

JOÃO MAURÍCIO FERRAZ DA SILVA

**RESISTÊNCIA ADESIVA E CITOTOXICIDADE “*In Vitro*” DE
DIFERENTES GERAÇÕES DE ADESIVOS DENTINÁRIOS**



2010

JOÃO MAURÍCIO FERRAZ DA SILVA

**RESISTÊNCIA ADESIVA E CITOTOXICIDADE “*In Vitro*” DE
DIFERENTES GERAÇÕES DE ADESIVOS DENTINÁRIOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, Especialidade em Dentística.

Orientador Prof. Dr. José Roberto Rodrigues

São José dos Campos

2010

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2008

S38r	Silva, João Maurício Ferraz da Resistência adesiva e citotoxicidade "In vitro" de diferentes gerações de adesivos dentinários / João Maurício Ferraz da Silva__ São José dos Campos : [s.n.], 2010 139f. : il. Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2010. Orientador: Prof. Adj. José Roberto Rodrigues. 1. Adesivos dentinários. 2. Resistência adesiva. 3. Citotoxicidade. I. Rodrigues, José Roberto. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título
------	--

tD15

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 26 de agosto de 2010.

Assinatura:

E-mail: jferrazdasilva@yahoo.com.br

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. José Roberto Rodrigues (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Prof. Dr. Eduardo Shigueyuki Uemura

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Prof. Dr. Carlos Henrique Ribeiro Camargo

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Prof. Dr. George Miguel Spyrides

Faculdade de Odontologia do Rio de Janeiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

Dr. Caio Gorgulho Zanet

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP.

São José dos Campos 23 de julho de 2010.

Dedico esse trabalho

*Aos meus amados pais, **Jairo** e **Marina**, que sempre me incentivaram e me educaram para que eu pudesse atingir os meus objetivos, além dessa orientação, contar com o amor de vocês é fator fundamental para as minhas conquistas. Amo vocês.*

*Aos meus queridos irmãos, **Pedro Ivo** e **Carolina**, meus exemplos de dedicação e estudo. A amizade e a alegria de estar ao lado de vocês são essenciais na minha vida.*

*À minha querida Vovó **Jael**, pela alegria demonstrada em todas as conquistas de filhos e netos.*

*Ao Professor **José Roberto Rodrigues***

*Meus agradecimentos pela orientação na
pesquisa e na vida.*

*Tenho uma grande admiração pela
maneira de você levar o trabalho e a vida
com muita responsabilidade, dedicação,
porém sem esquecer a alegria.*

Ao Professor e amigo **Eduardo Shigueyuki Uemura**

Meu grande “Pai Acadêmico” a quem respeito e admiro muito.

Meus mais sinceros agradecimentos pelo apoio, incentivo e ensinamentos passados desde o início da minha carreira.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente a **DEUS**, por ter continuado a me iluminar, me guiando, dando força, saúde e amor nas etapas de realização deste trabalho.

À **disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP**, nos nomes dos Professores **Lafayette Nogueira, Marcos Maekawa, Eduardo Uemura, Carlos Augusto Pavanelli e Rodrigo Máximo de Araújo** pela amizade, incentivo e apoio nesses anos de pós-graduação.

Ao professor **Gottfried Schmalz** por ter me dado a oportunidade de executar parte do trabalho em seu laboratório.

Ao professor **Helmut Schweikl** pela orientação e pelos ensinamentos passados durante a minha estada na Alemanha.

À **Birgit**, pessoa mais do que especial que apareceu na minha vida durante o doutorado sanduiche, muito obrigado pela ajuda, companhia e principalmente pelo amor vivido durante os seis meses.

Aos “**Biscateiros**” (**Guigu, Vandão, Kenzo, Quel, Michel, Luaninha, Samuca, Peter, Dadi, Marcelo, Vanessa, Douglas, Carla, Bruna e Cris**) pela família que nos tornamos nesses 6 meses, muitas histórias para contar e uma amizade mais do que especial para o resto da vida.

À **Claudi**, grande amiga e colega de trabalho, por todo o apoio, pelo ensinamento transmitido e pela imensa ajuda prestada durante a execução dos testes de barreira dentinária, como você mesmo disse: “Wir bilden ein gutes Team”.

À todos do laboratório do **ZEP (Carola, Claudia, Christine, Anton, Olly, Sandra, Christian)** pelos ensinamentos e as boas risadas durante o trabalho.

Às amigas e colegas de laboratório, **Steffi e Danijela**, pela companhia, passeios, conversas e por todos os bons momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos alemães, **Florian, Dominik, Sandy, Simone, Anne, Tim e Knoll**, pela ótima companhia, ajuda em vários momentos e por ensinarem um pouco da língua alemã.

Aos amigos **Ique e Samira**, pela ajuda que tornou possível a realização do doutorado sanduíche. Essa demonstração de amizade e confiança no meu trabalho me alegrou muito.

Aos meus grandes amigos, irmãos e sócios **Alessandro e Everton** pela amizade e companheirismo, e pela ajuda e compreensão durante o curso.

A todos os colegas de pós-graduação, em especial, **Virgílio, Daniel, Eron, Taciana, José Renato, Lílian e Alessandra**, pela ajuda e pelos bons momentos que passamos durante o curso.

Aos meus amigos **Caio, Carol, Fábio, Fernanda, Daniel Takahashi, Luciano, Eduardo, Raphael, Rodrigo, Matheus, Romildo, Larissa, Natália, Julio, Kazu e Milena** pela amizade e pela ajuda durante a realização do trabalho.

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP** pela minha formação acadêmica.

À **Universidade de Regensburg**, em especial ao **Departamento de Dentística e Periodontia**, por terem me dado a oportunidade de realização de meu doutorado sanduíche na instituição.

Ao Prof. Dr. **Clóvis Pagani**, coordenador do programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, por sempre estar disposto a ajudar e lutar por um curso de melhor qualidade.

Ao Prof. **Ivan Balducci** e Prof. **Anton Hiller** pela disposição e ajuda na parte estatística de todos os trabalhos realizados durante o curso.

Às secretárias **Silvia, Liliane e Suzana** pela atenção dada em todos os momentos da realização do trabalho.

Aos funcionários do departamento de Odontologia Restauradora e de Materiais Odontológicos e Prótese, nos nomes de **Josiane, Rosângela, Fernanda e Clélia** por estarem sempre dispostas a colaborar e pela ajuda na realização desta pesquisa.

Às secretárias do curso de pós-graduação **Erena, Lilian, Rosemary e Cida**, pelos esclarecimentos e constante colaboração durante o curso.

Às **funcionárias da Biblioteca “Profª. Leila Novaes”** por terem auxiliado na aquisição de materiais literários durante todo o curso, em especial à **Silvana**, por todas as orientações e revisão bibliográfica deste trabalho.

À **CAPES** e ao **DAAD**, pelo apoio à pesquisa e concessão de bolsa de estudo.

A todos os **funcionários e pacientes** da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da UNESP que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	12
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS E QUADROS	16
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	18
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Sistemas Adesivos	24
2.2 Citotoxicidade	44
3 PROPOSIÇÃO	65
4 MATERIAL E MÉTODO	66
4.1 Teste de Microcissalhamento	66
4.2 Teste de Citotoxicidade	74
4.2.1 Teste de Barreira Dentinária	74
4.2.1.1 Cultivo celular	74
4.2.1.2 Obtenção das fatias de dentina	76
4.2.1.3 Montagem dos <i>inserts</i>	77
4.2.1.4 Montagem das câmaras.....	79
4.2.1.5 Colocação das câmaras no sistema	79
4.2.1.6 Aplicação do material.....	81
4.2.1.7 Desmontagem do sistema	83
4.2.1.8 Teste de MTT.....	85
5 RESULTADOS	88
5.1 Teste de Microcissalhamento	88
5.2 Teste de Citotoxicidade	93
6 DISCUSSÃO	97
7 CONCLUSÕES	116

8 REFERÊNCIAS	117
APÊNDICES.....	133
ANEXO	138
<i>ABSTRACT</i>.....	139

Silva JMF. Resistência adesiva e citotoxicidade “*in vitro*” de diferentes gerações de sistemas adesivos [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2010.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar quatro diferentes sistemas adesivos (Multi-Purpose, Single Bond, SE Plus e Easy Bond – 3M ESPE) no que se refere à resistência adesiva ao microcislamento na dentina bovina. Além de avaliar a citotoxicidade desses novos sistemas adesivos por meio do teste de barreira dentinária e ensaio de MTT em fibroblastos pulpares bovinos. Para o teste de microcislamento 80 dentes bovinos tiveram suas raízes seccionadas, foram embutidos em resina acrílica e tiveram a superfície vestibular desgastada expondo-se a dentina, sendo que em 40 dentes a espessura de dentina remanescente foi de 500µm e nos outros 40 de 200µm. Os cdp receberam então o procedimento adesivo de acordo com as instruções do fabricante e com auxílio de uma matriz metálica, cilindros de resina (Z 250 – 3M ESPE) de 0,8 mm de diâmetro e 1mm de altura foram construídos. Após 24h os cdp foram então submetidos ao ensaio de microcislamento. Para avaliar a citotoxicidade foi usado o teste de barreira dentinária. Células pulpares bovinas transformadas foram cultivadas em redes de nylon por 2 semanas, obtendo-se uma cultura de 3 dimensões. Essas culturas celulares foram separadas dos materiais testados por fatias de dentina de 500 e 200µm em um dispositivo de perfusão celular. Os materiais foram aplicados na porção cavitária do dispositivo de acordo com as instruções do fabricante, e um material de moldagem a base de sílica (President, Coltene) foi usado como controle negativo (100% de viabilidade celular). Após 24 h de período de exposição, a viabilidade celular foi mensurada fotometricamente (teste MTT). Por meio de estatística descritiva verificou-se que a melhor eficiência adesiva foi apresentada pelo adesivo auto-condicionante de um passo só, Easy Bond (21,06 MPa - 200µm; 27,01 MPa- 500µm) seguido pelo Single Bond (15,64 MPa - 200µm; 23,45 MPa- 500µm), SE Plus (18,23 MPa - 200µm; 20,07 MPa- 500µm) e Multi Purpose (15,24 MPa - 200µm; 17,99 MPa - 500µm). Além disso, verificou-se que em todos os adesivos a resistência foi maior nos cdp com espessura de dentina de 500µm. Em relação à citotoxicidade o Multi Purpose reduziu levemente a viabilidade celular para 92.5% (200µm) e 93.7% (500µm). Single Bond foi moderadamente tóxico, reduzindo a viabilidade celular para 71.1% (200µm) e 64.6% (500µm). O adesivo auto-condicionante SE Plus diminuiu a viabilidade celular para 85% (200µm) e 71% (500µm), e foi considerado moderadamente tóxico. Em contraste, o Easy Bond não reduziu a viabilidade celular nesse teste, independente da espessura de dentina. Concluiu-se que todas as quatro gerações de adesivos testados apresentam boa adesividade à dentina em cavidades profundas, e que possivelmente a técnica mais complexa de aplicação dos adesivos de condicionamento ácido total interferiu na qualidade adesiva desses produtos. Como dois dos quatro adesivos

estudados mostraram toxicidade moderada, isso poderia sugerir em cavidades profundas uma proteção pulpar.

Palavras – chave: adesivos dentinários. Resistência adesiva. Citotoxicidade.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Confecção do cdp: a) Dente bovino; b) seccionamento da raiz; c) abertura coronária e completa remoção do teto da câmara pulpar; d) verificação da espessura de dentina remanescente; e) detalhe da marcação de 0,8mm de dentina remanescente no espécimen; f) cdp embutido em resina acrílica..... 68
- Figura 2 - Confecção do cilindro de resina composta para ensaio de microcissalhamento: a) matriz metálica; b) posicionamento do cdp na matriz e do tubo de tygon; c) resina composta inserida no tubo após fotopolimerização; d) cdp finalizado pronto para o ensaio de microcissalhamento..... 72
- Figura 3 - Cdp posicionado para ensaio de microcissalhamento..... 73
- Figura 4 - Cultivo celular: a) Células SV3neoB na passagem 20; b) cultivo das células em redes de poliamido; c) cultivo das culturas em 3 dimensões em placas de 24 poços; d) cultura celular em três dimensões..... 76
- Figura 5 - Obtenção das fatias de dentina: a) corte no micrótomo; b) conferência da espessura no paquímetro; c) quebra das fatias; d) armazenamento em meio de cultura..... 77
- Figura 6 - Montagem dos *inserts*: a) *insert* metálico; b) colocação da rede com as células em cultura tri-dimensional; c) colocação da fatia de dentina por sobre a rede; d) *insert* montado..... 78
- Figura 7 - Montagem das câmaras: a) Esquema da câmara de perfusão; b) *insert* montado na câmara..... 79
- Figura 8 - Montagem do sistema: a) Câmaras montadas no sistema; b) sistema de tubos de difusão; c) sistema conectado nas garrafas de meio de difusão; d) sistema

	montado.....	80
Figura 9 -	Aplicação do material: a) câmara de difusão aberta; b) aplicação do adesivo; c) fotopolimerização do adesivo; d) aplicação da resina composta; e) fotopolimerização da resina composta; f) material aplicado.....	82
Figura 10 -	Desmontagem do sistema: a) <i>Inserts</i> removidos das câmaras; b) corte da parte central da rede; c) <i>Insert</i> aberto; d) detalhe da rede cortada, região central utilizada para o teste de viabilidade celular; e) células armazenadas em meio de cultura antes do teste de MTT.....	84
Figura 11 -	Teste de MTT: a) Células em contato com o corante MTT; b) Incubação das células em estufa a 37°C e 5% de CO ₂ ; c) Células coradas após incubação; d) Células colocadas em contato com o DMSO; e) Solução de DMSO tingida; f) Análise da densidade óptica da solução tingida em Espectrofotômetro.....	86
Figura 12 -	Gráfico de colunas (média±desvio padrão) dos dados de resistência adesiva obtidos segundo quatro tipos de adesivos sob duas espessuras da dentina.....	89
Figura 13 -	Gráfico <i>Interaction Plot</i> dos valores de Mpa para os diferentes sistemas adesivos e espessura de remanescente dentinário.....	92
Figura 14 -	Gráfico de colunas referente às porcentagens de viabilidade celular dos grupos controles e dos adesivos testados, nas espessuras de 200 e 500 µm.....	94

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Adesivos utilizados na pesquisa.....	69
Quadro 2 -	Materiais utilizados como controle negativo e positivo no teste de barreira dentinária.....	81
Tabela 1 -	Valores médios e desvio-padrão dos valores de resistência adesiva (Mpa) obtidos dos cdp dos diferentes sistemas adesivos conforme a espessura de dentina remanescente.	89
Tabela 2 -	ANOVA (dois fatores) para os dados obtidos	90
Tabela 3 -	Teste de Tukey (5%) para a variável sistema adesivo.....	91
Tabela 4 -	Teste de Tukey (5%) para a variável remanescente dentinário.....	91
Tabela 5 -	Teste de Tukey (5%) para as variáveis sistema adesivo e remanescente dentinário.....	92
Tabela 6 -	Porcentagens de células viáveis dos grupos controle e experimentais nas diferentes espessuras de dentina (200 e 500 μm).....	93
Tabela 7 -	Comparação entre os grupos - teste não paramétrico Mann–Whitney U -test ($\alpha=0.05$).....	96
Tabela 8 -	Valores de resistência adesiva dos materiais estudados no teste de microcislamento com espessura de dentina de 200 μm	133
Tabela 9 -	Valores de resistência adesiva dos materiais estudados no teste de microcislamento com espessura de dentina de 500 μm	134
Tabela 10 -	Valores de densidade ótica dos materiais estudados no teste de barreira dentinário número 1 (200 μm).....	135

Tabela 11 -	Valores de densidade ótica dos materiais estudados no teste de barreira dentinário número 2 (200 μm).....	135
Tabela 12 -	Valores de densidade ótica dos materiais estudados no teste de barreira dentinário número 3 (200 μm).....	136
Tabela 13 -	Valores de densidade ótica dos materiais estudados no teste de barreira dentinário número 4 (500 μm).....	136
Tabela 14 -	Valores de densidade ótica dos materiais estudados no teste de barreira dentinário número 5 (500 μm).....	137
Tabela 15 -	Valores de densidade ótica dos materiais estudados no teste de barreira dentinário número 6 (500 μm).....	137

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C = grau centígrado

µm = micrometros

3-D = três dimensões

cm = centímetros

h = horas

Kg = kilograma

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

min = minutos

mm = milímetros

rpm = rotações por minuto

s = segundos

MTT = 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio

HEMA = 2 hidroxietilmetacrilato

TEGDMA = trietilenoglicol dimetacrilato

Bis-GMA = bisfenil A glicidil metacrilato

UDMA = uretano dimetacrilato

Cdp = corpo-de-prova

kPa = kilo Pascal

MPa = mega Pascal

LED = Light Emiting Diode

MP = Multi-Purpose

SB = Single-Bond

SE = SE Plus

EB = Easy Bond

MEM α = meio mínimo essencial

SBF = Soro bovino fetal

PBS = solução salina tamponada com fosfato

EDTA = ácido etileno diamino tetracético

DMSO = dimetilsufóxido

SDH = succinil desidrogenase

CaGPG 14 = Calcium Glas Pulver gemisch 14

1. INTRODUÇÃO

Os conceitos de promoção de saúde, prevenção e a estética sedimentam a Odontologia atual, que atravessa um período de constante progresso. O surgimento das técnicas adesivas e materiais restauradores são um exemplo disso, devendo, porém, sua aplicação clínica ser sustentada por bases científicas conseguidas por meio de pesquisas envolvendo novas técnicas e materiais.

Essa constante atualização se torna necessária, fazendo com que a função caminhe junto com os novos conceitos de Odontologia, melhorando o tratamento e conseqüentemente obtendo uma maior longevidade.

Devido à importância dos mecanismos de adesão, o processo de união entre os materiais restauradores e a estrutura dental passa por um longo e árduo período de investigação desde os anos 50. Neste período tivemos o início da “Odontologia Adesiva”, onde as constantes pesquisas foram responsáveis pela imensa evolução observada ao longo dos anos. O conceito do condicionamento ácido, apresentado por Buonocore em 1955 despertou o interesse por novas investigações. Dessa maneira passamos por Bowen (1963) e o desenvolvimento das resinas compostas e Silverstone et al. (1975) demonstrando os diferentes padrões de condicionamento da superfície do esmalte. Posteriormente, pesquisas foram conduzidas para investigar os mecanismos de adesão dos materiais restauradores a dentina, uma vez que devido às características histológicas e estruturais da dentina, muito diferente da do esmalte, a união adesiva àquele substrato não atingia os mesmos valores quando comparadas ao esmalte.

A melhoria na qualidade de união dos sistemas adesivos apresentou-se acompanhada de uma maior complexidade técnica de aplicação clínica, com a necessidade de execução de múltiplos passos operatórios, dificultando o trabalho do profissional e, de certa forma, comprometendo a homogeneidade dos resultados de adesão (Toba et al., 2003).

Atualmente, observa-se uma tendência ao desenvolvimento de sistemas mais simples, que associam menos passos operatórios, no sentido de tornar a técnica adesiva menos sensível, diminuindo a possibilidade de erros e, conseqüentemente, de falhas na adesão, como excessivo condicionamento ácido ou ressecamento da dentina. Além disso, o menor tempo de trabalho diminui o risco de contaminação da dentina durante o procedimento adesivo, fator de extrema importância para a qualidade de união e resposta biológica do tecido (Brackett et al., 2005).

Na odontologia restauradora existem diversas técnicas de aplicação dos materiais. A utilização de materiais forradores como base é bastante comum nesses procedimentos. Essas bases são indicadas como reforço da estrutura dental, amortecedores de carga mastigatória e também como protetores do complexo dentina-polpa (Mc Cullock e Smith, 1986; Yap et al., 2002). Existem diversos materiais que podem ser utilizados para tal fim, sendo sua indicação dependente de suas propriedades. Os cimentos de ionômero de vidro e os cimentos de hidróxido de cálcio são os materiais mais indicados para a proteção desse complexo (Silva et al., 2006). Porém, com o surgimento da odontologia adesiva, os adesivos dentinários passaram a ser usados não só como o meio de união entre estrutura dentária e material restaurador, mas também como agente protetor do complexo. Alguns autores indicam a aplicação de sistemas adesivos como forradores apenas em cavidades rasas e médias, pois acreditam que em cavidades profundas estes materiais podem ser tóxicos aos tecidos adjacentes (Schmalz et al., 2002). Porém, outros autores acreditam que mesmo em cavidades profundas

e até em proteção pulpar direta os sistemas adesivos podem ser efetivos sem causar danos às estruturas e promovendo boa adesão (Akimoto et al, 1998; Cox, 2000; Hafez et al., 2000). Segundo esses autores uma hibridização adequada pode selar tanto a dentina quanto a polpa, dessa maneira protegendo-as de injúrias adicionais e infecções pós-operatórias e permitindo uma completa neoformação tecidual por meio da capacidade reacional do complexo dentinário-pulpar.

Idealmente, os adesivos dentinários deveriam possuir propriedades físico-químicas satisfatórias e apresentar boa tolerância ao tecido dentário e estruturas adjacentes. Entretanto, o sucesso clínico dos materiais, não depende apenas de suas propriedades físico-químicas, mas também de sua segurança biológica (Schweikl et al., 2006). A proximidade com o tecido pulpar, ao usarmos os sistemas adesivos para a realização de restaurações, pode levar a uma irritação pulpar devido à difusão de alguns componentes pelos túbulos dentinários (Costa et al., 1999). Dessa maneira uma propriedade de grande importância, que sempre deve ser levada em consideração, é a biocompatibilidade dos materiais, uma vez que estes ficarão em contato direto com os tecidos dentários por longos períodos de tempo.

Portanto, sistemas adesivos e seus componentes deveriam ser exaustivamente testados quanto ao seu comportamento biológico antes de serem utilizados clinicamente. Com esse propósito, inicialmente, experimentos em animais e testes em cultura celular devem ser aplicados. No entanto, os experimentos em animais para análise de citotoxicidade de materiais são dispendiosos, consomem bastante tempo e sua abrangência ainda é um assunto controverso na literatura. Os métodos de cultura celular, por outro lado, são relevantes e satisfatórios para a avaliação de propriedades biológicas básicas de materiais dentários. São melhores padronizados e reproduzíveis, sendo rápidos e fáceis na sua realização,

além de apresentarem custo relativamente baixo (Huang, Chang, 2002; Camps et al., 2003; Souza et al., 2006). Além disso, o experimento realizado *in vitro* tem como vantagem a facilidade no controle dos fatores experimentais, o que representa, frequentemente, problema em experimentos *in vivo* (Huang, Chang, 2002).

Sabendo que a camada de dentina remanescente é uma proteção natural da polpa aos efeitos citotóxicos dos materiais odontológicos (Galler et al., 2005; Demirci et al., 2008), os testes de citotoxicidade *in vitro*, que incluem barreira dentinária, parecem se aproximar das condições clínicas. Estes testes são importantes, pois se pode obter dados científicos relevantes, os quais contribuem diretamente com o desenvolvimento de novos materiais e técnicas, assim como evitam a ocorrência de danos ao complexo dentino-pulpar quando da utilização de materiais tóxicos ou novos procedimentos clínicos agressivos.

A determinação da viabilidade celular, bem como a citotoxicidade, pode ser interpretada por marcação celular com cromo radioativo (Pascon et al., 2000), identificação do halo de inibição pelo contato direto entre materiais e células, análise do grau de destruição da monocamada celular, contagem de células pela exclusão do azul de Trypan (Scelza et al., 2001; Cavalcanti et al., 2005), entre outros. O método de avaliação pelo ensaio do corante brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) é extremamente confiável, rápido e facilmente reproduzível verificando não apenas o número de células em uma amostra, mas também a atividade metabólica devido à ação de desidrogenases, como a succinil desidrogenase, presente em células viáveis.

Diante de toda a evolução dos materiais dentários e da técnica de aplicação, em especial dos sistemas adesivos, verificamos a importância da avaliação das propriedades físico-químicas, analisando também a biocompatibilidade do material.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Para facilitar o entendimento do embasamento teórico, este capítulo foi dividido em dois tópicos: sistemas adesivos, onde descrevemos a evolução dos sistemas e os resultados de pesquisas envolvendo as diferentes gerações; e citotoxicidade, em que apresentamos os testes realizados para a obtenção deste tipo de informação e pesquisas nesta área em relação aos sistemas adesivos.

2.1 Sistemas Adesivos

A odontologia está em constante evolução, com a intenção de buscar sempre melhores resultados clínicos, novos materiais e novas técnicas operatórias são desenvolvidos com o passar dos anos. A adesão às estruturas dentárias é um dos grandes desafios da odontologia, conseqüentemente é um dos assuntos mais pesquisados. Dessa maneira a evolução dos sistemas adesivos é algo marcante no meio odontológico, porém esse progresso deve ser baseado em pesquisas clínicas e laboratoriais que comprovem sua efetividade clínica.

Um passo importante na Odontologia Adesiva foi dado em 1955 quando Buonocore avaliou alterações no esmalte dental após a aplicação do ácido fosfórico a 85% durante 30 s. Foi notado que a superfície do esmalte apresentava uma opacidade, diante disso o autor concluiu que o uso do ácido fosfórico alterou química e morfológicamente a superfície do esmalte por meio da criação de microporosidades, obtendo retenções que aumentaram fortemente a união da resina acrílica restauradora ao esmalte.

A grande evolução da Odontologia Estética foi marcada em 1963, quando Bowen ao buscar um material restaurador estético com melhores propriedades, incorporou partículas de sílica tratadas com silano à fase orgânica de uma resina à base de Bis-GMA, com o objetivo de reforço do material. Ao comparar este material com os materiais disponíveis na época e com a estrutura dental, quanto às suas propriedades físicas, os resultados mostraram que o novo compósito apresentou melhor desempenho que os demais. O autor concluiu que a adição de carga inorgânica desempenhou papel fundamental no reforço do material, melhorando suas propriedades físicas.

Com o objetivo de verificar a possibilidade da penetração de resina ser o fator mecânico responsável pela adesão desse material à superfície do esmalte condicionado, Buonocore et al. (1968) desenvolveram uma pesquisa com os materiais utilizados na época. Observaram que a formação dos *tags* devido ao condicionamento ácido era sim de fato, a causa principal da adesão das resinas à estrutura de esmalte condicionada. Além disso, concluíram que a diferença na força de união adesiva e sua longevidade entre os diversos materiais estava relacionada com a diferença em suas propriedades físicas e químicas.

Outro marco na evolução dos sistemas adesivos foi a descrição da camada híbrida por Nakabayashi et al. em 1982 ao realizar uma pesquisa

com o objetivo de avaliar a efetividade do 4-metacriloxietil trimetacrilato anidrido (4-META), na adesão ao esmalte e dentina condicionada por ácidos. O condicionamento com ácido cítrico a 10% e solução de cloreto férrico a 3% previamente a adesão provou ser eficaz. O monômero com porções hidrofílicas e hidrofóbicas infiltraram os tecidos duros, nesta penetração, os monômeros polimerizaram na dentina condicionada peri e intertubular e uma adesão adequada à estrutura foi obtida. Os autores concluíram que a penetração e polimerização reforçam a estrutura dental.

Em uma revisão de literatura Rueggeberg (1991) analisou aspectos referentes à escolha e tratamento do substrato dental utilizados em testes de adesão, comparando dentes humanos e bovinos. Devido à dificuldade de obtenção dos dentes humanos e o risco de infecção que envolve este, a busca por um substituto se intensificou e os dentes bovinos, pela sua maior disponibilidade, passaram a ser bastante utilizados em testes de adesão. Os autores concluíram que existe uma série de fatores que podem interferir nos resultados de resistência adesiva. Mesmo não havendo uma metodologia para o critério de seleção e preparo do substrato, o importante é haver uma padronização dos métodos de análise, bem como a interpretação dos dados obtidos.

Com as intensas pesquisas dos materiais adesivos, diferentes testes de adesão são realizados. Fowler et al. (1992) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a influência das variáveis nos testes de adesão. Além do tipo de teste (cisalhamento ou tração), o desenho do aparelho de teste e o substrato dentário são variáveis importantes nos testes de adesão. Os autores analisaram a adesão por meio de método de cisalhamento e tração. Verificaram que o teste de cisalhamento apresentou maior número de falhas adesivas reais, portanto, segundo os autores, deve ser preferido para testes de adesão.

Harnirattisai et al. (1993) realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de observar a estrutura na interface de um adesivo dentinário e a dentina de lesões cervicais de erosão/abrasão.

Para tanto, foram selecionados 10 primeiros pré-molares superiores livres de cárie e com a presença de lesão de erosão/abrasão, extraídos por motivos periodontais. As paredes da lesão foram limpas e em seguida foi realizado um condicionamento ácido com ácido fosfórico 37% durante 60 s. Os espécimes foram então lavados com *spray* de ar/água por 10 s e secos com ar durante 15 s antes da aplicação do sistema adesivo. Foi usada uma fina camada de resina *flow* para cobrir a lesão cervical. Os dentes foram então armazenados por 24 h e em seguida foram seccionados no sentido vestibulo-lingual com auxílio de discos de diamante. Obtida as duas metades, uma delas foi preparada para análise em MEV e a outra para o teste de microdureza com a intenção de verificar uma possível relação entre a espessura da camada híbrida formada e a dureza superficial das paredes da lesão. A profundidade de impregnação do adesivo foi medida diretamente nas imagens do MEV.

Os resultados mostraram que a maioria dos túbulos dentinários estavam obliterados por deposição e que a profundidade de penetração do adesivo foi entre 0,3 a 3 μ m. Uma pequena quantidade de *tags* foi observada além de uma camada híbrida mais fina e com uma morfologia variável na parede oclusal das lesões.

Kugel et al.(1993), avaliaram o efeito do condicionamento ácido em esmalte e dentina por meio de análise em MEV. Foram usados o ácido fosfórico a 10 e 32%; ácido maleico a 10%; uma combinação de ácido fosfórico a 25% e oxalato de alumínio, todos aplicados por 15 s. Os resultados mostraram que a dentina tratada com ácido fosfórico apresentou desobstrução e alargamento dos túbulos, o ácido maleico promoveu a

remoção da *smear layer* e a abertura dos túbulos, já a combinação removeu a *smear layer* e promoveu formação parcial de *plugs*. Os autores concluíram que em todos os tratamentos houve remoção da *smear layer* e exposição dos túbulos dentinários, porém o tratamento com a combinação dos ácidos resultou em *plugs* subsuperficiais nos túbulos dentinários.

Øilo (1993) realizou uma revisão de literatura sobre testes de adesão e seus significados. A resistência adesiva é a força por unidade de área necessária para romper uma ligação. O propósito de romper esta ligação é estabelecer um valor numérico que represente o quão forte era aquela adesão. Para tanto, pode-se lançar mão dos testes de tração e o de cisalhamento. Nos testes de tração, a adesão é rompida por uma força incidindo perpendicular à superfície do dente. A dificuldade neste teste é manter o alinhamento tanto do dente quanto da força, evitando que haja concentração de *stress* devido à geometria interfacial incorreta. No teste de cisalhamento, a adesão é rompida por uma força incidindo paralelamente à superfície do dente. Para o autor, os testes de adesão são capazes de fornecerem uma boa indicação de como uma determinada combinação de adesivo e compósito irá funcionar.

A evolução dos materiais odontológicos atinge a era dos adesivos autocondicionantes, novos materiais desenvolvidos com a intenção de diminuir passos clínicos e promoverem melhor adesão às estruturas dentárias. Pesquisas passaram a ser realizadas com estes novos materiais, Watanabe e Nakabayashi (1993) desenvolveram um *primer* autocondicionante que consistia de uma solução aquosa de 2-metacriloxietil fenila hidrogênio fosfato (Phenyl-P) 20% e de 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) 30% para adesão em esmalte e dentina simultaneamente. Os autores verificaram que o *primer* reduzia o tempo de trabalho, eliminando o passo de lavagem do ácido, além de evitar o risco de colapso das fibras colágenas

dentinárias. Porém, houve uma retenção da *smear layer* a qual foi responsável pela difusão insuficiente do adesivo.

Ainda avaliando as novas gerações de sistemas adesivos, Van Meerbeek et al. (1998) realizaram uma revisão de literatura. Uma classificação usada para os sistemas é em relação à *smear layer*. Um grupo promove a remoção completa desta e são subdivididos em um ou dois frascos, dependendo da aplicação combinada ou separada do *primer* e do adesivo. O outro grupo se trata dos sistemas autocondicionantes, que apenas modifica a *smear layer*. Estes sistemas contêm um monômero ácido Phenyl-P e HEMA para simultaneamente condicionar e tratar o substrato. Os autores afirmam que além da simplicidade da técnica de utilização, estes sistemas promovem uma desmineralização superficial da dentina e a penetração simultânea de monômeros.

Outra revisão de literatura que teve com tema o estado presente e perspectivas futuras da Odontologia Adesiva foi realizada por Lopes et al. (2002). Os autores citam duas técnicas adesivas, que segundo eles são as mais proeminentes hoje em dia: condicionamento total e os sistemas autocondicionantes. Baseados em pesquisas, os adesivos com condicionamento total prévio à sua aplicação, já demonstraram serem eficazes tanto em situações laboratoriais quanto clínicas. Porém os sistemas autocondicionantes necessitam provar sua eficácia. A evolução dos novos sistemas é intensa, porém os resultados envolvendo estes materiais não são previsíveis, mas alguns sistemas, como o Prompt L-Pop (3M ESPE) e o Clearfil SE Bond (Kuraray), alcançaram resultados positivos nas estruturas dentárias. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar a evidência destes sistemas.

Duke (2002) em uma revisão de literatura, afirma que com o surgimento dos adesivos autocondicionantes muitos profissionais passaram

a utilizar estes novos materiais. O autor enfatiza a importância de pesquisas científicas comprovarem a efetividade dos lançamentos antes deles serem utilizados em consultórios e clínicas. Segundo o autor os cirurgiões dentistas têm o costume de esperar a comprovação científica dos novos materiais para então lançarem mão deles no tratamento de seus pacientes. Porém, no caso dos adesivos autocondicionantes, por diminuírem o tempo clínico das sessões, os profissionais ignoraram este aspecto e passaram a usar os novos sistemas em larga escala. Enquanto a comunidade científica não comprovar a efetividade dos sistemas adesivos autocondicionantes, o autor sugere aos clínicos que caminhem devagar e foquem exclusivamente nos interesses de seus pacientes.

Para Rodrigues Filho e Lodovici (2003) os problemas técnicos relacionados à utilização de sistemas adesivos de condicionamento total estão associados às características morfológicas e de composição dos substratos aderentes, sobretudo no que se refere à complexidade da dentina. Diante disso, novos sistemas surgiram com a proposta de acabarem com os problemas na união adesiva devido à complexidade da obtenção desta na dentina. Os chamados sistemas autocondicionantes promovem uma penetração do adesivo ao mesmo tempo em que vai ocorrendo a desmineralização da dentina. Os autores concluíram que os novos sistemas adesivos são promissores e constituem uma boa alternativa para casos específicos, por facilitarem a técnica adesiva e garantirem uma menor influência de variáveis inerentes ao processo. Entretanto, por ainda serem muito recentes, requerem mais estudos clínicos longitudinais, para considerarmos estes sistemas como substitutos dos convencionais.

Com o surgimento dos novos sistemas adesivos autocondicionantes é importante encontrarmos técnicas de utilização que melhorem o seu desempenho clínico. Diante disso, Roh e Chung em 2005 desenvolveram uma pesquisa com o objetivo de verificar se a utilização do adesivo e da

resina composta do mesmo fabricante promove uma maior resistência adesiva quando comparados a outras combinações de diferentes fabricantes.

Para a confecção dos cdp foram utilizados terceiros molares extraídos por motivos ortodônticos. Estes tiveram a porção oclusal e as raízes seccionadas resultando em discos de 2 mm. Foram utilizados 5 diferentes tipos de adesivos e 5 resinas compostas:

- a) Prime & Bond NT / Spectrum (Dentsply)
- b) Onecoat Bond / Synergy Compact (Coltene)
- c) Excite / Tetric Ceram (Vivadent)
- d) Syntac / Tetric Ceram (Vivadent)
- e) Clearfil SE Bond / Clearfil AP-X (Kuraray)
- f) Z 100 (3M ESPE)

Foram formados 25 grupos de acordo com as combinações entre adesivo e resina composta. Após os tratamentos de superfície na dentina, cilindros de resina composta de 0,7 mm de diâmetro e 0,4 mm de altura foram construídos para a realização do ensaio de micro-cisalhamento.

Os resultados mostraram uma maior eficiência dos adesivos autocondicionantes em relação aos de condicionamento total, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Entre os adesivos autocondicionantes, não foi verificada diferença na resistência adesiva em função da resina composta utilizada, já nos de condicionamento total, algumas combinações apresentaram alterações na resistência de união. Dessa maneira os autores concluíram que não houve um aumento na resistência adesiva quando feita uma combinação de adesivo e resina composta de mesmo fabricante, especialmente nos adesivos autocondicionantes.

Sempre com o objetivo de melhorar a união adesiva entre dente e material restaurador, tratamentos de superfícies são realizados nos substratos. Com a intenção de avaliar, por meio de microscopia, o efeito de alguns pré-tratamentos de superfície de dentina Montes et al. (2005) realizaram um estudo.

Foram obtidos 30 dentes bovinos que tiveram a dentina exposta por meio de desgaste com lixa. Em seguida os dentes foram divididos em 6 grupos que receberam diferentes tratamentos em suas superfícies:

- a) Grupo 1 : Controle, não foi realizado nenhum tratamento;
- b) Grupo 2 : a dentina foi condicionada com ácido fosfórico a 37% durante 15 s;
- c) Grupo 3: a dentina foi condicionada com ácido fosfórico a 37% durante 15 s e depois foi aplicado NaOCl durante 1 min;
- d) Grupo 4: foi aplicado NaOCl durante 1 min;
- e) Grupo 5: foi aplicado o sistema autocondicionante Clearfil SE Bond;
- f) Grupo 6: foi aplicado o sistema autocondicionante Clearfil SE Bond e depois foi aplicado NaOCl durante 1 min.

Os resultados mostraram diversos aspectos:

- a) Grupo 1: apresenta uma *smear layer* cobrindo a dentina com características de uma crosta de debris que apresentava pouca porosidade;
- b) Grupo 2: o tratamento provocou a completa remoção da *smear layer* abrindo os túbulos, sendo o diâmetro deles de 3 a 4 μ m;

- c) Grupo 3: além da remoção da camada híbrida, o tratamento realizado promoveu a completa remoção do colágeno inter e peritubular;
- d) Grupo 4: quando apenas o NaOCl foi aplicado por sobre a *smear layer*, não houve grandes alterações na morfologia da superfície;
- e) Grupo 5: o tratamento com o sistema auto-condicionante foi suficiente para dissolver a *smear layer*, porém removeu parcialmente os *smear plugs*. A desmineralização foi superficial e não mostrou uma diferença nítida entre dentina intertubular e peritubular.
- f) Grupo 6: observou uma maior dissolução dos *smear plugs* e uma permanência das fibras colágenas peritubulares.

Diante dos resultados, os autores concluíram que os tratamentos realizados nesse estudo mostraram diferenças significantes no substrato dentina, o que pode influenciar nos resultados dos procedimentos adesivos.

Com o surgimento dos adesivos autocondicionantes diversas pesquisas envolvendo estes sistemas foram realizadas. Além de verificarem a eficácia destes novos adesivos dentinários, os autores os comparavam entre si. Diante disso, Sasakawa et al. (2005) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a resistência adesiva à dentina, por meio de ensaio de microcisalhamento, de diferentes sistemas autocondicionantes e comparar a morfologia da interface resina dentinade cada adesivo.

Foram selecionados para a pesquisa 24 terceiros molares, dos quais foram obtidas fatias de dentina de 1 mm de espessura. A porção oclusal da fatia foi polida com lixa d'água n° 600 para alisar a superfície e promover a

formação da *smear layer*. Em seguida as fatias foram divididas em 6 diferentes grupos de acordo com o adesivo aplicado:

- a) Adper Promt L-Pop (3M ESPE);
- b) AQ Bond Plus (Sun Medical);
- c) OBF-2 (Tukuyama);
- d) Reactmer Bond (Shofu);
- e) Xeno III (Dentsply);
- f) SE Bond (Kuraray) – controle.

Após a aplicação do adesivo foram construídos 3 ou 4 cilindros de dentina em cada fatia de dentina, esses cilindros apresentavam 0,8 mm de espessura e 1 mm de altura. Em seguida foram armazenados em água a 37°C durante 24h antes de serem submetidos ao ensaio de microcisalhamento. Para análise da interface dentina/adesivo/resina fatias de resina foram construídas sobre as fatias de dentina. Após seccionamento os corpos-de-prova foram avaliados em microscopia eletrônica de varredura.

Os autores observaram uma menor resistência adesiva dos autocondicionantes de um passo só, com exceção do adesivo AQ Bond Plus, que mostrou valores semelhantes ao do grupo controle. Em relação à interface foi observado que a camada híbrida formada pelos sistemas de um passo só apresentava espaços vazios, sem penetração de adesivo, o que para os autores justifica a menor resistência desses sistemas.

Knobloch et al. em 2007 avaliaram alguns destes novos adesivos. O objetivo da pesquisa foi verificar a resistência adesiva de 3 adesivos autocondicionantes de um passo, 2 adesivos de dois passos e um adesivo de condicionamento ácido prévio, por meio de ensaio de microtração.

Foram selecionados 24 terceiros molares humanos isentos de cárie que tiveram a porção oclusal seccionada com discos de diamante para a exposição da dentina. Em seguida os dentes foram divididos em 6 grupos que receberam a aplicação dos sistemas adesivos estudados:

- a) Clearfil SE (Kuraray);
- b) Optibond Solo Plus-self-etch (Kerr Corp);
- c) iBond (Heraeus Kulzer);
- d) G-Bond (GC America);
- e) Clearfil S3 Bond (Kuraray);
- f) Prime & Bond NT (Dentsply).

Os adesivos foram aplicados de acordo com as instruções dos fabricantes e em seguida foram construídos cilindros de resina em incrementos de 1 mm por sobre a dentina tratada. Os espécimes foram então seccionados e obtidos 20 palitos para cada grupo para o ensaio de microtração.

Os resultados permitiram que os autores concluíssem que os adesivos autocondicionantes apresentam uma menor adesividade à dentina quando comparados com um adesivo que necessita do condicionamento ácido prévio. Quando comparados entre si, os adesivos autocondicionantes de 2 e 1 passo mostraram valores semelhantes de resistência adesiva.

Banomyong et al. em 2007 realizaram uma pesquisa com o objetivo de comparar a permeabilidade dentinária usando quatro condicionadores de superfície. Além disso, verificaram o efeito desses condicionadores na

resistência adesiva de um cimento de ionômero de vidro e dois adesivos dentinários.

Para o condicionamento da superfície foram utilizados:

- a) Condicionador de dentina (ac. Poliacrílico 10%)
- b) condicionador de cavidade (ác. Poliacrílico 20% + 3% Al Cl₃);
- c) ácido fosfórico 37%;
- d) primer do adesivo Clearfil SE Bond.

Primeiramente foi realizado o teste de permeabilidade dentinária após a aplicação dos agentes de superfície. A verificação foi feita por meio de um aparelho especial para verificar passagem de fluídos em duas condições de pressão diferentes (0 e 1,3 kPa).

Após o teste de permeabilidade dentinária foi realizado o teste de microcisalhamento. Os grupos foram divididos de acordo com o tratamento de superfície e o material restaurador:

- a) Grupo 1: sem condicionamento, sem agente adesivo e material restaurador cimento de ionômero de vidro (Fuji IX GP – GC)
- b) Grupo 2: condicionador de dentina, sem agente adesivo e material restaurador cimento de ionômero de vidro (Fuji IX GP – GC)
- c) Grupo 3: condicionador de cavidade, sem agente adesivo e material restaurador cimento de ionômero de vidro (Fuji IX GP – GC)

- d) Grupo 4: condicionamento com ac. fosfórico 37%, adesivo Single Bond 2 (3M) e material restaurador Filtek supreme XT (3M);
- e) Grupo 5: condicionamento com o primer do Clearfil SE, adesivo do Clearfil SE e material restaurador Filtek supreme XT (3M).

Os grupos de 6 a 10 seguiram respectivamente os mesmos procedimentos dos grupos de 1 a 5, porém nos 5 primeiros grupos o ensaio de microcisalhamento foi realizado com pressão pulpar simulada em 0 kPa enquanto que os últimos grupos a pressão pulpar foi de 1,3 kPa.

Os resultados mostraram que apenas a superfície dentinária condicionada com ácido fosfórico teve a permeabilidade aumentada, em pressão simulada de 1,3 kPa. No teste de microcisalhamento os autores verificaram que os valores variaram de acordo com o sistema adesivo utilizado, sendo que o sistema autocondicionante apresentou melhor desempenho que o sistema de condicionamento ácido total, tanto na pressão de 0 kPa quanto na de 1,3 kPa. O desempenho dos sistemas nas diferentes pressões foi afetado apenas no caso do Single Bond 2, sendo os valores de união adesiva sob pressão de 0 kPa maiores quando a pressão foi simulada em 1,3 kPa.

Diante disso os autores concluíram que a hipótese de que não haveria diferença na permeabilidade dentinária e na resistência adesiva entre os grupos experimentais foi rejeitada.

Ishikawa et al.(2007) avaliaram a resistência adesiva de alguns adesivos autocondicionantes de um frasco só ao esmalte e dentina.

Para avaliar a união adesiva foram realizados dois testes, o de microtração e o de microcisalhamento. Foram selecionados 104 molares

humanos, dos quais 24 foram separados para realizar análise em microscopia eletrônica de varredura e os outros 80 foram destinados aos ensaios de resistência adesiva.

Para o ensaio de microcissalhamento em dentina, 20 dentes tiveram a dentina exposta pela remoção da porção oclusal dos dentes. Em seguida os sistemas adesivos foram aplicados:

- a) S3 Bond;
- b) AQ Bond;
- c) G Bond;
- d) Clearfil SE Bond;
- e) Clearfil AP-X.

Por sobre a dentina tratada foram construídos cilindros de resina de 0,7 mm de diâmetro e 0,5 mm de altura com a resina Clearfil AP-X. Após armazenamento em água destilada o teste de microcissalhamento foi realizado em uma máquina de ensaios universal.

Dentro das limitações do estudo, os autores concluíram que os dois tipos de ensaios mostraram que o adesivo de dois passos produziu melhor resistência adesiva em dentina que os de um passo só.

Coelho et al. em 2008 realizaram pesquisa com o objetivo de testar a hipótese de que os valores de resistência adesiva são inversamente proporcionais à espessura da camada de adesivo dentinário, realizando teste laboratorial de microtração e análise se elementos finitos.

Para o estudo foram utilizados 18 terceiros molares, os quais tiveram o esmalte oclusal removido usando um disco de diamante expondo dessa maneira a dentina. Em seguida os dentes foram divididos em dois grupos

que receberam procedimento adesivo com dois diferentes sistemas: Single Bond e Clearfill SE Bond. Os dois grupos foram então divididos em três subgrupos cada um, de acordo com a quantidade de camadas de adesivo aplicadas:

- a) SBC (controle): Single Bond (3M ESPE) sistema foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante;
- b) SB 1 : após a aplicação e fotopolimerização da primeira camada, uma camada adicional foi aplicada e fotopolimerizada;
- c) SB 2: após a aplicação e fotopolimerização da primeira camada, duas camadas adicionais foi aplicada e fotopolimerizada;
- d) SEC (control): Clearfill SE Bond (3M ESPE) sistema foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante;
- e) SE 1: após a aplicação e fotopolimerização da primeira camada, uma camada adicional foi aplicada e fotopolimerizada;
- f) SE 2: após a aplicação e fotopolimerização da primeira camada, duas camadas adicionais foram aplicadas e fotopolimerizada;

Após aplicação do sistema adesivo um bloco de resina de 4mm foi fabricado com a resina Z100 (3M ESPE) sobre cada dente e em seguida estes foram armazenados em H₂O por 7 dias a 37°. C. Os espécimes foram então cortados para a obtenção dos palitos usados no ensaio de microtração que foram executados em uma Máquina de testes de tensão (Model TSD 500 – USA). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de ANOVA um fator e Teste de Tukey com nível de significância de 95%.

De acordo com os resultados laboratoriais e do teste de elementos finitos, a hipótese estudada, segundo os autores, foi aceita para o adesivo Single Bond e rejeitada para o sistema Clearfill SE Bond.

Burrow et al. (2008), considerando a falta de informações a respeito dos sistemas adesivos *all-in-one* realizaram um estudo comparando a resistência adesiva, por meio de teste de microcisalhamento, de um adesivo autocondicionante de dois passos e de 5 sistemas de frasco único.

Molares humanos foram selecionados e tiveram suas raízes seccionadas na junção amelo-dentinária com auxílio de discos de diamante. Em seguida os espécimes foram cortados no sentido vestibulo-lingual expondo esmalte e dentina. Os dentes foram então embutidos em gesso Tipo III e receberam os procedimentos adesivos de acordo com as instruções dos fabricantes:

- a) Go! (Southern Dental Ind. – Australia)
- b) S³Bond (Kuraray – Japan)
- c) G-Bond (GC Int – Japan)
- d) Adper Prompt L-Pop (3M – ESPE – USA)
- e) One-Up Bond F Plus (Tokuyama Dental – Japan)
- f) Clearfil SE Bond (Kuraray – Japan)

Após aplicação dos sistemas adesivos, com o auxílio de um tubo de polietileno de 0.7 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura, a resina composta foi aplicada na região adesiva e os espécimes foram armazenados em H₂O a 37°. C por 24 h. Após esse período os espécimes foram submetidos ao ensaio de microcisalhamento em uma máquina de ensaios universal. Os valores obtidos foram avaliados estatisticamente pelo teste ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey.

Os resultados mostraram para todos os adesivos que os valores de resistência adesiva foi maior para a dentina quando comparado com o esmalte. Na dentina o sistema Clearfil SE Bond diferiu estatisticamente dos

sistemas de frasco único, apresentando valores maiores de resistência. Os autores concluíram que os sistemas de frasco único, pelos valores de resistência adesiva mostrados, possivelmente terão resultados clínicos satisfatórios.

Ritter et al. (2008) realizaram uma pesquisa clínica com o objetivo de avaliar a performance de um adesivo de frasco único (iBond – Heraeus Kulzer) com um de três passos (Gluma Solid Bond – Heraeus Kulzer) quando utilizados em dentina esclerótica e não-esclerótica em lesões cervicais não cariosas.

Um total de 30 pacientes foi atendido durante o estudo, sendo que 105 restaurações foram realizadas. Os dentes restaurados apresentavam contato oclusal normal com o dente antagonista e tinham saúde periodontal adequada. As lesões foram classificadas em 4 tipos de acordo com o grau de dentina esclerótica presente.

Baseados nessa classificação e dependendo do tratamento de superfície com o sistema adesivo as lesões foram divididas em 4 Grupos:

- a) Grupo 1: usado o adesivo de três passos em lesões sem ou com mínima esclerose dentinária;
- b) Grupo 2: usado o adesivo de passo único em lesões sem ou com mínima esclerose dentinária;
- c) Grupo 3: usado o adesivo de passo único em lesões com esclerose dentinária;
- d) Grupo 4: usado o adesivo de passo único em lesões com esclerose dentinária após condicionamento ácido.

As lesões foram então restauradas com resina composta de micropartículas (Durafill VS – Heraeus Kulzer) pela técnica incremental sendo cada incremento fotopolimerizado por 20 s.

As restaurações foram avaliadas nos períodos de 6 e 18 meses e depois de 3 anos em relação aos seguintes critérios: retenção, cor, adaptação marginal, forma anatômica, descoloração marginal, cáries secundárias, sensibilidade pré e pós-operatória, textura superficial e fratura da restauração.

Os resultados mostraram um excelente desempenho das restaurações quando utilizado o sistema adesivo de três passos em dentina não esclerótica (Grupo 1). Os Grupos 2 e 3 apresentaram bom comportamento em relação à retenção porém nos aspectos de adaptação marginal e descoloração marginal mostrou alguns defeitos depois dos 3 anos, estando dentro dos níveis de clinicamente aceitável. No Grupo 4 a quantidade de desadaptação marginal e de descoloração marginal foi menor que no Grupo 3, porém naquele grupo 4 restaurações falharam por motivo de retenção.

Os autores, levando em conta as limitações do estudo, concluíram que os adesivos de frasco único tiveram um desempenho inadequado nas restaurações de lesões não cariosas, especialmente quando existe algum grau de esclerose dentinária.

Saboia et al. em 2008 desenvolveram uma pesquisa variando a característica do substrato, no caso a dentina. O objetivo foi analisar a resistência adesiva de um adesivo autocondicionante de dois passos em dentina desproteinizada, imediatamente após aplicação do adesivo e após 6 meses. Testaram a hipótese de que o uso de hipoclorito de sódio (NaOCl) após condicionamento ácido promoveria um aumento na resistência adesiva.

Vinte e quatro terceiros molares foram selecionados e tiveram a parte oclusal seccionada expondo a dentina. Os dentes foram condicionados com ácido fosfórico a 35% durante 15 s e em seguidas lavados em água. Logo após os cdp foram divididos em 2 grupos:

- a) Grupo 1: adesivo XP Bond foi aplicado na dentina sem colágeno;
- b) Grupo 2: adesivo XP Bond foi aplicado em dentina normal.

No grupo 1, após o condicionamento ácido da dentina, esta foi tratada com NaOCl a 10% durante 60 s para remover a matriz orgânica desmineralizada.

Após os tratamentos de superfície, blocos de resina de 4 mm de altura foram construídos por sobre a dentina tratada e o conjunto foi seccionado para a obtenção dos palitos para o ensaio de micro-tração. Obtido os palitos estes foram divididos em dois subgrupos, um deles foi submetido ao ensaio após 24h de armazenamento, já o outro grupo foi testado após 6 meses de armazenamento em saliva artificial a 37° C.

Os resultados mostraram que a resistência adesiva foi afetada pela aplicação do NaOCl após condicionamento ácido. Os autores concluíram que, devido a essa diminuição da união adesiva após pré-tratamento, uma adequada penetração do adesivo na matriz orgânica da dentina é um passo fundamental para a adesividade contribuindo também para a longevidade e estabilidade da união adesiva.

Can-Karabulut et al.(2009) desenvolveram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a resistência de união de diferentes sistemas adesivos em dentina de dente permanente e decíduo.

Foram selecionados 21 dentes permanentes e 21 decíduos, sendo eles isentos de cárie e restauração. Os dentes tiveram suas raízes seccionadas e foram embutidos em resina acrílica mantendo a porção coronária exposta. A parte oclusal também foi seccionada com o auxílio de discos de diamante expondo a dentina. Em seguida os dentes foram divididos em 3 subgrupos nos quais foram aplicados os diferentes sistemas adesivos de acordo com as normas dos fabricantes:

- a) Sistema condicionamento total de três passos (Scotchbond Multi Purpose – 3M);
- b) sistema autocondicionante de 2 passos (Gluma Comfort Bond – Heraus-Kulzer);
- c) sistema autocondicionante de passo único (Promt-L-Pop – 3M).

Após a aplicação dos adesivos, um cone de resina composta de 3 mm de diâmetro e 2 mm de altura foi construído . Os espécimes foram então armazenados em H₂O destilada por 24 h e submetidos a 500 ciclos em uma cicladora térmica. Após a ciclagem térmica foi realizado o ensaio de cisalhamento para obtenção dos valores de resistência adesiva em Mpa. As fraturas foram analisadas e classificadas em adesiva, coesiva ou mista.

Os resultados mostraram uma maior união adesiva à dentina dos dentes permanentes em todos os sistemas. Ao comparar os adesivos entre si, independente da dentina, o sistema de condicionamento total se mostrou mais efetivo em relação aos outros dois, porém só apresentou diferença estatística quando comparado ao sistema autocondicionante de um passo só.

2.2 Citotoxicidade

Pesquisas envolvendo materiais odontológicos foram, desde 1919, sinônimas de testes de propriedades físicas. A avaliação da citotoxicidade era realizada posteriormente, após o uso clínico, quando danos desnecessários aos pacientes já haviam ocorrido (Langeland, 1978). Atualmente esse conceito vem mudando, cada vez mais pesquisas, em relação à biocompatibilidade dos materiais, vem sendo feitas, o que leva à uma maior confiança por parte dos profissionais na hora de aplicar um material.

Em relação aos testes de avaliação da biocompatibilidade dos materiais odontológicos, eles são divididos em dois tipos: primários (testes *in vitro*) e os secundários (testes *in vivo*). Para Camps et al. (2003) os testes secundários só deve acontecer quando há coerência nos resultados dos testes primários.

Recentemente, muitas pesquisas vêm sendo realizadas, pois existe uma grande preocupação em relação à biocompatibilidade dos materiais, uma vez que essa propriedade, hoje em dia, é um pré-requisito para o sucesso de um tratamento. Estes estudos são realizados por meio de pesquisas de citotoxicidade *in vitro*, utilizando modelos em cultura de células provenientes de linhagens obtidas comercialmente e culturas primárias estabelecidas em laboratórios individualmente (Souza et al., 2006). Estes estudos possuem grande importância na avaliação prévia do comportamento biológico dos materiais frente aos tecidos (Schmalz et al., 2002; Mantellini et al., 2003; Wang et al., 2006).

O grande desafio dos testes *in vitro* é poder extrapolar os seus achados para a clínica, dessa maneira alterações nas metodologias já conhecidas estão sempre sendo empregadas para poder cada vez mais

aproximar estes testes ao que acontece clinicamente. Com esse intuito, Schmalz et al. em 1996 iniciaram o desenvolvimento de um teste que visa simular uma situação clínica, é o teste de barreira dentinária, o qual simula o complexo dentina-polpa utilizando um dispositivo que permite por meio de uma fatia de dentina separar a cultura de célula do material estudado, além de conseguir similar a circulação pulpar.

Os adesivos dentinários, por serem aplicados muitas vezes próximos ao tecido pulpar, são materiais, cuja biocompatibilidade, é fator indispensável para um sucesso clínico em sua utilização. Diante disso, os sistemas adesivos sempre foram alvo de intensas pesquisas de citotoxicidade. Bouillauet et al. (1998) testaram a hipótese de que a permeabilidade dentinária pode influenciar a toxicidade dos sistemas adesivos. Para os autores uma alta permeabilidade deveria aumentar a toxicidade por aumentar a difusão dos componentes através da dentina.

Discos de dentina com espessura de 0,5 mm foram preparados de molares humanos. Um total de 48 discos foi obtido, sendo eles, por meio de um teste de permeabilidade, divididos em três categorias: baixa, média e alta permeabilidade. Quatro diferentes adesivos foram aplicados nos discos de dentina, um total de 12 discos por grupo, sendo 4 de cada categoria de permeabilidade:

- a) Aelitebond (Bisco);
- b) Optibond (Kerr);
- c) Prisma Universal Bond 3 (DeTrey);
- d) Scotchbond Multipurpose (3M ESPE).

Os discos foram posicionados sobre uma cultura de células pulpares e após a aplicação dos adesivos o teste de MTT, para verificação da viabilidade celular, foi realizado.

Os resultados mostraram que a permeabilidade dos discos afetou a toxicidade dos adesivos, sendo a supressão celular maior para as dentinas com média e alta permeabilidade. O adesivo Scotchbond Multipurpose mostrou claramente esse resultado.

Os autores concluíram que a aplicação destes adesivos na dentina, especialmente em dentina com alta permeabilidade, é um risco em potencial para causar danos no tecido pulpar.

Com o surgimento dos adesivos de um frasco só, iniciou-se o ciclo de pesquisas envolvendo estes materiais. As pesquisas abordaram também o aspecto da biocompatibilidade. Hashieh et al. em 1999, realizaram um estudo com o objetivo de comparar a citotoxicidade de adesivos autocondicionantes de um passo só com sistemas de múltiplos passos.

A citotoxicidade foi avaliada através do teste de MTT, através do qual se avalia a capacidade de um material de induzir danos celulares. Culturas de células foram expostas a diferentes adesivos dentinários de quarta e quinta gerações:

- a) All-Bond 2 (4ª geração – Bisco);
- b) One-step (5ª geração – Bisco);
- c) Scotchbond Multi-purpose (4ª geração – 3M ESPE);
- d) Scotchbond One (5ª geração – 3M ESPE);
- e) Syntac (4ª geração – Vivadent);
- f) Syntac SC (5ª geração – Vivadent);
- g) Tenure (4ª geração – Denmat);
- h) Tenure Quick (5ª geração – Denmat).

Cada adesivo foi avaliado quanto à sua citotoxicidade em diferentes diluições: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Após 2 h de contato as células foram avaliadas em um Spectrofotômetro e a citotoxicidade foi calculada.

Os resultados mostraram que todos os adesivos promoveram uma citotoxicidade quando usados sem diluição e quando diluídos em 10^{-1} e 10^{-2} , como esperado pelos autores a citotoxicidade diminuiu progressivamente nas diluições de 10^{-3} a 10^{-8} . Além disso, verificaram que nos adesivos das marcas 3M e Vivadent os adesivos de 5ª geração mostraram menos citotoxicidade em relação aos de 4ª geração. Já nas marcas Bisco e Denmat os sistemas de frasco único foram mais citotóxicos que os de múltiplos frascos.

Huang e Chang em 2002 realizaram um estudo de citotoxicidade com o objetivo de avaliar cinco diferentes sistemas adesivos e seus efeitos em cultura de células pulpaes humanas.

Para o teste de citotoxicidade foi usado o MTT, que permite avaliar a quantidade de células vivas após o contato com o material estudado. Os adesivos utilizados foram:

- a) Clearfil SE Bond (Kuraray);
- b) Heliobond (Vivadent);
- c) Prime & Bond NT (Dentsply);
- d) Single Bond (3M ESPE);
- e) Syntac Single Component (Vivadent).

Os resultados mostraram que todos os adesivos avaliados são citotóxicos para células pulpaes humanas pelo teste de MTT. Verificaram

que o adesivo Single Bond foi o mais tóxico, seguido pelo Prime & Bond, Sintac Single Component, Heliobond e o menos tóxico Clearfil SE Bond.

Diante dos resultados, os autores concluíram que os adesivos dentinários são citotóxicos para células pulpare humanas, dependendo do material estudado. Devido a isso, uma polimerização adequada dos adesivos é necessária e quando possível substituir estes materiais por outro menos tóxico.

Os componentes dos sistemas adesivos, por difusão podem entrar em contato com o tecido pulpar e dessa maneira causar algumas injúrias a este tecido. Sabe-se que a dentina remanescente pode servir com uma proteção, diminuindo o contato dos componentes tóxicos com as células. Com a intenção de simular o que ocorre clinicamente, Schmalz et al. em 2002 realizaram uma pesquisa que avaliou o efeito de diferentes sistemas adesivos, com pH baixo, sobre células pulpare bovinas, por meio de um teste de barreira dentinária.

Foram obtidas fatias de dentina com espessura de 0,5 mm, as quais foram colocadas em uma câmara separando-a em dois compartimentos. Foram utilizados 5 sistemas adesivos os quais foram aplicados sobre a superfície "cavitária" da dentina de acordo com as instruções dos fabricantes: All-Bond 2 (Bisco); Prime & Bond (Dentsply); Syntac Single Component (Vivadent); Syntac Classic (Vivadent); Prompt L-Pop (3M ESPE). A porção "pulpar" foi difundida com meio de cultura em duas diferentes velocidades, 0,3ml/h e 2ml/h, após 24h o eluato foi obtido e realizado ensaio de MTT para verificação da vitalidade celular.

Os resultados mostraram que o adesivo Syntac Classic foi mais danoso para as células, reduzindo a viabilidade celular para 38,2% para a difusão de 0,3 ml/h e para 73,4% na difusão de 2ml/h. Em ambas as

situações o Prompt L-Pop foi o menos citotóxico, chegando até a aumentar o número de células viáveis.

Diante dos resultados os autores concluíram que os sistemas de pH baixo não se mostraram citotóxicos no teste de barreira dentinária, portanto, danos pulpares devido aos materiais testados não devem ocorrer. Além disso, concluíram que o teste de barreira dentinária realizado mostrou simular melhor uma situação clínica do que métodos que promovem o contato direto do material com as células, podendo o teste de barreira dentinária substituir, mesmo que parcialmente, experimentos com animais.

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade de diferentes sistemas adesivos, Szep et al. (2002) realizaram uma pesquisa utilizando fibroblastos gengivais. Para tal foram utilizados os seguintes materiais: Ariston Liner (Vivadent); Etch & Prime 3.0 (Degussa); Optibond Solo (Kerr); Prime & Bond NT (Dentsply); Scotchbond 1 (3M ESPE); Syntac Sprint (Vivadent).

Os adesivos testados foram aplicados em lâminas de vidro e polimerizados de acordo com as instruções dos fabricantes. As lâminas foram então colocadas em placas de Petri e então foi acrescentado meio de cultura até que se atingisse a concentração de 0,2 mg por 1ml de meio. Após 48h foi obtido o eluato, e 5ml dele foi colocado em contato com fibroblastos e incubado a 37°C e a 4% CO₂ por 72h. Após esse período as células foram avaliadas em microscópio com aumento de 100 – 250 vezes. Os seguintes parâmetros foram utilizados para a avaliação das células:

- a) Células normais, incluindo fibroblastos em mitose ou núcleo inativo;
- b) Células alteradas patologicamente, incluindo fibroblastos com aumento do núcleo, binucleação, anormalidades nucleares e vacúolos;

- c) Células mortas, incluindo fibroblastos redondos, células com desintegração nuclear;
- d) Densidade celular (numero de células por mm²).

Os resultados mostraram uma diferença estatística em termos de células normais entre os grupos dos adesivos dentinários e o grupo controle. Entre os materiais, Prime & Bond NT mostraram maior numero de células normais que o Ariston Liner e Scotchbond 1. O menor numero de células viáveis foi encontrado para o Scotchbond 1, sendo estatisticamente diferente em comparação com Optobond Solo e Prime & Bond NT.

Diante dos resultados os autores concluíram que pela citotoxicidade apresentada pelos sistemas adesivos, os fabricantes deveriam fornecer uma lista precisa dos componentes destes sistemas para podermos trabalhar com mais segurança.

Mantellini et al. (2003) realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar o efeito de um adesivo dentinário na viabilidade e no ciclo celular de três diferentes linhagens de células.

Discos de 5 mm x 2 mm foram confeccionados com o adesivo Single Bond (3M ESPE) com o auxílio de um molde pré fabricado. O tempo de polimerização também foi variado, sendo o sistema testado sem polimerização, parcialmente polimerizado (10s) e totalmente polimerizado (40s). Os cdp foram então colocados em *inserts* de membrana permeável para evitar contato direto com as células. As células ficaram expostas ao sistema por 24h, sendo sua vitalidade avaliada após esse período por citometria de fluxo.

Verificaram que quando não polimerizados o adesivo foi altamente citotóxico, sendo quase 100% das células apoptóticas. Quando parcialmente polimerizados o sistema adesivo induziu apoptose em 40-50% das células, já

quando completamente polimerizados não houve indução apoptótica nas células.

Os autores concluíram ser importante o conhecimento dos mecanismos de citotoxicidade dos materiais dentários para a seleção de uma estratégia de proteção do complexo dentina-polpa que permite uma saúde pulpar e conseqüente regeneração dentinária.

Após a polimerização dos sistemas adesivos uma quantidade de monômeros não sofre conversão, sendo estes monômeros residuais os responsáveis pela citotoxicidade causada por esses materiais. Diante disso, Spagnuolo et al. (2004) desenvolveram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a citotoxicidade de dois adesivos de frasco único após polimerização com uma luz halógena convencional e com LED.

Foram utilizados dois sistemas adesivos de frasco único (Optibond Solo – Kerr; Scotchbond One – 3M ESPE) que foram polimerizados por duas fontes diferentes, uma luz halógena convencional (Optilux 500 – Kerr) e um LED (Elipar Freelight – 3M ESPE). Os materiais foram colocados em contato com culturas de células e após a incubação foi verificada a viabilidade celular (teste de MTT).

Os resultados mostraram que o adesivo Scotchbond One polimerizado com o LED foi o mais tóxico, resultando em uma quantidade de células vivas de apenas 23%. Em seguida com 29,3% de viabilidade celular veio o adesivo Scotchbond One polimerizado com a luz halógena. O adesivo Optibond Solo foi o menos tóxico, sendo que quando polimerizado com LED a viabilidade celular foi de 35% e quando usada luz halógena foi de 77,61%.

Os autores concluíram que a liberação de monômeros tem um impacto na biocompatibilidade do material, sendo a polimerização completa

fator importante para os adesivos dentinários não causarem danos ao tecido pulpar.

Koliniotou-Koumpia et al. (2005) desenvolveram um estudo, cujo objetivo foi avaliar comparativamente a reação tecidual do complexo dentina-polpa após uso de 4 sistemas adesivos em cavidades experimentais em dentes íntegros de cachorros.

Três cachorros saudáveis foram usados no estudo, sendo que 81 cavidades de classe V foram preparadas em dentes molares, pré-molares, caninos e terceiros incisivos tanto da maxila quanto da mandíbula. As cavidades foram preparadas de acordo com o seguinte protocolo:

- 1) O preparo foi realizado 0,5 a 1 mm acima da gengiva livre, paralelo à junção cimento-esmalte;
- 2) a cavidade foi preparada até atingir dentina com uma profundidade de 2mm;
- 3) o soalho da cavidade foi mantido curvo e paralelo à superfície vestibular dos dentes;
- 4) as cavidades foram lavadas com solução salina e secas com ar.

Após os preparos os dentes foram restaurados, sendo que os dentes foram divididos em 4 grupos cada um correspondendo a um adesivo diferente:

- a) Etch and Prime 3.0 (Degussa);
- b) Single Bond (3M ESPE);
- c) Clearfil SE Bond (Kuraray);
- d) Prompt L-Pop (3M ESPE).

Em todos os grupos a aplicação dos adesivos foi realizada de acordo com as instruções dos fabricantes. Os procedimentos restauradores foram realizados e permaneceram em função por 65 dias. Passados os primeiros 44 dias, mais 24 dentes receberam o mesmo tratamento. Finalmente, passados 58 dias mais 24 dentes receberam o tratamento, isso foi realizado para que se pudesse fazer a verificação nos períodos de 7, 21 e 65 dias. Após esse período os dentes foram extraídos, seccionados e obtidas lâminas para visualização em microscópio.

Ao microscópio foi avaliada a infiltração de células inflamatórias, alterações na camada odontoblástica e alterações na zona de pré-dentina.

Os resultados mostraram uma moderada infiltração de células inflamatórias quando adesivos fortes autocondicionantes foram usados. Além disso, os adesivos Etch and Prime 3.0 e Prompt L-Pop apresentaram uma redução severa na camada odontoblástica nos três períodos avaliados.

Diante disso os autores concluíram que os adesivos contemporâneos aplicados em cavidades profundas não está correlacionado com inflamação pulpar ou necrose tecidual. Porém, relatam que os adesivos autocondicionantes médios parecem ser mais promissores em termos de biocompatibilidade.

Acredita-se que a barreira dentinária seja um meio de proteção para a polpa, diante disso Galler et al. em 2005 desenvolveram uma pesquisa cujo objetivo foi avaliar a influencia de três materiais, que apresentam contato com a dentina, na reação de células pulpares quando são aplicados em barreiras dentinárias de diferentes espessuras.

Para a pesquisa foram usados quatro diferentes materiais. Como controle negativo utilizou-se um material de moldagem não tóxico a base de

polivinilsiloxano (100% de viabilidade celular). Para os grupos experimentais foram utilizados os seguintes materiais:

- a) Cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond – 3M ESPE);
- b) Adesivo dentinário auto-condicionante (Prompt L-Pop – 3M ESPE);
- c) Adesivo (Syntac classic – Vivadent).

A viabilidade celular de culturas de três dimensões foi determinada pela atividade enzimática por meio do teste de MTT.

Os resultados mostraram que o adesivo Syntac classic foi o material mais citotóxico, reduzindo a viabilidade celular a 17-18%. O Vitrebond apresentou toxicidade significativa quando comparado ao grupo controle e ao Prompt L-Pop, este foi o menos tóxico entre os grupos experimentais, mantendo viabilidade celular entre 59 a 107%. Em relação à barreira dentinária, a citotoxicidade para o Vitrebond e Prompt L-Pop foi claramente influenciada pela espessura da dentina, visto que a viabilidade celular foi maior quando a espessura de dentina foi de 500 µm para 100 µm.

Os autores concluíram que as propriedades de proteção do remanescente dentinário são aparentemente seletivas e dependem da natureza química do material.

Teixeira et al.(2006) em um estudo in vivo objetivou avaliar a biocompatibilidade de três agentes e um cimento a base de hidróxido de cálcio.

Para o estudo in vivo foram usados ratos nos quais foram implantados tubos de polietileno contendo os materiais a serem avaliados: Grupo 1: Prime

e Bond NT; Grupo 2: Bond 1; Grupo 3: Optibond Solo e Grupo 4 (controle): cimento de Ca(H)_2 . Após os períodos de 15, 30 e 60 dias as partes subcutâneas contendo as implantações foram excisadas e preparadas para serem visualizadas em microscópio para avaliação do grau de inflamação. Para classificar as reações inflamatórias foi usada a seguinte escala: sem inflamação; inflamação média; inflamação moderada e inflamação severa, de acordo com o número de células inflamatórias presentes.

Os resultados mostraram que após 15 dias de contato houve uma inflamação moderada, sendo que os grupos experimentais nesse período não diferiram do grupo controle. Já após 30 dias, no grupo controle a inflamação diminuiu, passando a ser média, porém para os outros grupos a inflamação se manteve moderada. Após os 60 dias de teste houve uma melhora na inflamação em todos os grupos, porém o grupo controle foi o único que houve uma redução completa da inflamação.

De acordo com as condições experimentais, os autores concluíram que os agentes adesivos em contato com os tecidos promoveram reação inflamatória, não podendo ser considerados compatíveis. Entre os adesivos o Prime e Bond foi o mais tóxico sendo que o hidróxido de cálcio pode ser considerado compatível aos tecidos biológicos.

Wiegand et al. (2006) realizaram uma pesquisa com o objetivo de verificar a citotoxicidade de diferentes sistemas adesivos autocondicionantes por meio de um teste de barreira dentinária, alterando a espessura dentinária e o tempo de perfusão.

Foram usados 5 diferentes sistemas adesivos auto-condicionantes: A – Prompt LPop; B – Xeno III; C – Clearfil SE Bond; D – One Up Bond F; E – Resulcin Aqua Prime & Monobond. Fatias de dentina de 1, 1.5 e 2.5 mm foram obtidas de dentes bovinos. A superfície voltada para a polpa teve a *smear layer* removida por meio da aplicação de ácido fosfórico a 38%,

durante 15 s. As células utilizadas foram fibroblastos de ratos L-929. Para a simulação da interação do complexo dentina-polpa, as fatias de dentina e as células foram posicionadas em uma câmara de testes que simula essas condições. O dispositivo permite a perfusão do meio com as células simulando a polpa. Os materiais avaliados foram aplicados na superfície dentinária de acordo com as instruções do fabricante. Após 15, 30, 45,60 e 120 min. o meio perfundido foi recolhido e realizado o teste de MTT para verificação da viabilidade celular.

Os resultados permitiram aos autores concluir que os adesivos autocondicionantes podem ser citotóxicos para fibroblastos L-929. Porém, essa citotoxicidade é limitada com o passar do tempo e também dependente da espessura de dentina remanescente.

Em 2007 Koliniotou-Koumpia et al. realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a citotoxicidade de seis sistemas adesivos usando cultura de células.

Foram utilizados 6 sistemas adesivos, os quais foram colocados em contato com cultura de células pulpares humanas. Após incubação a viabilidade celular foi verificada. Os adesivos utilizados foram: Syntac (Vivadent); Solobond (Voco); Bond 1(Jeneric Pentron); Scotchbond 1 (3M ESPE); Heliobond (Vivadent); F-2000(3M ESPE). Foi verificada a biocompatibilidade do material sem estar polimerizado e após polimerização.

Os resultados mostraram que os seis sistemas exibiram certa toxicidade, resultando em redução no número de células vivas após 24 e 72 h. A citotoxicidade foi maior após as 72 h e nos grupos não polimerizados. Em relação aos adesivos, o Scotchbond 1 e F-2000 mostraram maior toxicidade seguidos pelo Solobond e Bond 1.

Os autores concluíram então que todos os adesivos dentinários testados podem causar reações em cavidades profundas na ausência de uma base adequada.

A citotoxicidade dos adesivos dentinários é dependente da quantidade do material que entra em contato com o tecido pulpar. A dentina é uma barreira de proteção ao tecido, sendo que quanto maior a espessura de dentina remanescente, menor o risco de dano pulpar. Diante disso Çetingüç et al. (2007) desenvolveram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a difusão pela dentina de HEMA de três diferentes adesivos dentinários em molares permanentes e decíduos.

Foram selecionados 15 molares decíduos e 15 molares permanentes para o estudo, sendo que estes tiveram suas raízes seccionadas 1 mm abaixo do limite amelo-cementário. Em seguida cavidades oclusais de 4 mm de diâmetro foram preparadas até uma profundidade na qual se obtinha 1 mm de dentina remanescente. Os dentes foram então divididos em 3 grupos que receberam os tratamentos de superfície de acordo com o sistema adesivo utilizado:

- a) Grupo 1: condicionamento com ácido fosfórico a 37% por 15 s e depois aplicação do adesivo Syntac Single Component (Ivoclar);
- b) Grupo 2: aplicação do adesivo Clearfil SE Bond (Kuraray);
- c) Grupo 3: aplicação do adesivo Syntac Single Component (Ivoclar) sem condicionamento ácido prévio.

As cavidades foram preenchidas com cimento de ionômero de vidro e a quantidade de HEMA que passou pela dentina foi avaliada após 4 min, 24 h e 72 h.

Os resultados mostraram que em todos os grupos houve difusão do componente dos sistemas adesivos utilizados. Após as 72 h verificou-se a maior quantidade de HEMA liberado, porém 50% dessa liberação ocorreram nos primeiros 4 min em todos os grupos. Além disso, foi observado que os dentes decíduos que receberam condicionamento ácido permitiram uma maior e mais rápida difusão de HEMA, enquanto que os dentes permanentes tratados apenas com o Syntac Single Component apresentaram o menor índice de difusão.

Diante disso os autores concluíram que os dentes molares podem ser considerados seguros em relação à difusão dentinária, porém, em cavidades profundas, uma proteção do complexo dentina/polpa deve ser feita.

Com os novos conceitos de odontologia nos deparamos com situações que antigamente não eram vivenciadas, muitas vezes se realiza procedimentos adesivos sobre uma dentina alterada. Diante disso, Harnirattisai et al. (2007) desenvolveram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a resistência adesiva de dois adesivos usados em dentina normal e em dentina pigmentada por amálgama, simulando uma troca de restauração de amálgama por resina composta.

Foram selecionados 24 dentes extraídos que apresentavam restaurações de amálgama. As restaurações de amálgama foram removidas e a parte oclusal da coroa dentária foi seccionada expondo a dentina. Para que os dentes fossem selecionados para o estudo foi necessário apresentar uma região preta descolorida na parede pulpar da cavidade, além disso, a presença de dentina normal ao redor para servir de controle. Logo após foram realizados os procedimentos adesivos, os dentes foram divididos em dois grupos os quais receberam tratamento se superfícies com os seguintes adesivos:

- a) Single-Bond (3M ESPE)

b) Clearfil SE Bond (Kuraray)

Os adesivos foram aplicados de acordo com as instruções dos fabricantes. Após a aplicação dos adesivos, blocos de resina foram construídos sobre a dentina. Os dentes foram então seccionados e obtidos os palitos para o ensaio de microtração.

Os resultados mostraram que a união adesiva à dentina normal foi maior que à dentina pigmentada para ambos os adesivos. Ao se comparar os adesivos entre si, foi verificado que na dentina normal o Clearfil SE Bond apresentou maiores valores de união adesiva, porém, na dentina pigmentada ambos se comportaram de maneira semelhante.

Os adesivos dentinários liberam o monômero residual que pode interagir com o tecido pulpar. Diante disso Demirci et al. (2008) avaliaram a hipótese de que adesivos dentinários podem causar citotoxicidade em células pulpares pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Foram utilizados para o estudo 5 diferentes adesivos, os quais foram analisados quanto à citotoxicidade:

- a) Clearfil SE Bond (Kuraray);
- b) Clearfil Protect Bond (Kuraray);
- c) AdheSE (Ivoclar Vivadent);
- d) Prompt L-Pop (3M ESPE);
- e) Excite (Ivoclar Vivadent).

Para o teste de citotoxicidade, células humanas transformadas de tecido pulpar foram expostas aos extratos dos *primers* e adesivos dos

sistemas estudados. Além disso, foi realizado também o teste de barreira dentinária, com a intenção de simular uma situação clínica mais real.

Os resultados mostraram que em todos os sistemas avaliados no estudo os agentes adesivos foram mais citotóxicos que os *primers*. Além disso, os autores verificaram que não houve agressão às células quando foi utilizada a barreira dentinária, isso demonstra que a dentina protege a polpa de um dano imediato após a aplicação do sistema adesivo. Porém, o potencial citotóxico demonstrado nas culturas deve ser clinicamente relevante, foi observado que a redução celular ocorreu tanto na aplicação do *primer* quanto do adesivo. Diante disso, a concentração de ingredientes de atividade biológica pode ser o suficiente para modificar o metabolismo das células pulpares quando estes materiais são usados em cavidades profundas sem a proteção de uma barreira dentinária e quando células pulpares estão expostas a esses materiais.

A Biocompatibilidade dos materiais vem ganhando importância no conceito atual de odontologia. Dessa maneira, Koulaouzidou et al. em 2008 realizaram uma pesquisa com o objetivo de verificar a citotoxicidade de 5 sistemas adesivos, sendo um deles um novo que apresenta potencial antibacteriano.

Foram utilizados 5 sistemas adesivos na pesquisa, os quais foram colocados em contato com três diferentes tipos de linhas celulares: Scotchbond 1 (3M ESPE); Clearfil Protect Bond (Kuraray); Excite (Ivoclar); One-Step Plus (Bisco); Tyrian SP (Bisco). Os adesivos foram avaliados quanto à citotoxicidade estando polimerizados e não polimerizados, 100 µl de cada adesivo foram aplicados em uma placa esterilizada. Em seguida 5 ml de meio de cultura foi colocado em cada placa e incubado por 24h a 37°C. Após esse período, 100µl do eluato foi colocado em contato com as células e

incubado por 24 e 48h, períodos nos quais foram realizados os ensaios de citotoxicidade por coloração de SRB.

Os resultados mostraram que os adesivos sem estarem polimerizados são altamente citotóxicos, não apresentando células vivas após 24h de contato. Nos ensaios com os adesivos polimerizados, o sistema com capacidade antibacteriana (Clearfil Protect Bond) foi o menos citotóxico nas três linhagens de célula, sendo o Scotchbond 1 o mais citotóxico também em todas elas.

Os autores concluíram que o sistema adesivo com propriedades antibacterianas pode representar um passo à frente, não apenas devido ao potencial antibacteriano, mas também por ter apresentado uma menor citotoxicidade.

Testes em cultura de células são indicados para a verificação da citotoxicidade de materiais odontológicos em substituição aos testes in vivo. Porto et al. (2009), realizaram um estudo cujo objetivo foi verificar o potencial citotóxico de um sistema adesivo de condicionamento ácido total de frasco único, em função de uma polimerização tardia e tempo de imersão em meio de cultura no preparo do extrato.

O sistema adesivo utilizado foi o Single Bond 2, foram confeccionados corpos-de-prova de 5mm de diâmetro e 2mm de altura que foram imersos em meio de cultura imediatamente após a polimerização e após 24h, sendo mantidos imersos por 24 ou 72h, formando assim 4 grupos experimentais:

- a) Grupo 1: imersão imediatamente após a polimerização e durante 24h;
- b) Grupo 2: imersão 24h após a polimerização e durante 24h;
- c) Grupo 3: imersão imediatamente após a polimerização e durante 72h e

d) Grupo 4: imersão 24h após a polimerização e durante 72h.

Após a obtenção dos extratos, este foi colocado em contato com macrófagos de ratos em placas de 6 poços e incubados por 24h em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após o período de incubação a viabilidade celular foi verificada por meio do teste de MTT.

Os resultados mostraram que o adesivo utilizado reduziu a viabilidade celular em todos os casos, porém nos extratos obtidos após 24h de imersão a redução foi de 46 (imersão imediata) e 67% (imersão após 24h) enquanto na imersão de 72h a redução foi de 82 (imersão imediata) e 79% (imersão após 24h).

Os autores concluíram que o adesivo utilizado causou citotoxicidade intensa na cultura de macrófagos e ressaltam a necessidade de outros estudos que simulem uma situação clínica de aplicação dos adesivos.

Com o surgimento das novas unidades fotopolimerizadoras, estudos utilizando diversas fontes foram realizados. Sigusch et al. em 2009 realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a citotoxicidade de cinco diferentes sistemas adesivos fotopolimerizados por 3 diferentes unidade fotopolimerizadoras.

Os adesivos utilizados foram o iBond (Heraus), Adper Prompt L Pop (3M), Prime e Bond (Dentsply), Clearfil protect Bond (Kuraray) e Syntac (Vivadent). Em relação às fontes ativadoras, as usadas foram Luz Halógena (10 s), LED LCU (10 s de ativação) e por ultimo o SML-LCU (4 s. de ativação) . Após o contato com as células, estas tiveram sua vitalidade testadas por meio do teste vermelho neutro de absorção.

Os autores concluíram que a biocompatibilidade pode ser otimizada com uma boa combinação entre material e unidade polimerizadora, uma vez

que são os monômeros residuais os responsáveis pela citotoxicidade dos materiais.

Vajrabhaya et al. em 2009 realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a citotoxicidade de 3 sistemas adesivos auto-condicionantes utilizando cultura de célula em 3 dimensões em um modelo de simulação com perfusão.

Os adesivos avaliados foram o Opti Bond Solo Plus (Kerr), o Xeno III (Dentsply) e o i Bond (Heraus Kulzer), como controle negativo foi utilizado o material de moldagem President (Coltene) e o controle positivo foi o Vitrebond (3M). O teste utilizado para a avaliação foi o teste de barreira dentinária, o qual com a utilização de câmaras de perfusão, simulam o complexo dentina-polpa pela colocação de uma fatia de dentina separando as células em cultura de 3 dimensões e o material estudado, simulando dessa maneira, *in vitro*, uma situação clínica. Após o período de perfusão, foi realizado o teste de MTT para verificação da viabilidade celular.

Os resultados mostraram que o Optibond Solo Plus reduziu a viabilidade celular a 99,66%, o Xeno III a 72,59%, sendo o i Bond o mais tóxico, reduzindo a viabilidade para 10,65%.

Os autores concluíram que quando utilizar adesivos com alta toxicidade um forramento de proteção do complexo dentina-polpa deve ser realizado e ressaltam a importância de não só avaliar as propriedades de adesão, infiltração de novos materiais, mas sempre atentar também aos aspectos de biocompatibilidade.

3. PROPOSIÇÃO

Avaliar quatro diferentes sistemas adesivos no que se refere à resistência adesiva ao microcisalhamento na dentina bovina simulando cavidades profundas. Em seguida avaliar *in vitro* a citotoxicidade desses sistemas adesivos, em nível molecular, por teste de barreira dentinária e ensaio de MTT em fibroblastos pulpares bovinos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Teste de Microcislamento

Para o preparo dos cdp foram obtidas mandíbulas bovinas, retiradas de animais recém abatidos (Frigorífico Mantiqueira – São José dos Campos – SP), das quais foram extraídos 80 incisivos empregando-se um elevador apical reto 301 (Quinelato – Rio Claro – SP). Após a extração os dentes foram limpos e tiveram as fibras do ligamento periodontal removidas com auxílio de uma lâmina de bisturi n° 15. Em seguida foi realizada a abertura endodôntica com broca esférica n° 3 (KG Sorensen) para a completa remoção do teto da câmara pulpar. A porção radicular de todos os dentes foi removida, por secção transversal ao longo eixo do dente, realizada com o auxílio de um disco de carborundum.

O tecido pulpar foi extirpado por meio de limas endodônticas, sendo a câmara pulpar irrigada com soro fisiológico para remoção dos detritos. Em seguida a superfície do esmalte foi submetida a um desgaste, em um recortador para gesso, com a finalidade de expor a camada de dentina.

Os dentes foram, então, divididos em dois grupos de 40 dentes. No Grupo 1 os dentes foram desgastados até que a espessura remanescente de dentina fosse de 500 μm e no Grupo 2 de 200 μm . Tal procedimento foi realizado com o auxílio de um especímetro. Os espécimes foram então colocados em uma matriz de silicone para embutimento em resina acrílica ativada quimicamente (Jet-Clássico), de forma que a superfície vestibular dos dentes ficasse exposta (Figura 1).

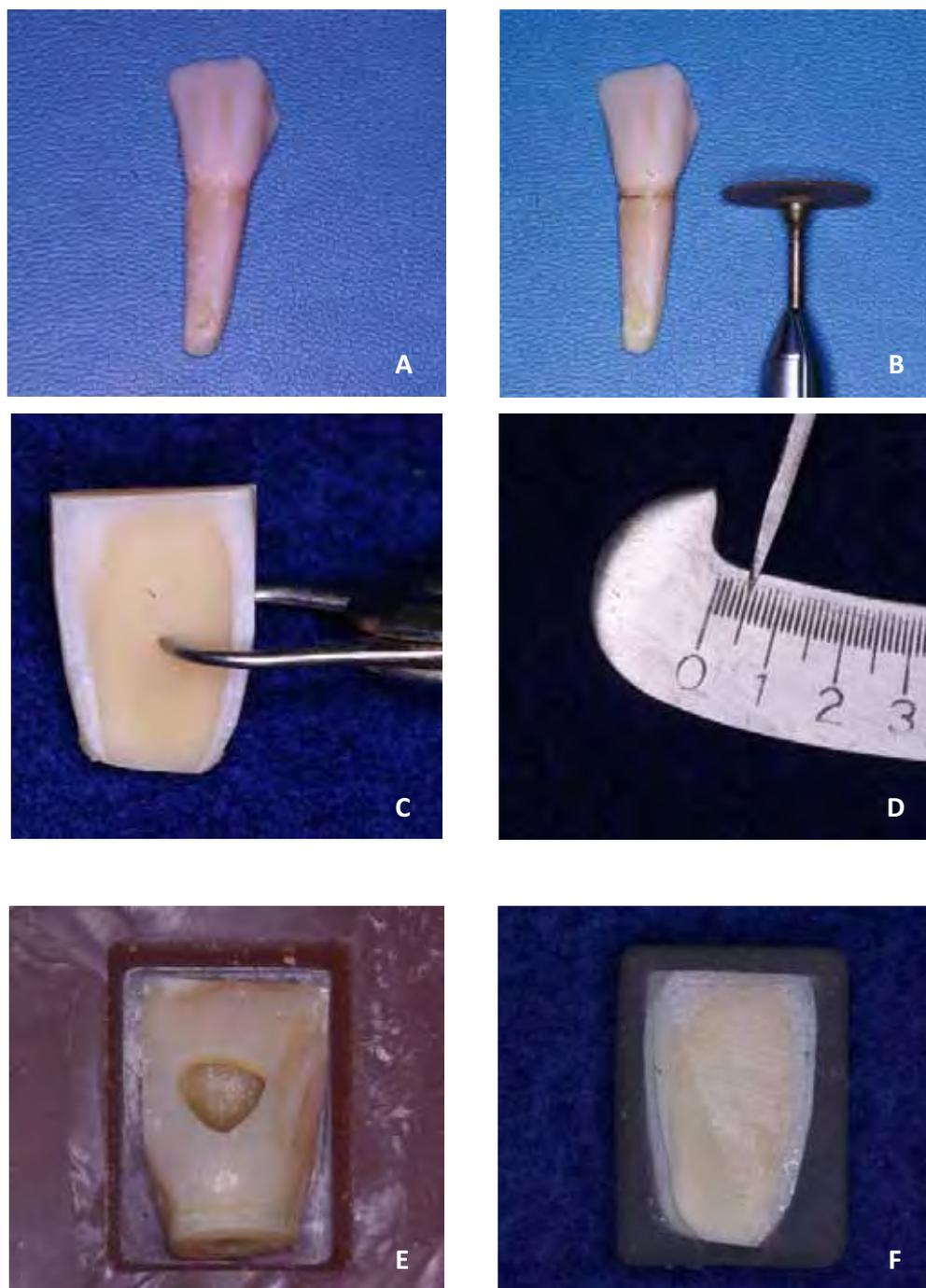


Figura 1 – Confeção do cdp: a) Dente bovino; b) seccionamento da raiz; c) verificação da espessura de dentina remanescente; d) detalhe da marcação de 0,5mm de dentina remanescente no espécimen; e) cdp posicionado na matriz de silicone para embutimento; f) cdp embutido em resina acrílica.

Os cdp foram armazenados por 24h em água destilada a 37°C e a seguir a superfície de dentina foi submetida a polimento, utilizando uma politriz circular (Eros), com uma série de discos de granulação decrescente (600, 800, 1200), a fim de se conseguir superfície lisa e uniforme.

Os cdp foram armazenados em água destilada por mais 24h. Em seguida os 40 dentes de cada grupo foram divididos em 4 subgrupos contendo 10 dentes cada um de acordo com o sistema adesivo utilizado (Quadro 1):

Quadro 1 – Adesivos utilizados na pesquisa.

Material	Fabricante	Composição
Adesivo multifrascos <i>Adper Scotchbond Multi-Purpose (MP)</i>	3M ESPE	Primer: HEMA, ácido polialcenólico. Adesivo: Bis-GMA e HEMA
Adesivo monocomponente <i>Single Bond (SB)</i>	3M ESPE	Bis-GMA e HEMA, dimetacrilatos, etanol ácido polialcenólico
Adesivo com <i>primer</i> autocondicionante <i>Adper SE Plus (SE)</i>	3M ESPE	Primer ácido: HEMA, corante, surfactante. Adesivo: UDMA, TEGDMA, HEMA.
Adesivo autocondicionante <i>Adper Easy-Bond (EB)</i>	3M ESPE	Bis-GMA, HEMA, dimetacrilato, etanol, ácido polialcenólico.

GRUPO 1MP e 2MP: Scotchbond Multi-Purpose (3M ESPE)

GRUPO 1SB e 2SB: Single Bond 2 (3M ESPE)

GRUPO 1SE e 2SE: Adper SEPlus (3M ESPE)

GRUPOS 1EB e 2EB: Adper Easy Bond (3M ESPE)

Os diferentes grupos receberam os procedimentos adesivos de acordo com as instruções do fabricante.

Nos grupos 1MP e 2MP, os espécimes receberam condicionamento com ácido fosfórico a 35% por 15 s, seguido de lavagem com *spray* de água por 10 s e secagem com jato de ar. Com um pincel do tipo *microbrush* (Microbrush Corp.), foi aplicada uma camada do *primer* Adper Scotchbond Multi-uso sobre a dentina condicionada, aplicando o pincel na superfície por 10 s, seguido de secagem. Em seguida, também com um pincel do tipo *microbrush* aplicou-se uma camada do adesivo do sistema, manipulando-o por 10 s, seguido de secagem e fotoativação por 10 s.

O fotopolimerizador Optilux (Demetron Research Corp.) foi utilizado e sua intensidade de luz foi medida a cada grupo, por meio de um radiômetro, para assegurar uma intensidade de luz padronizada em 500mW/cm².

Nos grupos 1SB e 2SB, os espécimes receberam condicionamento com ácido, como o descrito para os grupos 1MP e 2MP. Com um pincel do tipo *microbrush*, aplicaram-se duas camadas consecutivas do adesivo Single Bond 2 sobre a dentina condicionada, seguido de secagem para evaporar o solvente e fotoativação por 10 s.

Nos grupos SE e EB, os espécimes não receberam condicionamento ácido previamente à aplicação do adesivo, de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Nos grupos 1SE e 2SE, foi aplicado com um *microbrush* o Primer do Adper SE Plus sobre a dentina usando-se o aplicador durante 10 s até a obtenção de uma superfície de coloração avermelhada. Após, foi aplicado um jato de ar para evaporação dos componentes voláteis. Com outro *microbrush*, foi aplicado o *bond*, até o desaparecimento da cor vermelha, indicando que os componentes de adesão foram ativados. Em seguida, aplicou-se uma nova camada de adesivo, seguida de secagem e fotoativação por 10 s.

Nos grupos 1EB e 2EB, foi aplicada uma camada do adesivo com o aplicador do próprio material, por 10 s sobre superfície dentinária. Em seguida, realizou-se a secagem do líquido por aproximadamente 5 s, evidenciando a vaporização do solvente. Logo após, uma segunda camada do adesivo foi aplicada, seguida de secagem e fotoativação por 10 s.

Na etapa seguinte as amostras foram posicionadas em um dispositivo metálico, que possui uma matriz de teflon bipartida com um orifício em seu interior, com 2 mm de diâmetro e 2 mm de altura. Para a confecção das amostras para o ensaio de microcisalhamento foram utilizados tubos de *tygon* R-3603 (*Norton Performance Plastic Co.*), com diâmetro externo de 2 mm por 1 mm de altura, e 0,8 mm de diâmetro interno, com a finalidade de delimitar a área de adesão.

Por meio da matriz de teflon, o tubo de *tygon* foi posicionado e imobilizado sobre a dentina. No interior desses tubos, com o auxílio de um aplicador de hidróxido de cálcio (SS White Duflex), a resina composta Filtek Z250 (3M ESPE) foi aplicada em incremento único e fotoativada por 40 s, para se obter os pequenos cilindros para o ensaio mecânico. Em seguida, o cdp foi retirado da matriz e realizada uma fotoativação complementar por 40 s. Após 1h em temperatura ambiente, o tubo de *tygon* foi removido utilizando,

uma lâmina de bisturi nº15 (Med Blade), com cuidado, para não induzir nenhum estresse ao compósito. (FIGURA 2)

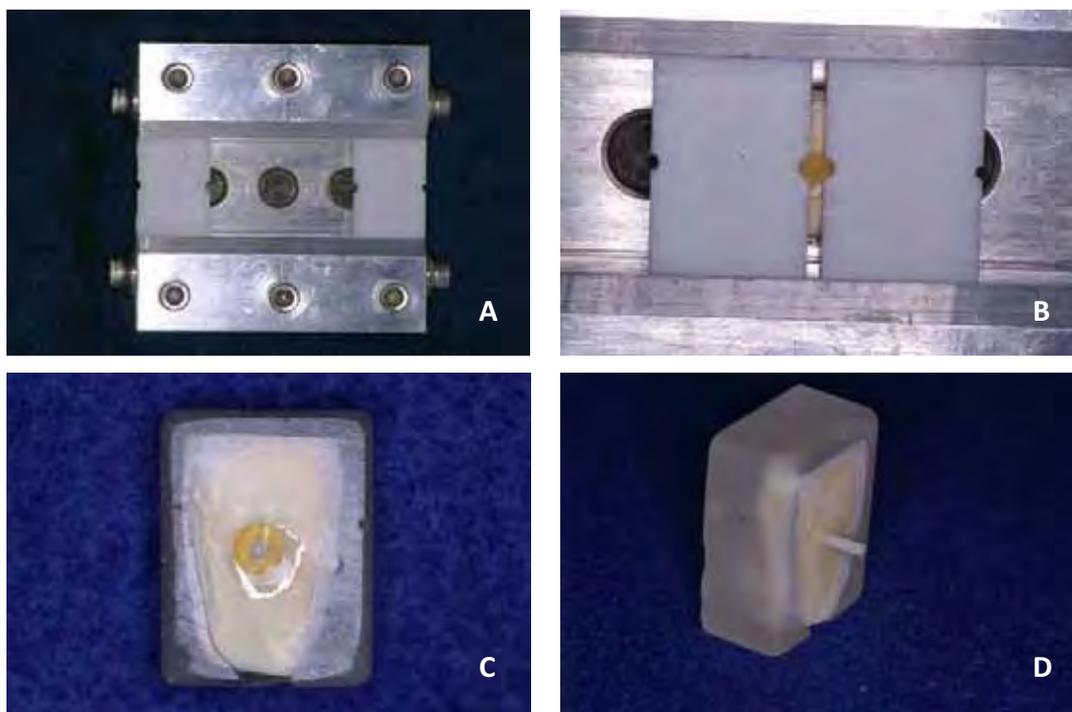


Figura 2 – Confeção do cilindro de resina composta para ensaio de microcisalhamento: a) matriz metálica; b) posicionamento do cdp na matriz e do tubo de tygon; c) resina composta inserida no tubo após fotopolimerização; d) cdp finalizado pronto para o ensaio de microcisalhamento.

Todos os cdp foram armazenados em água destilada, em estufa bacteriológica a 37°C por 24h e em seguida foram submetidos ao teste de microcisalhamento.

Os cdp foram submetidos ao teste mecânico laboratorial para avaliação da resistência da união às tensões de microcisalhamento. Este teste foi realizado em uma máquina de ensaios universal EMIC DL2000 com uma célula de carga de 50 kg. Esta máquina possui um terminal de

computador acoplado, preparado para efetuar a leitura dos dados transmitidos pelo ensaio mecânico, por meio de um programa próprio.

Utilizou-se uma base metálica, que possibilita o posicionamento correto dos cdp e um fio ortodôntico de 0,2 mm de diâmetro fixado na extremidade superior móvel da máquina. Na realização do teste, o fio forma um laço ao redor do cilindro de resina composta, sendo posicionado na interface adesiva (Figura 3). A velocidade utilizada foi de 0,5 mm/seg (Hara et al., 2001).



Figura 3 –Cdp posicionado para ensaio de microcisalhamento.

O valor da resistência ao microcisalhamento foi determinado pelo quociente da força máxima aplicada durante o teste, pela área utilizada para a adesão. Esse valor, expresso em MPa, determina a carga necessária para o rompimento da união adesiva, estabelecida na interface entre dentina e resina composta.

Os resultados obtidos no teste de microcisalhamento foram analisados, estatisticamente, por meio de estatística descritiva, análise de variância a dois fatores (ANOVA) e Teste de Tukey com nível de significância de 5%.

4.2 Teste de Citotoxicidade

Os adesivos dentinários foram avaliados quanto à citotoxicidade por meio do teste de barreira dentinária.

4.2.1 Teste de Barreira Dentinária

4.2.1.1 Cultivo Celular

Células pulpareas bovinas transformadas (SV3neoB), na passagem 20, foram cultivadas em meio contendo MEM α (Gibco BRL; Karlsruhe, Germany) suplementado com 20% SBF, com penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 μ g/ml) e geneticina (50mg/ml). As células foram então lavadas com 10 ml de PBS, separadas com 3 ml de solução de 0,25% de tripsina com EDTA e ressuspendidas com 10 ml de meio de cultura e transferidas para um tubo de Falcom (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA), formando uma suspensão celular.

Essa suspensão foi contada com o auxílio de uma câmara de Neubauer (Kerka, Alemanha) e uma quantidade de 4 milhões de células foi separada em outro tubo de Falcom e centrifugada a 900 rpm durante 5 min. Após a centrifugação o meio antigo foi sugado e o *Pellet* celular ressuspendido com 1000 μ l de meio de cultura com a finalidade de se obter uma concentração de 80.000 células em cada 20 μ l.

No teste de barreira dentinária as células são cultivadas em cultura de 3 dimensões, como descrito anteriormente (Schuster et al., 2001). Essa cultura é obtida com o auxílio de uma rede de poliamido (Sefar, Wasserburg AM Inn, Alemanha) que foi cortada com o auxílio de um dispositivo de corte

com diâmetro de 8 mm. As redes foram então lavadas com solução de 0,1N de ácido éssico durante 30 min e depois realizadas 5 lavagens de 5 min com água destilada. Em seguida a água foi despejada e as redes foram secas em temperatura ambiente e autoclavadas. As redes foram então colocadas em placa de 48 poços com a finalidade de se aplicar uma camada de Fibronectina a 0,003% (Sigma, Alemanha). Essa camada de proteína é necessária para que as células se mantenham unidas na rede. Uma quantidade de 100 µl foi pipetada no primeiro poço, cobrindo a rede. Na seqüência o conteúdo era retirado do poço e pipetado no seguinte até que dessa maneira todas as redes recebessem a camada de fibronectina, esperando-se 2 h para que as redes secassem por completo.

Para o cultivo celular por sobre as redes, foram utilizadas placas de 6 poços, com 1,25 ml de meio de cultura em cada poço. Filtros *Millicel* (Millipore Corporation, Bedford, USA) foram posicionados nos poços e dentro dos filtros foram colocadas 4 redes, tomando-se o cuidado para que as redes ficassem úmidas e não se tocassem entre si e nem nas paredes do filtro. Em seguida, 20 µl da suspensão celular (80.000 células) foram pipetados em cada rede e estas foram incubadas por 48h em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 48 h, as redes, com auxílio de uma pinça, foram transferidas para uma placa de 24 poços com 1 ml de meio em cada poço e novamente incubadas. O período de incubação foi de 14 dias, sendo que a cada 48 h era feita uma troca de meio de cultura (Figura 4). O meio de cultura para o cultivo das células continha uma concentração de 0,05 mg/ml de ácido ascórbico (Merck), necessário para uma melhor proliferação das células. Após os 14 dias de cultivo iniciou-se o teste de barreira dentinária.



Figura 4 - Cultivo celular: a) Células SV3neoB na passagem 20; b) cultivo das células em redes de poliamido; c) cultivo das culturas em 3 dimensões em placas de 24 poços; d) cultura celular em três dimensões.

4.2.1.2 Obtenção das fatias de dentina

Para o teste de barreira dentinária, fatias de dentina foram utilizadas. Para tal, dentes bovinos foram obtidos de animais recém abatidos (Frigorífico, Furth im Wald, Alemanha) os quais foram embutidos em resina acrílica (Paladur – Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha). Em seguida, os dentes foram posicionados em um Micrótomo (Leitz, Alemanha) e fatias de 200 e 500 μm foram obtidas. Logo após o corte, as fatias foram medidas para verificação da espessura e a porção pulpar foi demarcada. A porção pulpar da dentina recebeu condicionamento com ácido cítrico a 50% por 30 s, lavado em água destilada por 30 s e colocados em solução de NaCl 0,9% para a remoção da *smear layer*. Após, as fatias foram autoclavadas a 121° C durante 25 min e armazenadas em geladeira. Sessenta e duas horas antes do início do teste estas foram retiradas da geladeira e, trabalhando em

bancada esterilizada, com auxílio de dois alicates, foram quebradas no tamanho desejado, aproximadamente 6 mm. Foram então posicionadas em placas de 24 poços que continham meio de cultura sem SBF, e incubadas até o dia do teste. Este procedimento foi realizado apenas para se controlar um possível crescimento bacteriano nas fatias, antes do início do teste (Figura 5).

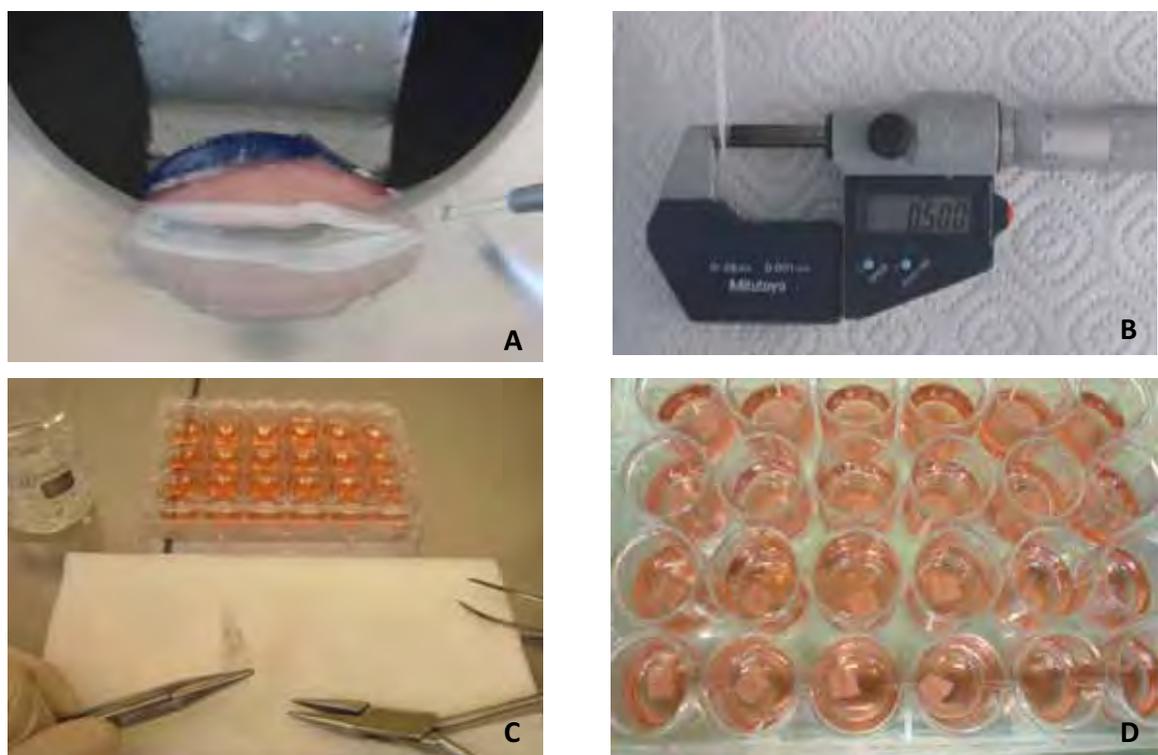


Figura 5 - Obtenção das fatias de dentina: a) corte no micrótomo; b) conferência da espessura no paquímetro; c) quebra das fatias; d) armazenamento em meio de cultura.

4.2.1.3 Montagem dos *Inserts*

Para a simulação do complexo dentina-polpa, *inserts* de metal foram utilizados. Os *inserts* são compostos por duas partes, uma inferior e outra

que é uma tampa rosqueável com um orifício em sua superfície. Trabalhando em bancada esterilizada, com o auxílio de uma pinça, as redes com as células foram posicionadas no centro do *insert*. Em seguida a fatia de dentina foi retirada do meio de cultura e colocada, com a porção pulpar para baixo, por sobre a rede com a cultura celular. Feito isso, a tampa foi colocada e parafusada sem apertar. Através do orifício da tampa tem-se acesso à lâmina de dentina e esta foi coberta com algodão. Os *inserts*, então, foram colocados nos poços no meio de cultura na placa de 24 poços, de onde as redes foram tiradas para manter a umidade dentinária. (Figura 6)

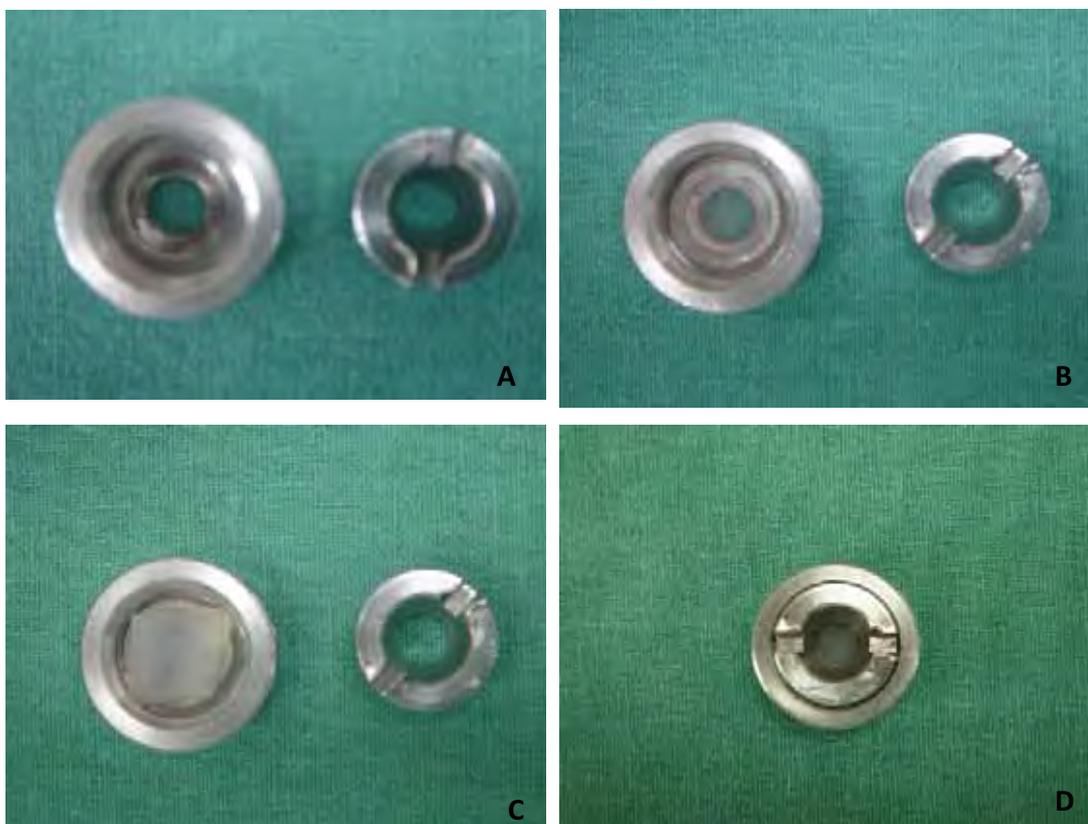


Figura 6 - Montagem dos *inserts*: a) *insert* metálico; b) colocação da rede com as células em cultura tri-dimensional; c) colocação da fatia de dentina por sobre a rede; d) *insert* montado.

4.2.1.4 Montagem das Câmaras

O teste de barreira dentinária consiste de câmaras de perfusão, as quais são feitas de material poliacrílico e permitem, por meio de um sistema de tubos, que as células sejam perfundidas, pelo meio de cultura, durante todo o experimento. Essas câmaras possuem um orifício na porção interna da tampa que permite o encaixe dos *inserts* metálicos. Com os *inserts* posicionados as câmaras foram fechadas e colocadas no sistema (Figura 7).

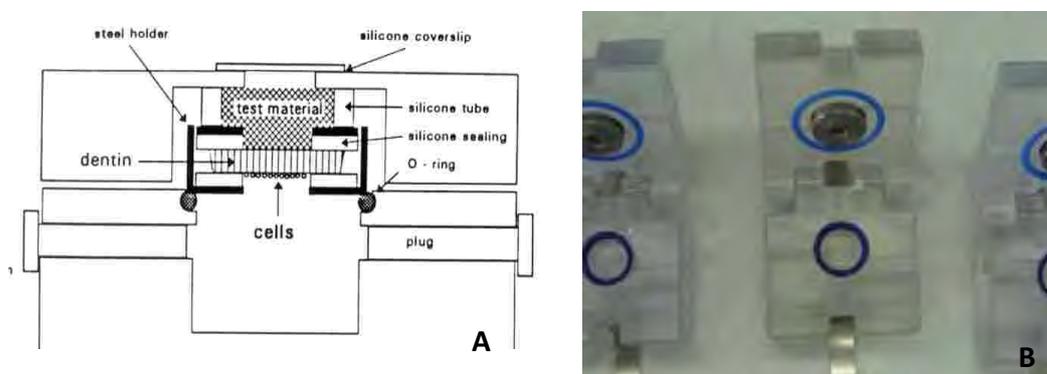


Figura 7 - Montagem das câmaras: a) Esquema da câmara de perfusão; b) *insert* montado na câmara.

4.2.1.5 Colocação das câmaras no sistema

O sistema do teste de barreira dentinária consiste em uma placa aquecida onde foram posicionadas as garrafas contendo meio de cultura para perfusão e as câmaras. Por meio de um sistema de mangueiras e uma bomba peristáltica, o meio de cultura é sugado, difundindo - se pelas câmaras e, dessa maneira, irrigando as células. Após passar pelas câmaras o meio era então gotejado em uma garrafa vazia que serviu de reservatório de lixo. Após a montagem do sistema, foi ajustada a velocidade de difusão de 0,3ml/h, mantendo-se essa velocidade de perfusão por 24h (Figura 8).



Figura 8 - Montagem do sistema: a) Câmaras montadas no sistema; b) sistema de tubos de difusão; c) sistema conectado às garrafas de meio de difusão; d) sistema montado.

4.2.1.6 Aplicação do material

Após 24 h de difusão o sistema foi desligado e a tampa da câmara aberta para a aplicação do material. Para o teste de barreira dentinária foram utilizados os mesmos materiais do teste de microcissalhamento, sendo a técnica de aplicação a mesma em ambos. Como controle negativo foi utilizado o material de moldagem President (Coltene) e como controle positivo um material desenvolvido na Universidade de Regensburg (Alemanha) chamado CaGPG 14 (Quadro 2). Após aplicação do material o sistema foi novamente ativado, porém agora, com uma velocidade de difusão de 2 ml/h (Figura 9).

Quadro 2. Materiais utilizados como controle negativo e positivo no teste de barreira dentinária.

Material	Fabricante
President	Coltène AG
CaGPG 14	Universidade Regensburg

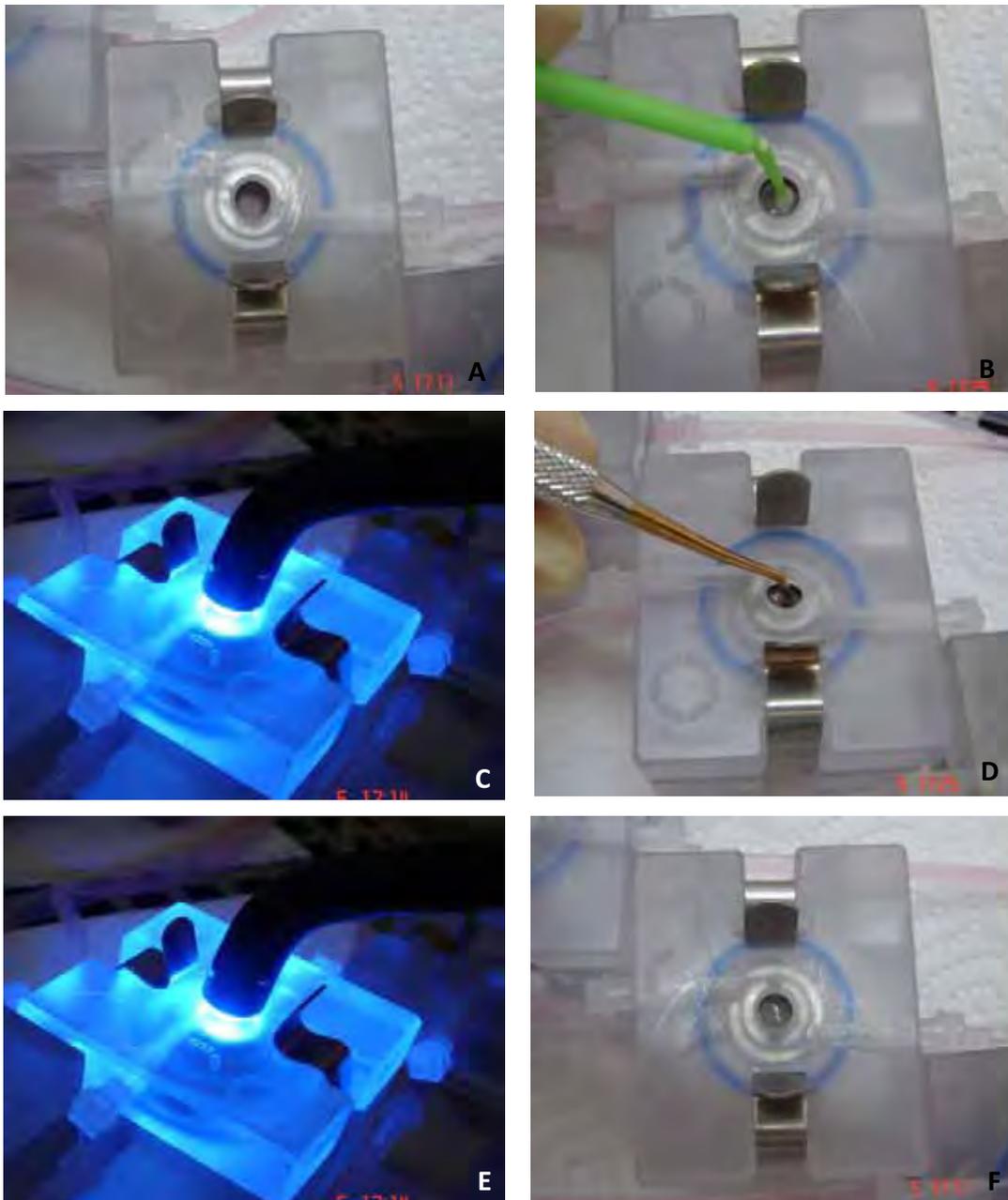


Figura 9 - Aplicação do material: a) câmara de difusão aberta; b) aplicação do adesivo; c) fotopolimerização do adesivo; d) aplicação da resina composta; e) fotopolimerização da resina composta; f) material aplicado.

4.2.1.7 Desmontagem do Sistema

Após a aplicação do material o sistema é ativado para mais 24h de difusão. Após esse período ele foi novamente desligado e os *inserts* removidos das câmaras. Nessa fase, os *inserts* antes de serem abertos, foram fechados mais firmemente com o auxílio de uma chave de fenda. Com a pressão exercida sobre o conjunto dentina/rede com células, a rede era cortada na sua parte central, que posteriormente foi usada para fazer a leitura de viabilidade celular. Após exercer a pressão para o corte, os *inserts* foram então abertos e a porção central da rede com células foi colocada em meio de cultura em uma placa de 24 poços (Figura 10).



Figura 10 - Desmontagem do sistema: a) *inserts* removidos das câmaras; b) corte da parte central da rede; c) *insert* aberto; d) detalhe da rede cortada, região central utilizada para o teste de viabilidade celular; e) células armazenadas em meio de cultura antes do teste de MTT.

4.2.1.8 Teste de MTT

Após a obtenção das redes com as células, a viabilidade celular foi determinada pela mensuração da atividade da succinil desidrogenase (SDH). A atividade da SDH, indicativa da função mitocondrial, foi mensurada pelo ensaio de MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio; Sigma, St Louis, MO, USA). A atividade foi quantificada pela dissolução do sal de formazan dentro de 0.1 N NaOH (6.25 v/v%) e a leitura da densidade óptica resultante da solução foi mensurada em um espectrofotômetro a 600nm (EL311, Biotek Instruments, Burlington, VT, USA).

Em uma placa de 48 poços, foram pipetados 500µl do corante MTT em 25 poços. Após, as redes com as células foram colocadas em contato com a solução de MTT e incubadas por 1 h em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após este período, as redes foram transferidas para outra placa de 48 poços que continha 250µl de DMSO em cada poço e colocadas para agitar durante 20 min a uma velocidade de 100rpm. Após, 200µl da solução tingida, foram pipetados em poços de uma placa de 96 poços para a análise em espectrofotômetro (Figura 11).



Figura 11 - Teste de MTT: a) Células em contato com o corante MTT; b) Incubação das células em estufa a 37°C e 5% de CO₂; c) Células coradas após incubação; d) Células colocadas em contato com o DMSO; e) Solução de DMSO tingida; f) Análise da densidade óptica da solução tingida em Espectrofotômetro.

O teste de barreira dentinária foi realizado utilizando-se fatias de dentina de 200 e 500 μ m, sendo realizados, para cada espessura de dentina, dois testes independentes para cada material. A densidade óptica do controle negativo foi considerada como sendo 100% de viabilidade celular, sendo então os resultados dos grupos experimentais e controle positivo expressos em porcentagens em função do controle negativo. Os resultados foram então avaliados estatisticamente pelo teste de Mann–Whitney *U*-test ($\alpha=0.05$) (SPSS, Version 13.0 SPSS; Chicago, IL, USA)

5. RESULTADOS

5.1 Teste de Microcisolhamento

Os valores de resistência adesiva referente aos 4 sistemas adesivos estudados, nas diferentes espessuras de dentina remanescente (200 e 500 μm) são apresentados nas tabelas 8 e 9 (Apêndice A).

A medida de tendência central (média) da distribuição dos valores e a dispersão (desvio-padrão), referentes aos sistemas adesivos estudados e às diferentes espessuras de dentina remanescente, estão apresentados na tabela 1 e representados na forma de gráficos de colunas na Figura 12.

Tabela 1. Valores médios e desvio-padrão dos valores de resistência adesiva (Mpa) obtidos dos cdp dos diferentes sistemas adesivos conforme a espessura de dentina remanescente.

Material	Espessura	Média	Desvio padrão
Multi Purpose	200 μm	15,24	4,49
	500 μm	17,99	7,14
Single Bond	200 μm	15,65	6,83
	500 μm	23,45	5,03
SE Plus	200 μm	18,24	8,46
	500 μm	20,08	6,31
Easy Bond	200 μm	21,06	10,39
	500 μm	27,02	8,56

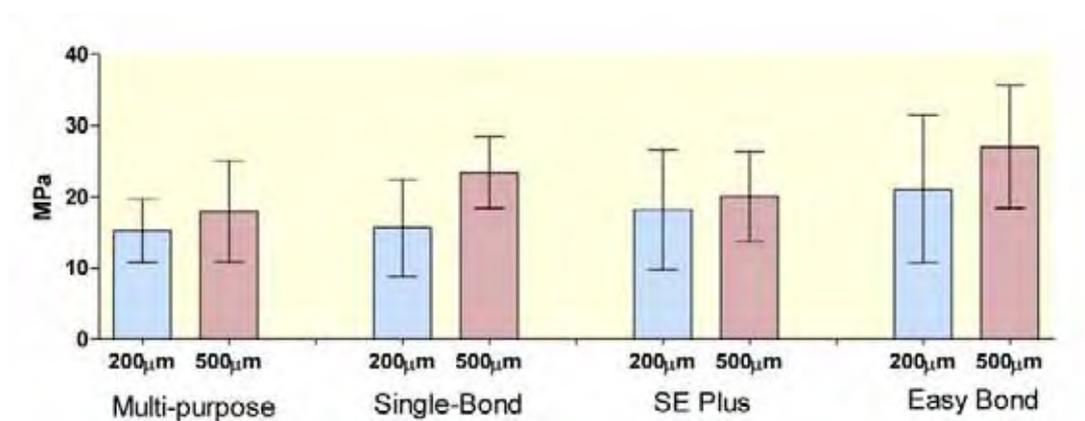


FIGURA 12 - Gráfico de colunas (média \pm desvio padrão) dos dados de resistência adesiva obtidos segundo quatro tipos de adesivos sob duas espessuras da dentina.

Os valores médios de Mpa dos 4 sistemas adesivos testados se mostram semelhantes quando analisados na mesma espessura de dentina, verifica-se que o sistema autocondicionante foi o mais eficiente na resistência adesiva (21,06 e 27,02) em ambas as espessuras de dentina. Seguido pelo Single Bond (15,65 e 23,45), e SE Plus (18,24 e 20,08) com

resultados bastante semelhantes e por ultimo o sistema de 3 passos Multi Purpose (15,24 e 17,99). Em todos os sistemas verificou-se uma maior resistência à união adesiva nos cdp de remanescente dentinário de 500 μm quando comparados à outra espessura testada (200 μm).

Ao verificar a distribuição normal dos valores de Mpa referentes aos materiais testados, foi efetuado o teste ANOVA a dois fatores (sistema adesivo e espessura de dentina), para avaliar a influência do tipo de adesivo e a quantidade de dentina remanescente sobre a resistência adesiva. Verificou-se que o efeito interação é estatisticamente não significativo ($p=0,5494 > 0,05$) (Tabela 2)

Tabela 2 – ANOVA (dois fatores) para os dados obtidos.

Efeito	gl	SQ	QM	F	p
Adesivo	3	571,82	190,607	3,5	0,0196*
Espessura	1	421,04	421,041	7,74	0,0069*
Interação	3	115,81	38,604	0,71	0,5494
Resíduo	72	3916,75	54,399		
Total	79	5025,43			

* $p < 0.05$

Ainda por meio do teste ANOVA, Tabela 3, foi verificado que os efeitos principais são estatisticamente significantes.

Por meio do teste de Tukey (5%), porém, verificamos que a diferença estatística entre os adesivos só ocorre quando não levamos em consideração a espessura de dentina, ou seja, os sistemas Easy Bond e Multi Purpose são diferentes estatisticamente apenas quando comparamos as médias considerando os 20 valores de resistência adesiva. (Tabela 3)

Tabela 3. Teste de Tukey (5%) para a variável sistema adesivo.

Material	Média	Grupos homogêneos
Easy Bond	24,04	A
Single Bond	19,54	AB
SE Plus	19,15	AB
Multi Purpose	16,61	B

Em relação à dentina remanescente, quando consideramos os valores de todos os sistemas em relação às duas espessuras, verifica-se diferença estatística, sendo a resistência adesiva maior na espessura de 500 μm . (Tabela 4)

Tabela 4. Teste de Tukey (5%) para a variável remanescente dentinário.

Espessura	Média	Grupos homogêneos
500 μm	22,13	A
200 μm	17,54	B

Ao analisarmos os valores de resistência à união adesiva em relação aos diferentes sistemas nas mesmas espessuras, o teste de Tukey (5%) não mostrou diferença estatística entre os adesivos, assim como não houve diferença dentro de um mesmo sistema quando comparada as duas espessuras de dentina remanescente, como pode ser observado na Tabela 5 e na forma de gráfico *interection plot* na Figura 13.

Tabela 5. Teste de Tukey (5%) para as variáveis sistema adesivo e remanescente dentinário.

Material	Espessura	Média	Grupos homogêneos
Easy Bond	200 μm	21,06	AB
	500 μm	27,02	A
Single Bond	200 μm	18,24	B
	500 μm	20,08	AB
SE Plus	200 μm	15,65	AB
	500 μm	23,45	AB
Multi Purpose	200 μm	15,24	B
	500 μm	15,24	AB

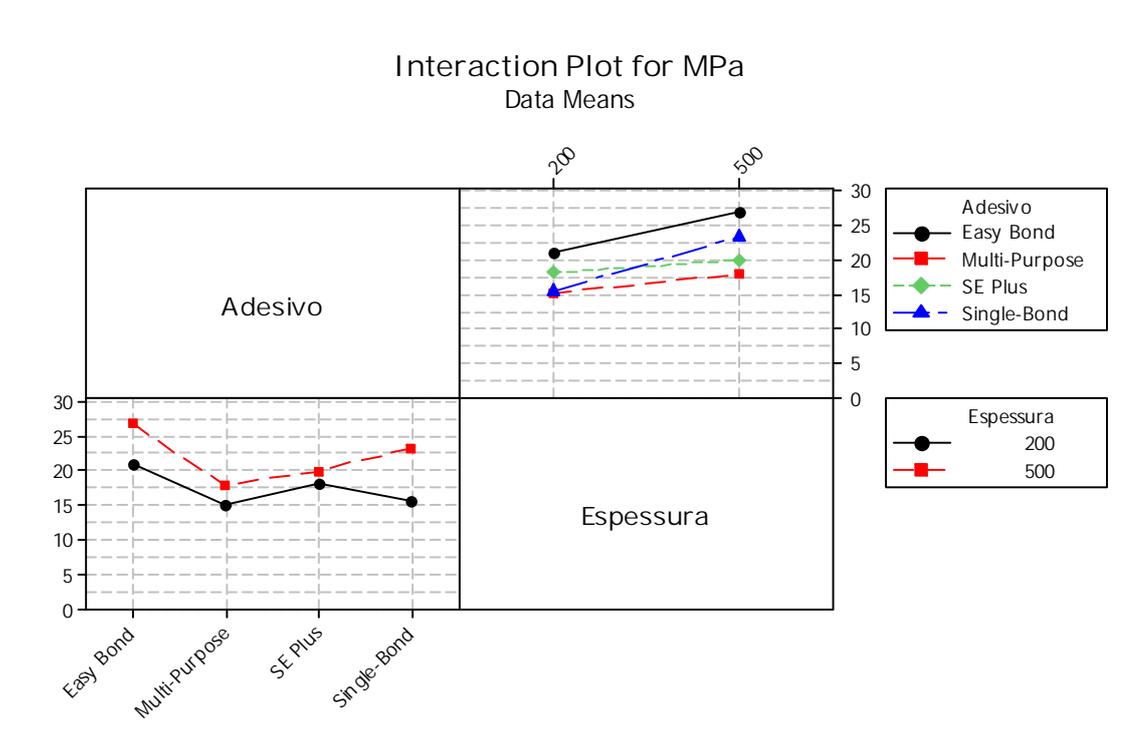


FIGURA 13. Gráfico *Interaction Plot* dos valores de Mpa para os diferentes sistemas adesivos e espessura de remanescente dentinário.

5.2 Teste de Citotoxicidade

Os valores de densidade óptica dos 4 sistemas adesivos e dos materiais controle utilizados, nas diferentes espessuras de dentina (200 e 500 μm) de todos os testes realizados, são apresentados nas tabelas de 10 a 15 (Apêndice B).

As porcentagens de células viáveis referentes aos quatro sistemas adesivos estudados, aos grupos controles e às diferentes espessuras de dentina, estão apresentadas na Tabela 6 e representadas na forma de gráfico de colunas na Figura 14.

Tabela 6. Porcentagens de células viáveis dos grupos controle e experimentais nas diferentes espessuras de dentina (200 e 500 μm).

Material	200 μm	500 μm
President	100	100
Multi Purpose	92,51	93,70
Single Bond	71,17	64,60
SE Plus	84,97	71,55
Easy Bond	103,37	110,39
CaGPG 14	6,3	38,97

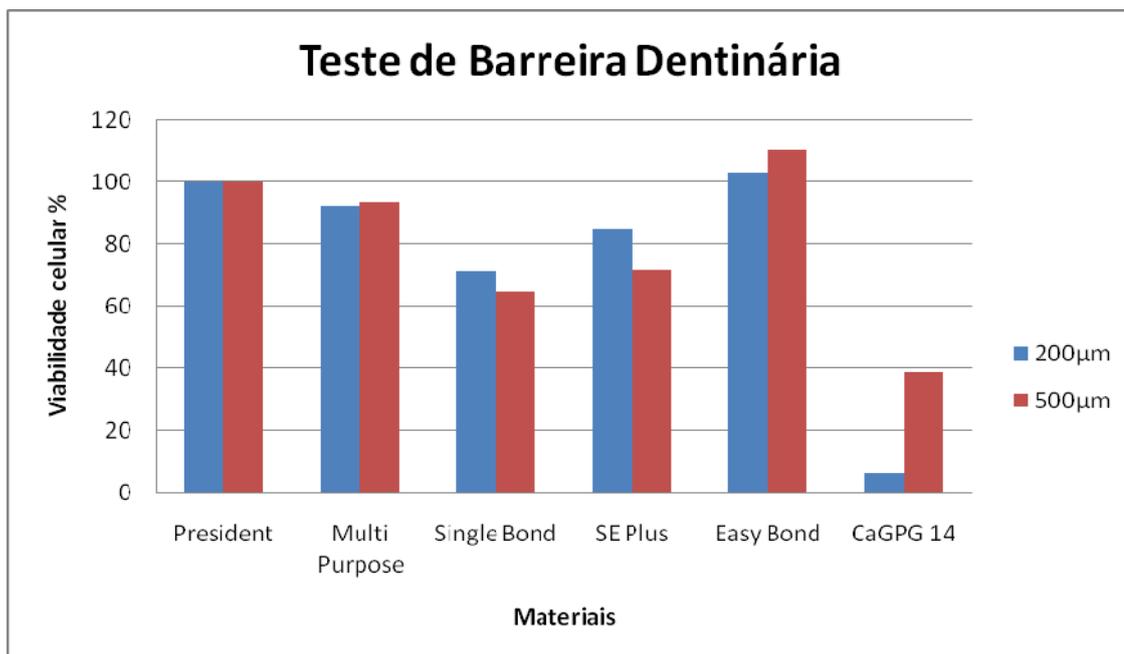


FIGURA 14 - Gráfico de colunas referente às porcentagens de viabilidade celular dos grupos controles e dos adesivos testados, nas espessuras de 200 e 500 µm.

Após 24h de exposição aos materiais, o adesivo Adper Scotchbond Multi Purpose reduziu a taxa de sobrevivência celular para 92,5% na espessura de dentina de 200 µm e para 93,7% na espessura de 500 µm, o que o caracteriza como um material de baixa toxicidade. Com o adesivo Adper Scotchbond Single Bond a redução na taxa de sobrevivência celular foi maior, ficando esta em 71,1% na espessura de 200 µm e em 64,6% quando utilizada a espessura de 500 µm, sendo este então considerado um material com toxicidade moderada. Em relação aos adesivos auto-condicionantes, o Adper Scotchbond SE reduziu a taxa de sobrevivência celular para 85% e para 71%, nas espessuras de dentina de 200 e 500 µm respectivamente, apresentando dessa maneira uma toxicidade moderada. Já o adesivo Adper Easy Bond não reduziu a taxa de sobrevivência celular, independentemente da espessura de dentina utilizada, ou seja, é um material não tóxico.

O material CaGPG 14, utilizado como controle positivo, apresentou toxicidade severa, reduzindo a taxa de sobrevivência celular a 6,3% na espessura de 200 μm de dentina e a 38,9% na de 500 μm .

Resumindo, os resultados no teste de Barreira Dentinária, mostram que a toxicidade dos materiais pode ser classificada seguindo uma ordem decrescente de toxicidade, em ambas as espessuras de dentina: CaGPG 14 > Single Bond > SE > Multi Purpose > Easy Bond.

Para a comparação entre os grupos, foi realizado o teste não paramétrico Mann–Whitney *U*-test ($\alpha=0.05$) (SPSS, Version 13.0 SPSS; Chicago, IL, USA). Foi verificado que não houve diferença estatística entre os valores de sobrevivência celular, para o mesmo sistema adesivo, quando comparadas às duas espessuras de dentina utilizada (200 e 500 μm). Entre os materiais testados, verificou-se diferença estatística dos adesivos Adper Single Bond e Adper SE em relação aos demais. (Tabela 7)

O grupo controle positivo apresentou diferença estatística em relação a todos os outros grupos, já o grupo controle negativo apresentou diferença estatística em relação aos adesivos que apresentaram toxicidade moderada, não havendo diferença estatística para o adesivo com baixa toxicidade e nem para o não tóxico.

Tabela 7. Comparação entre os grupos - teste não paramétrico Mann-Whitney *U*-test ($\alpha=0.05$)

Material	President	Multi-Purpose	Single Bond	SE	Easy Bond	CaGPG 14	
President	ns	ns	0	0,014	ns	0	200 µm
Multi-Purpose	ns	ns	0,003	ns	0,035	0	
Single Bond	0	0,011	ns	0,043	0	0	
SE Plus	0,005	0,043	ns	ns	0,001	0	
Easy Bond	ns	ns	0,001	0,009	ns	0	
CaGPG 14	0	0	0,001	0	0	ns	
500 µm							200µm/ 500 µm

6. DISCUSSÃO

O estudo avaliou a resistência adesiva e o comportamento biológico, em simulação de cavidade profunda, de quatro diferentes sistemas adesivos dentinários, sendo dois deles com condicionamento ácido prévio e dois sistemas autocondicionantes. Optou-se pelo teste de microcisalhamento para avaliar o comportamento *in vitro* destes sistemas. Para avaliar o comportamento biológico foi utilizado um teste de barreira dentinária em cultura celular e posterior análise da viabilidade celular por meio de ensaio de MTT.

A odontologia adesiva está em constante evolução, o uso de adesivos dentinários é cada vez maior (Øilo, 1993), e dessa maneira as opções no mercado e as técnicas de utilização são cada vez mais numerosas. Diante disso, estes novos materiais e técnicas devem ser avaliados, por meio de pesquisas, para que possam ser indicados e usados clinicamente com segurança (Barkmeier e Cooley, 1992; Øilo, 1993; Reifeis et al., 1995).

Os adesivos dentinários podem ser classificados de diversas maneiras, como por exemplo, quanto ao período de surgimento (gerações), quanto à técnica de aplicação, quanto ao condicionamento ácido e pelo sistema de ativação entre outros. Atualmente alguns autores (Perdigão et al., 2000) sugerem uma classificação mais simplificada levando-se em consideração a presença ou não de condicionamento ácido e o número de

frascos em cada sistema. Nessa classificação temos então 4 tipos de sistemas adesivos.

Os dois primeiros são sistemas que necessitam de condicionamento ácido total prévio. Esse condicionamento é geralmente realizado com ácido fosfórico a 37%, sendo aplicados 30 s em esmalte e 15 s em dentina. Na dentina o condicionamento dissolve completamente a *smear layer* e remove a fase mineral até uma profundidade aproximada de 5 microns (Lopes et al., 2002; Perdigão, 2002). Uma fase de colágeno, ácido resistente permanece presente na superfície após a remoção e limpeza do ácido. A posterior penetração do adesivo nessa gama de colágeno e sua subsequente polimerização resultam na chamada camada híbrida (Nakabayashi et al., 1982). No primeiro tipo, o *primer* e o adesivo do sistema vem em frascos separados, sendo então, após o condicionamento ácido, aplicada uma camada de *primer*, e em seguida aplica-se o adesivo seguido de fotopolimerização pelo tempo recomendado pelo fabricante. No segundo tipo de sistema, o *primer* e o adesivo vem misturados em um mesmo frasco, sendo então, após o condicionamento ácido, aplicado o sistema seguido de fotopolimerização. Existem diversos desses sistemas no mercado, sua efetividade clínica já foi comprovada por diversas pesquisas (Barkmeier e Cooley, 1992; Fortin et al., 1994; Cardoso et al., 1998; Coelho et al., 2008; Can-Karabulut et al., 2009), porém resultados controversos também são encontrados na literatura (Roh e Chung, 2005; Banomyong et al., 2007).

A evolução dos sistemas adesivos foi baseada na tentativa de se facilitar a técnica de aplicação e dessa maneira diminuir a chance de erros durante o procedimento adesivo, principalmente em relação à dentina (Tay et al., 1996; Sano et al., 1998; Reis Silva, 2002). Surgiram então na década de 80 os chamados sistemas autocondicionantes, que não necessitavam mais do condicionamento com ácido fosfórico (Chigira et al., 1994 e Watanabe et al., 1994). Esses sistemas possuem em suas formulações misturas aquosas

de monômeros acídicos, como ésterfosfato ou ácido carboxílico, e HEMA (Hayakawa et al., 1998; Toledano et al., 2001). Além da simplificação, uma característica implícita nesses sistemas é a desmineralização superficial da estrutura dentária e a penetração simultânea dos monômeros resinosos que são polimerizados *in situ* (Van Meerbeck et al., 1998; Lopes et al., 2002). Os componentes reativos dos sistemas autocondicionantes são ésteres alcoóis bivalentes com ácido metacrílico e ácido fosfórico ou derivado, além dos monômeros hidrofílicos tradicionais, como o HEMA. O resíduo fosfato é responsável por condicionar a dentina, enquanto que o componente metacrilato da molécula é responsável pela copolimerização com o agente de adesão e a resina composta. Com este processo, não há a necessidade de lavagem dos produtos da reação ou dos ésteres residuais do ácido fosfórico, pois ambos são subseqüentemente polimerizados na camada de adesão (Watanabe et al., 1994; Hannig et al., 1999; Fritz et al., 2001). Dessa maneira o processo de desmineralização da dentina ocorre simultaneamente à penetração do adesivo na malha de colágeno, formando a camada híbrida, e nos túbulos dentinários formando os *tags*. Isso, segundo alguns autores, faz com que a profundidade de desmineralização seja idêntica a profundidade de penetração do adesivo, eliminando o risco de uma nanoinfiltração por conta de espaços vazios. Para muitos autores, a adesão à dentina é favorecida por eliminar alguns pontos de dificuldade na técnica antiga, como o tempo de condicionamento com ácido fosfórico e o excessivo ressecamento da dentina (Sano et al., 1998).

Os outros dois tipos fazem parte desses sistemas autocondicionantes, sendo o terceiro tipo, um sistema que apresenta o *primer* e o adesivo em frascos separados e no quarto tipo o *primer* e o adesivo vêm em um mesmo frasco. Quando comparados com os sistemas de condicionamento ácido total, os autocondicionantes apresentam valores inferiores de adesão em esmalte (Frankenberger e Tay, 2004), porém em dentina, os resultados são

controversos (Perdigão et al., 2006; Banomyong et al., 2007). Muitos estudos pesquisaram a efetividade adesiva dos diferentes sistemas, comparando os de frasco único com os de múltiplos frascos, sendo a maioria dos resultados desfavoráveis aos sistemas nos quais primer e adesivo vêm misturados (Sasakawa et al., 2005; Ishikawa et al., 2007; Burrow et al., 2008).

Estudos prévios avaliaram as propriedades de adesividade (Sasakawa et al., 2005; Ishikawa et al., 2007) e citotoxicidade (Huang, Chang 2002; Demirci et al., 2008) de diversos sistemas adesivos de diferentes marcas. No estudo optamos por materiais de um mesmo fabricante, com composições semelhantes, com a intenção de focar os resultados nas possíveis diferenças em função das gerações de adesivos. Como os 4 tipos de sistemas adesivos escolhidos são largamente utilizados em consultórios e clínicas particulares, é importante que a evolução dos materiais e técnicas seja acompanhada de comprovação científica, o que nos fez selecionar um sistema adesivo de cada tipo para o estudo.

Os estudos clínicos são de extrema importância para avaliação dos materiais odontológicos, porém pela demanda de tempo para a coleta de dados e posterior publicação dos resultados os materiais avaliados podem se tornar obsoletos. Dessa maneira, estudos *in vitro* desempenham papel fundamental na qualificação dos novos materiais, possibilitando, se não, por resultados clínicos, mas por comparação, comprovarmos a utilização clínica de novos produtos (Barkmeier e Cooley, 1992; Li et al., 2001; Kaaden et al., 2002; Frankenberger e Tay, 2005; Van Meerbek et al., 2005). Os testes laboratoriais são rápidos e eficazes, porém necessitam de uma adequada padronização para que se possa fazer a extrapolação dos resultados obtidos para a clínica (Stanley, 1993; Miyazaki et al., 1999; Hara et al., 2001; Torii et al. 2003)

Os adesivos dentinários podem ser avaliados quanto às suas propriedades químicas e mecânicas, porém, não existe um teste laboratorial ou clínico que consiga avaliar todas as propriedades necessárias para o sucesso de um material. Uma propriedade mecânica de extrema importância é a da resistência adesiva, a qual pode ser analisada por meio de testes de tração ou cisalhamento (Øilo, 1993). Resistência adesiva é definida como a força por unidade de área necessária para romper uma união adesiva com a falha adesiva ocorrendo na/ou perto da interface adesiva (ISO/TC 106). O propósito dos testes de resistência adesiva é a obtenção de um valor que mostre quão forte era a união.

Para se qualificar a resistência adesiva de um material podem-se avaliar as tensões de cisalhamento ou tração, e suas variações, utilizando áreas diminutas, testes chamados de microcisalhamento e de microtração. Porém, os resultados destes testes mostram que existe uma grande variação entre eles (Council on Dental Materials, 1987). Van Noort et al. (1989) avaliando diferentes métodos para a obtenção dos dados de resistência adesiva, verificaram que diferentes métodos ou pequenas alterações dentro de um mesmo método podem gerar resultados de resistência adesiva 2 a 4 vezes maiores em um mesmo produto. Diante disso, concluíram não existir um método ideal e ressaltaram a importância da interpretação cautelosa dos dados para a comparação de resultados.

O teste de cisalhamento consiste na aplicação de uma força que age paralelamente à superfície dentária, rompendo a união adesiva. Alguns autores questionam a validade deste tipo de teste, justificando que ele não reflete a resistência adesiva da interface dentina/compósito, devido a uma distribuição não uniforme da tensão, sugerindo, dessa maneira, a realização de testes de tração e microtração (Aguilar et al., 2002; Hashimoto et al., 2003; Abo et al., 2004; Andrade et al., 2004). Para a presente pesquisa optamos pelo teste de microcisalhamento, pois segundo Fowler et al. (1992)

e Cardoso et al. (1998), o *stress* de cisalhamento é considerado o mais representativo das situações clínicas, e é efetivo para a comparação entre dados de um mesmo trabalho. Além disso, nesse tipo de teste utilizamos uma área diminuta, o que permite a obtenção de uma área adesiva com as mesmas características em toda sua extensão (Mc Donough et al., 2002; Shimada et al., 2002, Toba et al., 2003) e elimina o problema da não-uniformidade de distribuição do *stress* ao longo da interface adesiva. (Shimada et al., 2002; Weerasinghe et al., 2005; Sadr et al., 2007)

Dentro do teste de microcisalhamento podemos ter alterações. Dessa maneira Foong et al. (2006) avaliaram dois métodos para a aplicação da força, um deles por meio de uma lâmina biselada posicionada paralelamente a interface adesiva e o outro utilizando um fio ortodôntico (0,2 mm de diâmetro) circundando a área de adesão. Os autores verificaram que o método do fio, também utilizado em nossa pesquisa, mostrou maior confiabilidade nos resultados, apresentando um coeficiente de variação 50% menor do que o obtido pelo outro método, e concluíram que o fio ortodôntico foi capaz de distribuir as tensões de cisalhamento mais uniformemente, por envolver metade da circunferência do cilindro de resina composta e se posicionar mais facilmente na interface adesiva.

Um aspecto que vem ganhando importância nos últimos anos quando se trata de qualificar um material para a utilização clínica, é em relação ao seu comportamento biológico, ou seja, a biocompatibilidade. Para avaliar este aspecto inicialmente experimentos em animal e em cultura celular deveriam ser realizados. No entanto, os experimentos em animais para análise de citotoxicidade de materiais são dispendiosos, consomem bastante tempo e sua abrangência ainda é um assunto controverso na literatura. Os métodos de cultura celular, por outro lado, são relevantes e satisfatórios para a avaliação de propriedades biológicas básicas de

materiais dentários, são melhores padronizados e reproduzíveis, sendo rápidos e fáceis na sua realização, além de possuírem custo relativamente baixo (Huang e Chang, 2002; Camps et al., 2003; Souza et al., 2006). Além disso, o experimento realizado *in vitro* tem como vantagem a facilidade no controle dos fatores experimentais o que representa freqüentemente um problema em experimentos *in vivo* (Huang e Chang, 2002).

Os estudos *in vitro* devem ser largamente utilizados. Estes tipos de testes apresentam a vantagem de termos um controle maior das situações do teste. Porém, é preciso cautela na hora de interpretar os dados, pois sua interpretação deve ser feita em função das condições experimentais. Em muitos casos os resultados são erroneamente entendidos e dessa maneira uma falsa interpretação pode ocorrer. Nos testes de citotoxicidade *in vitro* o objetivo é verificar a toxicidade do material estudado e não a resposta do tecido (Langeland, 1978; Spangberg, 1978).

No estudo optou-se em avaliar a citotoxicidade dos adesivos dentinários por meio do teste de barreira dentinária, que consiste em um dispositivo capaz de reproduzir a relação do complexo dentina-polpa laboratorialmente. Existem diversos testes para se avaliar a biocompatibilidade de materiais dentários (ISO 7405 2008), porém, no caso dos adesivos dentinários, ou eles são avaliados sem estarem polimerizados (Hashieh et al., 1999; Demirci et al., 2008) ou quando polimerizados, o *primer* do sistema não é avaliado juntamente (Huang e Chang, 2002; Mantelini et al., 2003; Teixeira et al., 2006), não representando o que acontece clinicamente. Para simular uma situação clínica, para a utilização dos materiais adesivos, um modelo *in vitro* de câmara pulpar foi desenvolvido, posicionando a dentina como uma barreira entre o material e as células-alvo. Schmalz et al. (1996) descreveram um sistema *in vitro* de teste de barreira dentinária, o qual é baseado em componentes comercialmente disponíveis, facilitando assim a padronização do ensaio. Outra vantagem desse sistema é

a possibilidade de perfusão da “câmara pulpar” com meio de cultura, simulando assim o fluxo sanguíneo pulpar. Com o teste de barreira dentinária é possível simular a interação de todos os componentes envolvidos no procedimento adesivo e sua relação com o complexo dentino-pulpar, justificando sua utilização no estudo.

No teste de barreira dentinária utilizamos cultura de célula em 3 dimensões, o que permite um contato célula a célula e uma comunicação similar ao que ocorre *in vivo*. Em contraste com a diferenciação morfológica, fisiológica e biomecânica limitadas das culturas *monolayer*, as culturas em 3 dimensões facilitam o crescimento e as funções celulares, assim como ocorre *in vivo*. Além disso, o tipo de cultura de célula utilizado simula uma distribuição de substâncias nos tecidos. A penetração e absorção de nutrientes, dos produtos finais das vias catabólicas ou de substâncias tóxicas de materiais aplicados ocorrem similarmente às situações *in vivo* (Knüchel e Sutherland, 1992; Fusenig, 1994). As células SV3NeoB, que são células pulpares bovinas transformadas, foram utilizadas no estudo, porque se proliferam bem nesse tipo de cultura.

Na realização do teste de barreira dentinária, após um período de perfusão de 24 h, a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT. Este teste foi escolhido, pois se mostra o mais adequado para o objetivo, qual foi o de analisar a vitalidade celular após a aplicação dos materiais estudados. (Schmalz et al., 1996).

Para os testes de resistência adesiva e de barreira dentinária foram utilizados dentes bovinos. A escolha foi baseada na facilidade de obtenção e devido aos aspectos éticos que envolvem a utilização de dentes humanos. Além disso, diversos autores ao realizarem comparações entre dentes bovinos e humanos qualificam aqueles para serem usados em testes de resistência adesiva (Nakamichi et al., 1983; Schilke et al., 1999; Krifka et al., 2007). Em relação ao teste de barreira dentinária, Galler et al. (2005) relatam

que devido às semelhanças na composição, densidade e difusão da dentina humana e bovina, esta pode ser usada para o teste.

A adesão à dentina é considerada o elo mais fraco nos procedimentos restauradores. Intensas pesquisas foram realizadas com o objetivo de se obter a melhor adesão a esse substrato, sendo esse ainda o maior desafio da odontologia adesiva. Essa dificuldade é devido a diversos aspectos, principalmente aos relacionados com a composição inorgânica da dentina. A umidade dentinária, a malha de colágeno e a relação com o tecido pulpar são alguns exemplos que levam esse substrato a ser o verdadeiro “calcanhar de Aquiles” da odontologia adesiva (Nakabayashi et al., 1982; Perdigão, 2002). Resultados discrepantes na literatura, que variam de 5 Mpa a 48 Mpa (Roh e Chung, 2005; Sasakawa et al., 2005) comprovam a dificuldade da adesão a esse substrato. Assim, quando novos materiais surgem, a dentina é sempre alvo dos estudos de adesão, o que é o objetivo também da nossa pesquisa.

A resistência adesiva de quatro gerações de sistemas adesivos foi avaliada por meio de ensaio de microcisalhamento, variando-se também a espessura do remanescente dentinário. O modelo estatístico, aplicado através de teste de análise de variância, mostrou o grau de significância das variáveis.

Analisando os resultados foi verificado que os sistemas adesivos não apresentaram diferenças significantes na resistência adesiva, independente da espessura do remanescente dentinário. Porém, o adesivo autocondicionante de um passo (Easy Bond) foi o que apresentou os maiores valores, seguido pelo Single Bond (sistema de condicionamento ácido total de um frasco), pelo SE Plus (autocondicionante de dois passos) e por último, com os menores índices de resistência, o adesivo Multi-Purpose, sistema de condicionamento total de 2 frascos.

Fatores que podem afetar a resistência adesiva dos sistemas adesivos dentinários estão descritos na literatura (Kato e Nakabayashi, 1998; Hashimoto et al., 2002), sendo que a maioria deles está diretamente relacionado com a completa penetração dos agentes adesivos na dentina desmineralizada e o grau de conversão dos monômeros infiltrados (Roh e Chung, 2005).

Os sistemas de condicionamento total apresentaram valores de resistência adesiva inferiores quando comparados ao sistema autocondicionante de um passo, fato que vai de encontro com outras pesquisas (Sasakawa et al., 2005; Knobloch et al., 2007; Can Karabulut et al., 2009). Os sistemas adesivos de condicionamento total ácido já têm sua efetividade comprovada na literatura (Barkmeier e Cooley, 1992; Fortin et al., 1994; Cardoso et al., 1998; Coelho et al., 2008; Can-Karabulut et al., 2009), porém é de conhecimento geral que esses sistemas apresentam a desvantagem de uma complexidade técnica, principalmente relacionada ao tempo de condicionamento e à umidade dentinária (Rodrigues Filho e Lodovici, 2003; Knobloch et al., 2007). A desmineralização da dentina pelo ácido fosfórico torna esse tecido muito mais dinâmico e instável. A remoção da *smear layer* juntamente com a desmineralização da dentina expõem uma estrutura predominantemente orgânica de fibrilas colágenas, a qual se mantém aberta, sustentada pela água. Essa situação é requisito para haver espaço para a penetração adequada dos agentes adesivos e conseqüente formação da camada híbrida (Nakabayashi et al., 1982). Uma secagem excessiva da dentina, após a lavagem do ácido, leva ao desmoronamento da rede de fibrilas, colabando-as e impedindo a penetração dos monômeros do sistema adesivo (Sano et al., 1998). Por outro lado, uma umidade excessiva da dentina pode levar à diluição dos monômeros hidrófilos, resultando em uma estrutura preparada inadequadamente (Tay, 1996).

Quando a técnica adesiva dos sistemas de condicionamento total é realizada corretamente, ocorre uma boa penetração na dentina desmineralizada pelo ácido fosfórico, porém, Sano (1998) afirma que o grau de desmineralização muitas vezes é maior que a capacidade de penetração dos agentes adesivos, originando espaços vazios e uma zona desmineralizada não-hibridizada, podendo resultar em microinfiltração, prejuízos na resistência adesiva e sensibilidade pós-operatória. Esse fato, somado à complexidade técnica de aplicação podem justificar o fato desses sistemas apresentarem valores inferiores ao autocondicionante, sendo o Multi-Purpose o sistema com os menores valores de resistência adesiva em nosso estudo.

Comparando os dois adesivos de condicionamento total, o Single Bond apresentou melhores resultados que o Multi Purpose, porém, sem diferença estatística. Lopes et al. (2002) também relatam desempenho semelhante. Para esses autores a popularidade dos adesivos de condicionamento ácido total de um frasco só está relacionada com a sua facilidade de manuseio, conveniência e por ser menos confuso para os clínicos e não porque promovem uma melhor adesão. O discreto melhor desempenho talvez possa ser explicado por uma melhor penetração do sistema de frasco único, não necessariamente maior, mas com menos espaços vazios, uma vez que a técnica de três passos por ser mais complexa pode ter sido prejudicial ao desempenho do sistema Multi-Purpose. Além disso, Swift et al. (1995) afirmam que esse sistema mostrou em alguns estudos *in vitro*, a formação de *tags* resinosos nos túbulos dentinários, porém essa penetração não se difundia para a microestrutura da dentina inter e peritubular desmineralizada, sendo então, esses *tags* frágeis, contribuindo pouco para a adesividade.

Em nosso estudo, os maiores valores de união adesiva foram obtidos pelo sistema autocondicionante de um passo, o que está de acordo com

diversos autores (Roh e Chung 2005; Banamyong et al., 2007; Burrow et al., 2008). Esses sistemas surgiram com a proposta de facilitar a técnica de aplicação, dispensando o condicionamento ácido prévio, tentando, contornar os problemas inerentes à técnica convencional, garantindo uma superfície mais homogênea e estável, melhorando a qualidade da união (Rodrigues Filho e Lodovici 2003). À medida que a estrutura é condicionada, concomitantemente vai havendo a penetração dos outros componentes do sistema. Teoricamente deveria então se formar uma zona de interdifusão saturada de resina e sem espaços vazios, e isso resultaria em valores de união adesiva maiores, mesmo sendo essa zona não tão espessa quanto nos sistemas de condicionamento total (Roh, Chung, 2005). Outros autores (Fritz et al., 2001; Hashimoto et al., 2003; Sadr et al., 2007) também verificaram melhores valores de resistência adesiva em sistemas autocondicionantes, preconizando que a menor capacidade de condicionamento desses sistemas não interfere negativamente na resistência adesiva. Esse fato pode explicar os maiores valores do sistema autocondicionante em nossa pesquisa.

Outro aspecto estudado foi a quantidade de dentina remanescente. De acordo com os resultados não houve diferença estatística significativa na resistência adesiva, dentro de um mesmo sistema adesivo, variando-se a espessura de dentina (200 e 500 μm), porém em todos os casos os valores de adesão para o remanescente de 500 μm foi maior. Ao analisarmos as médias de todos os sistemas conjuntamente, verificou-se diferença estatística entre as duas espessuras, fato que já foi relatado por outros autores (Tagami et al., 1990).

A formação da camada híbrida na dentina intertubular contribui para a adesividade de acordo com a quantidade de dentina disponível para ser penetrada pelos monômeros. Segundo Garberoglio e Brännström (1976), a quantidade de dentina intertubular vai diminuindo de acordo com a

profundidade da cavidade, uma vez que quanto mais próximo ao tecido pulpar a quantidade e o diâmetro dos túbulos dentinários vão aumentando. Nossos resultados como de outros autores (Tagami et al., 1990; Shabka e Khalaf, 1995; Shams, 1995; Yoshiyama et al., 1995; Van der Vyver et al., 1996) indicam que a resistência adesiva varia de acordo com a profundidade cavitária, diminuindo em cavidades muito profundas. Isso pode ser explicado pela menor quantidade de dentina inter e peritubular disponíveis para a interdifusão dos monômeros hidrofílicos (Pashley, 1990). Além disso, uma maior permeabilidade dentinária induz a um maior molhamento, dificultando a penetração do adesivo na rede de fibras colágenas (Tagami et al., 1990).

O estudo avaliou a citotoxicidade de quatro diferentes sistemas adesivos, estes foram aplicados em um teste de barreira dentinária que simulava a relação do complexo dentina-polpa. O modelo estatístico aplicado através do Mann–Whitney *U*-test ($\alpha=0.05$) (SPSS, Version 13.0 SPSS; Chicago, IL, USA) mostrou as diferenças entre os grupos experimentais e controles.

Passando a analisar os resultados de citotoxicidade, verificou-se que três dos sistemas adesivos (Scotchbond Multi-Purpose, Scotchbond Single Bond, Scotchbond SE) apresentaram certo grau de citotoxicidade, e um deles (Adper Easy Bond) não apresentou toxicidade, para ambas as espessuras de dentina (200 e 500 μm).

É de consenso na literatura que adesivos dentinários podem ser citotóxicos às células pulpares quando aplicados em cavidades profundas (Schmalz et al., 2002; Schweikl et al., 2006; Teixeira et al., 2006; Wiegand et al., 2006; Koulaouzidou et al., 2007; Porto et al., 2009; Vajrabhaya et al., 2009). Diversas pesquisas comprovam a toxicidade dos adesivos dentinários, porém a etiologia das respostas pulpares não é completamente entendida, assim como o efeito dos adesivos no ciclo celular (Mantellini et al. 2003; Koliniotou-Koubia et al., 2007). A toxicidade dos materiais dentários tem sido

avaliada *in vitro* por meio de testes que verificam o crescimento celular, alterações na membrana permeável, alterações metabólicas e alterações citopatogênicas e, em alguns estudos, a citotoxicidade é avaliada por dois ou mais desses parâmetros (Helgeland, 1982). Alguns autores atribuem essa toxicidade aos monômeros, relatando o Bis-GMA e o UDMA como os mais tóxicos enquanto o HEMA e o TEGDMA como moderadamente tóxicos (Ratanasathienet et al., 1995; Rakish et al., 1998; Geursten et al., 1999). Chang et al.(2005) verificaram que o HEMA induz inibição do crescimento celular e promove perturbação do ciclo celular. Resultado disso são a depleção de glutatônio e a produção de ROS que são fatores-chave para a apoptose celular. Alguns adesivos podem, ao invés de induzir apoptose, fazer com que a célula entre em fase de latência, fato que também é preocupante, pois células nesse estado não são capazes de formar dentina reacional, ou seja, perdem sua função de resposta a agentes agressores (Mantellini et al.,2003).

Ferracane (1994) e Goldberg (2008) afirmam que a reação de conversão dos monômeros de dimetacrilato em matriz polimérica nunca é completa, sendo então as reações adversas das células, resultantes da liberação desses monômeros, não polimerizados como o TEGDMA ou HEMA. Relatam que os monômeros parecem estar diretamente relacionados com a citotoxicidade provocada em células pulpares e gengivais, e que provavelmente também são os responsáveis pelo potencial alérgico do material. Além dos monômeros, alguns sistemas adesivos podem ser tóxicos devido à canforoquinona, que é o fotoiniciador mais comum e capaz de induzir citotoxicidade e efeitos mutagênicos (Atsumi et al., 1998).

A completa polimerização dos sistemas é dificilmente conseguida, sendo assim, diferentes componentes dos materiais adesivos podem ser liberados quando em ambiente úmido (Gerzina e Hume, 1996; Geursten et al., 1999). Quando aplicados em cavidades profundas, esses monômeros

residuais, por difusão, podem atingir a polpa, e em dentina condicionada essa penetração tende a ser maior (Pashley 1990). Em certa concentração podem ser tóxicos às células pulpares, causando inflamação e provocando uma desorganização tecidual (Pashley, 1990; Ulker e Sengun, 2009). A severidade dessa reação pulpar frente aos materiais adesivos pode ser influenciada por diversos fatores, como a composição do material, procedimento clínico de aplicação e permeabilidade dentinária (Pashley, 1990; Söderholm, 1991). Dessa maneira a composição dos materiais e a permeabilidade dentinária, ou seja, a penetração dos monômeros residuais, atingindo as células no teste de barreira dentinária, justifica a toxicidade apresentada pelos materiais utilizados no estudo.

O sistema de condicionamento total prévio Scotchbond Single Bond foi o mais tóxico nesse estudo, mas apresentando uma toxicidade moderada, o que está de acordo com diversas pesquisas (Huang e Chang, 2002; Koulaouzidou et al., 2007; Porto et al., 2009). O adesivo Scotchbond Multi-Purpose apresentou uma baixa toxicidade, o que também está de acordo com outros autores (Bouillaguet et al., 1998). A toxicidade desses sistemas se justifica pela penetração dos monômeros residuais do adesivo através da dentina, devido à permeabilidade dentinária. Ao compararmos os sistemas de condicionamento total, a maior toxicidade do Scotchbond Single Bond está de acordo com diversos autores (Huang e Chang, 2002; Koulaouzidou et al., 2007; Porto et al., 2009), e pode ser justificada pelo fato de o sistema adesivo de condicionamento total prévio, de um frasco, ser formulado com monômeros resinosos dissolvidos em acetona, etanol, água ou uma combinação desses solventes. Os solventes atuam como meio de transporte e para diminuir a viscosidade da resina, permitindo assim uma penetração mais profunda da resina nas microporosidades e possibilitando melhores resultados da técnica adesiva (Wang et al., 2007). Porém, a presença de solvente residual pode ter efeito adverso na união adesiva, uma vez que ele impede a completa polimerização do adesivo. Isso ocorre, pois quando

acontece evaporação inicial do solvente, a densidade do adesivo aumenta, criando um gradiente de concentração de monômero, que atua como uma barreira para a evaporação adicional do solvente (Pashley et al., 1998). Sabe-se que a polimerização do adesivo não é completa quando em ambiente úmido, resultando assim em mais monômeros residuais (Mantelini et al., 2003), justificando a maior toxicidade do sistema de um frasco. No sistema de dois frascos, como o primer é aplicado separadamente, a evaporação do solvente se dá por completo, possibilitando um maior grau de conversão dos monômeros e diminuindo a quantidade de monômero residual capaz de atingir as células.

Na literatura encontramos diversos estudos que mostram que os adesivos com condicionamento ácido total prévio são mais citotóxicos que os sistemas autocondicionantes (Hashie et al., 1999; Huang e Chang, 2002; Schmalz et al., 2002; Vajrabhaya et al., 2009). Esses resultados estão de acordo com os nossos, com exceção do Scotchbond SE que se mostrou mais citotóxico que o Scotchbond Multi-Purpose. Segundo Varjhabaya et al. (2009) os sistemas de condicionamento ácido total são mais tóxicos pois o condicionamento com ácido fosfórico aumenta a permeabilidade dentinária, permitindo que mais monômeros residuais penetrem para o tecido pulpar, fato que justifica a citotoxicidade desses sistemas em ambas as espessuras de dentina. Porém, Schmalz et al. (2002) e Galler et al. (2005), afirmam que essa influência do condicionamento ácido na permeabilidade dentinária só seria relevante em cavidades com menos de 300 μm de dentina remanescente, fato que vai de encontro aos nossos resultados, uma vez que não houve diferença na toxicidade quando usadas dentina de 200 e 500 μm de espessura.

O adesivo autocondicionante Scotchbond SE foi o segundo mais tóxico, apresentando uma baixa toxicidade, pouco maior que a toxicidade do sistema Scotchbond Multi Purpose. Este resultado discorda de outras

pesquisas (Hashie et al., 1999; Huang e Chang, 2002; Schmalz et al., 2002; Vajrabhaya et al., 2009), uma vez que a maior capacidade de penetração dos sistemas de condicionamento ácido total caracterizaria este tipo de adesivo como mais tóxico que os autocondicionantes. Como dito anteriormente, a maioria dos autores (Ratanasathien et al., 1995; Rakish et al., 1998; Geursten et al., 1999; Schweikl et al., 2006) atribuem a toxicidade dos sistemas adesivos à sua composição. Esses dois sistemas apresentam composição semelhante, porém a bula do produto não fornece detalhadamente a composição do material e nem a quantidade de cada componente presente. O sistema autocondicionante pode apresentar uma maior porcentagem de monômeros em sua composição, o que poderia justificar uma maior toxicidade deste sistema. Além disso, o adesivo Scotchbond SE apresenta um corante no sistema que indica quando a dentina está umedecida após a aplicação do primer ácido, o que também pode ter sido tóxico às células. Outro fato seria que a desmineralização dentinária promovida pelo primer ácido pode ter sido suficiente para uma boa penetração do adesivo, fazendo com que uma quantidade de monômeros residuais penetrasse e atingissem as células.

O outro sistema autocondicionante, Easy Bond, não mostrou nenhuma toxicidade, o que está de acordo com outras pesquisas encontradas na literatura (Schmalz et al., 2002; Galler et al., 2005; Demirci et al., 2008). Outros estudos verificaram toxicidade destes sistemas, porém são pesquisas que avaliam o sistema diretamente em contato com as células (Koliniotou-Koubia et al., 2001; Szep et al., 2001) . Devido à composição do sistema acreditamos que possam ser citotóxicos, porém no teste de barreira dentinária, a dentina agiu como uma proteção natural, impedindo que monômeros atingissem as células e causassem algum dano a elas (Demirci et al., 2008). Além da proteção dentinária, segundo Galler et al. (2005), os sistemas de frasco único não promovem uma desmineralização muito profunda na dentina, não ocorrendo penetração suficiente do material a

ponto de seus monômeros residuais atingirem as células, o que justifica a não toxicidade deles em nossa pesquisa.

É de consenso geral na literatura que a dentina remanescente é um importante meio de proteção para a penetração dos monômeros residuais, diminuindo a chance de haver uma inflamação do tecido (Hanks et al., 1988; Meryon et al., 1988; Meryon e Brook, 1989). Porém, em cavidades muito profundas, existe certa divergência na literatura, alguns autores verificaram que com a presença de dentina remanescente, não há dano às células pulpares provocado pelos monômeros (Schmalz et al., 2002; Galler et al., 2005; Demirci et al., 2008). No entanto, outros relatam que mesmo com dentina remanescente, apesar dela promover proteção, ainda assim os monômeros são capazes de causarem danos ao tecido (Bouillaguet et al., 1998; Ulker e Sengun, 2009). Nossos resultados estão de acordo com estes autores, uma vez que em três dos sistemas avaliados, apesar da presença da barreira dentinária, detectou-se citotoxicidade. Acreditamos que o sistema Easy Bond só não se mostrou citotóxico devido a uma desmineralização dentinária não tão profunda, impedindo que o adesivo atingisse as células. A proteção dentinária é comprovada. Sem dúvida ela diminui a quantidade de monômeros residuais que entram em contato com as células, porém, de acordo com nossos achados, essa proteção não se torna muito efetiva em cavidades profundas, uma vez que não houve diferença nos valores de toxicidade nas diferentes espessuras de dentina. Vajrabhaya et al. (2009) afirmam que a circulação sanguínea pulpar é um dos fatores mais importantes na diluição de substâncias tóxicas que chegam a esse tecido. Esse fato pode talvez explicar a não diferença na viabilidade celular nas espessuras de dentina. Devido ao fato de o teste de barreira dentinária ter a difusão de meio de cultura, os monômeros residuais podem ter sido diluídos a valores semelhantes, mesmo havendo uma possível maior penetração em uma espessura menor de dentina.

Um material para ser qualificado para o uso clínico deve primeiramente ter sua efetividade comprovada. Dessa maneira lançamos mão de estudos *in vitro*, e após uma aprovação inicial, há a necessidade da comprovação clínica. Nesse estudo foram avaliadas duas propriedades (resistência adesiva e citotoxicidade) de diferentes gerações de adesivos dentinários. De acordo com nossos resultados todos os sistemas mostraram comportamento compatível para a utilização clínica em ambos os aspectos. Porém, alguns cuidados devem ser tomados na utilização desses produtos. Em relação à resistência adesiva, é importante salientar, principalmente nos sistemas de condicionamento ácido total, que para a obtenção da máxima capacidade adesiva é preciso realizar a técnica de maneira correta, tomando cuidado com o tempo de condicionamento, umidade dentinária e a aplicação correta dos agentes, respeitando o tempo necessário para evaporação dos solventes e penetração do adesivo. Em relação ao comportamento biológico, a pesquisa mostrou que a maioria dos adesivos testados apresenta certo grau de toxicidade, induzindo apoptose ou interferindo no ciclo celular, o que interfere na regeneração dentinária. Foi mostrado também, que apesar de o remanescente dentinário promover uma proteção pulpar, em cavidades profundas, essa proteção não é suficiente para impedir uma penetração dos monômeros residuais. Portanto, achamos necessário nesses casos escolher uma estratégia de proteção do complexo dentina-polpa que permita uma regeneração dos tecidos envolvidos.

O sistema autocondicionante de um passo mostrou os melhores valores de resistência adesiva e não foi tóxico às células. O resultado torna esse tipo de sistema promissor, colocando-o como uma boa alternativa para casos específicos, sobretudo pela facilidade técnica e pela boa resposta biológica dos tecidos. Porém, é importante ressaltar que a efetividade de um material está relacionada à diversas propriedades, sendo necessárias pesquisas laboratoriais que analisem outros aspectos e pesquisas clínicas que possam comprovar a efetividade do sistema em um longo prazo.

7. CONCLUSÕES

Com bases nos resultados obtidos e nas condições de realização da pesquisa, podemos concluir:

- a) o adesivo autocondicionante (Easy-Bond) apresentou os maiores valores de resistência adesiva e não se mostrou tóxico às células;
- b) o adesivo de três passos (Multi-Purpose) apresentou os menores valores de resistência adesiva e uma baixa toxicidade;
- c) o adesivo Single Bond apresentou uma toxicidade moderada;
- d) o sistema autocondicionante SE Plus apresentou toxicidade moderada;
- e) todos os sistemas adesivos mostraram resultados satisfatórios para as duas propriedades estudadas;
- f) o adesivo autocondicionante se mostrou bastante promissor, porém é importante a realização de pesquisas clínicas e investigação de outras propriedades.

8. REFERÊNCIAS*

Abo T, Uno S, Sano H. Comparison of bonding efficacy of an all-in-one adhesive with a self-etching primer system. Eur J Oral Sci. 2004 June; 112(3):286-92.

Aguilar LT, Rezende NPM, Reis A, Loguercio AD, Grande RHM, Ballester RY et al. Tensile bond strength of adhesive systems – effects of primer and thermocycling. Pesq Odontol Bras. 2002 jan./mar.; 16(1):37-42.

Akimoto N, Momoi Y, Kohno A, Suzuki S, Otsiki M, Cox CF. Biocompatibility of clearfil liner bond 2 and clearfil AP-X system on non-exposed and exposed primate teeth. Quint Int. 1998; 29:177-88.

Andrade AP, Russo EMA, Shimaoka AM, Carvalho RCR. Estudo da resistência adesiva de sistemas “*self-etch*” comparados a um sistema “*all-etch*” aplicados ao esmalte e à dentina [abstract Pb216]. Braz Oral Res. 2004 Sept.; 18(suppl.):183.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na

Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Atsumi T, Murata J, Kamiyanagi I, Fujisawa S, Ueha T. Cytotoxicity of photosensitizers camphoroquinone and 9-fluorenone with visible light irradiation on a human submandibular duct cell line in vitro. *Arch Oral Biol.* 1998; 43:73-81.

Banomyong D, Palamara JEA, Burrow MF, Messer HH. Effect of dentin conditioning on dentin permeability and micro-shear bond strength. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115:502-9.

Barkmeier WW, Cooley RL. Laboratory evaluation of adhesive systems. *Oper Dent.* 1992; 17(suppl.5):50-61.

Bouillauet S, Virgillito M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentin bonding systems, *in vitro*. *J Oral Rehabil.* 1998; 25:45-51.

Bowen RL. Properties of silica-reinforced polymer for dental restorations. *J Am Dent Assoc.* 1963 Jan.; 66(1):57-64.

Brackett WW, Ito S, Haish LD, Pashley DH. Microtensile dentin bond strength of self-etching resins: Effect of hydrophobic layer. *Oper Dent.* 2005; 30(6):733-8.

Buonocore MG, Matsui A, Gwinnett AJ. Penetration of resin dental materials into enamel surfaces with reference to bonding. *Arch Oral Biol.* 1968 Jan.; 13(1):61-70.

Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials into enamel surfaces. *J Dent Res.* 1955 Dec.; 34(6):849-53.

Burrow MF, Kitasako Y, Thomas CD, Tagami J. Comparison of Enamel and Dentin Microshear Bond Strengths of a Two-step Self-etching Priming System with Five All-in-One Systems. *Oper Dent.* 2008; 33(4):456-60.

Camps J.; About, I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. *J Endod.* 2003; 29(9):583-6.

Can-Karabulut DC, Tulga Oz F, Karabulut B, Batmaz I, Ilk O. Adhesion to primary and permanent and permanent dentin and a simple model approach. *Europ J Dent* 2009; 3:32-4.

Cardoso PEC, Braga RR, Carrilho MRO. Evaluation of micro-tensile, shear and tensile tests determining the bond strength of three adhesive systems. *Dent Mater.* 1998; 14:394-8.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials *Int Endod J.* 2005 Aug;38(8):505-9.

Çetingüç A, Ölmez S, Vyrat N. HEMA diffusion from dentin bonding agents in Young and old primary molars in vitro. *Dent Mat.* 2007; 23:302-7.

Chang HH, Guo MK, Kasten FH et al. Simulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomater.* 2005; 26:745-53.

Chigira H et al. Self etching dentin primers containing phenyl-P. *J Dent Res.* 1994; mar 73(5):1088-95.

Coelho PG, Calamia C, Harsono M, Thompson VP, Silva NRFA. Laboratory and FEA evaluation of dentin – to – composite bonding as a function adhesive layer thickness. *Dent Mat.* 2008; 24:1297-303.

Costa CAS, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxicity of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line. *Dent Mater.* 1999; 15:434-41.

Council on Dental Materials, Instruments and equipment. Dentin bonding systems: an update. *J Am Dent Assoc.* 1987; 114:91.

Cox CF. Pulp protection and direct capping with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ versus adhesive resin systems: a review of factors leading to failure or success. In: Tagami J, Toledano M, Prati C, editors. *In: advanced adhesive dentistry.* Cirimido Italy: G Erredue; 2000. p. 149-75.

Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater.* 2008; 24:362-71.

Duke ES. Self-Etching adhesives: new science or just a trend? *Comp.* 2002; 23(12):1186-7.

Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil.* 1994; 21:441-52.

Foong J, Lee K, Nguyen C, Tang G, Austin D, Ch'ng C, et al. Comparison of microshear bond strengths of four self-etching bonding systems to enamel using two test methods. *Aust Dent J.* 2006 Sept.; 51(3):252-7.

Fortin D, Swift E, Denehy G, Reinhardt JW. Bond strength and microleakage of current dentin adhesives. *Dent Mater.* 1994, 10:253-68.

Fowler CS, Swartz ML, Moore BK, Rhodes BF. Influence of selected variables on adhesion testing. *Dent Mater.* 1992; 8(4):265-9.

Frankenberger R, Tay FR. Self-etch vs etch-and-rinse adhesives: effect of thermo-mechanical fatigue loading on marginal quality of bonded resin composite restorations. *Dent Mater.* 2005 May; 21(5):397-412.

Fritz UB, Diedrich P, Finger WJ. Self-etching primers – an alternative to the conventional acid etch technique? *J Orofac Orthop.* 2001 May;62(3):238-45.

Fusenig NE. Cell culture models: reliable tools in pharmacotoxicology? In: Fusenig NE, Graf H eds. *Cell culture in pharmaceutical research.* Heidelberg: Springer-Verlag; 1994.

Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective Influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *JOE.* 2005; 31(5):396-9.

Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol.* 1976; 21:355-62.

Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composites combination through dentine in vitro. *J Dent.* 1996; 24:125-8.

Geursten W, Spahl W, Muller K, Leyhausen G. Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemical. *J Biomed Mater Res Appl Biomater.* 1999; 48:772-7.

Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Invest.* 2008; 12:1-8.

Hafez AA, Kopel HM, Cox CF. Pulpotomy reconsidered: application of an adhesive system to pulpotomized permanent primate pulps. *Quint Int.* 2000; 31:579-89.

Hanks CT, Craig RG, Diehl ML, Pashley DH. Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. *J Oral Pathol.* 1988; 17:396-402.

Hannig M, Reinhardt KJ, Bott B. Self-etching primer vs. phosphoric acid: an alternative concept for composite to enamel bonding. *Oper Dent.* 1999 May/June; 24(3):172-80.

Hara AT, Pimenta LAF, Rodrigues AL Junior. Influence of cross-head speed on resin-dentin shear bond strength. *Dent Mater.* 2001 Mar.; 17(2):165-9.

Harnirattisai C, Inokoshi S, Shimada Y, Hosoda H. Adhesive Interface between Resin and etched dentin of cervical erosion/abrasion lesions. *Oper Dent.* 1993; 18:138-43.

Harnirattisai C, Senawongse P, Tagami J. Microtensile Bond strength of two adhesive resins to discolored dentin after amalgam removal. *J Dent Res.* 2007; 86(3):232-6.

Hashieh IA, Cosset A, Franquin JC, Camps J. In Vitro cytotoxicity of one-step dentin bonding systems. *J End.* 1999; 25(2):89-92.

Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, et al. Over-etching effects on micro-tensile bond strength and failure patterns for two dentin bonding systems. *J Dent.* 2002; 30:99-105.

Hashimoto M, Ohno H, Yoshida E, Hori M, Sano H, Kaga M et al. Resin-enamel bonds made with self-etching primers on ground enamel. *Eur J Oral Sci.* 2003 Oct.; 111(5):447-53.

Hayakawa T, Kikutake K, Nemoto K. Influence of self-etching primer treatment on the adhesion of resin composite to polished dentin and enamel. *Dent Mater.* 1998 Mar.; 14(2):99-105.

Helgeland. *In vitro* testing of dental cements. In: *Biocompatibility of dental materials.* CRC Press, Boca Raton. 1982, 201.

Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells in vitro. *Int End J.* 2002; 35:905-909.

Ishikawa A, Shimada Y, Foxton RM, Tagami J. Micro-tensile and micro-shear Bond strengths of current self-etch adhesives to enamel and dentin. *Am J Dent.* 2007; 20(3):161-6.

ISO 7405 – Dentistry: Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2008.

ISO/TC 106/Subcommittee 1. CD TR 11405 – Guidance on Testing adhesion to tooth structure. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Kaaden C, Powers JM, Friedl KH, Schmalz G. Bond strength of selfetching adhesives to dental hard tissues. *Clin Oral Investig.* 2002 Sept.; 6(3):155-60.

Kato G, Nakabayashi N. The durability of adhesion to phosphoric acid etched, wet dentin substrates. *Dent Mater.* 1998; 14:347-52.

Knobloch LA, Gailey D, Azer S, Johnston WM, Clelland N, Kerby RE. Bond strengths of one and two-step self-etch adhesive systems. *J Prost Dent.* 2007; 97(4):216-22.

Knüchel R, Sutherland RM. Cell differentiation and heterogeneity in spheroid culture. In: Bjerkwig R, ed. *Spheroid culture in cancer research.* Boca Raton: CRC Press; 1992.

Koliniotou-Koumpia E, Papadimitriou S, Tziafas D. Pulpal responses after application of current adhesive systems to deep cavities. *Clin Oral Invest.* 2007; 11:313-20.

Koliniotou-Koumpia E, Tziafas D. Pulpal responses following direct pulp capping oh healthy dog teeth with dentine adhesive systems. *J Dent.* 2005; 33:639-47.

Koulaouzidou EA, Helvatioglou-Antoniades M, Palaghias G, Karanika-Kouma A, Antoniades D. Cytotoxicity evaluation of an antibacterial dentin adhesive system on established cell lines. *J Biomed Mater Res.* 2008; 84B:271-6.

Krifka S et al. Bond strength of adhesive systems to dentin and enamel – human vs. bovine primary teeth *in vitro*. *Dent Mat.* 2008; 24(7):888-94.

Kugel G, Habib C, Zammitti S. Enamel and dentin surfaces after treatment with adhesion conditioners using environmental SEM [abstract 2260]. *J Dent Res.* 1993; 72(sp.iss.):386.

Langeland K. Correlation of screening tests to usage tests. *J Endodon.* 1978; 4(10):300-3.

Li HP, Burrow MF, Tyas MJ. The effect of long term storage on nanoleakage. *Oper Dent.* 2001 Nov./Dec.; 26(6):609-16.

Lopes GC, Baratieri LN, Andrada MAC, Vieira LCC. Dental adhesion: present state of the art and future perspectives. *Quintessence Int.* 2002 Mar.; 33(3):213-24.

Mantelini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res.* 2003; 82(8):592-6.

Mc Donough WG et al. A microshear test to measure bond strengths of dentin-polymer interfaces. *Biomater.* 2002; 23(17):3603-8.

McCulloch AJ, Smith BGN. *In vitro* studies of cusp reinforcement with adhesive restorative material. *Br Dent J.* 1986 Dec; 161:450-2.

Meryon SD, Brook AM. *In vitro* cytotoxicity of three dentine bonding agents. *J Dent.* 1989, 17: 279-85.

Meryon SD. The model cavity method incorporating dentine. *Int J Endodon*. 1988; 21:79-85.

Miyazaki M, Hirohata N, Takagaki K, Onose H, Moore K. Influence of self etching primer drying time on enamel bond strength of resin composites. *J Dent*. 1999 Mar.; 27(3):203-7.

Miyazaki M, Hirohata N, Takagaki K, Onose H, Moore K. Influence of self-etching primer drying time on enamel bond strength of resin composites. *J Dent*. 1999 Mar.; 27(3):203-7.

Montes MAJR, de Goes MF, Sinhoreti MAC. The In Vitro morphological effects of some current pré-treatments on dentin surface: a SEM evaluation. *Oper Dent*. 2005; 30(2):201-12.

Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*. 1982 May; 16(3):265-73.

Nakamichi M, Ikawu M, Fusayama T. Bovine teeth as a possible substitute in the adhesion test. *J Dent Res*. 1983; 62:1076-81.

Øilo G. Bond strength testing: what does it mean? *Int Dent J*. 1993 Oct.; 43(5):492-8.

Pascon, E. A.; Sousa, C. J. A.; Langeland, K. Biocompatibilidade de materiais endodônticos. Citotoxicidade da resina poliuretana derivada do óleo de mamona: Parte 1. *Rev ABO Nac*, 2000; 8(4):238-50.

Pashley DH. Interactions of dental materials with dentin. *Trans Acad Dent Mater*. 1990; 3:55-73.

Pashley EL, Zhang Y, Lockwood PE, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effects of HEMA on water evaporation from water-HEMA mixtures. *Dent Mat*. 1998; 14:6-10.

Perdigão J, Frankenberger R, Rosa BT, Breschi L. New trends in dentin/enamel adhesion. *Am J Dent.* 2000; 13:25D-30D.

Perdigão J, Gomes G, Gondo R, Fundingsland JW. In vitro bonding performance of all-in-one adhesives. Part 1- microtensile bond strengths. *J Adhe Dent.* 2006; 8(6):367-73.

Perdigão J. Dentin bonding as a function of dentin structure. *Dent Clin N Am.* 2002; 46:277-301.

Porto ICCM et al. *In vitro* potencial cytotoxicity of an adhesive system to alveolar macrophages. *Braz Dent J.* 2009; 20(3):195-200.

Rakish DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effects of dentin bonding agents on macrophage mitochondrial activity. *J Endodon.* 1998; 24:528-33.

Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res.* 1995; 74:1602-6.

Reifeis PE, Cochran MA, Moore BK. An in vitro shear bond strength study of enamel/dentin bonding systems on enamel. *Oper Dent.* 1995; 20:174-9.

Reis-Silva A. Espectro de umidade da superfície dentinária para três sistemas adesivos com diferentes solventes [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2002.

Ritter AV, Heymann HO, Swift Jr EJ, Studervant JR, Wilde Jr AD. Clinical evaluation of an all-in-one adhesive in non-cariou cervical lesions with different degrees of dentin sclerosis. *Oper Dent.* 2008, 33(4): 370-8.

Rodrigues Filho LE, Lodovici E. Entendendo a utilização de um sistema adesivo autocondicionante. *Rev da APCD.* 2003; 57(1):53 – 7.

Roh BD, Chung JH. Micro-shear Bond strength of five resin-based composites to dentin with five different dentin adhesives. *Am J Dent.* 2005; 18:333-7.

Rueggeberg FA. Substrate for adhesion testing to tooth structure – review of the literature. *Dent Mater.* 1991 Jan.; 7(1):2-10.

Saboia VPA, Nato F, Mazzoni A, et al. Adhesion of a Two-step etch-and-rinse adhesive on collagen-depleted dentin. *J Adhes Dent.* 2008; 10:419-22.

Sadr A, Ghasemi A, Shimada Y, Tagami J. Effects of storage time and temperature on the properties of two self-etching systems. *J Dent.* 2007 Mar.; 35(3):218-25.

Sano H et al. Clinical considerations of dentin adhesion. *Med Inc.* 1998; 1-13.

Sasakawa W, Nakaoki Y, Nagano F, et al. Micro-shear Bond strength of five single-step adhesives to dentin. *Dent Mat J.* 2005; 24(4):617-27.

Scelza, M. F. et al. Cytotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: an in vitro analysis. *J Endod.* 2001; 27:741-3.

Schilke R, Bauss O, Lisson JA, Schuckar M, Geurtsen W. Bovine dentin as a substitute for human dentin in shear bond strength measurements. *Am J Dent.* 1999; 12:92-6.

Schmalz G, Garhammer P, Schweikl H. A Commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J Endodon.* 1996; 22(5): 249-52.

Schmalz G, Shuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test *in vitro*. *J Endod.* 2002; 28(3):188-92.

Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metz C. Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *J Endodon.* 2001; 27:259-65.

Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, *et al.* Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater.* 2007; 23(6):688-95.

Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res.* 2006; 85(10):870-7.

Shabka AA, Khalaf MM. An investigation on the shear bond strength of one dentin adhesive at two different dentin depths. *Egypt Dent J.* 1995; 41:1031-4.

Shams SH. The influence of depth of substrate dentin surface and thickness of the current restorative samples on bond strength. *Egypt Dent J.* 1995; 41:1513-6.

Shimada Y, Yamaguchi S, Tagami J. Micro-shear bond strength of dual-cured resin cement to glass ceramics. *Dent Mater.* 2002 July; 18(5):380-8.

Sigusch BW, Pflaum T, Völpel A, Schinkel M, Jandt KD. The influence of various light curing units on the cytotoxicity of dental adhesives. *Dent Mater.* 2009; 25:1446-52.

Silva GAB, Lanza LD, Lopes-Júnior N, Moreira A, Alves JB. Direct pulp capping with dentin bonding system in human teeth: a clinical and histological evaluation. *Oper Dent.* 2006; 31:297-308.

Silverstone LM, Saxton CA, Dogon IL, Fejerskov O. Variation in the pattern of acid etching of human dental enamel examined by scanning electron microscopy. *Caries Res.* 1975; 9(5):373-87.

Söderholm KJ. Correlation of in vivo and in vitro performance of adhesive restorative materials: a report of the ASC MD 156 Task Group on test methods for the adhesion of restorative materials. *Dent Mater.* 1991; 7(2): 74-88.

Souza, NJA. et al. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *Int Endod.* 2006; 39:40–7.

Spagnuolo G, Annunziata M, Rengo S. Cytotoxicity and oxidative stress caused by dental adhesive systems cured with halogen and LED lights. *Clin Oral Invest.* 2004; 8:81-5.

Spangberg LSW. Correlation of in vivo and in vitro screening tests. *J Endodon.* 1978; 4(10):296-9.

Stanley HR. Guest editorial: an urgent plea for standardized bonding adhesion test. *J Dent Res.* 1993 Oct.; 72(10):1362-3.

Swift Ej, Perdigão J, Heymann HO. Bonding to enamel and dentin: A history of the art. *Quint Int.* 1995; 26:95-110.

Szep S, Kunkel A, Ronge K, Heidemann D. Cytotoxicity of modern dentin adhesives – in vitro testing on gingival fibroblasts. *J Biomed Mat Res Appl Biomater.* 2002; 63:53-60.

Tagami J, Tao L, Pashley DH. Correlation among dentin depth, permeability, and bond strength of adhesive resins. *Dent Mater.* 1990; 6: 45-50.

Tay FR et al. The overwet phenomenon: a scanning electron microscopic study of surface moisture in the acid-conditioned, resin-dentin interface. *Am J Dent.* 1996 June; 9(3):109-13.

Teixeira HM, Do Nascimento ABL, Hebling J, De Souza CA. In vivo evaluation of the biocompatibility of three current bonding agents. *J Oral Rehabil.* 2006; 33:542-50.

Toba S, Veerapavati W, Shimada Y, Nikaido T, Tagami J. Micro-shear Bond strengths of adhesive resins to coronal dentin versus the floor of the pulp chamber. *Am J Dent.* 2003; 16:51A-56A.

Toledano M, Osorio R, De Leonardi G, Rosales-Leal JI, Ceballos L, Cabrerizo-Vilchez MA. Influence of self-etching primer on the resin adhesion to enamel and dentin. *Am J Dent.* 2001 Aug.; 14(4):205-10.

Torii Y, Itou K, Nishitani Y, Yoshiyama M, Ishikawa K, Suzuki K. Effect of self-etching primer containing N-acryloyl aspartic acid on enamel adhesion. *Dent Mater.* 2003 June; 19(4):253-8.

Ulker H, Sengun A. Cytotoxicity evaluation of self adhesive composite resin cements by dentin barrier test on 3D pulp cells. *Eur J Dent.* 2009; 3: 120-6.

Vajrabhaya L, Korsuwannawong S, Bosl C, Schmalz G. The cytotoxicity of self-etching primer bonding agents in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107:e86-e90.

Van der Vyver PJ, De Wet FA, Ferreira MR. The effect of the depth of dentin on shear bond strength of adhesive resins. *J Dent Assoc South Afr.* 1996; 51:583-5.

Van Meerbeek B, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt KL, Lambrechts P, Peumans M. A randomized controlled study evaluating the effectiveness of a two-step self-etch adhesive with and without selective phosphoric-acid etching of enamel. *Dent Mater.* 2005 Apr.; 21(4):375-83.

Van Meerbeek B, Perdigão J, Lambrechts P, Vanherle G. The clinical performance of adhesives. *J Dent.* 1998 Jan.; 26(1):1-20.

Van Noort R, Noroozi S, Howard IC, Cardew G. A critique of bond strength measurements. *J Dent.* 1989; 17:61-7.

Wang FM, Qiu K, Hu T, Wan CX, Zhou XD, Gutmann JL. Biodegradable porous calcium polyphosphate scaffolds for the threedimensional culture of dental pulp cells. *Int End J.* 2006; 39:477-83.

Wang Y, Spencer P, Yao X, Brenda B. Effect of solvent content on resin hybridization in wet dentin bonding. *J Biomed Mat Res.* 2007;82:975-83.

Watanabe I, Nakabayashi N, Pashley DH. Bonding to ground dentin by a Phenyl-P self-etching primer. *J Dent Res.* 1994 June; 73(6):1212-20.

Watanabe I, Nakabayashi N. Bonding durability of photocured Phenyl-P in TEGDMA to smear layer-retained bovine dentin. *Quintessence Int.* 1993 May; 24(5):335-42.

Weerasinghe DS, Nikaido T, Wettasinghe KA, Abayakoon JB, Tagami J. Micro-shear bond strength and morphological analysis of a self-etching primer adhesive system to fluorosed enamel. *J Dent.* 2005 May; 33(5): 419-26.

Wiegand A, Caspar C, Becker K, Werner C, Attin T. In-vitro-Untersuchung zur Zytotoxizität von Self-Etch-Adhäsivsystemen. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2006; 116:614-21.

Yap AUJ, Cheang PHN, Chay PL. Mechanical properties of two restorative reinforced glass-ionomer cements. *J Oral Rehabil.* 2002; 29: 682-8.

Yoshiyama M, Carvalho R, Sano H, Horner J, Brewer PD, Pashley DH. Interfacial morphology and strength of bonds made to superficial versus deep dentin. *Am Dent J.* 1995; 8:297-302.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabelas referentes aos valores de resistência adesiva (Mpa) dos testes de microcisalhamento.

Tabela 8. Valores de resistência adesiva dos materiais estudados no teste de microcisalhamento com espessura de dentina de 200 µm.

CDP	Multi-Purpose	Single-Bond	SE Plus	Easy Bond
1	7,33	18,3	7,63	12,20
2	16,26	12,68	14,73	14,31
3	19,49	21,81	10,41	39,20
4	16,85	17,08	28,87	11,83
5	9,38	11,48	21,54	37,5
6	13,40	29,98	12,26	25,64
7	18,34	8,33	8,33	24,56
8	21,45	9,43	23,89	12,31
9	17,34	9,12	26,43	18,96
10	12,56	18,24	28,30	14,13

Tabela 9. Valores de resistência adesiva dos materiais estudados no teste de microcisalhamento com espessura de dentina de 500 μm .

CDP	Multi-Purpose	Single-Bond	SE Plus	Easy Bond
1	20,32	14,44	22,35	24,47
2	20,64	21,55	14,05	15,57
3	15,83	25,00	9,46	31,75
4	17,06	26,93	20,75	29,25
5	7,86	27,23	31,78	21,29
6	27,36	24,81	23,38	33,60
7	4,92	16,11	14,88	30,35
8	22,34	29,59	24,90	23,38
9	25,49	21,38	21,12	43,93
10	18,12	27,48	18,09	16,60

APÊNDICE B – Tabelas referentes aos valores de densidade ótica dos 6 testes de barreira dentinária.

Tabela 10. Valores de densidade ótica dos materiais estudados no teste de barreira dentinário numero 1 (200 μm).

Material/câmara de difusão	1	2	3	4	5
President	0,80	0,85	0,74	0,89	0,93
CaGPG14	0,36	0,07	0,09	0,07	0,05
Multi Purpose	0,79	0,78	0,72	0,72	0,48
Single Bond	0,68	0,52	0,62	0,60	0,46

Tabela 11. Valores de densidade ótica dos materiais estudados no teste de barreira dentinário numero 2 (200 μm).

Material/câmara de difusão	1	2	3	4	5
President	0,80	1,02	1,00	0,89	0,56
SE Plus	0,79	0,78	0,41	0,83	0,84
Easy Bond	1,02	0,92	0,79	1,01	0,85
Single Bond	0,72	0,65	0,71	0,58	0,78

Tabela 12. Valores de densidade ótica dos materiais estudados no teste de barreira dentinário numero 3 (200 μm).

Material/câmara de difusão	1	2	3	4	5
President	0,76	0,90	1,04	0,77	1,01
CaGPG14	0,06	0,08	0,58	0,53	0,17
Easy Bond	0,99	0,92	0,90	0,93	0,92
SE Plus	0,53	0,75	0,74	0,95	0,77
Multi Purpose	1,00	0,95	0,92	0,76	0,87

Tabela 13. Valores de densidade ótica dos materiais estudados no teste de barreira dentinário numero 4 (500 μm).

Material/câmara de difusão	1	2	3	4	5
President	0,92	0,91	0,95	0,90	0,92
CaGPG14	0,36	0,37	0,18	0,43	0,09
Multi Purpose	0,78	0,66	0,64	0,66	0,70
Single Bond	0,56	0,73	0,54	0,62	0,49
SE Plus	0,61	0,60	0,60	0,60	0,70

Tabela 14. Valores de densidade ótica dos materiais estudados no teste de barreira dentinário numero 5 (500 μm).

Material/câmara de difusão	1	2	3	4	5
President	0,95	0,89	1,04	0,82	0,79
Easy Bond	1,05	1,04	1,12	1,11	1,08
Single Bond	0,85	0,58	0,27	0,67	0,78
Multi Purpose	0,99	1,01	1,14	1,08	0,91

Tabela 15. Valores de densidade ótica dos materiais estudados no teste de barreira dentinário numero 6 (500 μm).

Material/câmara de difusão	1	2	3	4	5
President	0,90	0,69	0,82	0,71	0,82
CaGPG14	0,35	0,44	0,45	0,28	0,43
Easy Bond	0,59	0,73	0,71	0,85	0,61
SE Plus	0,85	0,62	0,79	0,57	0,84

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa – Local.

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Diniz
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax (12) 3947-9010 / ajgotti@fosjo.unesp.br / Guadon@fosjo.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **09/2009-PA/CEP**, sobre **“Resistência à união de diferentes sistemas dentinários autocondicionantes à dentina que sofreu erosão ácida e caracterização biológica de seus componentes)”** sob responsabilidade de **JOÃO MAURÍCIO FERRAZ DA SILVA**, tendo como orientador o Prof.Dr. José Roberto Rodrigues, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 11 de março de 2009

Profa. Dra. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO
Coordenadora

Silva JMF. Bond strength and citotoxicity "in vitro" of diferent generations of dentin adhesives. [tesis]. São José dos Campos: School of dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2010.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate four different adhesive systems (Multi-Purpose, Single Bond, SE Bond Plus and Easy - 3M ESPE) with regard to microshear bond strength to bovine dentin. In addition evaluate the cytotoxicity of these new adhesive systems by means of a dentin barrier test. To test microshear 80 bovine teeth had their roots sectioned and were embedded in acrylic resin. The buccal surface had been worn to expose the dentin, in 40 teeth the remaining dentin thickness was 500µm and 200µm in the other 40. The specimes received the adhesive procedure according to the manufacturer's instructions and with the aid of a metal matrix, cylinders of resin (Z 250 - 3M ESPE) from 0.8 mm in diameter and 1mm in height were built. After 24h the specimes were then subjected to the microshear testing To evaluate the cytotoxicity, a dentin barrier test was used. SV3NeoB transfected bovine pulp derived cells were grown on nylon meshes for 2 weeks achieving a 3-dimensional cell culture as described. These cell cultures were separated from the test materials by dentin slices of 200 or 500µm thickness in a cell cultures perfusion chamber. The materials were applied into the cavity part of the device according to manufacturer's instruction, and a silicon impression material (President, Coltene) served as a negative control material (100% cell viability). After a 24h exposure period, cell viability was measured photometrically (MTT test). Median values (plus 25% and 75% percentiles) of cell viability measurements (n=10) were statistically analyzed (Mann-Whitney test, $\alpha= 0.05$). Descriptive statistics

found that the best bonding performance was presented by the single step adhesive Easy Bond (21.06 - 200µm, 27.01 - 500µm) followed by Single Bond (15.64 - 200µm; 23.45 - 500µm), SE Plus (18.23 - 200µm; 20.07 - 500µm) and Multi Purpose (15.24 - 200µm; 17.99 - 500µm). Moreover, it was found that all the adhesive strength was greater in specimens with dentin thickness of 500µm. Although the averages verify these differences, the Tukey test (5%) showed no statistical difference between adhesives when compared in the same dentin thickness. Regarding the cytotoxicity Multi Purpose slightly reduced the cell viability to 92.5% (200µm) and 93.7% (500µm) . Single Bond was moderately cytotoxic because it reduced cell viability to 71.1% (200µm) and 64.6% (500µm). The self-etching adhesive Scotchbond SE decreased cell viability to 85% (200µm) and 71% (500µm), and was considered moderately cytotoxic. In contrast, Easy Bond did not reduce cell viability in this test regardless of the dentin thickness. We conclude that all four generations of adhesives tested have good adhesion to dentin in deep cavities, and possibly the more complex technique of the total etching adhesives interfered with the bond quality of these products. As Two of the four studied adhesives showed some cytotoxicity and this may suggest in deep cavities pulp protection e.g. by a calciumhydroxide preparation applied on dentin close to the pulp.

Key Words: Dentin adhesives. Bond strength. Cytotoxicity.