh et al., 2013). Além disso, muitos relatos sobre essas propriedades foram baseados em estudos com resinas compostas e poucos estudos foram associados à sistemas adesivos.

Em um estudo realizado em paralelo, observou-se que, para o mesmo sistema adesivo, houve uma redução nos valores das propriedades mecânicas ($RF=4,23\pm1,57$; $ME=20,36\pm4,80$) e aumento das propriedades físicas ($\%A=22,32\pm1,91$; $\%S=14,49\pm1,81$) em relação aos dados obtidos no presente estudo. Contudo, tais diferenças foram verificadas sem ação de qualquer meio de imersão sobre o sistema adesivo. Diante disso, nota-se que a água exerceu efeitos sobre as propriedades do material, porém pouco significativos em relação aos demais solventes estudados.

Além da água, a restauração adesiva está rotineiramente exposta a outros meios que podem favorecer a degradação da interface. Diante disso, este estudo comparou tanto o efeito da degradação em água quanto em outros solventes sobre a interface adesiva. Solventes orgânicos estão presentes em alguns enxaguatórios bucais, bebidas e alimentos e promovem maior liberação dos componentes resinosos (principalmente BisGMA) quando comparados à água.

A metiletilcetona (MEK), ou também conhecida como butanona, é um solvente orgânico à base de cetona, presente em algumas qualidades de frutos e vegetais. Este solvente foi utilizado no estudo de Marghalani e Watts (2013), no qual avaliaram as propriedades de materiais resinosos após imersão em diferentes solventes por 30 dias. Os autores relataram que a solubilidade da MEK se aproxima da solubilidade dos monômeros metacrilatos, verificando diferenças significativas na deformação dos materiais. Na literatura odontológica, há pouco estudo sobre a ação do MEK sobre as propriedades dos materiais resinosos. Por isso, este estudo optou pelo uso desse solvente, na proposta de elucidar seus efeitos sobre a interface adesiva e sobre os materiais restauradores.

Quando se observa os resultados de resistência de união para armazenamento em MEK, não houveram diferenças significativas para os diferentes tipos de dentina. As médias obtidas estão mais relacionados às características do substrato do que ao meio de armazenamento. Verifica-se na interação entre os fatores, que o tempo de armazenamento alterou a resistência de união (30 dias), quando comparada ao tempo 24 h, mas sem diferenças significativas (Tabela 5). Todavia, pode-se constatar que a MEK exerceu menor efeito sobre a degradação da interface. Seu potencial solvente foi observado nas imagens de MEV, evidenciando falhas e fendas entre a camada de adesivo e resina composta. Sendo assim, a

degradação promovida pela ação da MEK ocorreu sobre os monômeros dos materiais resinosos, sem interferências na camada híbrida formada.

A ação da MEK sobre o sistema adesivo foi verificada ainda pela redução da resistência flexural e módulo de elasticidade (Tabelas 7 e 9) em relação à água. Mesmo com a redução, houve o aumento nos valores de RF e ME obtidos quanto ao tempo de armazenamento. Como os parâmetros de solubilidade deste solvente se assemelham aos dos monômeros presentes na composição tanto do material adesivo como na resina composta, podem ter contribuído para maior sorção e solubilidade, como observadas na Tabela 10 e 11. Consequentemente, este solvente pode ter favorecido a dissolução da matriz resinosa com a degradação tanto parte hidrófila como hidrófoba, alterando as propriedades mecânicas. Este fato mostra o efeito da degradação deste solvente diretamente sobre os monômeros resinosos (como BisGMA e HEMA), o que justifica, ainda, as fendas apresentadas entre os materiais resinosos.

Outro solvente orgânico, o etanol, tem potencial de degradação dos principais componentes das resinas adesivas e restauradoras. Presente em bebidas e alimentos, o etanol pode comprometer a longevidade das restaurações adesivas, pois é capaz de penetrar na matriz resinosa, levar a uma maior absorção de água, dilatação e plasticização da matriz e promover a liberação de monômeros não reagidos (Yap et al., 2001; Zhang, Xu, 2008). Essa dissolução parcial da matriz resinosa pode resultar na degradação da interface, prejudicando a resistência de união. Neste estudo, a concentração da solução de etanol (99%) foi utilizada de acordo com estudos prévios que avaliaram o efeito do solvente nas propriedades dos materiais resinosos (Marghalani, Watts, 2013; Sideridou et al., 2015). Além disso, optou-se pelo uso do etanol absoluto (99%) para verificar o efeito exclusivamente do etanol, separadamente da água. Este fato vai em desacordo com a maioria dos estudos que utilizaram de solução de etanol (50% - 75%) para armazenamento e envelhecimentos (Lee et al., 1994; Yap et al., 2001; Akova et al., 2006; Zhang, Xu, 2008; Reis et al., 2015; Sideridou et al., 2015).

Lee et al. (1994) avaliaram a exposição às soluções de simulação oral (saliva artificial e etanol) sobre a resistência adesiva à dentina sadia, e mostraram que a solução de etanol promoveu efeito prejudicial à resistência de união, revelando por MEV, numerosas falhas e fissuras desenvolvidas após sete dias de armazenamento.

Este fato corrobora os resultados obtidos neste presente estudo, pois todos os substratos exibiram uma diminuição na resistência adesiva em função do tempo de armazenamento em etanol. Além disso, falhas entre os materiais resinosos também foram observadas em MEV.

Parâmetros de solubilidade semelhantes entre este solvente e os monômeros da matriz resinosa (como BisGMA) podem resultar na maior eluição dos componentes resinosos e acelerar o envelhecimento da restauração (Lee et al., 1994, 1995; Marghalani, Watts, 2013). Além disso, Lee et al. (1994) afirmam que a difusividade da solução de etanol é maior que a da água para os compósitos resinosos, provavelmente pelas características químicas e solubilidade dos componentes. Essa maior capacidade de permeabilidade do etanol pode explicar a maior degradação ocorrida na interface e, conseqüentemente, a redução dos valores de resistência de união.

Os resultados do presente estudo mostram que o etanol apresentou diferenças estatisticamente significativas tanto para o tempo de 24 h quanto para 30 dias. Como já mencionado, o etanol já promoveu um efeito sobre o material resinoso após sete dias de armazenamento (Lee et al., 1994), ou seja, por consequência, após os 30 dias de imersão, seus efeitos foram mais acentuados.

O tempo de armazenamento em etanol também mostrou efeito significativo sobre as propriedades mecânicas do sistema adesivo avaliado (Tabela 7 e 9). Muitos materiais mostraram aumento da resistência flexural e elasticidade entre 24 h e um mês, e relativa estabilidade até 6 meses de armazenamento (Sabbagh et al., 2002). Colaborando com esses autores, o presente estudo apresentou um aumento tanto da resistência à flexão quanto do módulo de elasticidade após 30 dias de imersão, mas sem comparação por tempos maiores de avaliação. Segundo os estudos Gladys et al., o módulo de elasticidade teve um aumento durante o primeiro mês e ligeira redução dos valores médios até manter uma estabilidade (Gladys et al., 1997). Para Sabbagh et al. (2002), após seis meses, o material atinge um estado estável e nenhuma redução adicional acomete as propriedades, pois a rede de polímeros estará saturada pelo meio de imersão. Zankuli et al. (2014) complementam que o máximo de ganho do material é alcançado no primeiro mês de imersão. Por isso, todas as amostras foram imersas em cada solvente e avaliadas após 30 dias de armazenamento.

Como a solubilidade dos monômeros resinosos presentes no sistema adesivo (como HEMA e BisGMA) é maior em solvente orgânico que em água (Zhang, Xu, 2008; Yesilyurt et al., 2009), os resultados apresentados no presente estudo mostraram diferenças estatisticamente significativas quanto às suas propriedades físico-mecânicas, tanto na sorção e solubilidade quanto na RF e ME. Este fato pode ser decorrente da facilidade deste solvente em penetrar na matriz resinosa (maior sorção), o que resultou em monômeros resinosos hidrófilos e hidrófobos mais eluídos (maior solubilidade), prejudicando a resistência à flexão e módulo de elasticidade do material (Hosaka et al., 2007; Zhang, Xu, 2008). Colaborando com a literatura (Lee et al., 1996; Yap et al., 2001; Zhang, Xu, 2008; Marghalani, Watts, 2013; Reis et al., 2015) que também observaram efeito significativo do etanol sobre as propriedades dos materiais resinosos. Nota-se, portanto, que o etanol exerceu maior e mais rápida degradação sobre as propriedades do sistema adesivo, tornando-o um solvente para envelhecimento clinicamente relevante.

Quanto ao substrato de união, verificou-se que a dentina naturalmente afetada sofreu drasticamente o efeito da imersão em etanol. Os baixos valores de resistência de união na interação dos fatores dentina-tempo-solvente, mostraram que as características químicas advindas da dentina afetada associada ao desafio do etanol sobre o material resinoso influenciam diretamente as características da interface adesiva. A comparação com a literatura dos resultados sobre diferentes tipos de dentina utilizando a metodologia proposta não foi possível por não se encontrarem estudos semelhantes para serem confrontados.

Como observado, os materiais restauradores se deterioram em presença de água e solventes, por mecanismos de hidrólise, em função do tempo. Por isso, este estudo avaliou a resistência adesiva em dois momentos: após 24 h e 30 dias de armazenamento. Com o aumento no tempo, a resistência adesiva diminuiu, corroborando com os resultados observados na literatura. Este resultado pode refletir a escolha do armazenamento em palitos para avaliação da degradação na interface, bem como pelos tipos de solução a que foram submetidos (Armstrong SR et al., 2001; Skovron et al., 2010; Reis et al., 2015).

Os resultados do presente estudo sugerem que os solventes orgânicos foram mais eficientes do que a água na degradação dos monômeros resinosos, devido a sua permeabilidade e capacidade de penetração na matriz resinosa (Tabelas 13, 15,

16 e 17). Contudo, a presença da água promoveu maior degradação da interface de união adesivo-dentina, interferindo na integridade da camada híbrida. Sendo assim, observou-se que o efeito solvente, como fator isolado, não foi estatisticamente significativo neste estudo. No entanto, quando se observa a interação entre os fatores, verificou-se que tais substâncias interferiram na resistência de união entre sistema adesivo e substrato dentinário conforme o tempo de armazenamento (Tabela 4). Desta forma, pode-se constatar que a segunda hipótese de nulidade testada foi parcialmente aceita e a terceira hipótese rejeitada.

Dentro das limitações do estudo, a longevidade da interface adesiva é dependente do substrato sob o qual a restauração será realizada, como das soluções em que são rotineiramente expostos. Este estudo evidencia que a dentina naturalmente afetada por cárie exibe alterações físico-químico-mecânicas em toda sua estrutura que não são induzidas pelos protocolos *in vitro*, e a torna um substrato de relevância clínica para os estudos na área da adesão.

O modelo de ciclagem de pH mostrou-se efetivo para mimetizar as propriedades mecânicas de um substrato afetado por cárie. Além disso, a água foi o meio de degradação sobre a interface adesiva tanto pela parte estrutural da dentina (advinda da pressão pulpar) como pelo meio de imersão (armazenamento), o qual promoveu menos efeito diante dos procedimentos restauradores; enquanto que os solventes orgânicos (etanol e MEK) promoveram a degradação sobre os materiais resinosos.

Logo, mais pesquisas laboratoriais e clínicas são necessárias, no sentido de se verificar tratamentos específicos para aprimorar o desempenho dos materiais adesivos em substrato afetado por cárie em termos de longevidade clínica.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia proposta e com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- Os diferentes substratos (sadia, artificialmente e naturalmente afetados) apresentaram diferenças significativas, com os menores valores de resistência de união para o substrato naturalmente afetado por cárie;
- Os solventes (água, etanol e metiletilcetona) não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre si; contudo, quando avaliados a influência dos mesmos sobre os diferentes substratos, diferiram significativamente diante da resistência de união;
- Os tempos de armazenamento (24 h e 30 dias) influenciaram os valores de resistência de união às diferentes dentinas, e diante dos diferentes solventes, com redução da resistência adesiva após 30 dias;
- Os solventes orgânicos, principalmente o etanol, reduziu significativamente as propriedades físico-mecânicas do sistema adesivo.

REFERÊNCIAS*

- Abdalla AI, Feilzer AJ. Four-year water degradation of a total-etch and two self-etching adhesives bonded to dentin. *J Dent*. 2008 Aug;36(8):611-7. doi: 10.1016/j.jdent.2008.04.011. Pubmed PMID: 18514996.
- Abedin F, Ye Q, Good HJ, Parthasarathy R, Spencer P. Polymerization- and solvent-induced phase separation in hydrophilic-rich dentin adhesive mimic. *Acta Biomater*. 2014 Jul;10(7):3038-47. doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.001. Pubmed PMID: 24631658.
- Akova T, Ozkomur A, Uysal H. Effect of food-simulating liquids on the mechanical properties of provisional restorative materials. *Dent Mater*. 2006 Dec;22(12):1130-4. doi: 10.1016/j.dental.2005.09.009. Pubmed PMID: 16386787.
- Almahdy A, Koller G, Festy F, Bartsch JW, Watson TF, Banerjee A. An MMP-inhibitor modified adhesive primer enhances bond durability to carious dentin. *Dent Mater*. 2015 May;31(5):594-602. doi: 10.1016/j.dental.2015.03.003. Pubmed PMID: 25804191.
- Amaral CM, Diniz AM, Arantes EB, Dos Santos GB, Noronha-Filho JD, da Silva EM. Resin-dentin Bond Stability of Experimental 4-META-based Etch-and-rinse Adhesives Solvated by Ethanol or Acetone. *J Adhes Dent*. 2016;18(6):513-20. doi: 10.3290/j.jad.a37200. Pubmed PMID: 27869252.
- Arcis RW, Lopez-Macipe A, Toledano M, Osorio E, Rodriguez-Clemente R, Murtra J, et al. Mechanical properties of visible light-cured resins reinforced with hydroxyapatite for dental restoration. *Dent Mater*. 2002 Jan;18(1):49-57. doi: 10.1016/S0109-5641(01)00019-7. Pubmed PMID: 11740964.
- Armstrong S, Breschi L, Ozcan M, Pfeifferkorn F, Ferrari M, Van Meerbeek B. Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μ TBS) approach. *Dent Mater*. 2017 Feb;33(2):133-43. doi: 10.1016/j.dental.2016.11.015. Pubmed PMID: 28007396.
- Armstrong S, Geraldini S, Maia R, Raposo LH, Soares CJ, Yamagawa J. Adhesion to tooth structure: a critical review of "micro" bond strength test methods. *Dent Mater*. 2010 Feb;26(2):e50-62. doi: 10.1016/j.dental.2009.11.155. Pubmed PMID: 20045179.
- Armstrong SR, Keller JC, Boyer DB. Mode of failure in the dentin-adhesive resin-resin composite bonded joint as determined by strength-based (μ TBS) and fracture-based (CNSB) mechanical testing. *Dent Mater*. 2001 May;17(3):201-10. doi: 10.1016/S0109-5641(00)00070-1. Pubmed PMID: 11257292.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Azevedo CS, Trung LC, Simionato MR, Freitas AZ, Matos AB. Evaluation of caries-affected dentin with optical coherence tomography. *Braz Oral Res.* 2011 Sep-Oct;25(5):407-13. doi: 10.1590/S1806-83242011000500006. Pubmed PMID: 22031053.

Bacchi A, Abuna G, Consani RL, Sinhoreti MA, Sauro S, Feitosa VP. Effects of simulated pulpal pressure, mechanical and thermocycling challenge on the microtensile bond strength of resin luting cements. *Int J Adhesion & Adhesives.* 2015;60:69-74. doi: 10.1016/j.ijadhadh.2015.03.009.

Barcellos DC, Batista GR, Pucci CR, Persici ES, Borges AB, Torres CR, et al. Longitudinal evaluation of bond strength to enamel of dental adhesive systems associated with Nd:YAG Laser. *Oper Dent.* 2015 May-Jun;40(3):E122-31. doi: 10.2341/13-181-L. Pubmed PMID: 25706613.

Barcellos DC, Fonseca BM, Pucci CR, Cavalcanti B, Persici Ede S, Goncalves SE. Zn-doped etch-and-rinse model dentin adhesives: Dentin bond integrity, biocompatibility, and properties. *Dent Mater.* 2016 Jul;32(7):940-50. doi: 10.1016/j.dental.2016.04.003. Pubmed PMID: 27174214.

Bedran-Russo A, Leme-Kraus AA, Vidal CMP, Teixeira EC. An Overview of Dental Adhesive systems and the dynamic tooth-adhesive interface. *Dent Clin North Am.* 2017 Oct;61(4):713-31. doi: 10.1016/j.cden.2017.06.001. Pubmed PMID: 28886765.

Belli R, Sartori N, Peruchi LD, Guimaraes JC, Araujo E, Monteiro S, Jr., et al. Slow progression of dentin bond degradation during one-year water storage under simulated pulpal pressure. *J Dent.* 2010 Oct;38(10):802-10. doi: 10.1016/j.jdent.2010.06.012. Pubmed PMID: 20599465.

Brännstrom M, Linden LA, Astrom A. The hydrodynamics of the dental tubule and of pulp fluid. A discussion of its significance in relation to dentinal sensitivity. *Caries Res.* 1967;1(4):310-7. doi:10.1159/000259530. Pubmed PMID: 5241870.

Camps J, Pizant S, Dejou J, Franquin JC. Effects of desensitizing agents on human dentin permeability. *Am J Dent.* 1998 Dec;11(6):286-90. Pubmed PMID: 10477980.

Cardoso MV, Moretto SG, Carvalho RC, Russo EM. Influence of intrapulpal pressure simulation on the bond strength of adhesive systems to dentin. *Braz Oral Res.* 2008 Apr-Jun;22(2):170-5. doi: 10.1590/S1806-83242008000200013. Pubmed PMID: 18622488.

Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Yiu C, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *Am J Dent.* 2005 Dec;18(6):315-9. Pubmed PMID: 16433398.

Carvalho FG, Carlo HL, Sacramento PA, Barros S, Santos RL, Puppin-Rontani RM. Biodegradation of caries-affected dentin bonding interface of fluoride and MDPB-

containing adhesive system. *Int J Adhesion & Adhesives*. 2013;47:134-40. doi:10.1016/j.ijadhadh.2013.08.008.

Carvalho RM, Manso AP. Biodegradation of resin-dentin bonds: a clinical problem? *Curr Oral Health Rep*. 2016;3(3):229-33. doi:10.1007/s40496-016-0104-0.

Carvalho RM, Manso AP, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH. Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. *Dent Mater*. 2012 Jan;28(1):72-86. doi: 10.1016/j.dental.2011.09.011. Pubmed PMID: 22192252.

Ceballos L, Camejo DG, Victoria Fuentes M, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM, et al. Microtensile bond strength of total-etch and self-etching adhesives to caries-affected dentine. *J Dent*. 2003 Sep;31(7):469-77. doi:10.1016/S0300-5712(03)00088-5. Pubmed PMID: 12927458.

Çehreli ZC, Yazici AR, Akca T, Ozgunaltay G. A morphological and micro-tensile bond strength evaluation of a single-bottle adhesive to caries-affected human dentine after four different caries removal techniques. *J Dent*. 2003 Aug;31(6):429-35. doi: 10.1016/S0300-5712(03)00011-3. Pubmed PMID: 12878026.

Celiberti P, Carvalho TS, Raggio DP, Mendes FM. Influence of dental materials used for sealing caries lesions on laser fluorescence measurements. *Lasers Med Sci*. 2012 Mar;27(2):287-95. doi: 10.1007/s10103-010-0856-z. Pubmed PMID: 21161311.

Ciucchi B, Bouillaguet S, Holz J, Pashley D. Dentinal fluid dynamics in human teeth, in vivo. *J Endod*. 1995 Apr;21(4):191-4. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80564-9. Pubmed PMID: 7673819.

Clarkson BH, Wefel JS, Miller I. A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacteria in vitro. *J Dent Res*. 1984 Oct;63(10):1186-9. doi: 10.1177/00220345840630100201. Pubmed PMID: 6592198.

Condon JR, Ferracane JL. Reduction of composite contraction stress through non-bonded microfiller particles. *Dent Mater*. 1998 Jul;14(4):256-60. doi: 10.1016/S0109-5641(98)00036-0. Pubmed PMID: 10379253

Daculsi G, LeGeros RZ, Jean A, Kerebel B. Possible physico-chemical processes in human dentin caries. *J Dent Res*. 1987 Aug;66(8):1356-9. doi: 10.1177/00220345870660081401. Pubmed PMID: 3476605.

de Alexandre RS, Santana VB, Kasaz AC, Arrais CA, Rodrigues JA, Reis AF. Effect of long-term simulated pulpal pressure on the bond strength and nanoleakage of resin-luting agents with different bonding strategies. *Oper Dent*. 2014 Sep-Oct;39(5):508-20. doi: 10.2341/13-078. Pubmed PMID: 24502755.

de Azevedo CS, Garbui BU, Martins e Silva C, Simionato Lorenzetti MR, de Freitas AZ, Matos AB. Obtaining artificially caries-affected dentin for in vitro studies. *J Contemp Dent Pract*. 2014 Jan 01;15(1):12-9. doi:10.5005/jp-journals-10024-1480. Pubmed PMID: 24939258

de Moraes RR, Marimon JL, Schneider LF, Sinhoreti MA, Correr-Sobrinho L, Bueno M. Effects of 6 months of aging in water on hardness and surface roughness of two microhybrid dental composites. *J Prosthodont*. 2008 Jun;17(4):323-6. doi: 10.1111/j.1532-849X.2007.00295.x. Pubmed PMID: 18266654.

De Munck J, Luehrs AK, Poitevin A, Van Ende A, Van Meerbeek B. Fracture toughness versus micro-tensile bond strength testing of adhesive-dentin interfaces. *Dent Mater*. 2013 Jun;29(6):635-44. doi: 10.1016/j.dental.2013.03.010. Pubmed PMID: 23570626.

De Munck J, Mine A, Poitevin A, Van Ende A, Cardoso MV, Van Landuyt KL, et al. Meta-analytical review of parameters involved in dentin bonding. *J Dent Res*. 2012 Apr;91(4):351-7. doi: 10.1177/0022034511431251. Pubmed PMID: 22173327.

De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*. 2005 Feb;84(2):118-32. doi:10.1177/154405910508400204. Pubmed PMID: 15668328

De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*. 2003 Feb;82(2):136-40. doi: 10.1177/154405910308200212. Pubmed PMID: 12562888.

Deng D, Yang H, Guo J, Chen X, Zhang W, Huang C. Effects of different artificial ageing methods on the degradation of adhesive-dentine interfaces. *J Dent*. 2014 Dec;42(12):1577-85. doi: 10.1016/j.jdent.2014.09.010. Pubmed PMID: 25257825.

Deng DM, ten Cate JM. Demineralization of dentin by *Streptococcus mutans* biofilms grown in the constant depth film fermentor. *Caries Res*. 2004 Jan-Feb;38(1):54-61. doi: 10.1159/000073921. Pubmed PMID: 14684978.

Dietschi D, Campanile G, Holz J, Meyer JM. Comparison of the color stability of ten new-generation composites: an in vitro study. *Dent Mater*. 1994 Nov;10(6):353-62. doi: 10.1016/0109-5641(94)90059-0. Pubmed PMID: 7498599.

Duke ES, Lindemuth J. Variability of clinical dentin substrates. *Am J Dent*. 1991 Oct;4(5):241-6. Pubmed PMID: 1810335

Eckert GJ, Platt JA. A statistical evaluation of microtensile bond strength methodology for dental adhesives. *Dent Mater*. 2007 Mar;23(3):385-91. doi: 10.1016/j.dental.2006.02.007. Pubmed PMID: 16540162.

Eick JD. Smear layer--materials surface. *Proc Finn Dent Soc*. 1992;88 Suppl 1:225-42. Pubmed PMID: 1508878

Eliades G, Vougiouklakis G, Palaghias G. Heterogeneous distribution of single-bottle adhesive monomers in the resin-dentin interdiffusion zone. *Dent Mater*. 2001 Jul;17(4):277-83. doi: 10.1016/S0109-5641(00)00082-8. Pubmed PMID:11356203.

Erhardt MC, Lobo MM, Goulart M, Coelho-de-Souza FH, Valentino TA, Pisani-Proenca J, et al. Microtensile bond strength of etch-and-rinse and self-etch adhesives to artificially created carious dentin. *Gen Dent*. 2014 May-Jun;62(3):56-61. Pubmed PMID: 24784516.

Erhardt MC, Osorio R, Toledano M. Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin. *J Dent*. 2008a Dec;36(12):1068-73. doi: 10.1016/j.jdent.2008.09.002. Pubmed PMID: 18922612.

Erhardt MC, Rodrigues JA, Valentino TA, Ritter AV, Pimenta LA. In vitro microTBS of one-bottle adhesive systems: sound versus artificially-created caries-affected dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008b Jul;86(1):181-7. doi: 10.1002/jbm.b.31004. Pubmed PMID: 18161781.

Erhardt MC, Toledano M, Osorio R, Pimenta LA. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: effects of long-term water exposure. *Dent Mater*. 2008c Jun;24(6):786-98. doi: 10.1016/j.dental.2007.09.007. Pubmed PMID: 18023859.

Escribano N, Del-Nero O, de la Macorra JC. Sealing and dentin bond strength of adhesive systems in selected areas of perfused teeth. *Dent Mater*. 2001 Mar;17(2):149-55. doi:10.1016/S0109-5641(00)00057-9. Pubmed PMID: 11163385.

Feitosa VP, Gotti VB, Grohmann CV, Abuna G, Correr-Sobrinho L, Sinhoreti MA, et al. Two methods to simulate intrapulpal pressure: effects upon bonding performance of self-etch adhesives. *Int Endod J*. 2014 Sep;47(9):819-26. doi: 10.1111/iej.12222. Pubmed PMID: 24298904.

Feitosa VP, Leme AA, Sauro S, Correr-Sobrinho L, Watson TF, Sinhoreti MA, et al. Hydrolytic degradation of the resin-dentine interface induced by the simulated pulpal pressure, direct and indirect water ageing. *J Dent*. 2012 Dec;40(12):1134-43. doi: 10.1016/j.jdent.2012.09.011. Pubmed PMID: 23000523.

Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater*. 2006 Mar;22(3):211-22. doi: 10.1016/j.dental.2005.05.005. Pubmed PMID: 16087225.

Ferreira LS, Francci C, Navarro RS, Calheiros FC, Eduardo Cde P. Effects of Nd:YAG laser irradiation on the hybrid layer of different adhesive systems. *J Adhes Dent*. 2009 Apr;11(2):117-25. Pubmed PMID: 19492713.

Finger WJ, Inoue M, Asmussen E. Effect of wettability of adhesive resins on bonding to dentin. *Am J Dent*. 1994 Feb;7(1):35-8. Pubmed PMID: 9115677

Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability--A literature review. *Dent Mater*. 2016 Feb;32(2):e41-53. doi: 10.1016/j.dental.2015.11.007. Pubmed PMID: 26743967.

Fu J, Kakuda S, Pan F, Hoshika S, Ting S, Fukuoka A, et al. Bonding performance of a newly developed step-less all-in-one system on dentin. *Dent Mater J*. 2013;32(2):203-11. doi: 10.4012/dmj2012-204. Pubmed PMID: 23538754.

Fusayama T. Clinical guide for removing caries using a caries-detecting solution. *Quintessence Int*. 1988 Jun;19(6):397-401. Pubmed PMID: 3269590.

Fusayama T. Intratubular crystal deposition and remineralization of carious dentin. *J Biol Buccale*. 1991 Sep;19(3):255-62. Pubmed PMID: 1939049.

Fusayama T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. *Oper Dent*. 1979 Spring;4(2):63-70. Pubmed PMID: 296808.

Fusayama T, Okuse K, Hosoda H. Relationship between hardness, discoloration, and microbial invasion in carious dentin. *J Dent Res*. 1966 Jul-Aug;45(4):1033-46. Pubmed PMID: 5224073.

Fusayama T, Terachima S. Differentiation of two layers of carious dentin by staining. *J Dent Res*. 1972 May-Jun;51(3):866. Pubmed PMID: 4113394.

Garberoglio R, Brannstrom M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol*. 1976;21(6):355-62. Pubmed PMID: 1066114.

Gernhardt CR, Bekes K, Hahn P, Schaller HG. Influence of pressure application before light-curing on the bond strength of adhesive systems to dentin. *Braz Dent J*. 2008;19(1):62-7. doi:10.1590/S0103-64402008000100011. Pubmed PMID: 18438562.

Gerzina TM, Hume WR. Effect of hydrostatic pressure on the diffusion of monomers through dentin in vitro. *J Dent Res*. 1995 Jan;74(1):369-73. doi: 10.1177/00220345950740011301. Pubmed PMID: 7876431.

Ghiggi PC, Dall Agnol RJ, Burnett LH, Jr., Borges GA, Spohr AM. Effect of the Nd:YAG and the Er:YAG laser on the adhesive-dentin interface: a scanning electron microscopy study. *Photomed Laser Surg*. 2010 Apr;28(2):195-200. doi: 10.1089/pho.2009.2530. Pubmed PMID: 19795996.

Gilmour SM, Edmunds DH, Dummer PM. The production of secondary caries-like lesions on cavity walls and the assessment of microleakage using an in vitro microbial caries system. *J Oral Rehabil*. 1990 Nov;17(6):573-8. doi: 10.1111/j.1365-2842.1990.tb01428.x. Pubmed PMID: 2283552

Gladys S, Van Meerbeek B, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Comparative physico-mechanical characterization of new hybrid restorative materials with conventional glass-ionomer and resin composite restorative materials. *J Dent Res*. 1997 Apr;76(4):883-94. doi: 10.1177/00220345970760041001. Pubmed PMID: 9126185.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011 Jan 01;3:711-35. Pubmed PMID: 21196346

Gonçalves LL. Sistema Adesivo Universal: influência da técnica de condicionamento e da pressão pulpar simulada com soro fetal bovino ou água deionizada na resistência de união à dentina [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2014.

Goodis HE, White JM, Marshall GW, Jr., Yee K, Fuller N, Gee L, et al. Effects of Nd: and Ho:yttrium-aluminium-garnet lasers on human dentine fluid flow and dental pulp-chamber temperature in vitro. *Arch Oral Biol*. 1997 Dec;42(12):845-54. doi:10.1016/S0003-9969(97)00076-9. Pubmed PMID: 9460538.

Goracci C, Sadek FT, Monticelli F, Cardoso PE, Ferrari M. Influence of substrate, shape, and thickness on microtensile specimens' structural integrity and their measured bond strengths. *Dent Mater*. 2004 Sep;20(7):643-54. doi: 10.1016/j.dental.2003.08.009. Pubmed PMID: 15236939.

Haj-Ali R, Walker M, Williams K, Wang Y, Spencer P. Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. *J Prosthodont*. 2006 Mar-Apr;15(2):82-8. doi: 10.1111/j.1532-849X.2006.00079.x. Pubmed PMID: 16650007.

Haldi J, Wynn W. Protein Fractions of the Blood Plasma and Dental-Pulp Fluid of the Dog. *J Dent Res*. 1963 Sep-Oct;42:1217-21. doi:10.1177/00220345630420051601. Pubmed PMID: 14061942.

Haldi J, Wynn W, Culpepper WD. Dental pulp fluid - I: Relationship between dental pulp fluid and blood plasma in protein, glucose and inorganic element content. *Arch Oral Biol*. 1961;3:201-6. doi: 10.1016/0003-9969(61)90137-6.

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials*. 2003 Sep;24(21):3795-803. doi:10.1016/S0142-9612(03)00262-X. Pubmed PMID: 12818552.

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y, et al. Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. *J Biomed Mater Res*. 2002;63(3):306-11. doi:10.1002/jbm.10208. Pubmed PMID: 12115762.

Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res*. 2005 Aug;84(8):741-6. doi: 10.1177/154405910508400811. Pubmed PMID: 16040733.

Helfer AR, Melnick S, Schilder H. Determination of the moisture content of vital and pulpless teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1972 Oct;34(4):661-70. doi:10.1016/0030-4220(72)90351-9. Pubmed PMID: 4506724

Hengtrakool C, Kukiattrakoon B, Kedjarune-Leggat U. Effect of naturally acidic agents on microhardness and surface micromorphology of restorative materials. *Eur J Dent*. 2011 Jan;5(1):89-100. Pubmed PMID: 21311608

Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine release and water sorption characteristics of chlorhexidine-incorporated hydrophobic/hydrophilic resins. *Dent Mater*. 2008 Oct;24(10):1391-9. doi: 10.1016/j.dental.2008.03.011. Pubmed PMID: 18439668.

Holleben P. Análise da resistência adesiva à dentina humana submetida ao condicionamento total sob pressão pulpar simulada e armazenamento em etanol 75% [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de São José dos Campos; 2013.

Hosaka K, Nakajima M, Yamauti M, Aksornmuang J, Ikeda M, Foxton RM, et al. Effect of simulated pulpal pressure on all-in-one adhesive bond strengths to dentine. *J Dent*. 2007 Mar;35(3):207-13. doi: 10.1016/j.jdent.2006.08.001 Pubmed PMID: 16989931.

Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials*. 2005a Nov;26(33):6449-59. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.052. Pubmed PMID: 15949841.

Ito S, Saito T, Tay FR, Carvalho RM, Yoshiyama M, Pashley DH. Water content and apparent stiffness of non-carries versus carries-affected human dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005b Jan 15;72(1):109-16. doi: 10.1002/jbm.b.30130. Pubmed PMID: 15389491.

Itoh K, Kusunoki M, Oikawa M, Tani C, Hisamitsu H. In vitro comparison of three carries dyes. *Am J Dent*. 2009 Aug;22(4):195-9. Pubmed PMID: 19824552

Jain P, Reinhardt JW, Krell KV. Effect of dentin desensitizers and dentin bonding agents on dentin permeability. *Am J Dent*. 2000 Feb;13(1):21-7. Pubmed PMID: 11763898

Joves GJ, Inoue G, Nakashima S, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Mineral density, morphology and bond strength of natural versus artificial carries-affected dentin. *Dent Mater J*. 2013;32(1):138-43. doi:10.4012/dmj.2012-243. Pubmed PMID: 23370882.

Joves GJ, Inoue G, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Nanoindentation hardness of intertubular dentin in sound, demineralized and natural carries-affected dentin. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014 Apr;32:39-45. doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.12.017. Pubmed PMID: 24394774.

Kato G, Nakabayashi N. The durability of adhesion to phosphoric acid etched, wet dentin substrates. *Dent Mater*. 1998 Sep;14(5):347-52. doi:10.1016/S0109-5641(99)00003-2. Pubmed PMID: 10379265

Kim RJ, Choi NS, Ferracane J, Lee IB. Acoustic emission analysis of the effect of simulated pulpal pressure and cavity type on the tooth-composite interfacial debonding. *Dent Mater*. 2014 Aug;30(8):876-83. doi: 10.1016/j.dental.2014.05.027. Pubmed PMID: 24938925.

Kitasako Y, Burrow MF, Nikaido T, Tagami J. The influence of storage solution on dentin bond durability of resin cement. *Dent Mater*. 2000 Jan;16(1):1-6. doi: 10.1016/S0109-5641(99)00061-5. Pubmed PMID: 11203517.

Kostoryz EL, Dharmala K, Ye Q, Wang Y, Huber J, Park JG, et al. Enzymatic biodegradation of HEMA/bisGMA adhesives formulated with different water content. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Feb;88(2):394-401. doi: 10.1002/jbm.b.31095. Pubmed PMID: 18395826.

Lee SY, Greener EH, Covey DA, Menis DL. Effects of food/oral simulating fluids on microstructure and strength of dentine bonding agents. *J Oral Rehabil*. 1996 May;23(5):353-61. doi:10.1111/j.1365-2842.1996.tb00864.x. Pubmed PMID: 8736449

Lee SY, Greener EH, Mueller HJ. Effect of food and oral simulating fluids on structure of adhesive composite systems. *J Dent*. 1995 Feb;23(1):27-35. doi:10.1016/0300-5712 (95)90657-4. Pubmed PMID: 7876413.

Lee SY, Greener EH, Mueller HJ, Chiu CH. Effect of food and oral simulating fluids on dentine bond and composite strength. *J Dent*. 1994 Dec;22(6):352-9. Pubmed PMID: 7844264

Leme AA, Vidal CM, Hassan LS, Bedran-Russo AK. Potential role of surface wettability on the long-term stability of dentin bonds after surface biomodification. *J Biomech*. 2015 Jul 16;48(10):2067-71. doi: 10.1016/j.jbiomech.2015.03.016. Pubmed PMID: 25869721.

Lenzi TL, Soares FZ, Tedesco TK, de Oliveira Rocha R. Is It Possible to induce Artificial Caries-affected Dentin using the Same Protocol to Primary and Permanent Teeth? *J Contemp Dent Pract*. 2015 Aug 01;16(8):638-42. doi:10.5005/jp-journals-10024-1734. Pubmed PMID: 26423499.

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(5):679-728. Pubmed PMID: 8292714

Loguercio AD, Barroso LP, Grande RH, Reis A. Comparison of intra- and intertooth resin-dentin bond strength variability. *J Adhes Dent*. 2005 Summer;7(2):151-8. Pubmed PMID: 16052764

Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci*. 2009 Oct;117(5):587-96. doi:10.1111/j.1600-0722.2009.00663.x. Pubmed PMID: 19758257.

Marchesi G, Frassetto A, Mazzoni A, Apolonio F, Diolosa M, Cadenaro M, et al. Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-year in vitro study. *J Dent*. 2014 May;42(5):603-12. doi: 10.1016/j.jdent.2013.12.008 Pubmed PMID: 24373855.

Marghalani HY, Watts DC. Viscoelastic stability of resin-composites aged in food-simulating solvents. *Dent Mater*. 2013 Sep;29(9):963-70. doi: 10.1016/j.dental.2013.07.009. Pubmed PMID: 23910977.

Marimoto AK, Cunha LA, Yui KC, Huhtala MF, Barcellos DC, Prakki A, et al. Influence of Nd:YAG laser on the bond strength of self-etching and conventional adhesive systems to dental hard tissues. *Oper Dent*. 2013 Jul-Aug;38(4):447-55. 10.2341/11-383-L Pubmed PMID: 23215546

Marquezan M, Correa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol*. 2009 Dec;54(12):1111-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.09.007. Pubmed PMID: 19878926.

Marshall GW, Jr., Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent*. 1997 Nov;25(6):441-58. doi:10.1016/S0300-5712(96)00065-6. Pubmed PMID: 9604576.

Maske TT, Isolan CP, van de Sande FH, Peixoto AC, Faria ESAL, Cenci MS, et al. A biofilm cariogenic challenge model for dentin demineralization and dentin bonding analysis. *Clin Oral Investig*. 2015 Jun;19(5):1047-53. doi: 10.1007/s00784-014-1331-1. Pubmed PMID: 25323985.

Mazzitelli C, Monticelli F, Osorio R, Casucci A, Toledano M, Ferrari M. Effect of simulated pulpal pressure on self-adhesive cements bonding to dentin. *Dent Mater*. 2008 Sep;24(9):1156-63. doi: 10.1016/j.dental.2008.01.005. Pubmed PMID: 18295325.

Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjaderhane L, et al. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res*. 2012 May;91(5):467-72. doi: 10.1177/0022034512439210. Pubmed PMID: 22354448.

Mazzoni A, Tjaderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015 Feb;94(2):241-51. doi: 10.1177/0022034514562833. Pubmed PMID: 25535202.

McIntyre JM, Featherstone JD, Fu J. Studies of dental root surface caries. 1: Comparison of natural and artificial root caries lesions. *Aust Dent J*. 2000 Mar;45(1):24-30. doi:10.1111/j.1834-7819.2000.tb00238.x. Pubmed PMID: 10846269.

McKinney JE, Wu W. Chemical softening and wear of dental composites. *J Dent Res*. 1985 Nov;64(11):1326-31. doi:10.1177/00220345850640111601. Pubmed PMID: 2936780.

Melo P, Azevedo A, Henriques M. Cárie dentária - a doença antes da cavidade. *Acta Pediátrica Portuguesa*. 2008;39(6):253-9.

Mobarak EH. Effect of chlorhexidine pretreatment on bond strength durability of caries-affected dentin over 2-year aging in artificial saliva and under simulated intrapulpal pressure. *Oper Dent*. 2011 Nov-Dec;36(6):649-60. doi: 10.2341/11-018-L. Pubmed PMID: 21864128.

Mobarak EH, Daifalla LE. Long-term nanoleakage depth and pattern of cervical restorations bonded with different adhesives. *Oper Dent*. 2012 Jan-Feb;37(1):45-53. doi: 10.2341/11-166-L. Pubmed PMID: 21942238.

Mohamed MF, El Deeb HA, Gomaa IE, Mobarak EH. Bond durability of different resin cements to caries-affected dentin under simulated intrapulpal pressure. *Oper Dent*. 2015 May-Jun;40(3):293-303. doi: 10.2341/14-035-L. Pubmed PMID: 25405902.

Moll K, Park HJ, Haller B. Effect of simulated pulpal pressure on dentin bond strength of self-etching bonding systems. *Am J Dent*. 2005 Oct;18(5):335-9. Pubmed PMID: 16335043

Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Yu H, Buzalaf MA, et al. Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: hardness and mineral content correlation. *Caries Res*. 2013;47(2):162-70. doi: 10.1159/000345362. Pubmed PMID: 23235318.

Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*. 1982 May;16(3):265-73. doi: 10.1002/jbm.820160307. Pubmed PMID: 7085687.

Nakajima M, Kunawarote S, Prasansuttiorn T, Tagami J. Bonding to caries-affected dentin. *Japanese Dental Science Review*. 2011;47(20):102-14. doi: 10.1016/j.jdsr.2011.03.002.

Nakajima M, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Yoshiyama M, Ebisu S, et al. Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesives. *J Dent Res*. 1995 Oct;74(10):1679-88. doi: 10.1177/00220345950740100901. Pubmed PMID: 7499591.

Nakajima M, Sano H, Urabe I, Tagami J, Pashley DH. Bond strengths of single-bottle dentin adhesives to caries-affected dentin. *Oper Dent*. 2000 Jan-Feb;25(1):2-10. Pubmed PMID: 11203785

Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res*. 2011 Apr;90(4):506-11. doi: 10.1177/0022034510391906. Pubmed PMID: 21248362.

Oilo G, Olsson S. Tensile bond strength of dentin adhesives: a comparison of materials and methods. *Dent Mater*. 1990 Apr;6(2):138-44. doi: 10.1016/S0109-5641(05)80045-4. Pubmed PMID: 2127754.

Oliveira SS, Pugach MK, Hilton JF, Watanabe LG, Marshall SJ, Marshall GW, Jr. The influence of the dentin smear layer on adhesion: a self-etching primer vs. a total-etch system. *Dent Mater*. 2003 Dec;19(8):758-67. doi: 10.1016/S0109-5641(03)00023-X. Pubmed PMID: 14511734.

Omar H, El-Badrawy W, El-Mowafy O, Atta O, Saleem B. Microtensile bond strength of resin composite bonded to caries-affected dentin with three adhesives. *Oper Dent*. 2007 Jan-Feb;32(1):24-30. doi: 10.2341/06-2. Pubmed PMID: 17288325.

Özok AR, Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR. Effect of dentin perfusion on the sealing ability and microtensile bond strengths of a total-etch versus an all-in-one adhesive. *Dent Mater*. 2004 Jun;20(5):479-86. doi: 10.1016/j.dental.2003.07.004. Pubmed PMID: 15081555.

Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjaderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci*. 2003 Apr;111(2):117-27. doi: 10.1034/j.1600-0722.2003.00026.x. Pubmed PMID: 12648263.

Park JG, Ye Q, Topp EM, Misra A, Kieweg SL, Spencer P. Effect of photoinitiator system and water content on dynamic mechanical properties of a light-cured bisGMA/HEMA dental resin. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Jun 15;93(4):1245-51. doi: 10.1002/jbm.a.32617. Pubmed PMID: 19827107.

Park JG, Ye Q, Topp EM, Lee CH, Kostoryz EL, Misra A, et al. Dynamic mechanical analysis and esterase degradation of dentin adhesives containing a branched methacrylate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009a Oct;91(1):61-70. doi: 10.1002/jbm.b.31374. Pubmed PMID: 19358261.

Park JG, Ye Q, Topp EM, Misra A, Spencer P. Water sorption and dynamic mechanical properties of dentin adhesives with a urethane-based multifunctional methacrylate monomer. *Dent Mater*. 2009b Dec;25(12):1569-75. doi: 10.1016/j.dental.2009.07.010. Pubmed PMID: 19709724.

Pashley DH. Dentin bonding: overview of the substrate with respect to adhesive material. *J Esthet Dent*. 1991 Mar-Apr;3(2):46-50. doi: 10.1111/j.1708-8240.1991.tb00808.x. Pubmed PMID: 1888543.

Pashley DH. Dentin: a dynamic substrate--a review. *Scanning Microsc*. 1989 Mar;3(1):161-74; discussion 74-6. Pubmed PMID: 2662395.

Pashley DH. Smear layer: overview of structure and function. *Proc Finn Dent Soc*. 1992;88 Suppl 1:215-24. Pubmed PMID: 1508877.

Pashley DH. Smear layer: physiological considerations. *Oper Dent Suppl*. 1984;3:13-29. Pubmed PMID: 6396586.

Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent*. 1997 Sep;25(5):355-72. doi: 10.1016/S0300-5712(96)00057-7. Pubmed PMID: 9241954.

Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakajima M, Yoshiyama M, Shono Y, et al. The microtensile bond test: a review. *J Adhes Dent*. 1999 Winter;1(4):299-309. Pubmed PMID: 11725659.

Pashley DH, Livingston MJ, Reeder OW, Horner J. Effects of the degree of tubule occlusion on the permeability of human dentine in vitro. *Arch Oral Biol*. 1978;23(12):1127-33. doi:10.1016/0003-9969(78)90119-X. Pubmed PMID: 287430.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004 Mar;83(3):216-21. doi:10.1177/154405910408300306. Pubmed PMID: 14981122.

Perdigão J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater*. 2010 Feb;26(2):e24-37. doi: 10.1016/j.dental.2009.11.149. Pubmed PMID: 20005565.

Perdigão J, Swift EJ, Jr., Denehy GE, Wefel JS, Donly KJ. In vitro bond strengths and SEM evaluation of dentin bonding systems to different dentin substrates. *J Dent Res*. 1994 Jan;73(1):44-55. Pubmed PMID: 8294617

Pereira PN, Nunes MF, Miguez PA, Swift EJ, Jr. Bond strengths of a 1-step self-etching system to caries-affected and normal dentin. *Oper Dent*. 2006 Nov-Dec;31(6):677-81. doi: 10.2341/05-131. Pubmed PMID: 17153976.

Peutzfeldt A, Asmussen E. Modulus of resilience as predictor for clinical wear of restorative resins. *Dent Mater*. 1992 May;8(3):146-8. doi:10.1016/0109-5641(92)90071-J. Pubmed PMID: 1387854.

Pinna R, Maioli M, Eramo S, Mura I, Milia E. Carious affected dentine: its behaviour in adhesive bonding. *Aust Dent J*. 2015 Sep;60(3):276-93. doi: 10.1111/adj.12309. Pubmed PMID: 25790344.

Polydorou O, König A, Hellwig E, Kummerer K. Long-term release of monomers from modern dental-composite materials. *Eur J Oral Sci*. 2009 Feb;117(1):68-75. doi: 10.1111/j.1600-0722.2008.00594.x. Pubmed PMID: 19196321.

Prati C, Chersoni S, Mongiorgi R, Pashley DH. Resin-infiltrated dentin layer formation of new bonding systems. *Oper Dent*. 1998 Jul-Aug;23(4):185-94. Pubmed PMID: 9760921

Prati C, Pashley DH. Dentine wetness, permeability and thickness and bond strength of adhesive systems. *Am J Dent*. 1992 Feb;5(1):33-8. Pubmed PMID: 1524740.

Pugach MK, Strother J, Darling CL, Fried D, Gansky SA, Marshall SJ, et al. Dentine caries zones: mineral, structure, and properties. *J Dent Res*. 2009 Jan;88(1):71-6. doi: 10.1177/0022034508327552. Pubmed PMID: 19131321.

Reis A, Carrilho M, Breschi L, Loguercio AD. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. *Oper Dent*. 2013 Jul-Aug;38(4):E1-E25. doi: 10.2341/12-258-LIT. Pubmed PMID: 23527523.

Reis A, Martins GC, de Paula EA, Sanchez AD, Loguercio AD. Alternative Aging Solutions to Accelerate Resin-Dentin Bond Degradation. *J Adhes Dent*. 2015 Aug;17(4):321-8. doi: 10.3290/j.jad.a34591. Pubmed PMID: 26295065.

Rocha C, Faria ESA, Peixoto A. Bond strength of adhesive luting agents to caries-affected dentin. *Oper Dent*. 2014 Jul-Aug;39(4):383-8. doi: 10.2341/13-062-L. Pubmed PMID: 24147744.

Rodrigues JA, Diniz MB, Josgrilberg EB, Cordeiro RC. In vitro comparison of laser fluorescence performance with visual examination for detection of occlusal caries in permanent and primary molars. *Lasers Med Sci*. 2009 Jul;24(4):501-6. doi: 10.1007/s10103-008-0552-4. Pubmed PMID: 18373155.

Sabbagh J, Vreven J, Leloup G. Dynamic and static moduli of elasticity of resin-based materials. *Dent Mater*. 2002 Jan;18(1):64-71. doi: 10.1016/S0109-5641(01)00021-5. Pubmed PMID: 11740966.

Sadek FT, Muench A, Poiate IA, Poiate Jr E, Cardoso PEC. Influence of specimens' design and manufacturing process on microtensile bond strength to enamel: laboratory and FEA comparison. *Mat Res*. 2010;13(2):253-60. doi: 10.1590/S1516-14392010000200021.

Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, et al. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater*. 1994 Jul;10(4):236-40. doi:10.1016/0109-5641(94)90067-1. Pubmed PMID: 7664990.

Santis LR, Silva TM, Haddad BA, Goncalves LL, Goncalves SE. Influence of dentin thickness on intrapulpal temperature under simulated pulpal pressure during Nd:YAG laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2017 Jan;32(1):161-7. doi: 10.1007/s10103-016-2098-1. Pubmed PMID: 27778115.

Sartori N, Peruchi LD, Phark JH, Duarte S, Jr. The influence of intrinsic water permeation on different dentin bonded interfaces formation. *J Dent*. 2016 May;48:46-54. doi: 10.1016/j.jdent.2016.03.005. Pubmed PMID: 26976554.

Sartori N, Peruchi LD, Phark JH, Lopes MM, Araujo E, Vieira LC, et al. Permeation of intrinsic water into ethanol- and water-saturated, monomer-infiltrated dentin bond interfaces. *Dent Mater*. 2015 Nov;31(11):1385-95. doi: 10.1016/j.dental.2015.08.159. Pubmed PMID: 26411647.

Sattabanasuk V, Burrow MF, Shimada Y, Tagami J. Resin adhesion to caries-affected dentine after different removal methods. *Aust Dent J*. 2006 Jun;51(2):162-9. doi: 10.1111/j.1834-7819.2006.tb00421.x. Pubmed PMID: 16848265.

Sauro S, Pashley DH, Mannocci F, Tay FR, Pilecki P, Sherrieff M, et al. Micropermeability of current self-etching and etch-and-rinse adhesives bonded to deep dentine: a comparison study using a double-staining/confocal microscopy technique. *Eur J Oral Sci.* 2008 Apr;116(2):184-93. doi: 10.1111/j.1600-0722.2007.00518.x. Pubmed PMID: 18353014.

Sauro S, Pashley DH, Montanari M, Chersoni S, Carvalho RM, Toledano M, et al. Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dent Mater.* 2007 Jun;23(6):705-13. doi: 10.1016/j.dental.2006.06.010. Pubmed PMID: 16904175.

Schaller HG, Weihing T, Strub JR. Permeability of dentine after Nd:YAG laser treatment: an in vitro study. *J Oral Rehabil.* 1997 Apr;24(4):274-81. doi: 10.1111/j.1365-2842.1997.tb00326.x. Pubmed PMID: 9147299.

Scherrer SS, Cesar PF, Swain MV. Direct comparison of the bond strength results of the different test methods: a critical literature review. *Dent Mater.* 2010 Feb;26(2):e78-93. doi: 10.1016/j.dental.2009.12.002. Pubmed PMID: 20060160.

Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod.* 2001 Jan;27(1):23-30. doi: 10.1097/00004770-200101000-00007. Pubmed PMID: 11487159.

Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007 Jan 6;369(9555):51-9. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60031-2. Pubmed PMID: 17208642.

Sengun A, Ozturk B, Ozer F. The effect of simulated intrapulpal pressure on bond strength to enamel and dentine. *J Oral Rehabil.* 2003 May;30(5):550-5. doi: 10.1046/j.1365.2842.2003.01096.x. Pubmed PMID: 12752939.

Shibata S, Vieira LC, Baratieri LN, Fu J, Hoshika S, Matsuda Y, et al. Evaluation of microtensile bond strength of self-etching adhesives on normal and caries-affected dentin. *Dent Mater J.* 2016;35(2):166-73. doi: 10.4012/dmj.2014-330. Pubmed PMID: 27041004.

Shono Y, Terashita M, Shimada J, Kozono Y, Carvalho RM, Russell CM, et al. Durability of resin-dentin bonds. *J Adhes Dent.* 1999 Autumn;1(3):211-8. Pubmed PMID: 11725669.

Sideridou ID, Achilias DS, Karabela MM. Sorption kinetics of ethanol/water solution by dimethacrylate-based dental resins and resin composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007 Apr;81(1):207-18. doi: 10.1002/jbm.b.30655. Pubmed PMID: 16941599.

Sideridou ID, Vouvoudi EC, Adamidou EA. Dynamic mechanical thermal properties of the dental light-cured nanohybrid composite Kalore, GC: effect of various food/oral simulating liquids. *Dent Mater.* 2015 Feb;31(2):154-61. doi: 10.1016/j.dental.2014.11.008. Pubmed PMID: 25523943.

Silva TM, Goncalves LL, Fonseca BM, Esteves SR, Barcellos DC, Damiao AJ, et al. Influence of Nd:YAG laser on intrapulpal temperature and bond strength of human dentin under simulated pulpal pressure. *Lasers Med Sci*. 2016 Jan;31(1):49-56. doi: 10.1007/s10103-015-1827-1. Pubmed PMID: 26510575.

Silva TM, Sales A, Pucci CR, Borges AB, Torres CRG. The combined effect of food-simulating solutions, brushing and staining on color stability of composite resins. *Acta Biomater Odontol Scand*. 2017 Jan;3(1):1-7. doi: 10.1080/23337931.2016.1276838. Pubmed PMID: 28642926.

Silverstone LM. The surface zone in caries and in caries-like lesions produced in vitro. *Br Dent J*. 1968 Aug 20;125(4):145-57. Pubmed PMID: 4876377.

Singh V, Misra A, Marangos O, Park J, Ye Q, Kieweg SL, et al. Viscoelastic and fatigue properties of model methacrylate-based dentin adhesives. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Nov;95(2):283-90. doi: 10.1002/jbm.b.31712. Pubmed PMID: 20848661.

Singh V, Misra A, Parthasarathy R, Ye Q, Park J, Spencer P. Mechanical properties of methacrylate-based model dentin adhesives: effect of loading rate and moisture exposure. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013 Nov;101(8):1437-43. doi: 10.1002/jbm.b.32963. Pubmed PMID: 23744598.

Skovron L, Kogeo D, Gordillo LA, Meier MM, Gomes OM, Reis A, et al. Effects of immersion time and frequency of water exchange on durability of etch-and-rinse adhesive. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Nov;95(2):339-46. doi: 10.1002/jbm.b.31718. Pubmed PMID: 20860046.

Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res*. 2002 Dec 5;62(3):447-56. doi: 10.1002/jbm.10364. Pubmed PMID: 12209931.

Spencer P, Wang Y, Katz JL, Misra A. Physicochemical interactions at the dentin/adhesive interface using FTIR chemical imaging. *J Biomed Opt*. 2005 May-Jun;10(3):031104. doi: 10.1117/1.1914844. Pubmed PMID: 16229629.

Spencer P, Ye Q, Park J, Misra A, Bohaty BS, Singh V, et al. Durable bonds at the adhesive/dentin interface: an impossible mission or simply a moving target? *Braz Dent Sci*. 2012;15(1):4-18. doi: 10.14295/bds.2012.v15il.790. Pubmed PMID:24855586.

Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, et al. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng*. 2010 Jun;38(6):1989-2003. doi: 10.1007/s10439-010-9969-6. Pubmed PMID: 20195761.

Steiner-Oliveira C, Rodrigues LKA, Zanin ICJ, Carvalho CL, Kamiya RU, Hara AT, et al. An in vitro microbial model associated with sucrose to produce dentin caries lesions. *Cent Eur J Biol*. 2011;6(3):414-21. doi: 10.2478/s11535-011-0011-2.

Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res*. 2002 Sep;81(9):603-7. doi: 10.1177/154405910208100905. Pubmed PMID: 12202640.

Takamizawa T, Barkmeier WW, Tsujimoto A, Scheidel DD, Watanabe H, Erickson RL, et al. Influence of water storage on fatigue strength of self-etch adhesives. *J Dent*. 2015 Dec;43(12):1416-27. doi: 10.1016/j.jdent.2015.10.018. Pubmed PMID: 26520580.

Taniguchi G, Nakajima M, Hosaka K, Iwamoto N, Ikeda M, Foxton RM, et al. Improving the effect of NaOCl pretreatment on bonding to caries-affected dentin using self-etch adhesives. *J Dent*. 2009 Oct;37(10):769-75. doi: 10.1016/j.jdent.2009.06.005. Pubmed PMID: 19589634.

Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Paakkonen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod*. 2010 Mar;36(3):475-81. doi: 10.1016/j.joen.2009.12.034. Pubmed PMID: 20171366.

Tjäderhane L. Dentin bonding: can we make it last? *Oper Dent*. 2015 Jan-Feb;40(1):4-18. doi: 10.2341/14-095-BL. Pubmed PMID: 25615637.

Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater*. 2013 Jan;29(1):116-35. doi: 10.1016/j.dental.2012.08.004. Pubmed PMID: 22901826.

Toledano M, Osorio R, Osorio E, Aguilera FS, Yamauti M, Pashley DH, et al. Durability of resin-dentin bonds: effects of direct/indirect exposure and storage media. *Dent Mater*. 2007 Jul;23(7):885-92. doi: 10.1016/j.dental.2006.06.030. Pubmed PMID: 16949659.

Valinoti AC, Neves BG, da Silva EM, Maia LC. Surface degradation of composite resins by acidic medicines and pH-cycling. *J Appl Oral Sci*. 2008 Jul-Aug;16(4):257-65. doi: 10.1590/S1678-77572008000400006. Pubmed PMID: 19089257.

Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, et al. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent Mater*. 2011 Aug;27(8):723-47. doi: 10.1016/j.dental.2011.05.001. Pubmed PMID: 21664675.

Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent*. 2003 May-Jun;28(3):215-35. Pubmed PMID: 12760693.

Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mine A, Van Ende A, Neves A, et al. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dent Mater*. 2010 Feb;26(2):e100-21. doi: 10.1016/j.dental.2009.11.148. Pubmed PMID: 20006379.

Vicente A, Molina S, Ortiz AJ, Bravo LA. Influence of food-simulating liquids on bond strength of brackets bonded with a HEMA-free and HEMA-containing self-etching primer. *Angle Orthod*. 2012 Mar;82(2):346-50. doi: 10.2319/032711-216.1. Pubmed PMID: 21830934.

Vidal CM, Tjaderhane L, Scaffa PM, Tersariol IL, Pashley D, Nader HB, et al. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. *J Dent Res*. 2014 Mar;93(3):269-74. doi: 10.1177/0022034513516979. Pubmed PMID: 24356440.

Vouvoudi EC, Sideridou ID. Dynamic mechanical properties of dental nanofilled light-cured resin composites: Effect of food-simulating liquids. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012 Jun;10:87-96. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.02.007. Pubmed PMID: 22520421.

Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res*. 2003 Feb;82(2):141-5. Pubmed PMID: 12562889

Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res A*. 2007 May;81(2):279-86. doi: 10.1002/jbm.a.30981. Pubmed PMID: 17120213.

Watanabe I, Nakabayashi N, Pashley DH. Bonding to ground dentin by a phenyl-P self-etching primer. *J Dent Res*. 1994 Jun;73(6):1212-20. doi: 10.1177/00220345940730061301. Pubmed PMID: 8046111.

White DJ, Faller RV, Bowman WD. Demineralization and remineralization evaluation techniques--added considerations. *J Dent Res*. 1992 Apr;71 Spec No:929-33. Pubmed PMID: 1592989

Woolley GM, Wilson PR. Pressure transmission across dentine in response to an external pressure: a laboratory study. *Arch Oral Biol*. 2005 Sep;50(9):799-805. doi: 10.1016/j.archoralbio.2005.01.010. Pubmed PMID: 15963454.

Xuan W, Hou BX, Lu YL. Bond strength of different adhesives to normal and caries-affected dentins. *Chin Med J (Engl)*. 2010 Feb 5;123(3):332-6. Pubmed PMID: 20193255

Yap AU, Tan SH, Wee SS, Lee CW, Lim EL, Zeng KY. Chemical degradation of composite restoratives. *J Oral Rehabil*. 2001 Nov;28(11):1015-21. doi: 10.1111/j.1365.2842.2001.00760.x. Pubmed PMID: 11722717.

Yasuda G, Inage H, Kawamoto R, Shimamura Y, Takubo C, Tamura Y, et al. Changes in elastic modulus of adhesive and adhesive-infiltrated dentin during storage in water. *J Oral Sci*. 2008 Dec;50(4):481-6. doi: 10.2334/josnusd.50.481. Pubmed PMID: 19106478.

Yesilyurt C, Yoldas O, Altintas SH, Kusgoz A. Effects of food-simulating liquids on the mechanical properties of a silorane-based dental composite. *Dent Mater J*. 2009 May;28(3):362-7. doi: 10.4012/dmj.28.362. Pubmed PMID: 19662736.

Yiu CK, King NM, Carrilho MR, Sauro S, Rueggeberg FA, Prati C, et al. Effect of resin hydrophilicity and temperature on water sorption of dental adhesive resins. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(9):1695-703. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.09.037. Pubmed PMID: 16226310.

Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Itou K, et al. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. *J Dent Res*. 2002 Aug;81(8):556-60. doi: 10.1177/154405910208100811. Pubmed PMID: 12147747.

Yoshiyama M, Tay FR, Torii Y, Nishitani Y, Doi J, Itou K, et al. Resin adhesion to carious dentin. *Am J Dent*. 2003 Feb;16(1):47-52. Pubmed PMID: 12744413

Yoshiyama M, Urayama A, Kimochi T, Matsuo T, Pashley DH. Comparison of conventional vs self-etching adhesive bonds to caries-affected dentin. *Oper Dent*. 2000 May-Jun;25(3):163-9. Pubmed PMID: 11203811

Zankuli MA, Devlin H, Silikas N. Water sorption and solubility of core build-up materials. *Dent Mater*. 2014 Dec;30(12):e324-9. doi: 10.1016/j.dental.2014.08.374. Pubmed PMID: 25205365.

Zhang Y, Xu J. Effect of immersion in various media on the sorption, solubility, elution of unreacted monomers, and flexural properties of two model dental composite compositions. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jun;19(6):2477-83. doi: 10.1007/s10856-008-3369-6. Pubmed PMID: 18253815.

Zhou W, Niu LN, Hu L, Jiao K, Chang G, Shen LJ, et al. Caries-resistant bonding layer in dentin. *Sci Rep*. 2016 Sep 07;6:32740. doi: 10.1038/srep32740. Pubmed PMID: 27599621.

APÊNDICE A – Preparo das soluções para ciclagem de pH

DENTINA AFETADA POR CÁRIE

Inicialmente deve-se preparar uma solução de fluoreto de sódio. Depois deve-se misturar as soluções preparadas com os demais sais e obter a solução final.

1) Preparar solução de fluoreto de sódio

a 10 ppm

Substância	Fórmula	Quantidade
Fluoreto de sódio	NaF	0,01 g
Água deionizada		qsp 100 ml

Dissolver o fluoreto de sódio em água dentro do balão volumétrico de 100 ml.

a 1 ppm

Substância	Fórmula	Quantidade
Fluoreto de sódio	NaF	0,001 g
Água deionizada		qsp 10 ml

Dissolver o fluoreto de sódio em água dentro do balão volumétrico de 10 ml.

2) Preparo da solução DESMINERALIZADORA (pH 4,5)

Substância	Fórmula	Quantidade
Ácido acético glacial (0,05 M)	CH ₃ COOH	3,0025 g
Cloreto de cálcio (2,2 mM)	CaCl ₂	0,32342 g
Fosfato de sódio (2,2 mM)	NaH ₂ PO ₄	0,34914 g
Acetato de sódio (0,05 M)	CH ₃ COONa	4,10171 g
*Fluoreto de sódio (1 ppm)	NaF	
Água deionizada		qsp 1L

Pesar os sais e dissolver em 1 litro de água deionizada em balão volumétrico. Checar o pH e ajustar com o ácido acético ou acetato caso não esteja correto.

3) Preparar a solução MINERALIZADORA (pH 7,0)

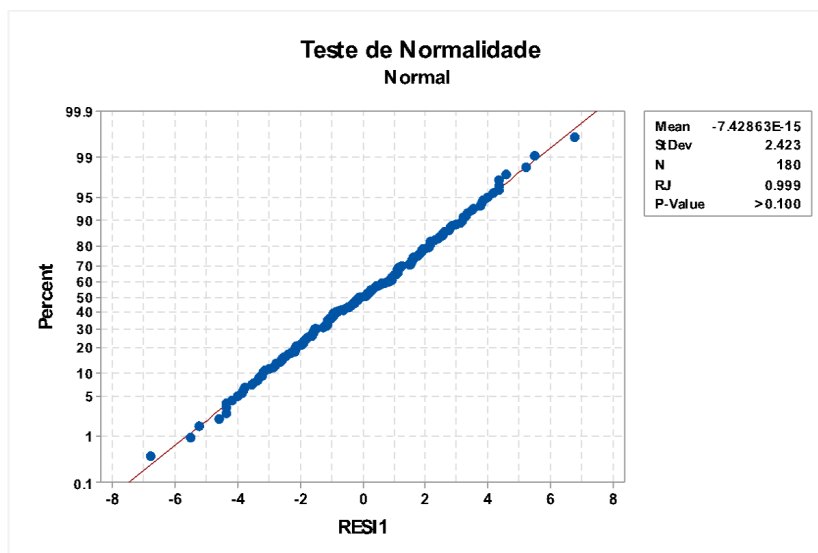
Substância	Fórmula	Quantidade
Cloreto de cálcio (1,5 mM)	CaCl ₂	0,2205 g
Fosfato de sódio (0,9 mM)	NaH ₂ PO ₄	0,1428 g
Cloreto de potássio (0,15 M)	KCl	11,1826 g
Solução Tris buffer (0,1 M)		12,112 g
*Fluoreto de sódio (10 ppm)	NaF	
Água deionizada		qsp 1L

Pesar os sais e dissolver em 1 litro de água deionizada em balão volumétrico. Checar o pH e ajustar com o ácido acético ou KCl caso não esteja correto. Imersar os espécimes na solução DES por 3 h e na solução MIN por 45 h a 37°C. Serão 8 ciclos de 48 h.

Fonte: Elaborada pelo autor.

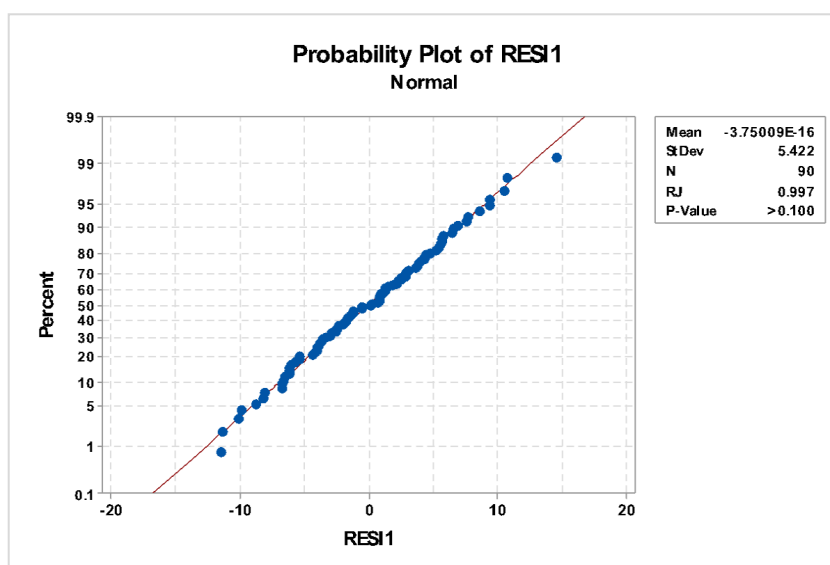
APÊNDICE B – Teste de normalidade para os valores de resistência adesiva (MPa)

Figura 28 – Gráfico da distribuição Normal (Ryan-Joiner) para ANOVA 3-fatores



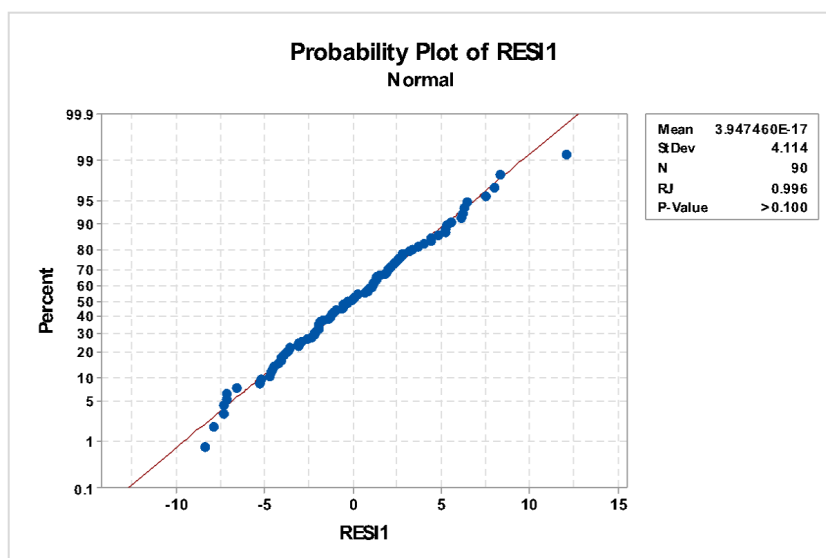
Fonte: Minitab.

Figura 29 – Gráfico da distribuição Normal (Ryan-Joiner) para os valores de 24 h



Fonte: Minitab.

Figura 30 – Gráfico da distribuição Normal (Ryan-Joiner) para os valores de 30 dias



Fonte: Minitab.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP

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

Título da Pesquisa: Avaliação da interface adesiva em dentina sadia e afetada por cárie sob pressão pulpar simulada e após envelhecimento em solventes.

Pesquisador: Tânia Mara da Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 44831415.8.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.079.299

Data da Relatoria: 22/05/2015

Apresentação do Projeto:

O Projeto referencia um campo a ser explorado em se tratando da dentina afetada, em virtude de sua permanência após a execução de preparo cavitários, de acordo com a atual filosofia conservadora. Leva em consideração que a maioria dos estudos sobre adesão ainda é realizada sobre dentina hígida e que comparativamente, há pouca informação sobre as características da interface de adesão quando se utiliza como substrato a dentina afetada por cárie. O Projeto referencia também fatores ainda sem esclarecimento como: a não correlação entre a espessura da camada híbrida e a resistência adesiva em qualquer dos substratos; a influência da umidade durante e após o procedimento adesivo; efeitos da simulação de pressão sobre os procedimentos restauradores adesivos em dentina afetada por cárie.

Objetivo da Pesquisa:

O estudo se propõe a avaliar a resistência de união e características da interface adesiva em dentina sadia e afetada por cárie, na presença de pressão pulpar simulada e após envelhecimento em solventes, esperando contribuir na compreensão dos fatores que promovem a degradação da interface adesiva e influenciam nos resultados de resistência de união longitudinal em dentina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não existe riscos por ser um estudo desenvolvido com molares humanos hígidos e os benefícios

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SÃO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 1.079.299

serão o conhecimento do comportamento dos procedimentos adesivos em ambiente úmido e em dentina afetada por cárie, sendo de extrema importância para a prática clínica considerando-se ainda que a cárie dentária é uma das doenças orais mais prevalentes na população mundial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa muito bem estruturada, de relevância, com plano de trabalho muito bem elaborado, sendo realizado em três fases, sendo que a segunda fase conta com a colaboração do Departamento de Engenharia Mecânica no Bioengineering Research Center da University of Kansas, constando o convite oficial da instituição acima citada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Consta solicitação de dispensa de TCLE por ser um estudo desenvolvido com molares humanos. Apresenta os Termos de Doação de Material Biológico dos três consultórios que doarão os dentes que também foram obtidos mediante Termo de Doação constante dos prontuários dos pacientes.

Recomendações:

ndn

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ndn

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer da relatora, aprovando o projeto.

SAO JOSE DOS CAMPOS, 26 de Maio de 2015

Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador)

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

ANEXO B – Termo de Doação de Material Biológico

TERMO DE DOAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO	
Eu, Dr.	_____
RG _____, CPF _____, CROSP _____, com	
consultório	localizado à _____
_____, na cidade	
de _____, Estado de São Paulo, declaro que estou doando	
dentes para serem utilizados em pesquisas científicas, obtidos mediante Termo de Doação	
constante dos prontuários dos pacientes.	
Declaro estar ciente que o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPh) do	
Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos da UNESP- Univ. Estadual	
Paulista poderá, a qualquer momento, solicitar cópia de todos os Termos de Doação de Material	
Biológico corretamente preenchidos por cada doador ou seu representante legal.	
São José dos Campos, _____ de _____ de 2014.	

Cirurgião-Dentista	
(profissional responsável pela coleta e destinação do material)	