



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

LUCÉLIA LEMES GONÇALVES

**SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL: análise da interface adesiva
e degradação colagenolítica em dentina submetida à diferentes
protocolos de condicionamento ácido**

2018

LUCÉLIA LEMES GONÇALVES

**SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL: análise da interface adesiva e
degradação colagenolítica em dentina submetida à diferentes protocolos
de condicionamento ácido**

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

Área: Dentística. Linha de Pesquisa: Avaliação clínica e laboratorial de alterações da estrutura dental, de materiais e de técnicas de prevenção e tratamento em dentística.

Orientador: Prof. Tit. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves

São José dos Campos

2018

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

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

Gonçalves, Lucélia Lemes

Sistema adesivo universal: análise da interface adesiva e degradação colagenolítica em dentina submetida à diferentes protocolos de condicionamento ácido / Lucélia Lemes Gonçalves. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
117 f. : il.

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

Orientador: Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves.

1. Dentina. 2. Metaloproteinases da matriz. 3. Colágeno. 4. Catepsina K. 5. Resistência à tração. I. Gonçalves, Sérgio Eduardo de Paiva, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves (Orientador)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Profa. Assist. Taciana Marco Ferraz Caneppele

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Eduardo Bresciani

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Flávio Henrique Baggio Aguiar

Universidade Estadual de Campinas-Unicamp
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Campus de Piracicaba

Prof. Assoc. Eduardo Moreira da Silva

Universidade Federal Fluminense-UFF
Faculdade de Odontologia
Campus de Niterói

São José dos Campos, 03 de Dezembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho Àquele a quem atribuo o título de primeiro cientista do universo: **Deus.**

Não existem palavras que sejam suficientes para te louvar.
Resta a mim engrandecer o Teu nome, tornar os Teus feitos conhecidos e mostrar ao mundo Tua Grandeza.

Graças te dou Senhor!

Graças pela vida, pela família e amigos!

Graças pelo sustento diário e pelas misericórdias sem fim!

Graças por cada oportunidade a mim ofertada!

Graças pelos bons dias e também pelos maus!

Graças te dou Senhor por ter realizado algo tão maravilhoso em minha vida, sem Ti nada do que foi feito se faria!

“Deus da criação

Presente desde o início

Antes mesmo do Tempo existir

Sem nenhum ponto de referência

Falou à escuridão e a luz surgiu

Através das Suas palavras cem bilhões de galáxias passaram a existir

No vapor da Sua respiração os planetas se formaram

E se as estrelas foram feitas para te adorar

Eu também o farei!

Posso ver seu coração em tudo o que o Senhor fez

Cada estrela é um sinal da sua Graça

E se a criação canta a Ti louvores,

Eu também cantarei!”

(So will I – Hillsong)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais **Creusa e Carmelino**, deixo o meu sincero agradecimento. Não apenas pelo apoio durante o curso, mas por toda uma vida. Obrigada por cada noite sem dormir, por cada dia de trabalho, pelas repreensões e também pelo incentivo. Obrigada, por todo esforço e sacrifícios pessoais que fizeram em meu favor. Eu não poderia ter pais melhores do que vocês, meus tesouros!

Ao meu orientador **Prof. Tit. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves**, gratidão é a palavra. *Chefe*, muito obrigada pelos últimos sete anos de convívio. Obrigada pelos ensinamentos, pelos incentivos e por cada porta aberta. Obrigada por ter me recebido de braços abertos, por toda a sua paciência e também por ter se feito amigo. Esses anos foram preciosos, não apenas pelo ganho científico, mas também porque o senhor me ajudou a crescer como pessoa. Sou grata a Deus, por ter cruzado os nossos caminhos, pois através da sua vida eu tenho sido muito abençoada, você é um exemplo. Eu sou e SEMPRE serei grata a você, pois reconheço que essa conquista é NOSSA.

À minha orientadora do doutorado-sanduíche **Profa. Dra. Anuradha Prakki**, expresso aqui o meu terno agradecimento. *Anu*, muito obrigada por ter me recebido não apenas no mundo científico, mas também em sua vida. Você é muito mais do que uma orientadora, é uma amiga. Obrigada pelos ensinamentos, oportunidades, incentivos, conselhos, cafés, risadas e apoio, não somente durante o tempo que estive no Canadá, mas que continua ainda hoje. Você marcou a minha vida de um modo muito especial. Obrigada por ser um instrumento de Deus para me ajudar alcançar essa vitória!

*To my Host Mothers **Judy and Elmira**, my special thanks! You were my family in Canada and supported me during my studies. Thanks a lot for had me in your house and hearts! I still miss you every day. I'll always be thankful! Love you!!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão **Leandro**, meu primeiro amigo e único irmão. Você sempre foi e será uma das pessoas mais importantes da minha vida. Obrigada pelo privilégio de ser Tia e conhecer um dos amores mais bonitos da vida!

Ao meu namorado **Rafael**, obrigada pelo carinho, paciência e incentivo durante a execução desse projeto. Seu apoio foi essencial. Te amo!

À minha prima **Regislaine**, melhor amiga. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos da Pós-graduação, agradeço a todos. Graças a Deus durante esses anos, tivemos uma convivência agradável. Não cito nomes, pois são muitos. Assim, a todos vocês deixo meu agradecimento por terem feito os dias de trabalho mais alegres, pelo apoio, troca de conhecimento e também por terem marcado minha história.

À **Família Gonçalves**, obrigada! Somos tantos, alguns já se foram e outros estão chegando, por isso expresse aqui minha gratidão pela oportunidade de ter trabalhado com um grupo unido e generoso. Nós realmente trabalhamos pelo bem da equipe. Continuemos assim!

Aos meus queridos amigos da “República dos Loucos” **Tânia, Rose, Beatriz, Rodnei, Patrícia e Felipe**, entre lutas e vitórias, concordâncias e discordâncias, continuamos unidos pelo desejo de compartilhar a vida. Muito obrigada pela amizade! Amo vocês!

À minha querida amiga **Tânia**, muito obrigada por sua amizade sincera e por ter me apoiado durante todo o período da pós-graduação. Agradeço especialmente, pelo suporte que me deu durante a execução desse projeto. Nossa amizade ultrapassou as paredes da universidade e a cada dia se fortalece. Longe ou perto, é bom saber que você é uma pessoa com quem sempre posso contar. Obrigada amiga, você é Mara!

Às minhas queridas amigas **Daniele, Rayssa, Laura e Ana Júlia**, presentes da pós-graduação, obrigada por me acompanharem nessa jornada. Passamos por muita coisa juntas. Valeu a pena!

À minha amiga **Janaína Bortolatto**, muito obrigada por tudo o que fez por mim durante minha estadia em Toronto. Você é um presente de Deus! Espero poder retribuir pelo menos um pouquinho da sua generosidade.

Às queridas amigas **Graziela, Denise, Karina e Liliane**, também agradeço, pois, presença de vocês me ajudou muito durante o tempo que estive em Toronto longe da minha família.

*To my colleagues **Terry and Arwa**, thanks a lot for all your help and patience during my research. You were so kind! I hope to see you again! I deserve all the best to you guys!*

Aos Professores **Eduardo e Taciana**, pelo convívio não somente na pós-graduação, mas também na Revista BDS e nos “cafés da vida”. Vocês são pessoas especiais, amigas e sempre dispostas a ajudar! Obrigada por terem aceitado fazer parte desse momento especial e muito mais por contribuírem para o meu crescimento como profissional e pessoal. Obrigada pelos conselhos e ensinamentos. Você tem a minha admiração. Sentirei saudades!

Aos professores **Carlos, Filomena e Alessandra**, agradeço pelos ensinamentos, pelo convívio e por cada oportunidade a mim ofertada.

Ao Prof. **César Pucci**, agradeço por generosamente ter cedido alguns materiais para realização desse trabalho. Também sou grata pelo apoio e amizade durante todo o período de pós-graduação. Obrigada por ser importar!

Às Funcionárias do Departamento de Dentística **Fernanda, Josiana e Liliane**, muito obrigada! Vocês são peças fundamentais para o nosso desenvolvimento, permitindo que possamos realizar nossos trabalhos adequadamente. Obrigada por toda a ajuda!

Aos Funcionários da Secretaria de Pós-Graduação **Bruno, Carolina e Sandra**, obrigada por serem sempre solícitos. O trabalho de vocês é essencial!

Aos Funcionários da Limpeza, Manutenção e Portaria, também agradeço a cada um, pois após 13 anos dentro da universidade reconheço que a gratidão não é apenas pelo trabalho bem executado, mas também pelo carinho e amizade aqui desenvolvidos.

Agradeço à **Empresa 3M do Canadá**, por ter concedido materiais para essa pesquisa.

À **CAPES**, agradeço pelo concessão da Bolsa de Mestrado, Doutorado e Doutorado-Sanduíche.

"Pela fé entendemos que os mundos pela palavra de Deus foram criados; de maneira que aquilo que se vê não foi feito do que é aparente."

Hebreus 11:3

*Only one life, 'twill soon be past
Only what's done for Christ will last.
(autor desconhecido)*

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Substrato dentinário – Composição, morfologia e interações	19
2.1.1 Dentina	19
2.1.2 A matriz extracelular dentinária e o colágeno Tipo I.....	20
2.1.3 Metaloproteinases da matriz extracelular e Cisteíno-catepsinas	22
2.2 Adesão ao substrato dentinário.....	26
2.3 Metodologias para análise dos componentes da interface adesiva.....	32
2.3.1 Análise por Espectroscopia Transformada de Fourier	33
2.3.2 Ensaio do tipo ELISA	34
2.3.2 Análise da resistência adesiva por ensaio de microtração	36
2.3.3 Análises micromorfológicas da interface adesiva por MEV	37
3 PROPOSIÇÃO	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Comitê de ética.....	41
4.2 Delineamento experimental.....	41
4.3 Divisão dos grupos.....	40
4.4 Primeira etapa – Caracterização química do substrato dentinário	45
4.5 Preparo das amostras, testes e análises da segunda etapa do estudo.....	46
4.5.1 Preparo das amostras.....	46
4.5.2 Protocolo de condicionamento do colágeno	49

4.5.3 Análises de concentração de proteína total e telopeptídeos solubilizados	49
4.5.4 Teste de resistência à tração.....	51
4.6 Preparo das amostras, testes e análises da terceira etapa do estudo	53
4.6.1 Preparo das amostras.....	53
4.6.2 Procedimento restaurador.....	54
4.6.3 Teste de resistência à microtração.....	56
4.6.4 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	59
4.6.5 Análise de nanoinfiltração por MEV.....	60
4.7 Planejamento estatístico	61
4.7.1 Análise estatística da segunda etapa.....	61
4.7.2 Análise estatística da terceira etapa	61
5 RESULTADOS	63
5.1 Primeira etapa – Caracterização química do substrato dentinário por espectroscopia FTIR.....	63
5.2 Segunda etapa – Análise da degradação colagenolítica.....	67
5.2.1 Análise da concentração de proteínas, telopeptídeos solubilizados e resistência à tração	67
5.3 Terceira etapa – Análise da interface adesiva	70
5.3.1 Análise da resistência de união por meio do teste de microtração e fractografia.....	70
5.3.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	74
5.3.3 Análise de nanoinfiltração por MEV.....	76
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	96
ANEXO.....	114

Gonçalves LL. Sistema adesivo universal: análise da interface adesiva e degradação colagenolítica em dentina submetida à diferentes protocolos de condicionamento ácido. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi analisar a interface adesiva do sistema adesivo Single Bond Universal (SBU) em dentina submetida à diferentes protocolos de condicionamento ácido em 24 h e 12 meses. E a degradação colagenolítica (DC) mediada por metaloproteinases (MMPs) e Catepsina-K (CAT-K) em tempo imediato. Esse estudo foi conduzido em 3 etapas: 1) Caracterização química da dentina em FTIR; 2) DC por meio de fragmentos do Teleopeptídeo Carboxiterminal do Colágeno Tipo I (ICTP) e do Terminal C do Teleopeptídeo ligado ao Colágeno Tipo I (CTX) e a resistência à tração (RT) da do colágeno; 3) Análise da interface adesiva através da resistência de união (RU), análise de fratura, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e nanoinfiltração (NI). Para FTIR foram utilizados 6 discos de dentina, divididos em 2 grupos: 1) Ácido fosfórico 32 % 15 s (AF), 2) Ácido poliacrílico 25 % 10 s (AP). Para análise da DC, 12 discos de dentina foram completamente desmineralizados e divididos em 3 grupos: 1) AF, 2) AP e 3) Água deionizada (Controle) 15 s. Após, foram incubados e armazenados por 1 semana. Seguindo-se a análise da concentração de proteína total (PT). 50 µl da solução de incubação foram utilizadas para analisar ICTP e CTX. As concentrações foram calculadas em relação à PT. Para RT, foram testados 36 palitos obtidos dos discos de colágeno. Para RU foram utilizados 48 dentes, divididos em 2 grupos, de acordo com o período de armazenamento, divididos em três subgrupos: 1) AF, 2) AP e 3) Autocondicionante SBU 20 s (SE). Os dentes foram restaurados e armazenados em água destilada 37 °C. Após, foram submetidos ao teste de microtração e análise de fraturas. Para as análises MEV e NI foram utilizados 2 espécimes de cada subgrupo. Para análise estatística utilizou-se ANOVA 1-Fator, ANOVA- 2 Fatores e teste de Tukey ($\alpha=0.05$). Para FTIR, AF reduziu a quantidade de fosfato e carbonato quando comparado ao AP. Para DC, a liberação de $ICTP_{PT}$ para AF foi significativamente maior do que para AP ($p < 0,05$). Não houve diferença na liberação de CTX_{PT} para AF e AP ($p > 0,05$). Para RT não houve diferença entre AP e Controle, porém, apresentaram valores maiores do que AF ($p<0,05$). Para RU em MPa, não houve diferença estatisticamente significativa para todos os tratamentos nos diferentes períodos de análise ($p < 0,05$). A análise de fraturas evidenciou a predominância de fraturas adesivas e mistas. MEV mostrou melhor qualidade da interface após 12 meses para AF e AP. Após

12 meses apenas SE não apresentou NI. Assim sendo, o autocondicionamento ainda parece ser a melhor opção para sistemas adesivos universais que possuam monômeros funcionais em sua composição.

Palavras-chave: Dentina. Metaloproteinases da matriz. Colágeno. Catepsina K. Resistência à tração.

Gonçalves LL. *Universal adhesive system: analysis of adhesive interface and collagenolytic degradation of demineralized dentin submitted to different acid etching protocols [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.*

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the adhesive interface of the Single Bond Universal (SBU) to dentin submitted to different acid etching protocols in 24 h and 12 months, and the collagenolytic degradation (CD) by matrix metalloproteinases (MMPs) and Cathepsin-K (CAT-K) in the immediate time. This study was divided into three stages: 1) Dentin chemical characterization by FTIR; 2) CD by release of the collagen telopeptide fragment cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP), and C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen (CTX) and ultimate tensile strength (UTS); 3) Analysis of the adhesive interface by microtensile bond strength (μ TBS), failure mode, scanning electron microscopy (SEM) of the AI, and nanoleakage by SEM (NL). For FTIR, six dentin disks were divided into two groups: 1) Phosphoric acid 15 s (PA), 2) Polyacrylic acid 10 s (PAA). For CD twelve dentin disks were completely demineralized, then were divided into 3 groups 1) PA, 2) PAA, and 3) deionized water (Control) for 15 s. All disks were incubated in a buffered solution (BS) for 1 week. Total protein (TP) concentrations were measured using Nanodrop™ at 280 nm. 50 μ l of BS was used to analyze solubilized telopeptide fragments using ICTP and CTX. ICTP and CTX average ratios were calculated in relation to TP concentration (ICTPtp and CTXtp). For UTS, 36 dentin beams obtained from collagen disks were tested. For μ TBS, forty-eight teeth were divided into two groups according to the period of storage, then subdivided into three subgroups: 1) PA, 2) PAA, and 3) Self-etch 20 s (SE). After, composite build up, the specimens were stored in distilled water at 37 °C. Two specimens of each group were used for SEM analysis of AI and NL. Data were analyzed by one-way ANOVA, two-way ANOVA and Tukey tests ($p < 0.05$). According to the results of the FTIR etching with PA reduced the amount of phosphate and carbonate when compared to PAA. ICTPtp release of PA was significantly higher^A than PAA ($p > 0,05$). CTXtp showed no difference between the PA and PAA ($p < 0,05$). For UTS there was no difference between PAA and control, but they were significantly higher ($p < 0.05$) than PA. For μ TBS in MPa, there is no statistical difference among all the etching protocols tested, as well in both storage periods of analysis ($p < 0,05$). The most prevalent failure mode were adhesives associated with mixed. SEM analysis highlighted a better quality of AI after 12 months for PA and PAA. However, after 12 months

only SE did not show NL. Then, the self-etching protocol seems to be a better choice regarding universal adhesive systems which have functional monomers in their blend.

Keywords: Dentin. Matrix metalloproteinases. Cathepsin K. Phosphoric acid. Polyacrylic acid.

1 INTRODUÇÃO

O principal problema relacionado à adesão em dentina é a limitada longevidade dos resultados clínicos obtidos (De Munck et al., 2005). Apesar dos avanços científicos ocorridos nas últimas décadas, esse tópico ainda representa um grande desafio devido à heterogeneidade do substrato dentinário (Perdigão, 2010; Spencer et al., 2012).

Os pesquisadores tem se concentrado em elucidar os mecanismos relacionados à degradação desse substrato, a fim de desenvolver materiais que a previnam e, conseqüentemente, influenciem positivamente o desempenho adesivo longitudinal (Liu et al., 2011; Tian et al., 2015).

De um modo geral, a adesão à dentina se dá essencialmente por sua desmineralização superficial, de forma completa ou parcial, que seja pelo condicionamento ácido total ou pela ação autocondicionante, seguida da infiltração dos monômeros resinosos nas porosidades criadas por esses modelos de condicionamento na matriz de colágeno exposta (Tjäderhane et al., 2013a), que polimerizados, se interligam micromecânica e quimicamente às fibras colágenas, culminando na formação da camada híbrida.

A interface adesiva, da qual a camada híbrida é o constituinte básico, é suscetível ao estresse mecânico, ação de enzimas endógenas como, as metaloproteinases da matriz e as cisteíno-catepsinas (Breschi et al., 2018), e hidrólise do componente resinoso (Perdigão et al., 2012; Spencer et al., 2012).

O papel desempenhado pelas enzimas endógenas tem se destacado entre os fatores associados à degradação da interface adesiva, pois são elementos próprios da dentina, presentes e atuantes durante o processo de maturação do substrato, permanecendo inativas após a mineralização (Martin-De Las Heras et al., 2000; Sulkala et al., 2007, 2002). Contudo, a desmineralização resultante do

procedimento de condicionamento dentinário, promove a ativação enzimática e dá início ao processo da degradação colagenolítica (Mazzoni et al., 2006; Nishitani et al., 2006; Ozcan et al., 2015; Tezvergil-Mutluay et al., 2013).

Nesse contexto, a adesão química, destaca-se como uma possível chave para a superação da degradação longitudinal (Van Meerbeek et al., 2011, 2003; Sezinando et al., 2016). Assim, seguindo a tendência de simplificação dos procedimentos adesivos a fim de se obter rapidez na execução, menor sensibilidade à técnica e facilitar a utilização pelo cirurgião-dentista (De Munck et al., 2005), foi introduzido no mercado um versátil sistema adesivo, que pode ser utilizado de acordo com ambas estratégias de condicionamento, denominado “universal” (Hanabusa et al., 2012).

Esses adesivos têm, incorporados em sua composição, monômeros capazes de estabelecer ligações químicas com a dentina, considerados responsáveis pelo aumento da longevidade adesiva (Van Meerbeek et al., 2011, 2003; Sezinando et al., 2016), como por exemplo: 10 – MDP (10 – Metacriloxidecil Di hidrogênio Fosfato), 4-MET (4 -Metacriloxietil Trimelítico) e Fenil-P (2- Metacriloxietil Fenil Fosfato) (Yoshida and Inoue, 2012).

Contudo, uma relevante questão tem sido levantada entre os pesquisadores: adesivos universais devem ser utilizados sob condicionamento ácido total em dentina? (Loguercio et al., 2015; Zhang et al., 2016)

O ácido fosfórico (32 – 37 %) é comumente empregado nos procedimentos adesivos (Tezvergil-Mutluay et al., 2012). A sua utilização no substrato dentinário promove a remoção do Ca^{2+} , o que pode afetar negativamente as potenciais ligações químicas entre adesivo e dentina (Loguercio et al., 2015).

Considerando a ação do condicionamento ácido total com ácido fosfórico sob a dentina e a sua interação com o sistema adesivo, levantamos a possibilidade de se realizar o condicionamento do substrato dentinário com um

ácido que possua maior afinidade com componentes do sistema adesivo e de ação menos agressiva ao substrato como, o ácido poliacrílico.

O ácido poliacrílico é amplamente estudado e tem se mostrado promissor, devido às possíveis interações químicas com os monômeros funcionais, já que o seu uso promove a formação de irregularidades na superfície do substrato dentinário e de uma camada intermediária, reativa quimicamente e que favorece as trocas entre os íons presentes no adesivo e o cálcio e fosfato presente na *smear layer* parcialmente desmineralizada, promovendo melhor contato entre material e substrato (Prati et al., 1992; Tanumiharja et al., 2000), culminando na adesão química. O uso desse ácido tem sido especulado em diversos estudos relacionado à adesão em dentina (Pavan et al., 2010; Stona et al., 2013; Tanumiharja et al., 2000; Tonial et al., 2010), além de se tratar de um material popular na odontologia, de fácil aquisição e manipulação, que se adequa ao objetivo proposto.

Diversas formas de análise podem ser observadas na literatura para se avaliar o colágeno dentinário antes e após o condicionamento (DeVito-Moraes et al., 2016; Hu et al., 2015; Ozcan et al., 2015), bem como após a realização das restaurações. Dentre elas destacam-se a espectroscopia FTIR (Botta et al., 2012; Lopes et al., 2018; Ubaldini et al., 2013), as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) (Al-Assaf et al., 2007; Moura et al., 2006; Pereira et al., 2014) e de transmissão (MET) (Suppa et al., 2005), a zimografia (Gu et al., 2018), os testes de resistência imediato e longitudinal de microtração (Marchesi et al., 2014; Muñoz et al., 2013; Wagner et al., 2014) e microcisalhamento (Hariri et al., 2012), difração de raios-X (Yuan et al., 2007), microscopia confocal (Wagner et al., 2014), etc. . Assim, a análise comparativa do comportamento entre os ácidos utilizados para condicionamento dentinário através de algumas delas, pode oferecer elementos essenciais para a previsibilidade do sucesso da técnica.

Desse modo, o objetivo desse trabalho foi caracterizar quimicamente o substrato dentinário, analisar a degradação colágenolítica e a interface adesiva de um sistema adesivo universal submetido à diferentes protocolos de condicionamento ácido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A elaboração desta revisão de literatura, não tem a pretensão de esgotar o assunto, considerando a abrangência desse campo das pesquisas científicas. Desse modo, a proposta é prover ao leitor um *background* através da abordagem de pesquisas relevantes que precederam esse estudo, para uma melhor compreensão da proposta do projeto em questão.

2.1 Substrato dentinário – Composição, morfologia e interações

2.1.1 Dentina

Pashley em 1996 (Pashley, 1996) descreveu a dentina como um substrato biológico poroso, preenchido por cristais de apatita em uma matriz colágena.

A dentina ocupa grande parte do órgão dental sendo, composta em volume por aproximadamente 50 % de matéria inorgânica, 30 % de colágeno Tipo I e proteínas não-colágenas, e 20 % de água (Tjäderhane et al., 2009).

É um complexo tecido mineralizado composto por apatita carbonatada, que se apresenta em uma estrutura tridimensional formada por túbulos dentinários intimamente conectados à polpa, que se estendem até à junção esmalte-dentina, envoltos por matriz peri e intertubular (Bedran-Russo et al., 2014; Carvalho et al., 2012).

Os túbulos dentinários se apresentam em forma de cone invertido com o seu maior diâmetro voltado para a polpa. Há uma variabilidade na concentração de túbulos dentinários de acordo com a região da dentina, onde próximo à polpa ocupam 22% do tecido, enquanto que apenas 1% próximo à junção esmalte-dentina (Garberoglio and Brännström, 1976; Nakabayashi and Pashley, 1998). Cada túbulo é internamente circundado por dentina peritubular altamente mineralizada (95 % de conteúdo mineral em volume) e interconectado por dentina intertubular rica em matéria orgânica, em sua maior parte fibras colágenas (com apenas 30 % de conteúdo mineral em volume) (Marshall, 1993). Considerando que a permeabilidade dentinária ocorre primariamente via túbulos dentinários, as variações regionais de densidade e calibre dos túbulos podem influenciar de modo significativo e proporcional as mudanças na permeabilidade (Pashley and Carvalho, 1997). As variações morfológicas e físicas, bem como o conteúdo altamente orgânico, dificultam o alcance da longevidade da adesão em dentina (Perdigão, 2010).

2.1.2 A matriz extracelular dentinária e o colágeno Tipo I

A matriz orgânica extracelular dentinária é um complexo composto por uma rede tridimensional de colágeno fibrilar e entidades globulares que são mineralizadas por nanoscópicos cristalitos de apatita durante o processo de dentinogênese (Veis, 2003).

Aproximadamente 90% da matriz extracelular é composta por colágeno, em sua maior parte colágeno do Tipo I com traços de colágeno tipo V e III (Tjäderhane et al., 2009), sendo os constituintes remanescentes proteínas não-colágenas como, sialoproteínas, fosfoproteínas, proteínas morfogenéticas do

osso, enzimas, fatores de crescimento e as proteoglicanas, o componente mais abundante dentre os anteriores (Mazzoni et al., 2012; Orsini et al., 2012).

A molécula de colágeno consiste em três cadeias, duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ entrelaçadas em uma tripla hélice (Breschi et al., 2018; Kramer et al., 2001; Rainey and Goh, 2009), contendo três domínios: tripla hélice central (> 95%), um amino terminal (N-telo-peptídeo) e um terminal carboxílico (C-telo-peptídeo) (Yamauchi and Shiiba, 2008).

As cadeias peptídicas formam fibrilas de colágeno insolúveis por um processo de agregação e compactação. Essas fibrilas apresentam um espaço de 67 nm entre si e encontram-se organizadas em bandas (Veis, 2003). Durante o processo de maturação da dentina, cristaltos de apatita se precipitam e ocupam os espaços entre as moléculas de colágeno e também os espaços interfibrilares (Landis and Jacquet, 2013), inativando as enzimas presentes na matriz extracelular que estavam ativas durante o processo de dentinogênese (Hannas et al., 2007).

Ao contrário do colágeno encontrado no osso, passível de renovação, o colágeno dentinário não se renova (Tjäderhane et al., 2009), o que implica no fato de que o mesmo não é facilmente degradado. Contudo, uma vez que isso ocorre, não há posterior substituição (Breschi et al., 2018). Além disso, o fato de não haver neoformação promove o acúmulo das ligações cruzadas ao longo do tempo (Miura et al., 2014), o que pode influenciar as propriedades mecânicas das fibrilas de colágeno (Miguez et al., 2004; Miura et al., 2014; Shinno et al., 2016).

A estabilidade apresentada pelo colágeno da matriz é devida à lenta formação de ligações cruzadas covalentes inter e intramoleculares, que ocorrem entre o C-terminal de uma molécula de colágeno e o N-terminal de uma molécula de colágeno adjacente (Yamauchi and Shiiba, 2008). As ligações de hidrogênio também desempenham um papel importante na estabilização da

tripla hélice ao unir as lacunas preenchidas com água entre as moléculas de colágeno, aproximando-as e facilitando as reações inter e intra moleculares (Brinckmann et al., 2005).

O colágeno presente na dentina é o mais reticulado encontrado no corpo. As ligações cruzadas são responsáveis pela capacidade do colágeno não sofrer desnaturação durante o condicionamento ácido realizado nos procedimentos adesivos (Schlueter and Veis, 1964).

2.1.3 Metaloproteinases da matriz extracelular e Cisteíno-catepsinas

A fim de compreender a importância e as implicações da atividade proteolítica endógena na degradação do colágeno, se faz necessária a compreensão do papel do grupo mais proeminente de enzimas endógenas da dentina: metaloproteinases da matriz (MMPS) e Cisteíno-catepsinas (Breschi et al., 2018).

No início dos anos oitenta Dayan e colaboradores (Dayan et al., 1983) reportaram a primeira evidência de atividade colagenolítica em dentina, tanto hígida quanto cariada. Contudo, apenas em 1998 Tjäderhane e colaboradores atribuíram às MMPs a responsabilidade pela degradação da matriz de dentina desmineralizada (Tjäderhane et al., 1998). Em meados de 2004 Pashley et al. (Pashley et al., 2004) demonstraram que o colágeno pode sofrer degradação mesmo em condições assépticas, indicando as proteases da matriz intrínseca como prováveis responsáveis.

As MMPs pertencem à classe das endopeptidases zinco-cálcio dependentes. O Zn^{2+} participa da ativação da enzima, enquanto o Ca^{2+} é um dos responsáveis pela preservação da sua estrutura terciária. Essas proteases

consistem em um pré-domínio, um pró-domínio com um resíduo cisteína, unido por meio de uma região “dobradiça”, à um domínio catalítico constituído por zinco e domínios fibronectina, e um domínio hemopexina (Figura 1).

Figura 1 – Esquema ilustrativo da estrutura das MMP-2 e 9



Fonte: Elaborado pelo autor.

Essas enzimas endógenas regulam funções em diversos processos biológicos e patológicos nos tecidos à base de colágeno devido à sua capacidade de degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular (Visse and Nagase, 2003).

Em humanos, os 23 membros da família das MMPs são frequentemente divididos em 6 grupos: collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, MMPs tipo membrana e outras MMPs - de acordo com o substrato, especificidade e origem (Tjäderhane et al., 2015).

Considerável interesse tem sido empregado em detectar, distribuir e compreender a função das MMPs presentes na cavidade oral (Hannas et al., 2007; Mazzoni et al., 2015). sendo que, diversas delas tem sido identificadas no complexo dentino-pulpar (Frassetto et al., 2016), como: estromelina 1 (MMP-3) (Boukpepsi et al., 2008; Mazzoni et al., 2011b), collagenase (MMP-8) (Sulkala et al., 2007), gelatinase A e B (MMP-2 e MMP-9) (Martin-De Las Heras et al., 2000; Mazzoni et al., 2007) e esmaltelina (MMP-20) (Sulkala et al., 2002).

As MMPs desempenham um importante papel durante o processo de maturação da dentina contudo, após a mineralização da matriz de colágeno elas

encontram-se cobertas por nanocristais de apatita, o que as mantém imóveis e não-funcionais (Hannas et al., 2007; Nishitani et al., 2006). Essas enzimas são sintetizadas e secretadas, em sua maioria, como proenzimas inativas (zimogênios), que podem ser ativadas por proteinases ou alguns agentes químicos, incluindo espécies de oxigênio reativo. MMPs podem também ser ativadas por um pH baixo, promovendo o rompimento da ligação zinco-cisteína (Nishitani et al., 2006; Tjäderhane et al., 2015; Visse and Nagase, 2003).

As MMPs mais facilmente identificadas na dentina são as MMP-2 e MMP-9 (Breschi et al., 2018). Em estudos realizados por Mazzoni e colaboradores (Mazzoni et al., 2009, 2007), a presença de MMP-9 e MMP-2 em pó de dentina hígida e cariada foi avaliada através de zimografia, análise *western blot* e diferentes técnicas imuno-histoquímicas, revelando a presença de isoformas dessas MMPs latentes e ativas em dentina parcialmente desmineralizada. O estudo realizado por Mazzoni (Mazzoni et al., 2009) também mostrou que a quantidade e os padrões de distribuição das MMPs na dentina parcialmente descalcificada são diferentes daqueles apresentados na não-mineralizada, nos quais a menor marcação foi observada, sugerindo que a desmineralização afeta a biodisponibilidade das MMPs e sua posterior ativação.

Estudos de Nishitani et al. e Mazzoni et al. (Mazzoni et al., 2006; Nishitani et al., 2006) evidenciaram a atividade gelatinolítica e colagenolítica em dentina parcialmente desmineralizada tratada tanto com adesivos autocondicionantes ou de condicionamento ácido total, confirmando o potencial envolvimento dessas endoproteases na ruptura das fibrilas colágenas da camada híbrida incompletamente infiltradas por resina.

Apesar das gelatinases MMP-2 e MMP-9 não serem de fato colagenases, desempenham um papel importante no processo colagenólise e na degradação endógena do colágeno dentinário (Breschi et al., 2018).

A presença das cisteíno-catepsinas em odontoblastos maduros de dentina hígida, foi recentemente reportada (Nascimento et al., 2011; Tersariol et al., 2010). Elas fazem parte do proeminente grupo de enzimas proteolíticas endógenas da matriz dentinária que participam da degradação (Breschi et al., 2018). Atuam como endopeptidases e participam na proteólise intracelular no compartimento lisossomal das células vivas (Dickinson, 2002) além de, atuarem também como exopeptidases e participarem da degradação da matriz extracelular através quebra das fibras de colágeno tipo I e proteoglicanas (Obermajer et al., 2008). As cisteíno-catepsinas tem sido apontadas como enzimas com um papel fundamental no processo de degradação da camada híbrida (Liu et al., 2011; Nascimento et al., 2011).

Dentre as catepsina presentes na dentina, a Catepsina-K é responsável por 98% da atividade colagenolítica, diferindo das MMPs (MMP-1, -2, -8 e -13) que clivam o colágeno tipo I dentro da tripla hélice em um único sítio nos fragmentos N-terminal e C-terminal, e de outras catepsinas (B, L e S) que clivam a extensão não-helicoidal do telopeptídeo das moléculas de colágeno. A Catepsina-K é capaz de clivar a molécula de colágeno em múltiplos sítios dentro da tripla hélice, gerando fragmentos múltiplos de colágeno de diversos tamanhos (Garnero et al., 1999; Liu et al., 2011).

De modo semelhante às MMPs, cisteíno-catepsinas podem ser ativadas em ambientes levemente acídicos sendo, que esta ativação, pode ainda alimentar o processo de ativação das MMPs. Além disso, as glicosaminoglicanas podem acelerar a conversão de formas latentes de enzimas da família das catepsinas para sua forma madura em pH neutro. Conseqüentemente, permitindo a atividade de catepsinas mesmo em pH neutro (Liu et al., 2011; Obermajer et al., 2008).

A presença de cisteíno-catepsinas nos túbulos dentinários indica que elas se originam da polpa dental via fluído dentinário, podendo ser ativadas por

monômeros resinosos levemente acídicos, ou pela interação com glicosaminoglicanas do fluído dentinário ou matriz colágena após a adesão e neutralização dos monômeros acídicos, coparticipando com as MMPs salivares no processo de degradação da interface adesiva (Liu et al., 2011; Tersariol et al., 2010).

De fato, as MMPs e as cisteíno-catepsinas presentes na dentina e no fluído dentinário contribuem para a degradação da camada híbrida e consequente redução da longevidade adesiva ao longo do tempo (Zheng et al., 2014). Contudo, vale ressaltar que as mudanças de pH causadas pelo condicionamento ácido da dentina durante o procedimento adesivo, os monômeros acídicos ou até mesmo os monômeros resinosos adesivos, podem contribuir significativamente na modulação da ativação e expressão das MMPs e cisteíno-catepsinas (Mazzoni et al., 2013; Tjäderhane et al., 2013a).

2.2 Adesão ao substrato dentinário

A adesão entre adesivo e dentina se dá essencialmente pela remoção da fase mineral do substrato dentinário, preservando a matriz colágena para que os espaços ocupados pelos minerais sejam então preenchidos por monômeros resinosos dando origem à camada híbrida (Van Meerbeek et al., 2003; Nakabayashi and Pashley, 1998).

A camada híbrida é um biocompósito formado por fibras colágenas e resina polimerizada (Van Meerbeek et al., 1992; Nakabayashi et al., 1982; Spencer et al., 2010), altamente orgânico, relativamente hidrofóbico e ácido-resistente (Tjäderhane, 2015). Esse mecanismo de adesão é considerado uma forma de engenharia tecidual (Pashley et al., 2011), da qual se espera uma íntima e permanente união entre dentina e resina composta (Carvalho et al.,

2012).

Atualmente os procedimentos adesivos podem ser realizados por meio de duas estratégias de condicionamento dentinário, condicionamento ácido total e autocondicionante (Hanabusa et al., 2012).

O objetivo principal de ambas estratégias é permitir que o adesivo infiltre a trama colágena (Tjäderhane, 2015). Contudo, independente da técnica de condicionamento utilizada ou do material, a formação da camada híbrida não é perfeita (Breschi et al., 2008; Van Meerbeek et al., 2011; Pashley et al., 2011; Vaidyanathan and Vaidyanathan, 2009). Diversos fatores podem contribuir para a incompleta infiltração dos monômeros resinosos na trama colágena entre eles, a presença do fluído dentinário dentro de um complexo de túbulos com numerosas anastomoses (HASHIMOTO et al., 2009), o limitado tempo para realização do procedimento restaurador, a presença de água necessária para a manutenção das fibras colágenas em posição para a penetração dos monômeros (Pashley et al., 2007) e o limitado grau de conversão dos mesmos. Além disso, a degradação hidrolítica da camada híbrida, é um dos principais fatores, em se tratando da manutenção da longevidade e integridade da interface adesiva, influenciando diretamente a resistência adesiva (Pashley et al., 2011; Tjäderhane et al., 2013b)

A exposição das fibras colágenas, resultante da incompleta infiltração, favorece à desnaturação, deformação e ruptura devido à fadiga cíclica, após prolongada função (Fung et al., 2009; Pashley et al., 2003). Além disso, as fibras expostas permanecem preenchidas pela água, que serve como um meio funcional para hidrólise da matriz resinosa por esterases e do colágeno, por enzimas colagenolíticas endógenas e exógenas (Liu et al., 2011).

Adesivos autocondicionantes de frasco único funcionam como membranas semipermeáveis, favorecendo o fluxo da água e a degradação hidrolítica (Franklin R. Tay et al., 2002), sendo essa condição correlacionada à

deficiente polimerização dos monômeros resinosos acídicos hidrofílicos de sua formulação, e conseqüentemente, ao fenômeno de separação de fases, que também contribui negativamente para a longevidade adesiva (Spencer et al., 2012). Contudo, tal efeito parece ser potencializado quando realizado o condicionamento com ácido fosfórico, que promove a completa desobliteração dos túbulos dentinários e o aumento da condutância hidráulica do substrato (Özok et al., 2004; Spencer et al., 2012).

Os sistemas adesivos de condicionamento ácido total, promovem a infiltração dos monômeros resinosos através do auxílio de um ácido, comumente o ácido fosfórico (32 - 37 %), que promove a dissolução da fase mineral da dentina à uma profundidade da ordem de 5 - 10 μm , desnudando a trama colágena, deixando-a altamente porosa e suspensa em água (Nakabayashi and Pashley, 1998).

Os sistemas adesivos autocondicionantes contém monômeros resinosos acídicos que simultaneamente infiltram e condicionam o substrato. Esses adesivos contem solventes (água, etanol ou acetona) para dissolver os monômeros, evitar o colapso da trama colágena e permitir que os monômeros preencham os espaços entre as fibras colágenas e também sua superfície (Van Meerbeek et al., 2011; Tjäderhane, 2015). Além disso, a parcial solubilização da hidroxiapatita parece exercer um efeito protetor sobre o colágeno (Liu et al., 2011), o que é evidenciado pela mínima atividade das MMP-2 e MMP-9 quando utilizado sistema adesivo autocondicionante de 2 passos (De Munck et al., 2010).

Os monômeros funcionais presentes nos adesivos autocondicionantes como por exemplo, o ester de ácido fosfórico (Fukeygawa et al., 2006) ou ácidos carboxílicos (Yoshida et al., 2000) são capazes de interagir com a hidroxiapatita por meio de uma reação iônica chamada (Yoshioka et al., 2002) “Adesão – Descalcificação” [66]. De acordo com esse modelo, todos os ácidos se ligam

ionicamente ao Ca^{2+} presente na hidroxiapatita. Assim, ácidos policarboxílicos, a despeito de seu pH ou concentração, tem a capacidade de interagir com a hidroxiapatita e até mesmo descalcificá-la, dependendo da taxa de dissolução e estabilidade dos sais de Ca^{2+} resultantes (Yoshida et al., 2001).

Considerando as diferenças quanto ao julgamento clínico do profissional, que pode escolher qualquer uma dessas estratégias, a utilização do sistema adesivo universal permite ao cirurgião-dentista a possibilidade de decidir por qual o tipo de condicionamento realizar, a partir de um único frasco (Hanabusa et al., 2012; Da Rosa et al., 2015). Além disso, os adesivos universais disponíveis no mercado assim como a maioria dos autocondicionantes, apresentam em sua composição básica os monômeros funcionais.

Desse modo, levando em consideração o fato de que a adesão química tem se destacado como uma provável chave para superação dos desafios ligados à degradação da interface adesiva (Van Meerbeek et al., 2011, 2003), o estudo dessa classe de sistemas adesivos é válido.

Entre os sistemas adesivos universais disponíveis no mercado, destaca-se o Single Bond Universal (3M ESPE, St. Paul, MN) que possui em sua composição o 10-MDP (10-metacriloxidecil di-hidrogênio fosfato) e o Vitrebond™Copolímero (VCP) - Copolímero do ácido polialcenóico, ambos com potencial de ligação química (Sezinando et al., 2016), e que tem mostrado um bom desempenho em tempo imediato e longitudinal nas pesquisas “*in vitro*” e “*in vivo*” (Lawson et al., 2015; Loguercio et al., 2015; Da Rosa et al., 2015).

O 10-MDP é um monômero resinoso ácido de caráter hidrofóbico e hidrofílico, que favorece a diminuição da permeabilidade à água e a redução da degradação hidrolítica (Lawson et al., 2015), agindo basicamente de acordo com o conceito de adesão-descalcificação proposto pelos sistemas adesivos autocondicionantes (Yoshida et al., 2001). Estudos sugerem que esse monômero, contém um grupo metacrilato polimerizável e um grupo fosfato, que

se ligam quimicamente à hidroxiapatita, formando sais de cálcio hidroliticamente estáveis e aumentando a resistência de dissolução acídica dos cristais de apatita residuais, sob a forma de uma nanocamada hidrofóbica e ácido-resistente na interface adesiva (Yoshida et al., 2012; Yoshihara et al., 2011), que supostamente protege as fibras colágenas da degradação (Hiraishi et al., 2013). Desse modo, promovendo aumento da resistência mecânica e estabilidade da adesão, colocando-o como o mais promissor monômero resinoso funcional da atualidade (Yoshida et al., 2012; Yoshihara et al., 2011). Contudo a literatura ainda é controversa quanto a interação do 10-MPD com substrato dentinário (Tian et al., 2015).

O VCP também se liga química e espontaneamente à hidroxiapatita (Sezinando et al., 2016) através da adesão-descalcificação (Fukuda et al., 2003). Os grupos carboxílicos (COO^-) nos ácidos polialcenóicos substituem os íons fosfato PO_4^{3-} na hidroxiapatita, estabelecendo ligações iônicas com o Ca^{2+} (Yoshida et al., 2001, 2000). O seu alto potencial de adesão química se deve à abundância de grupos carboxílicos polares presentes, estando sua excelente performance longitudinal associada à essa capacidade de auto-adesão (Mitra et al., 2009) e estabilidade frente à umidade.

Devido à presença e dada importância dos monômeros funcionais, a literatura é controversa quanto ao uso dos sistemas adesivos universais em dentina após o condicionamento ácido total (Loguercio et al., 2015). Segundo o conceito de adesão-descalcificação, a desmineralização dos tecidos duros por ácidos fortes (Yoshihara et al., 2011) resulta na dissolução dos cristais de apatita, o que elimina a possibilidade do estabelecimento de ligações químicas entre os monômeros resinosos funcionais e a hidroxiapatita, bem como a formação dos sais de cálcio e da nanocamada (Yoshida et al., 2012).

Embora o uso desses ácidos promova uma melhora no aspecto morfológico da interface adesiva, não há uma correlação positiva no que diz

respeito as médias de resistência de união (Wagner et al., 2014). As pesquisas mostram que para o tempo imediato a retenção micromecânica ainda é considerada o mecanismo de adesão primária (Van Meerbeek et al., 2003). Por isso, quando são comparados os resultados de análises de resistência de união imediata, não há diferença significativa entre as estratégias de condicionamento, o que é consensual na literatura (Muñoz et al., 2013; Perdigão et al., 2012; Wagner et al., 2014). Contudo, estudos de 12 meses de avaliação exibem melhores resultados para o modo autocondicionante (Da Rosa et al., 2015), onde a adesão química favorece a longevidade da adesão (Van Meerbeek et al., 2003).

A literatura evidencia que adesivos universais, aplicados no modo autocondicionante, apresentam menor infiltração para o tempo imediato e longitudinal de 12 meses, o que não ocorre quando empregado o condicionamento ácido total (Marchesi et al., 2014). Além disso, especula-se que quando adesivos dessa classe, contendo 10-MDP, são utilizados sob esta forma de condicionamento, a infiltração dos monômeros resinosos na trama colágena é inconsistente (Zhang et al., 2016). Sugerindo, que o condicionamento ácido total não deve ser a primeira escolha para sistemas adesivos universais (Loguercio et al., 2015).

O ácido poliacrílico, membro da família dos ácidos polialcenóicos, age promovendo um condicionamento suave da superfície, por meio da remoção da *smear layer* e exposição da matriz colágena em uma profundidade na ordem de 0,5 – 1,0 micrômetros (Inoue et al., 2001), permitindo a difusão do sistema adesivo e estabelecendo uma interação micromecânica, de acordo com os princípios da hibridização (Lin et al., 1992; De Munck et al., 2005).

Além disso, ligações químicas são estabelecidas pela interação iônica entre os sítios de ligação primária entre os grupos carboxílicos do ácido e os íons cálcio e fosfato da hidroxiapatita que permaneceu no colágeno, mesmo após o condicionamento ácido (Sezinando et al., 2016; Yoshida et al., 2000). Tais

interações químicas possivelmente contribuem para a otimização da resistência de união, promovendo um melhor selamento marginal, que protege a interface adesiva e aumenta a sua longevidade, conseqüentemente reduzindo a incidência de cárie secundária, fator determinante de falha das restaurações em resina composta (Spencer et al., 2012).

O uso do ácido poliacrílico tem sido especulado em diferentes estudos, visando a compreensão do seu efeito como condicionador dentinário previamente ao uso de cimentos autocondicionantes, nos quais apresentou resultado favorável (Pavan et al., 2010; Stona et al., 2013; Tanumiharja et al., 2000; Tonial et al., 2010). O que nos leva a crer que a utilização do ácido poliacrílico previamente ao uso do SBU possa influenciar positivamente a performance da interface adesiva longitudinalmente.

Além disso, a literatura evidencia um crescente interesse na análise do potencial de degradação colagenolítica, via MMPs e cisteíno-catepsinas, mediada por diferentes ácidos. Alguns estudos foram conduzidos analisando o ácido fosfórico, ácido poliacrílico e adesivos autocondicionantes. Contudo, as pesquisas se mostram divergentes quanto aos resultados, apontando que a diminuição ou aumento da degradação colagenolítica possa estar condicionada à concentração dos ácidos (DeVito-Moraes et al., 2016; Mazzoni et al., 2006; Nishitani et al., 2006; Ozcan et al., 2015; Pashley et al., 2004).

2.3 Metodologias para análise dos componentes da interface adesiva

A interface adesiva é um constituinte essencial do procedimento restaurador, formado pela interação entre dentina, sistema adesivo e resina composta. Assim, o sucesso clínico de uma restauração é dependente do

estabelecimento de uma efetiva adesão, que deve prover resistência, selamento marginal e durabilidade clínica (Armstrong et al., 2017).

A compreensão do comportamento e desempenho dos materiais odontológicos pode ser estudada por meio de diversos testes ou metodologias, que preferencialmente devem ser de fácil execução, reprodutíveis entre diferentes laboratórios e úteis para prever os desfechos clínicos (Van Meerbeek et al., 2010; Roeder et al., 2011). As características mais analisadas da interface estão correlacionadas aos substratos e materiais que a compõem, tanto no caráter químico como físico-mecânico e morfológico.

2.3.1 Análise por Espectroscopia Transformada de Fourier (FTIR)

Entre os métodos utilizados para determinar a composição química da dentina os mais utilizados são, Energia Dispersiva de Raio-X (EDS), Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR) e Raman (Lopes et al., 2018).

A espectroscopia FTIR é uma técnica espectroscópica vibracional utilizada para análises químicas em amostras biológicas (Andrew Chan and Kazarian, 2016), pois grande parte dos compostos orgânicos e inorgânicos são ativos na radiação infravermelha (IV).

A radiação IV está localizada entre a luz visível e as micro-ondas de um espectro sendo que, em se tratando da odontologia a maioria dos estudos adotam a região de interesse que se situa entre 400 cm^{-1} e 4000cm^{-1} (Parikh and Chorover, 2005), suficiente para análise de alterações nos tecidos mineralizados. Entre os componentes químicos presentes nos tecidos duros como a dentina

estão a água, fosfato, carbonato e os componentes do colágeno (Amidas I, II e III) que absorvem intensamente na região IV.

O espectro FTIR pode ser adquirido por diferentes técnicas como, transmissão, reflectância especular, reflectância difusa, espectroscopia fotoacústica e reflectância atenuada total (ATR). A técnica ATR-FTIR é uma forma de espectroscopia de reflexão interna na qual a amostra é colocada em contato com um elemento de reflexão interna com alto índice refrativo como o cristal de diamante. Assim, como a luz é transmitida através da amostra, pouca ou nenhuma preparação é requerida (Parikh and Chorover, 2005), sendo este considerado um método não destrutivo (Andrew Chan and Kazarian, 2016), altamente sensível e que requer um pequeno número de amostras (Grunenwald et al., 2014). Contudo, a identificação química dos componentes da dentina requer a observação de algumas características como a padronização do modo de preparo da amostra e a idade do doador, se for o caso, embora à despeito das possíveis variações os valores obtidos tendem a ser muito similares (Khanarian et al., 2014).

Assim, em se tratando da interface adesiva, a espectroscopia FTIR é útil para demonstrar a redução de conteúdo mineral e orgânico (Sato et al., 2013; Ubaldini et al., 2013), podendo ainda ser empregada para avaliar o colágeno dentinário em diferentes situações como, em dentina desmineralizada, desproteïnizada, aquecida e reidratada, e a degradação do colágeno (Bachmann et al., 2005; Botta et al., 2012; Liu and Wang, 2013; Silva et al., 2015).

2.3.2 Ensaio do tipo ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

As pesquisas tem se intensificado no intuito de se entender as interações fisiológicas e patológicas que acometem o substrato dentinário, entre elas a perda de colágeno da matriz na camada híbrida (Tjäderhane et al., 2013a), que pode ser causada, entre outros fatores, pela atividade das metaloproteinases e cisteíno- catepsinas (Nascimento et al., 2011; Tersariol et al., 2010; Tjäderhane et al., 1998).

As MMP's e as cisteíno-catepsinas são responsáveis pela liberação de fragmentos do telopeptídeo carboxiterminal do colágeno Tipo I (ICTP) e do telopeptídeo Terminal-C ligado ao colágeno Tipo I (CTX). Sendo que, a liberação desses fragmentos tem sido utilizada como biomarcadores para demonstrar a degradação da dentina desmineralizada (Tjäderhane et al., 2013a).

Para a análise da liberação de fragmentos é empregado o ensaio do tipo ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* - imunoabsorção enzimática), que se trata de uma técnica utilizada para detecção de um anticorpo ou um antígeno em uma variedade de amostras por meio de uma série de reações químicas. Existem diversos tipos de teste ELISA entre eles: direto, indireto, sanduíche, competitivo e reverso. Todos esses tipos de ensaios podem ser empregados na detecção de proteínas, vírus e drogas, tendo como vantagem a alta especificidade e sensibilidade (Wilson, 2010).

Diversos estudos tem empregado o ensaio do tipo ELISA para analisar a liberação de fragmentos de telopeptídeo ICTP e CTX (Hu et al., 2015; Ozcan et al., 2015; Turco et al., 2018, 2016), mas apenas recentemente Turco et al. (Turco et al., 2018) publicaram um trabalho a respeito de aspectos relativos à amostra e ao tempo de análise ressaltando que, para esse tipo de ensaio o período de armazenamento e a espessura da amostra são fatores importantes de serem observados, pois a liberação dos fragmentos diminui com o tempo e quanto maior a espessura do espécime, menor a difusão dos mesmos para o meio de incubação.

A literatura ainda não apresenta grande quantidade de estudos que correlacionem diretamente a degradação do colágeno Tipo I com a resistência adesiva contudo, Lin Hu et al. (Hu et al., 2015) realizaram um estudo em que foi possível estabelecer estatisticamente uma correlação negativa entre o nível de degradação do colágeno e a resistência adesiva, demonstrando que quanto maior a degradação menor a resistência.

2.3.2 Análise da resistência adesiva por ensaio de microtração

Diversas metodologias são capazes de mensurar a resistência adesiva à dentina entre elas, está a microtração (Van Meerbeek et al., 2010), que apesar de ser uma metodologia trabalhosa e sensível à técnica, pois requer um preparo adicional após o procedimento adesivo, apresenta muitas vantagens como: a versatilidade, devido à obtenção de múltiplos espécimes de um mesmo dente; controle da variabilidade regional do substrato e; melhor distribuição do estresse na interface, evitando a ocorrência de falhas coesivas (Pashley et al., 1999; Sano et al., 1994).

Considerando o nível de significância que se deseja obter empregando esse tipo de metodologia diversos são os fatores a serem observados, entre eles: seleção do dente, definição do tamanho da amostra (mínimo 5 espécimes por grupo) tempo e meio de armazenamento até o uso, limpeza e hidratação do dente, inclusão do dente, padronização da *smear layer*, medida do espécime, meio de armazenamento do espécime e período, especificações do teste na máquina de ensaio (velocidade e carga), análise de fraturas, entre outros (Armstrong et al., 2017; Pashley et al., 1999; Sano, 2006).

De um modo geral, estudos que tem como objetivo principal avaliar o desempenho de um sistema adesivo à dentina empregam o teste de microtração (Hanabusa et al., 2012; Marchesi et al., 2014; Muñoz et al., 2013; Sezinando et al., 2015; Wagner et al., 2014; Zhang et al., 2016), especialmente após ao desafio longitudinal, esse teste parece ser o melhor para prever a retenção das restaurações de resina composta (Van Meerbeek et al., 2010). Pois, o objetivo principal da adesão à estrutura dental deve ser prover resistência retentiva, selamento marginal e durabilidade clínica às restaurações (Armstrong et al., 2017).

2.3.3 Análises micromorfológicas da interface adesiva por MEV

A microscopia eletrônica tem se tornado uma das ferramentas mais utilizadas na odontologia devido a possibilidade de se analisar as estruturas dentais e as suas interações com materiais odontológicos como, os sistemas adesivos e os materiais restauradores (Pereira et al., 2014).

Contudo, o preparo das amostras para análise em MEV requer cautela, pois a literatura relata que existe um ponto crítico de secagem da amostra e que, o baixo e o alto vácuo empregados durante o procedimento de metalização são capazes de gerar trincas no substrato dental e através da interface adesiva, produzindo artefatos morfológicos tridimensionais nas amostras, que podem dificultar a caracterização das mesmas (Al-Assaf et al., 2007; Pereira et al., 2014).

Em se tratando da adesão, a análise micromorfológica é de extrema relevância, pois a aplicação do sistema adesivo induz a mudanças estruturais na superfície dentinária, dando origem à camada híbrida. Assim, valendo-se da

microscopia eletrônica de varredura (MEV), é possível observar a interface adesiva em detalhes como, a espessura da camada híbrida e a presença de *tags* e *microtags* resinosos, gaps falhas e poros (Anchieta et al., 2011). Além disso, esse tipo de análise é capaz de ajudar a elucidar os resultados de resistência adesiva que idealmente não deveriam ser analisados sem a observação da qualidade da interface adesiva, pois em alguns casos é possível encontrar disparidades entre os valores de resistência e o estudo qualitativo da interface como por exemplo, bons valores de adesão em áreas com presença de gaps, indicando susceptibilidade à infiltração (Moura et al., 2006; Uno S, 1995).

A nanoinfiltração é a infiltração em escala nanométrica, que pode ocorrer através da camada híbrida e/ ou camada adesiva na ausência de gaps, sendo considerada um importante fator que induz à degradação da adesão (Hariri et al., 2012; Li et al., 2000; Sano et al., 1995a).

Esse fenômeno pode ser causado pela incompleta infiltração dos monômeros resinosos na trama colágena desmineralizada ou devido à incompleta polimerização dos monômeros hidrofílicos (Pioch et al., 2001; Sano et al., 1995b, 1995a). A metodologia de análise consiste no uso do nitrato de prata, que possui baixo peso molecular e capacidade de difusão similar à da água, sendo capaz de marcar os espaços nanométricos preenchidos por água na interface adesiva (Sano et al., 1995a, 1995b; F. R. Tay et al., 2002), através de imagens obtidas por MEV ou por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Suppa et al., 2005; Yuan et al., 2007).

A literatura relata que parece haver uma correlação na análise “*in vitro*” entre a nanoinfiltração, resistência adesiva e o desafio longitudinal (Makishi et al., 2015), evidenciando em alguns estudos a diminuição da resistência adesiva e o aumento da nanoinfiltração (Makishi et al., 2016; F. Tay et al., 2002), indicando que a estabilidade mecânica longitudinal e a capacidade de selamento

dos adesivos é fundamental para a se predizer o comportamento clínico de uma restauração (Heintze et al., 2015).

3 PROPOSIÇÃO

Caracterizar quimicamente o substrato dentinário antes e após o condicionamento com ácido fosfórico 32 % (AF) ou ácido poliacrílico 25 % (AP) em tempo imediato. Analisar “*in vitro*” a atividade das Metaloproteinases (MMP’s) e Catepsina- K na dentina desmineralizada (colágeno) submetida ao condicionamento com AF e AP em tempo imediato. E a interface adesiva no substrato dentinário submetido à diferentes protocolos de condicionamento ácido: 1) AF; 2) AP; 3) Sem condicionamento adicional (Autocondicionante) com Single Bond Universal (SE), nos tempos imediato (24 h) e longitudinal (12 meses).

As hipóteses de nulidade testadas foram:

H₀A – Os diferentes protocolos de condicionamento não afetariam a concentração dos marcadores para atividade das MMP’s e Catepsina K no colágeno.

H₀B - Os diferentes protocolos de condicionamento dentinário empregados não resultariam em diferenças significativas entre si quanto a análise da interface adesiva nos diferentes períodos de avaliação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética

Este estudo foi submetido ao CEP/CONEP sob o número CAAE 60315716.4.0000.0077 e aprovado pelo parecer número 1.784.538 (Anexo A).

Foram utilizados 90 molares humanos hígidos extraídos por indicações terapêuticas, junto às clínicas e consultórios particulares. Os cirurgiões-dentistas foram informados sobre o uso dos dentes para fins de pesquisa científica em odontologia, e os de acordo assinaram o termo de doação de material biológico.

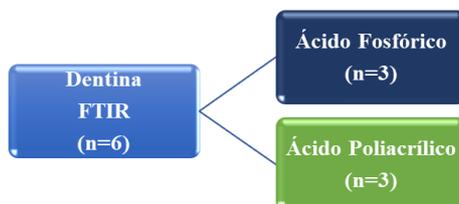
4.2 Delineamento experimental

Este estudo foi realizado em três etapas: 1) Caracterização química do substrato dentinário (FTIR); 2) Análise da degradação colagenolítica e 3) Análise da interface adesiva.

4.3 Divisão dos grupos

Na primeira etapa (N=6), a análise em FTIR foi realizada somente para os grupos AF e AP, as leituras foram realizadas antes e imediatamente após o condicionamento (Figura 2).

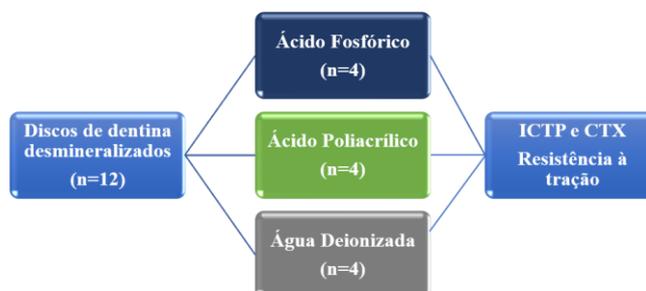
Figura 2 – Representação da distribuição das amostras, de acordo com o planejamento da primeira do estudo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação à divisão dos grupos (N=12) para a realização da segunda etapa, as amostras de dentina desmineralizada (colágeno) foram divididas em três grupos: ácido fosfórico, poliacrílico e água deionizada (controle). As análises foram realizadas em período imediato. (Figura 3).

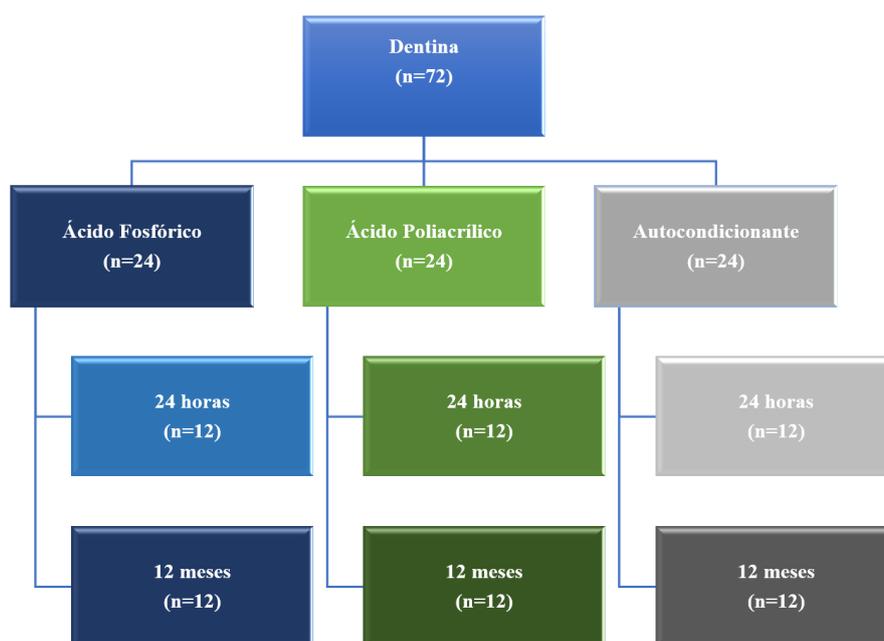
Figura 3 - Representação da distribuição das amostras, de acordo com o planejamento da segunda etapa do estudo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a realização da terceira etapa (N=72), as amostras de substrato dentinário foram divididas em três grupos, de acordo com o protocolo de condicionamento empregado: ácido fosfórico, ácido poliacrílico e autocondicionante. Após, foram divididas em subgrupos de acordo com o período de avaliação: 24 horas e 12 meses. Para cada uma das análises complementares de MEV da interface adesiva e nanoinfiltração foram designadas 2 amostras para os diferentes períodos de avaliação (Figura 4).

Figura 4 – Representação da distribuição das amostras, de acordo com o planejamento da terceira etapa do estudo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os materiais utilizados em todas as etapas desse trabalho e as instruções de uso, de acordo com as recomendações dos fabricantes, estão listados no Quadro 1.

Quadro 1 – Materiais utilizados para a realização do procedimento restaurador

MATERIAL	COMPOSIÇÃO	APLICAÇÃO
Scotchbond™ Universal Etchant Etching Gel 3M ESPE Brasil Ltda., Sumaré, SP, Brasil (Lote: 665021)	Ácido fosfórico 32%	Aplicar na dentina por 15 segundos. Após realizar a lavagem por 15 segundos com água.
Ketac Conditioner 3M ESPE Brasil Ltda., Sumaré, SP, Brasil (Lote: 656054)	Ácido poliacrílico 25%	Aplicar por 10 segundos e após proceder com a lavagem com água abundante.
Single Bond Universal (SBU) 3M ESPE, Brasil Ltda., Sumaré, SP, Brasil (Lote: 654851)	15-25% BisGMA, 15-25% HEMA, 5- 15% resinas dimetacrilato, 5- 15% silano, 1-10% monômero fosfato MDP, 1-5% copolímero do Vitrebond™ (ácido polialcenóico), 10- 15% etanol, 10-15% água, <2% iniciadores, em massa.	Com pincel do tipo <i>microbrush</i> , aplicar o adesivo com agitação sobre a dentina condicionada por 20 s. Secar com jato de ar suave por 5 s. Fotopolimerizar por 10 s.
Filtek Z350 XT, 3M do Brasil Ltda., Sumaré, SP, Brasil (Lote: 646778)	BisGMA, BisEMA UDMA, TEGDMA, PEGDMA, nanopartículas de zircônia/sílica.	Inserir incrementos de 2 mm. Fotopolimerizar cada incremento por 20 s.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Primeira etapa – Caracterização química do substrato dentinário

Para a realização da análise química da superfície dentinária, foram preparados três espécimes para cada grupo experimental.

Para obtenção dos espécimes, os dentes foram posicionados na máquina de cortes Isomet (, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) a fim de se realizar dois cortes. O primeiro corte foi realizado na região mais profunda do esmalte oclusal, para exposição da dentina. Já o segundo corte, paralelo ao primeiro, 1 mm abaixo da junção amelocementária, com o auxílio de um disco de diamante em baixa rotação e sob refrigeração constante. Após, foi realizado o desgaste dos espécimes de dentina com discos de lixa de carboneto de silício (Extec Corp. Enfield, CT, EUA) de granulação 600, sob refrigeração abundante a 300 rpm em politriz (DP-10, Panambra, São Paulo, Brasil) durante 1 minuto para padronização da *smear layer*.

As análises foram realizadas antes e após o condicionamento (Quadro 1), por meio da espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR, PerkinElmer Waltham, Massachusetts, EUA), equipado com um acessório de reflexão total atenuada (ATR). A superfície de dentina de cada amostra foi posicionada sobre a superfície do ATR e pressionada com auxílio de célula de carga plana de aço inoxidável (100 g/F), a fim de obter o máximo contato da amostra com o cristal de diamante do ATR (Figura 5). Os espectros de infravermelho foram registrados automaticamente pelo equipamento, por um computador acoplado para mapeamento do ensaio, utilizando o software Spectrum (versão 10.4.3, PerkinElmer Waltham, Massachusetts, EUA). Os espectros foram adquiridos no modo de absorbância, com faixa de transmissão entre 4000 e 650 cm^{-1} , 32 varreduras, a uma resolução de 4 cm^{-1} . Após a correção da linha de base e normalização, picos de absorbância do grupo fosfato

(entre 900-1200 cm^{-1}), grupo carbonato (870-1070 cm^{-1}), grupo amida presente na matriz de colágeno da dentina (Amida I, II e III, entre 1200-1700 cm^{-1}) e os anéis pirrolidínicos correspondentes a esteroquímica da prolina e hidroxiprolina (1450 cm^{-1}), foram comparados entre os tipos de substratos (Botta et al., 2012). A integridade do colágeno foi verificada através da razão entre Amida III (1235 cm^{-1}) /Anéis Pirrolidínicos (1450 cm^{-1}) (Sylvester et al., 1989).

Figura 5 – Caracterização química por FTIR



Legenda: a) equipamento FTIR; b) posicionamento da amostra sobre o cristal para análise.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Preparo das amostras, testes e análises da segunda etapa do estudo

4.5.1 Preparo das amostras

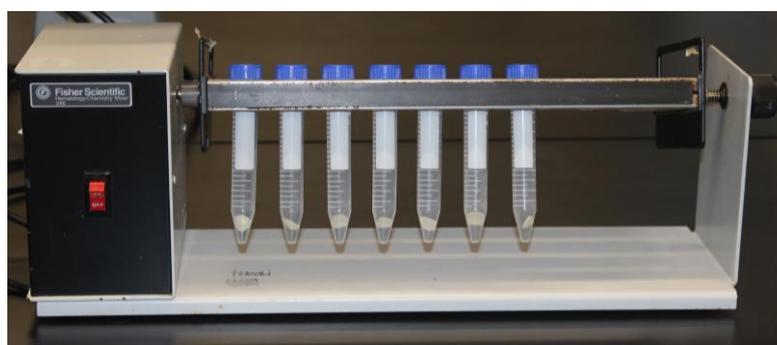
Foram utilizados doze dentes molares humanos hígidos. Os dentes foram limpos com curetas periodontais e pasta de pedra pomes e água com o auxílio de escova de Robinson, seguindo-se o armazenamento em água destilada a 4°C até

o início da pesquisa.

Os dentes foram posicionados na máquina de cortes Isomet (, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) e seccionados no terço médio da coroa paralelo ao longo eixo, a fim de se obter discos com espessura de 1 mm, com o auxílio de um disco de diamante em baixa rotação e sob refrigeração constante. Após, foi realizado o desgaste dos espécimes de dentina com discos de lixa de carboneto de silício (Extec Corp. Enfield, CT, EUA) de granulação 600, sob refrigeração abundante a 300 rpm em politriz (DP-10, Panambra, São Paulo, Brasil) até a obtenção de espécimes com $0,5 \pm 0,1$ mm, aferidos com um paquímetro (Otto-Arminger & Cia Ltda., Rio Grande do Sul, Brazil).

Cada disco de dentina foi colocado em um tubo com 15 ml de ácido fosfórico 10 % e mantidos sob agitação constante durante 40 h em um mixer (Hematology Chemistry, Fisher Scientific, EUA) em temperatura ambiente até para desmineralização e obtenção do colágeno. Após os espécimes foram lavados em água destilada durante 10 min (Figura 6).

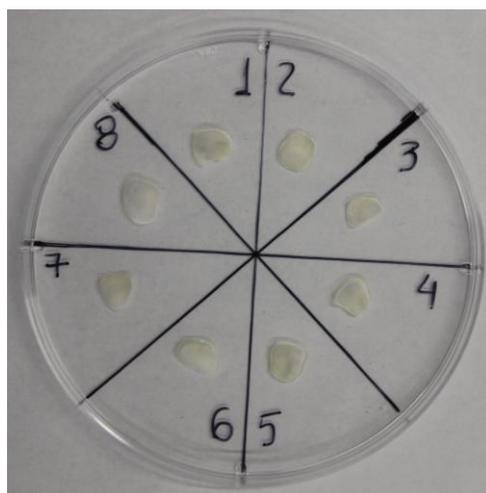
Figura 6 – Desmineralização dos discos de dentina em ácido fosfórico 10%



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os discos de colágeno foram colocados em uma placa de petri sem a tampa (Figura 7).

Figura 7 – Discos de colágeno



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os discos foram mantidos em um dissecador durante 24 h. Em seguida, a massa foi aferida utilizando uma balança analítica (Denver PI-214A Analytical Semi-micro Balance, Denver Instrument Company, Denver, Colorado, EUA). Os espécimes foram distribuídos em três grupos experimentais, de modo que ao final todos os grupos apresentavam quantidade de massa semelhante. Após os discos foram completamente reidratados em água deionizada por 1 hora a fim de recuperar o peso inicial.

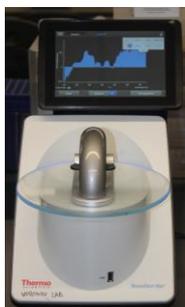
4.5.2 Protocolo de condicionamento do colágeno

O protocolo de condicionamento do colágeno foi realizado de acordo com as instruções dos fabricantes (Quadro 1). O protocolo de tratamento do grupo controle consistiu na exposição dos discos à água deionizada durante 30 s. Após a realização dos protocolos de condicionamento, os discos foram imersos em 50 ml de solução tampão (pH 7,2) durante 5 min, com o intuito de neutralizar o ácido. Após, foram então lavados com água deionizada, transferidos para eppendorfs contendo 1ml de meio de incubação, solução cálcio-zinco (5 mM HEPES, 2.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, and 0,05 mM ZnCl_2 (pH 7,2) e mantidos em estufa 37° C durante 7 dias.

4.5.3 Análises de concentração de proteína total e telopeptídeos solubilizados

Para a contagem de proteína total, foram utilizadas alíquotas de 1 μL do meio de incubação. A concentração de proteína total foi mensurada com a utilização de um espectrofotômetro Nanodrop™ One/One^c Microvolume UV-Vis Spectrophometer (Thermo *Scientific*, Wilmington, DE, USA), com o auxílio do software Protein A280 em comprimento de onda 280 nm. Para a realização das leituras, foram utilizadas alíquotas de 1 μL do meio de incubação em triplicata (Figura 8).

Figura 8 – Mensuração da concentração de proteína total no Nanodrop™



Fonte: Elaborado pelo autor.

A mensuração da degradação do colágeno foi realizada através da quantificação de fragmentos do Telopectídeo Carboxiterminal do Colágeno tipo I solubilizados (ICTP) e do Terminal-C ligado ao Telopectídeo do Colágeno tipo I (CTX). Sendo o ICTP considerado um marcador para degradação por meio da atividade das MMPs, e o CTX, indicador da degradação por meio da atividade da Catepsina-K.

Para a quantificação da concentração de ICTP liberado, o teste foi realizado em duplicata, por meio da coleta de alíquotas de 100 μ L do meio de incubação e utilização do kit ICTP ELISA (MyBiosource Inc, San Diego, USA). A fim de determinar a concentração de CTX foi quantificada em triplicata, utilizando três alíquotas de 100 μ L do meio de incubação. O kit empregado foi o CTX ELISA (MyBiosource Inc, San Diego, USA). Ambos kits foram empregados de acordo com as instruções dos fabricantes. A concentração de ICTP e CTX foi calculada em relação à quantidade de proteína total $ICTP_{PT}$ (ng/mg) e CTX_{PT} (ng/mg), sendo a leitura realizada por análise de absorvância com o auxílio de uma leitora de microplacas (Byotek™ Cytation™ 3 Cell Imaging MultiMode Reader, Fisher Scientific, EUA) (Figura 9).

Figura 9 – Análise da concentração de ICTP e CTX

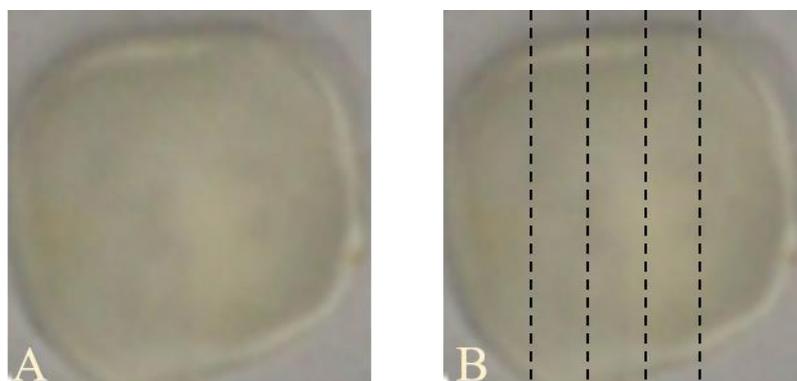


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.4 Teste de resistência à tração

Para resistência à tração, os discos de colágeno foram seccionados com o auxílio de uma lâmina de bisturi. Foram obtidos, 36 espécimes de colágeno com largura de 0,8 x 0,5 mm de espessura (Figura 10), a partir de 12 discos de dentina desmineralizada (n= 12), os mesmos utilizados que foram utilizados previamente para a análise da degradação colagenolítica. Os palitos foram medidos com o auxílio de um paquímetro (Starrett Indústria e Comércio Ltda., Itu, SP, Brasil) e colados em um suporte metálico utilizando cola de cianoacrilato em gel e acelerador. Sendo que, a manutenção da integridade da estrutura do espécime foi realizada mantendo o mesmo úmido durante todo o procedimento, desde o corte até o teste, por meio de uma gota de água deionizada na superfície.

Figura 10 – Obtenção dos palitos de colágeno



Legenda: a) matriz de dentina desmineralizada; b) representação da obtenção dos palitos de dentina desmineralizada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O ensaio foi executado em uma máquina de teste de resistência à microtração (Microtensile Tester, Bisco Inc., Texas, EUA), sujeita à uma força tensão à uma velocidade de 0,5mm/ min até o momento da completa ruptura do colágeno (Figura 11). Os valores de resistência foram obtidos em newtons, após as médias de cada grupo foram calculadas em MPa e tabelados para a realização da análise estatística.

Figura 11 – Máquina de teste de resistência à tração



Fonte: Bisco.

4.6 Preparo das amostras, testes e análises da terceira etapa do estudo

4.6.1 Preparo das amostras

Foram selecionados 72 dentes molares hígidos. Os dentes foram limpos com curetas periodontais e pasta de pedra pomes com água com o auxílio de escovas de Robinson, seguindo-se o armazenamento em água destilada a 4°C até o início da pesquisa.

Para o preparo das amostras, foi realizado um desgaste da superfície oclusal com o emprego de lixa d'água de granulação P400 (Fepa-P, Panambra, São Paulo, SP, Brasil), acoplados a uma politriz circular (DP-10, Panambra, São Paulo, SP, Brasil) a 300 rpm, sob refrigeração permanente com água a fim de criar uma superfície plana de dentina. Para padronização da *smear layer*, foram utilizados discos de lixa de carboneto de silício (Extex Corp. Enfield, CT, EUA)

de granulação 600, sob refrigeração abundante, por 10 segundos a 300 rpm.

Os dentes foram então incluídos em moldes de silicone industrial Rhodorsil (Artigos Odontológicos Clássico, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil) de formato cilíndrico com medidas internas de 1,5 cm de altura e 2,0 cm de diâmetro, preenchidos com resina acrílica quimicamente ativada incolor (Jet, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil) quando na sua fase pegajosa. Os dentes foram inseridos pelas raízes, até 1 mm abaixo da junção cimento-esmalte, de forma que a superfície oclusal ficou paralela à base da matriz de silicone. Concluída a polimerização, os espécimes foram retirados do molde. A parte superior do bloco, onde se encontra o dente embutido com a superfície oclusal desgastada foi novamente polida por 60 segundos, sob refrigeração constante, com discos de lixa d'água P600 (Fepa-P, Panambra, São Paulo, SP, Brasil), utilizando o dispositivo de polimento automático Autopol - 2 (Panambra, São Paulo, SP, Brasil) acoplado a politriz circular (DP-10, Panambra, São Paulo, SP, Brasil), a fim de garantir que a superfície polida estivesse exatamente perpendicular ao longo eixo do cilindro, para remoção de resíduos e padronizar a *smear layer* para a realização do procedimento restaurador.

4.6.2 Procedimento restaurador

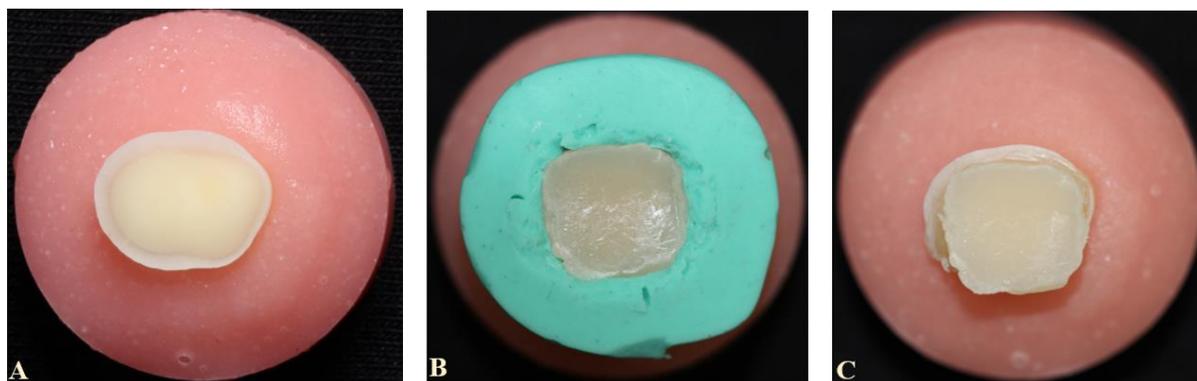
Os procedimentos adesivos e restauradores realizados seguiram o protocolo conforme as recomendações do fabricante (Quadro 1).

Após os procedimentos adesivos, a resina foi inserida em incrementos de 2 mm em uma matriz de silicone com dimensões de 4 x 4 x 2 mm. Cada incremento foi fotopolimerizado por 20 s com o fotopolimerizador Demi LED

Light Curing System (Kerr, KaVo do Brasil Indústria e Comércio Ltda., Joinville, SC, Brasil), a uma densidade de potência de 1100 mW/cm^2 . A densidade de potência foi verificada a cada 10 fotopolimerizações por um radiômetro LED (Kondortech, São Carlos, SP, Brasil). Para complementar a polimerização da resina, após a remoção da matriz de silicone, o bloco foi fotopolimerizado por mais 40 s (Figura 12).

Finalizado o procedimento restaurador, os espécimes foram armazenados em água destilada, em estufa bacteriológica, a 37° C . Os grupos correspondentes ao tempo imediato foram submetidos aos testes após 48 h de armazenamento (Singh et al., 2010). Em contrapartida, os demais grupos foram armazenados por um período de 12 meses, com troca de água semanal até a realização dos testes e análises propostos.

Figura 12 – Restauração em resina composta



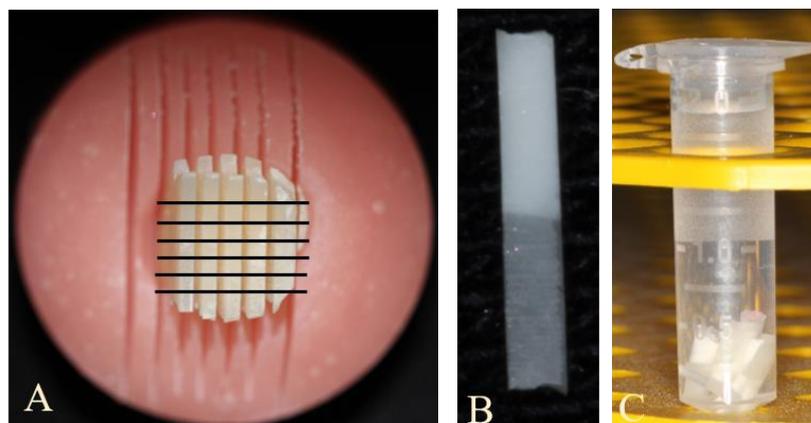
Legenda: a) espécime de dentina; b) inserção da resina composta com o auxílio de uma matriz de silicone; c) espécime restaurado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6.3 Teste de resistência à microtração

Os dentes (N=48) incluídos em resina foram posicionados na Labcut 1010 (Extec Technologies Inc., Enfield, CT, EUA) para a realização de cortes paralelos no longo eixo da coroa, em baixa velocidade e sob refrigeração, de aproximadamente 0,8 mm de espessura nos sentidos mésiodistal e vestibulo-lingual (Figura 13 A) , a fim de se obter palitos de resina composta e dentina (Figura 13 B). Os palitos de resina-dentina obtidos de cada espécime foram armazenados em tubos identificados (vol. 2 mL) do tipo Eppendorf (Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil), em estufa a 37° C, em água deionizada por 24 h antes do teste de microtração (Figura 13 C).

Figura 13 – Preparo dos palitos para o teste de microtração

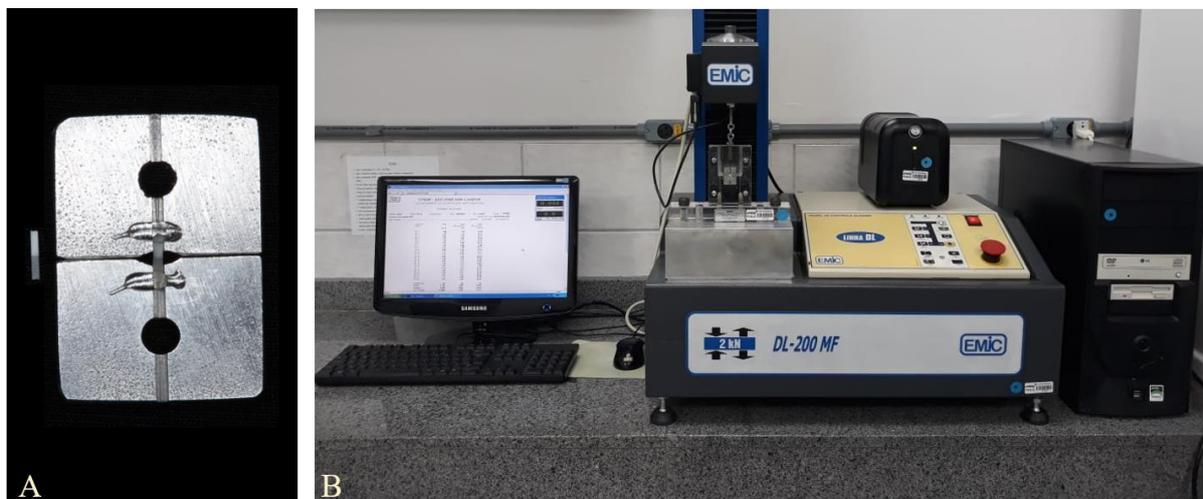


Legenda: a) espécime com cortes realizados paralelamente ao longo eixo do dente; b) palito com espessura de $\pm 0,8$ mm; c) armazenamento dos palitos em eppendorfs.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Previamente ao ensaio de microtração, a área de todos os palitos foi medida com um paquímetro digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., Itu, SP, Brasil). A resistência de união à tração foi calculada, em megapascal (MPa), por meio da fórmula: $R_m = F/A$, na qual: R_m é a resistência à microtração; F é a força aplicada, ou seja, o valor da carga (KgF) para rompimento da união adesiva; e A é a área de união (mm^2). Em seguida, cada palito foi fixado pelas extremidades, com cola de cianoacrilato em gel (454 Loctite), em um dispositivo metálico OD03d (Figura 14 A; *Odeme Equipamentos Médico e Odontológicos Ltda.*, Joaçaba, SC, Brasil). Para o ensaio de microtração na máquina de ensaios universal EMIC DL-1000 (*Equipamentos e Sistemas Ltda.*, São José dos Pinhais, PR, Brasil), foi utilizada uma célula de carga de 10 KgF, a uma velocidade de 0,5 mm/min, preconizada pela ISO/TR 11405:1994 (Figura 14 B). Os valores referentes à resistência de união em MPa foram coletados e tabelados para a realização da análise estatística.

Figura 14 – Máquina de ensaios universal utilizada para realização do teste de resistência à microtração



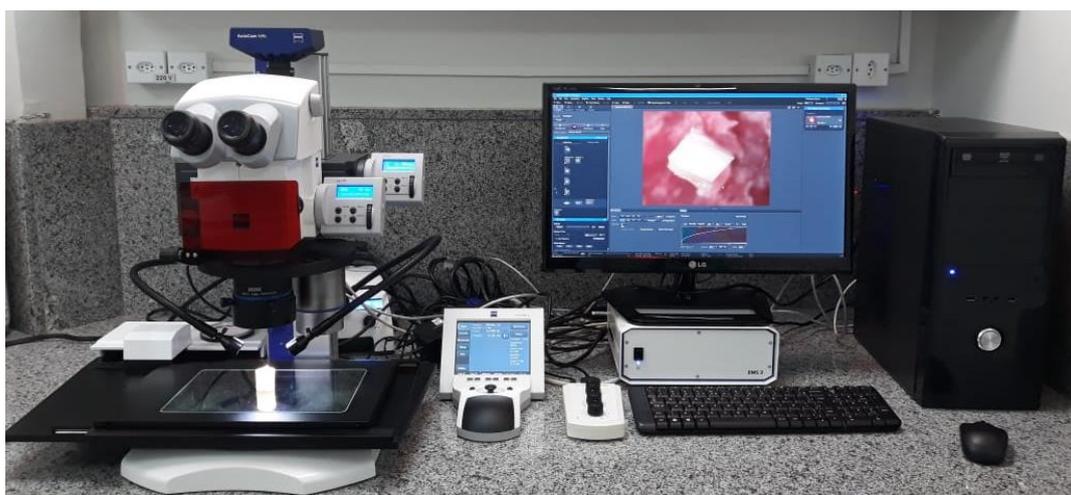
Legenda: a) palito fixado pelas extremidades com cola cianoacrilato no dispositivo metálico; b) EMIC.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os palitos fraturados após a realização do teste de microtração foram analisados em estereomicroscópio X20 (Stemi 2000 – Karl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemanha) com aumento de 50 vezes, para análise de fratura (Figura 15). Seguindo-se o seguinte padrão:

- **Coesiva em RC:** predominantemente ($\leq 75\%$) no interior da resina composta;
- **Coesiva em Dentina:** predominantemente ($\leq 75\%$) no interior da dentina;
- **Adesiva:** predominantemente na interface na interface ($\leq 75\%$);
- **Mista:** sem predominância de qualquer tipo de falha.

Para análise estatística foram consideradas apenas as falhas adesivas e mistas. Sendo que, as falhas pré-teste foram excluídas da análise.

Figura 15 – Análise de fraturas (50 X) em estereomicroscópio



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6.4 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise da interface adesiva frente aos diferentes condicionamentos, foram preparados dois espécimes de cada grupo (n=12) para observação em MEV. Os dentes foram seccionados horizontalmente a fim de remove-los da resina acrílica e, em seguida, perpendicularmente a interface adesiva.

Para observação da interface adesiva, cada espécime teve sua interface polida com discos de lixas d'água de granulação 1200 e 4000 (Extec Corp., Enfield, CT, EUA), em politriz circular, sob refrigeração. Em seguida, os espécimes foram condicionados com ácido fosfórico 37% sem sílica (Ataque Gel 37%, Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, Iporã, PR, Brasil) durante 15 s e lavados com água durante 15 s, promovendo a remoção da *smear layer* e facilitando a visualização da interface adesiva em MEV. Os espécimes foram mantidos em campanulas de vidro com sílica por sete dias para desidratação. Em sequência, foram montados em *stubs* de alumínio, e foi depositada, em vácuo, uma camada de 4 nm de liga Au-Pd sobre a superfície (Emitech SC7620 Sputter Coater, Moorestown, NJ, EUA) (Marimoto et al., 2013). Os espécimes foram observados em microscópio eletrônico de varredura (Inspect S50, FEI, Hillsboro, Oregon, EUA), com 20 KV de potência, empregando aumento de 2000 X, considerando a interface adesiva. As imagens foram coletadas através de um computador acoplado ao MEV.

4.6.5 Análise de nanoinfiltração por MEV

Para análise de nanoinfiltração, foram preparados dois espécimes de cada grupo (n=12). Fatias de resina/dentina de aproximadamente 2 mm de espessura foram obtidas a partir das hemi-coroas, através da cortadeira de precisão Labcut 1010 (Extec Technologies Inc., Enfield, CT, EUA). As fatias foram imersas em solução de nitrato de prata por 24 h, mantidas em câmara escura. Após este passo, as fatias foram lavadas e imersas numa solução reveladora por 8 h com luz fluorescente a fim de reduzir íons de prata em grãos ao longo da interface. Em seguida, os espécimes foram imersos por mais 8 h em solução reveladora. Os espécimes permaneceram em umidade relativa de 100% até o momento do preparo dos espécimes para o MEV (metodologia descrita no tópico anterior). Os espécimes foram avaliados em aumento de 2.000 X (Yuan et al., 2007).

O padrão de nanoinfiltração foi observado em MEV e avaliado qualitativamente pelo uso de escores.

- **0** – Sem nanoinfiltração;
- **1** – Pouca nanoinfiltração (< 25% da área avaliada);
- **2** – Média nanoinfiltração (25% ≤ 50% da área avaliada);
- **3** – Grande nanoinfiltração (> 50% da área avaliada).

4.7 Planejamento estatístico

4.7.1 Análise estatística da segunda etapa

Para análise estatística da segunda etapa, da concentração de ICTP e CTX foram consideradas as médias de cada grupo experimental, com um esquema fatorial do tipo 1 x 3. A variável experimental considerada foi o protocolo de condicionamento dentinário, apresentando três categorias: ácido fosfórico, poliacrílico e água deionizada (controle). Para análise da resistência à tração do colágeno, foi considerada a unidade dente (Eckert and Platt, 2007) para obtenção das médias de cada espécime. As variáveis resposta consideradas foram ng ICTP/mg proteína total, ng CTX/mg proteína total e MPa. A unidade experimental considerada foi o colágeno (n=4).

Os dados foram submetidos à análise estatística pelo programa Graphpad Prism (versão 6, 2010; La Jolla, CA, EUA). A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvio padrão. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade. A estatística inferencial consistiu nos testes: análise de variância ANOVA 1 fator (protocolo de condicionamento dentinário) e Tukey com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), para verificar diferenças estatisticamente significantes entre as condições experimentais.

4.7.2 Análise estatística da terceira etapa

Para a análise estatística da terceira etapa, para resistência à microtração foi considerada a unidade dente (Eckert and Platt, 2007). Seguiu-se um esquema fatorial do tipo 3 x 2. As variáveis experimentais foram o protocolo de condicionamento dentinário e o tempo. O primeiro fator, relativo ao protocolo de condicionamento, apresentou 3 categorias: ácido fosfórico, ácido poliacrílico e autocondicionamento. O segundo fator, relativo ao tempo de avaliação, apresentando duas categorias: 24 horas e 1 ano. Sendo considerada a variável resposta o valor, em MPa, da resistência adesiva à microtração. A unidade experimental foi a dentina do molar humano (n=8). Assim, foram obtidas as médias em MPa das 3 repetições.

Os dados foram submetidos à análise estatística pelo programa Graphpad Prism (versão 6, 2010; La Jolla, CA, EUA). A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvio padrão. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade. A estatística inferencial consistiu nos testes: análise de variância (ANOVA) sob 2 fatores (protocolo de condicionamento dentinário e tempo) e Tukey com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), para verificar diferenças estatisticamente significantes entre as condições experimentais.

5 RESULTADOS

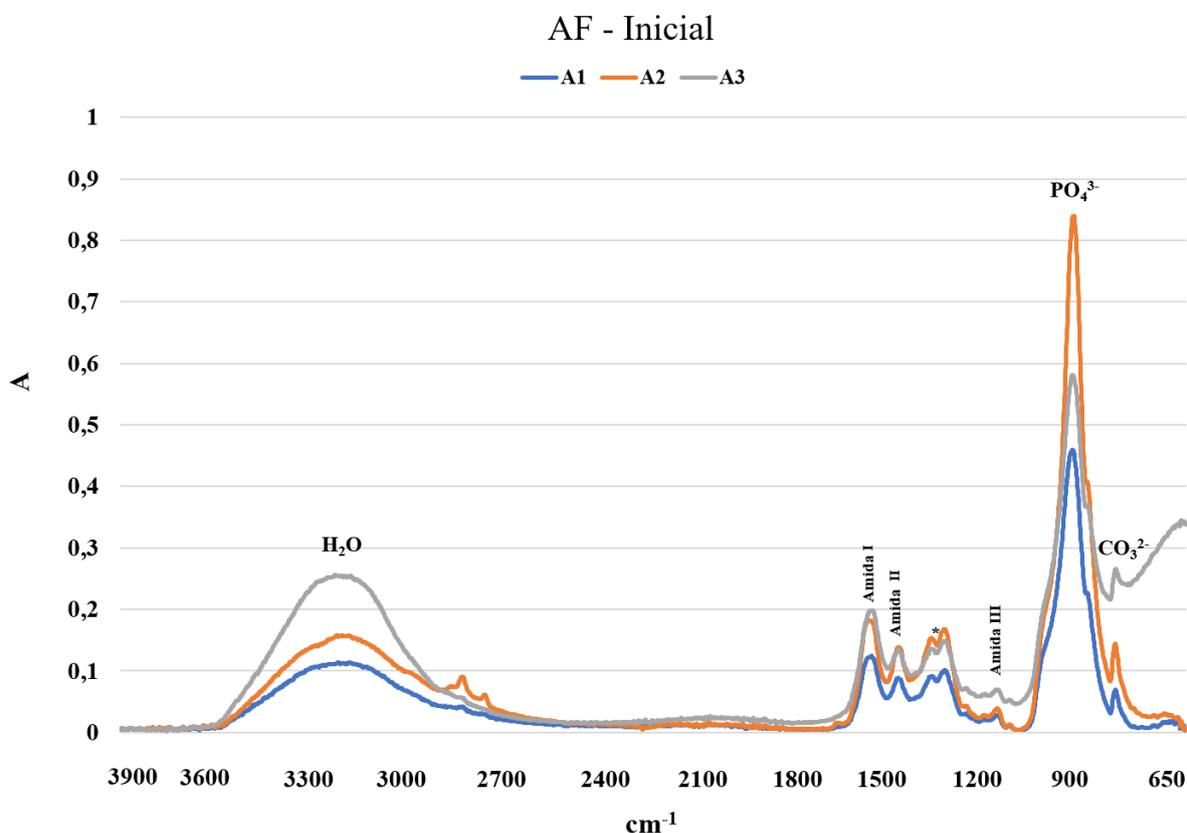
A análise dos resultados foi realizada em três etapas, como planejado previamente, a fim de facilitar a compreensão.

5.1 Primeira etapa – Caracterização química do substrato dentinário por espectroscopia FTIR

Os gráficos referentes aos picos de absorvância da dentina antes e após os diferentes protocolos de condicionamento estão representados nas Figuras 16, 17, 18 e 19 bem como, os dos grupos fosfato (entre 900 e 1200 cm^{-1}), carbonato (870 e 1070 cm^{-1}), amida (I, II e III; entre 1200 e 1700 cm^{-1}) e a região dos anéis pirrolidínicos (1450 cm^{-1}).

A análise da dentina previamente à aplicação do condicionamento com AF, os picos de absorvância do grupo fosfato apresentou absorvância com intensidade acima de 0,4 A e o carbonato variou sua intensidade atingindo o pico de 0,2 A. As amidas I e II variaram entre 0,1 e 0,2 A bem como, a região dos anéis pirrolidínicos (Figura 16). Já a amida III apresentou pico de intensidade inferior a 0,1 A.

Figura 16 - Representação gráfica dos picos de absorvância (A) da dentina previamente ao condicionamento com AF

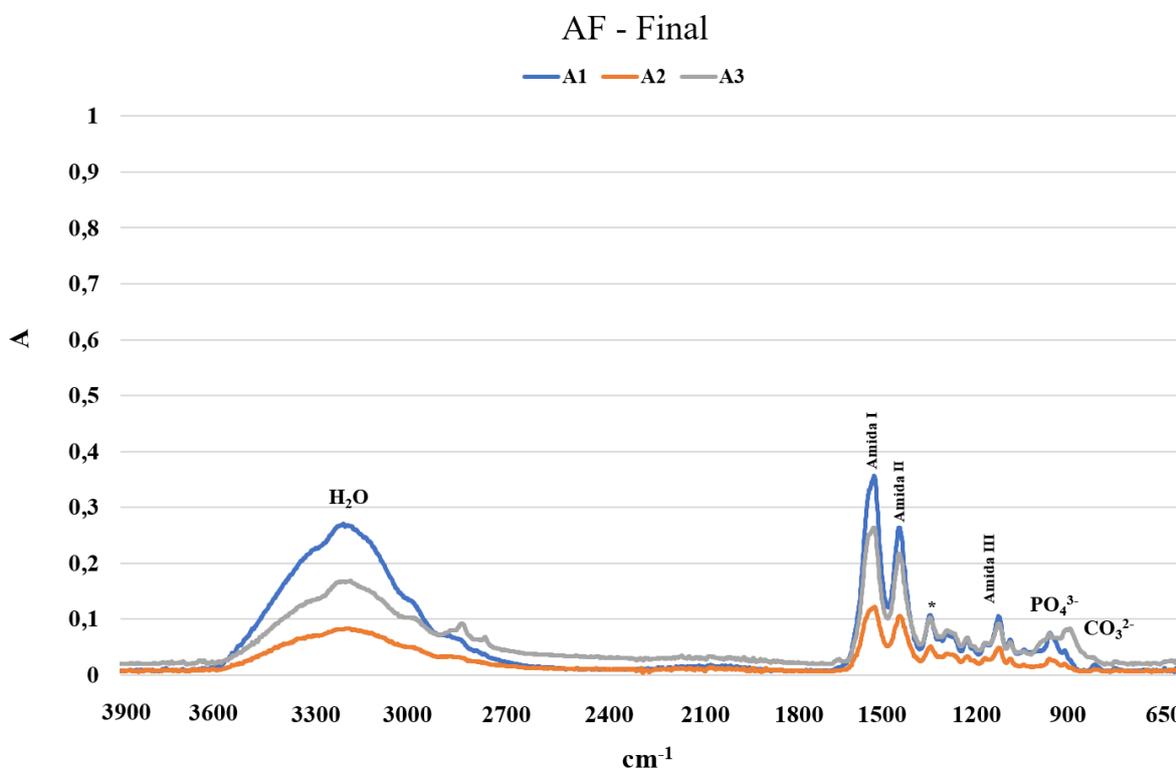


Legenda: H₂O: água; PO₄³⁻: grupo fosfato; CO₃²⁻: grupo carbonato; *: Região dos anéis pirrolidínicos (prolina e hidroxiprolina).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a análise da dentina após à aplicação do condicionamento com AF, os picos de absorvância do grupo fosfato e carbonato apresentaram redução na absorvância com intensidade abaixo de 0,1 A. Enquanto que, o inverso ocorreu com as amidas I, II e III que variaram entre 0,1 e 0,35 A bem como, a região dos anéis pirrolidínicos que apresentou pico de intensidade próximo a 0,1. A razão encontrada para Amida III/ Anéis pirrolidínicos foi igual a 0,95 (Figura 17).

Figura 17 - Representação gráfica dos picos de absorvância (A) da dentina após o condicionamento com AF

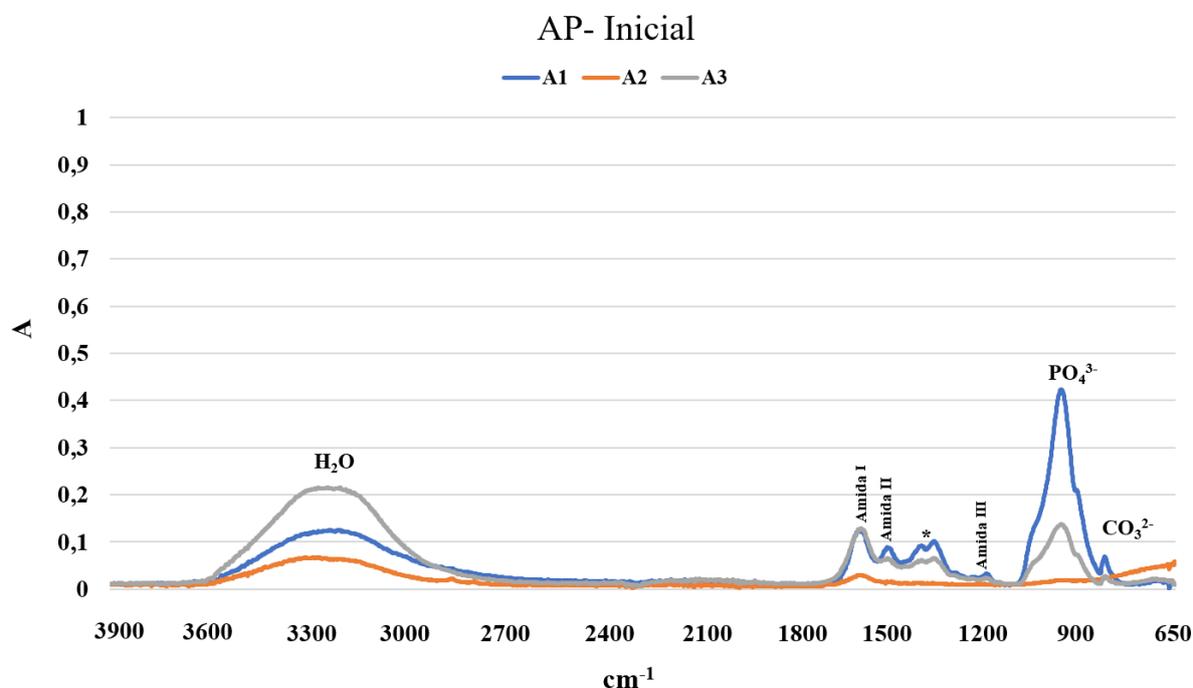


Legenda: H₂O: água; PO₄³⁻: grupo fosfato; CO₃²⁻: grupo carbonato; *: Região dos anéis pirrolidínicos (prolina e hidroxiprolina).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise da dentina previamente à aplicação do condicionamento com AP, os picos de absorvância do grupo fosfato apresentou absorvância com intensidade máxima de aproximadamente 0,4 A, o carbonato apresentou o pico de intensidade abaixo de 0,1 A. O grupo amida (I, II e III) exibiu intensidade de em torno de 0,1 A bem como, a região dos anéis pirrolidínicos (Figura 18).

Figura 18 - Representação gráfica dos picos de absorbância (A) da dentina previamente condicionamento com AP

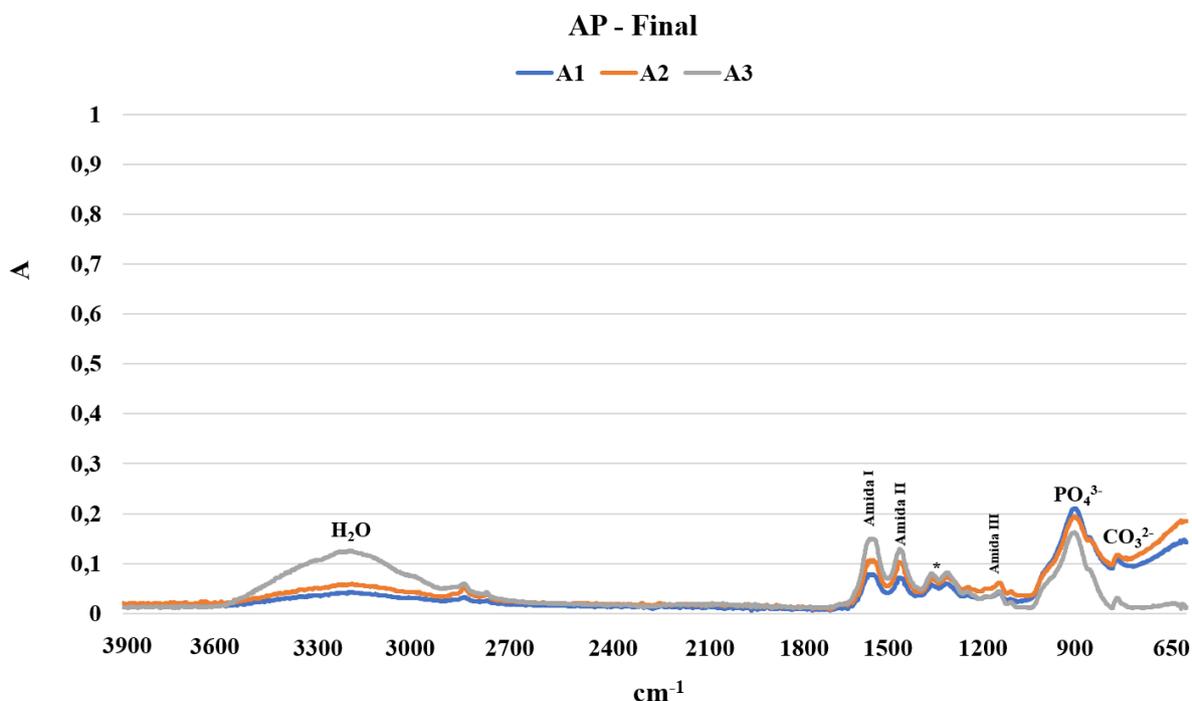


Legenda: H₂O: água; PO₄³⁻: grupo fosfato; CO₃²⁻: grupo carbonato; *:Região dos anéis pirrolidínicos (prolina e hidroxiprolina).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a análise da dentina após à aplicação do condicionamento com AF, o pico de absorbância do grupo fosfato sofreu redução exibindo intensidade de aproximadamente 0,2 A enquanto que, o pico de intensidade do grupo carbonato apresentou aumento na intensidade atingindo o máximo de 0,1 A. O grupo amida (I, II e III), exibiu pequena elevação no seu pico se mantendo em torno de 0,1 A, já a região dos anéis pirrolidínicos apresentou pequena redução na intensidade de absorção ficando abaixo de 0,1 A. A razão encontrada para Amida III/ Anéis pirrolidínicos foi igual a 0,80 (Figura 19).

Figura 19 - Representação gráfica dos picos de absorbância (A) da dentina após o condicionamento com AP



Legenda: H₂O: água; PO₄³⁻: grupo fosfato; CO₃²⁻: grupo carbonato; *: Região dos anéis pirrolidínicos (prolina e hidroxiprolina).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Segunda etapa – Análise da degradação colagenolítica

5.2.1 Análise da concentração de proteínas, telopeptídeos solubilizados e resistência à tração

As médias referentes as concentrações de proteína total, ICTP, CTX, ICTP_{PT}, CTX_{PT} e resistência a tração, estão apresentados numericamente na tabela 1 e graficamente nas figuras 20, 21 e 22. A análise estatística para ICTP_{PT}

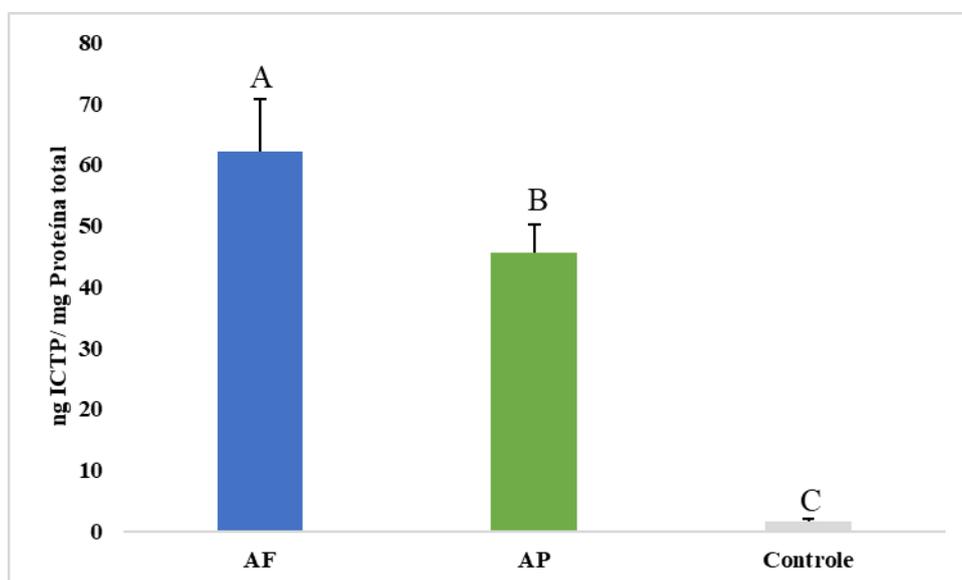
mostrou que houve diferença estatística entre os grupos AF ($62,17 \pm 8,64$ ng/ mg)^A, AP ($45,68 \pm 4,46$ ng/ mg)^B e controle ($1,55 \pm 0,38$ ng/ mg)^C ($p < 0,05$). A análise estatística para CTX_{PT} mostrou que o grupo AF ($1,13 \pm 0,32$ ng/ mg)^A não diferiu estatisticamente do AP ($0,74 \pm 0,18$ ng/ mg)^A contudo, ambos diferiram do controle ($0,02 \pm 0,005$ ng/ mg)^B ($p > 0,05$). Os valores de resistência a tração do colágeno (Figura 21) foram significativamente menores para AF ($1,03 \pm 0,20$ MPa)^A quando comparados a AP ($1,65 \pm 0,33$ MPa)^B e controle ($1,84 \pm 0,15$ MPa)^B. O grupo AP não diferiu significativamente do grupo controle ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Média (desvio padrão) das concentrações de proteína total (PT), ICTP, CTX, ICTP_{PT}, CTX_{PT} e resistência a tração

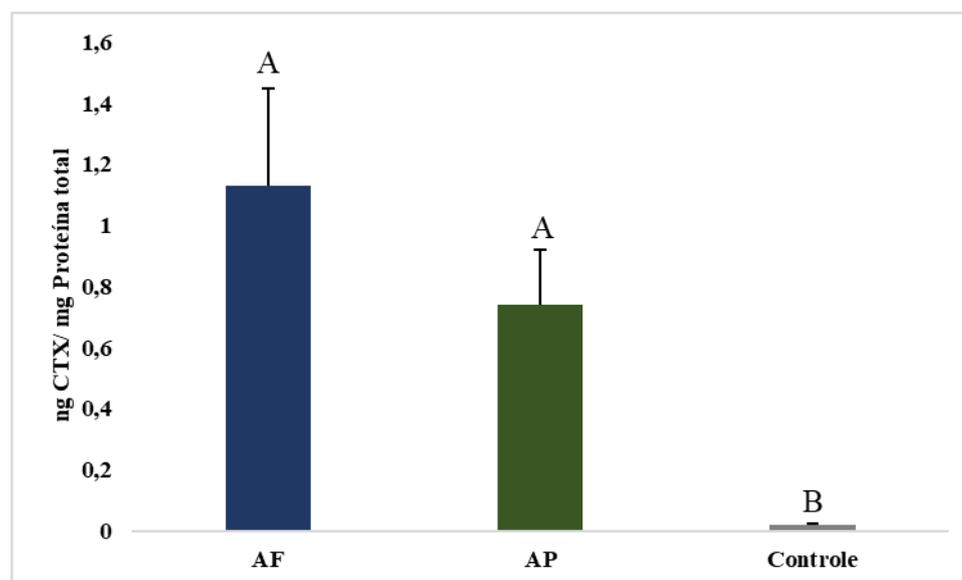
Grupos	PT (mg)	ICTP (ng)	ICTP_{PT} (ng/mg)	CTX (ng)	CTX_{PT} (ng/mg)	RT MPa
AF	0,040 (0,006)	2,49 (0,10)	62,17 ^A (8,64)	0,04 (0,03)	1,13 ^A (0,32)	1,03 ^A (0,20)
AP	0,05 (0,004)	2,27 (0,04)	45,68 ^B (4,46)	0,03 (0,006)	0,74 ^A (0,18)	1,65 ^B (0,33)
Controle	1,329 (0,295)	1,98 (0,02)	1,55 ^C (0,38)	0,02 (0,001)	0,02 ^B (0,005)	1,84 ^B (0,15)

Legenda: as letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas nas colunas. $\alpha = 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

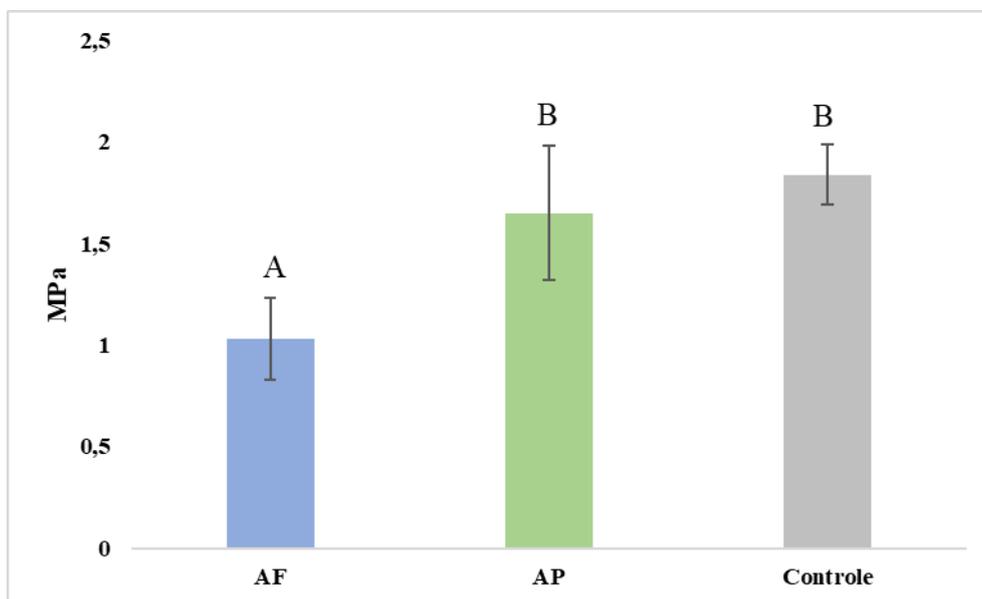
Figura 20 – Concentração de ICTP_{PT} liberado dos discos de colágeno

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 – Concentração de CTX_{PT} liberado dos discos de colágeno

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 – Resistência à tração do colágeno em MPa



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Terceira etapa – Análise da interface adesiva

5.3.1 Análise da resistência de união por meio do teste de microtração e fractografia

A tabela 2 apresenta os resultados para a análise de variância. Sendo que, de acordo com os resultados obtidos não houve uma interação estatisticamente significativa ($p = 0,28$) entre os fatores Tempo (24 horas e 12 meses) e tipo de Tratamento (AF, AP e SE). O fator tempo mostrou-se estatisticamente significativo ($p < 0,0001$) para o estudo. Contudo, o mesmo não foi verdadeiro quando verificada a influência do fator tratamento ($p = 0,48$).

Tabela 2 – Tabela de Análise de Variância (ANOVA 2-Fatores)

Fontes de Variação	GL	Soma Quadrática	Média Quadrática	F	Valor de P
Tempo	1	2480	2480	38,49	< 0,0001*
Tratamento	2	93,70	46,85	0,74	0,48
Interação	2	166,7	83,37	1,29	0,28
Resíduo	42	2706	64,43		

Legenda: *p < 0,0001 indica diferença estatisticamente significativa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na tabela 3 estão apresentados os valores em MPa, de média e desvio padrão da resistência de união obtida através do teste de microtração, para os grupos correspondentes aos períodos de análise imediata (24h) e 12 meses. As maiores médias foram apresentadas pelos grupos de análise imediata, sendo elas respectivamente: SE ($45,52 \pm 8,91$)^A, AP ($43,51 \pm 4,95$)^A e AF ($40,13 \pm 8,94$)^A. A análise após 12 meses de armazenamento constatou a queda dos valores de resistência de união, exibindo as seguintes médias em ordem decrescente: AF ($30,06 \pm 8,32$)^A, SE ($30,35 \pm 6,66$)^A, AP ($24,35 \pm 7,08$)^A. Embora haja uma diferença numérica, a análise estatística não apontou diferença estatisticamente significativa intragrupos analisados ($p > 0,05$). A figura 23 representa a análise graficamente.

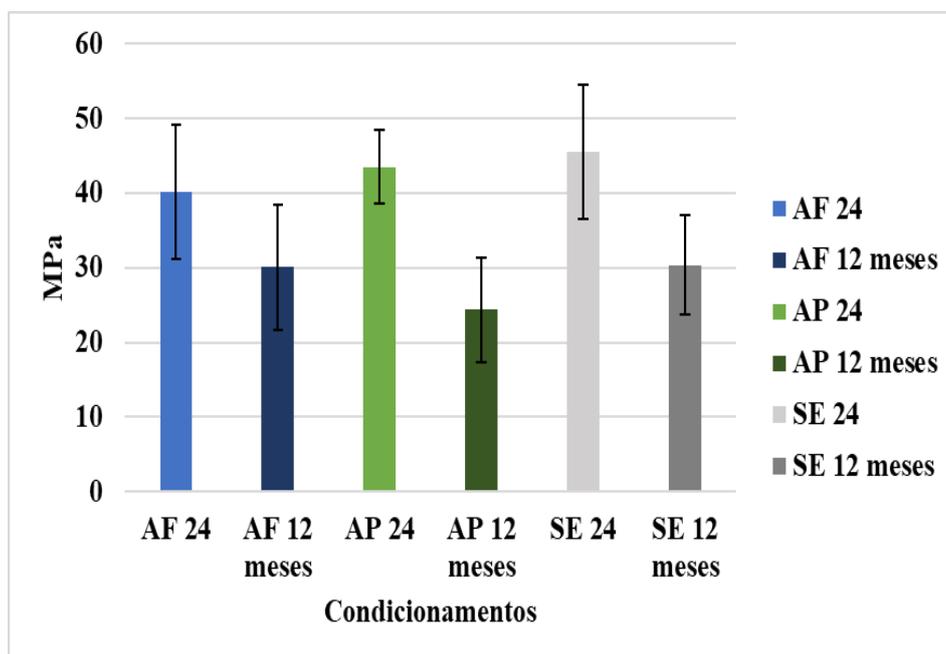
Tabela 3 – Análise da resistência de união – Média \pm Desvio Padrão teste de Tukey

Grupos	24 horas	12 meses
AF	40,13 \pm 8,94 MPa ^A	30,06 \pm 8,32 MPa ^A
AP	43,51 \pm 4,95 MPa ^A	24,35 \pm 7,08 MPa ^A
SE	45,52 \pm 8,91MPa ^A	30,35 \pm 6,66 MPa ^A

Legenda: as letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas nas colunas. $\alpha=0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 - Representação gráfica da análise de resistência de união (MPa)

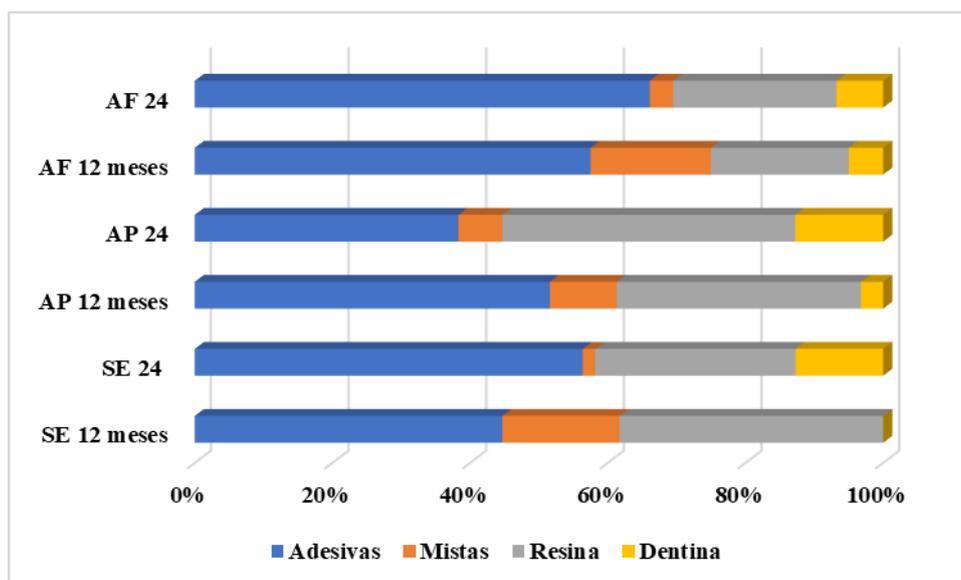


Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que: a falha adesiva foi a mais frequente em todos os grupos.

De acordo com a análise fractográfica (Figura 24), as fraturas adesivas associadas às mistas foram as mais abundantes, para o tempo imediato, nos grupos AF (aproximadamente 70%) e SE (58%), porém AP apresentou maior ocorrência de falhas coesivas em resina (42%) e dentina (13%). Após 12 meses de armazenamento, AF apresentou 75 % de falhas adesivas associadas às mistas e AP 62 %. Contudo, SE mostrou um aumento na incidência de falhas coesivas em resina (38,3 %).

Figura 24 - Representação gráfica da análise da distribuição de fraturas em porcentagem (%)

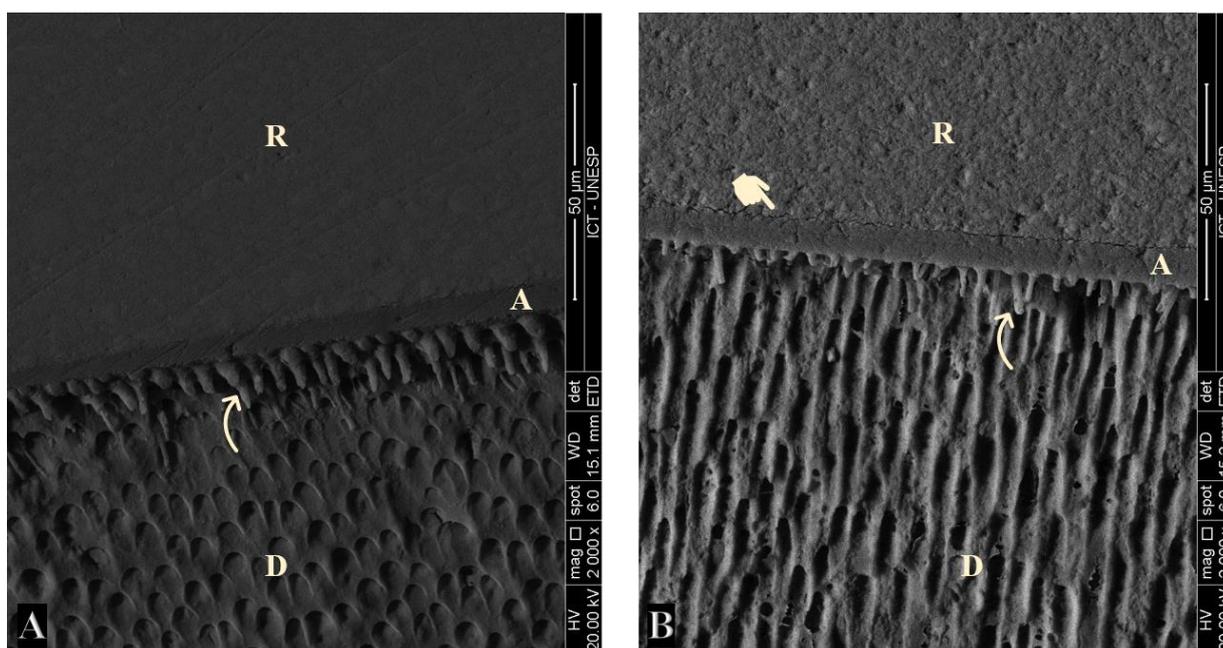


Fonte: Elaborado pelo autor (Excel - Microsoft Office 365 ProPlus).

5.3.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise comparativa da interface adesiva para o grupo AF em ambos os períodos (Figura 25 A e B), mostrou que a interface adesiva após um ano de armazenamento em água ainda apresentava numerosos *tags* resinosos, integridade da camada adesiva exibindo pequeno indício de degradação no topo.

Figura 25– Imagens ilustrativas da interface adesiva do grupo AF



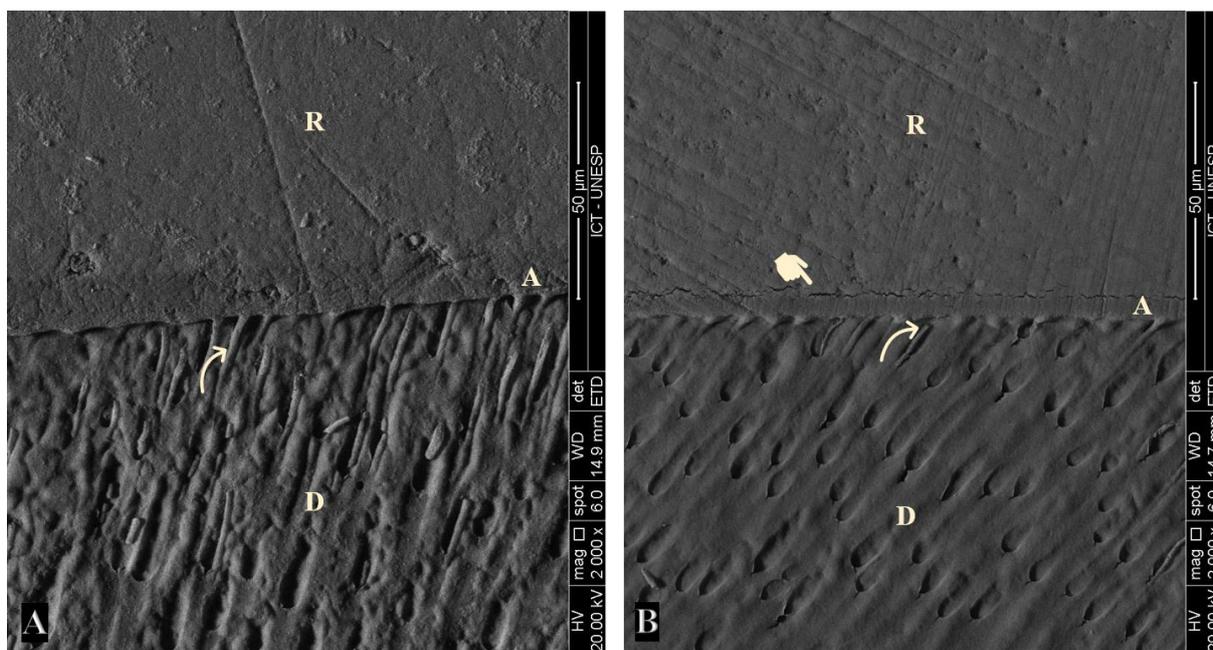
Legenda: A) Grupo AF 24h; B) Grupo AF 12 meses. R: resina; A: adesivo; D: dentina; Seta: *tag* resinoso; Indicador: degradação no topo da camada de adesivo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise do grupo AP (Figura 26 A e B), apresentou significativa alteração quando comparados os diferentes tempos. Após 12 meses, houve a diminuição do número de *tags* resinosos bem como, se pode notar sinais de

degradação no topo da camada adesiva.

Figura 26 – Imagens ilustrativas da interface adesiva do grupo AP

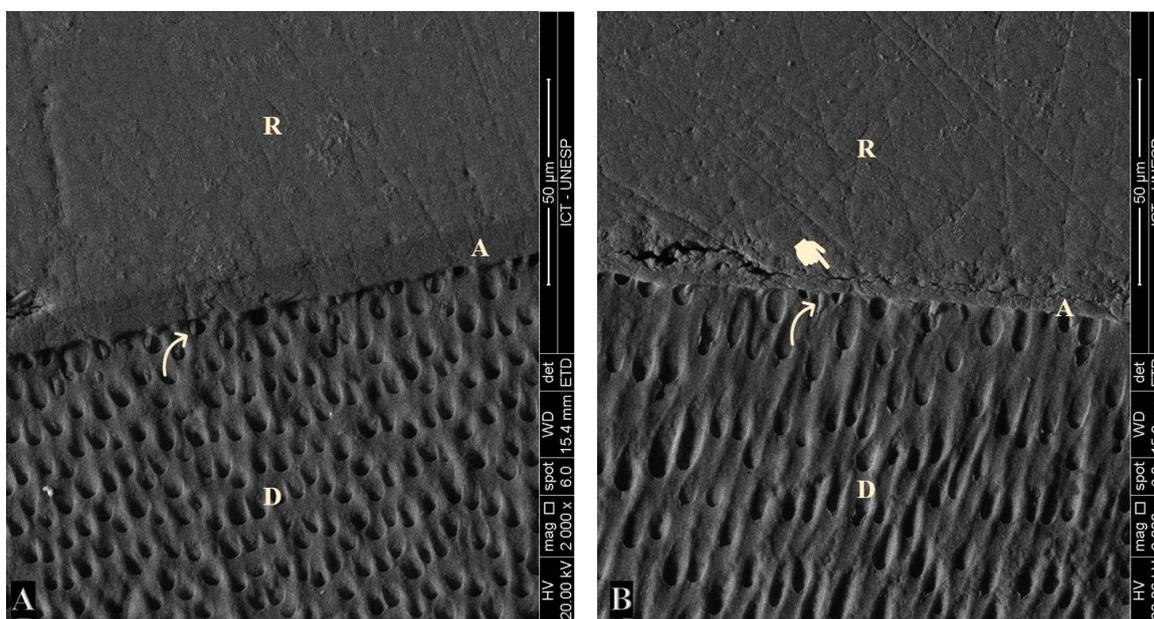


Legenda: A) Grupo AP 24h; B) Grupo AP 12 meses. Legenda: A) Grupo AF 24h; B) Grupo AF 1 ano. R: resina; A: adesivo; D: dentina; Seta: tag resinosa; Indicador: degradação no topo da camada de adesivo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise da interface adesiva do grupo SE (Figura 27 A e B) para o período imediato mostrou poucos e pequenos tags resinosos, perfil característico de sistemas adesivos autocondicionantes. Já a análise da interface após 12 meses de armazenamento apresentou redução da camada adesiva com indícios de degradação no topo da mesma.

Figura 27 – Imagens ilustrativas da interface adesiva do grupo SE



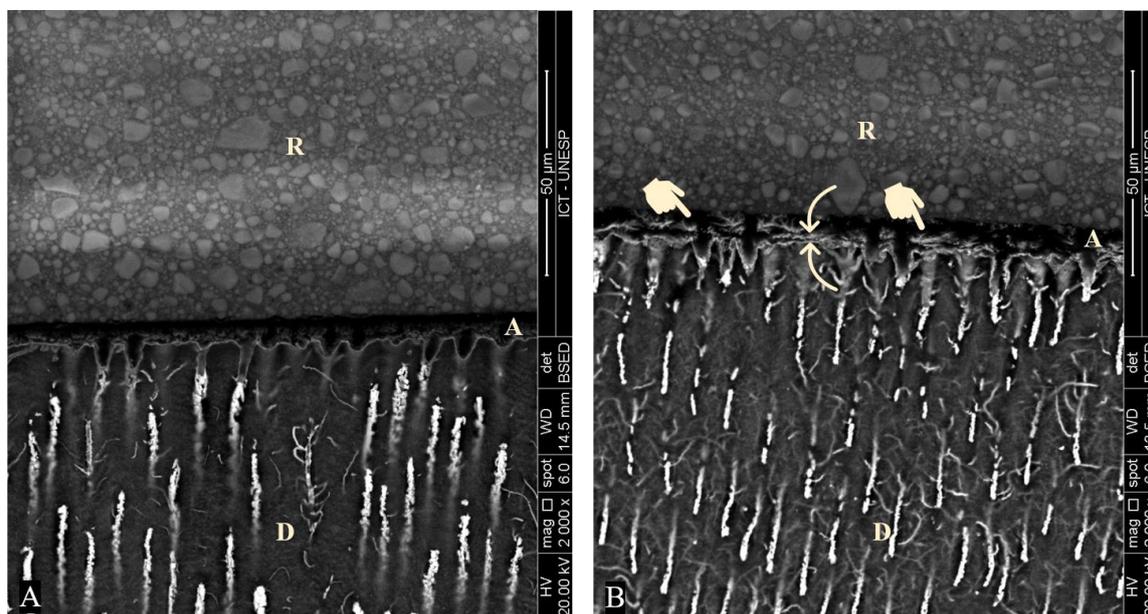
Legenda: A) Grupo SE 24h; B) Grupo SE 12 meses. Legenda: A) Grupo AF 24h; B) Grupo AF 1 ano. R: resina; A: adesivo; D: dentina; Seta: tag resinosa; Indicador: degradação no topo da camada de adesivo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 Análise de nanoinfiltração por MEV

A análise da nanoinfiltração da interface adesiva para o grupo AF em ambos os períodos (Figura 28 A e B), mostrou considerável índice de nanoinfiltração após 12 meses de armazenamento. Para o período de 24 h, não foi detectado nenhum indício de nanoinfiltração (score 0) contudo, após 12 meses de armazenamento mais de 50 % da interface apresentou sinal de nanoinfiltração (score 3).

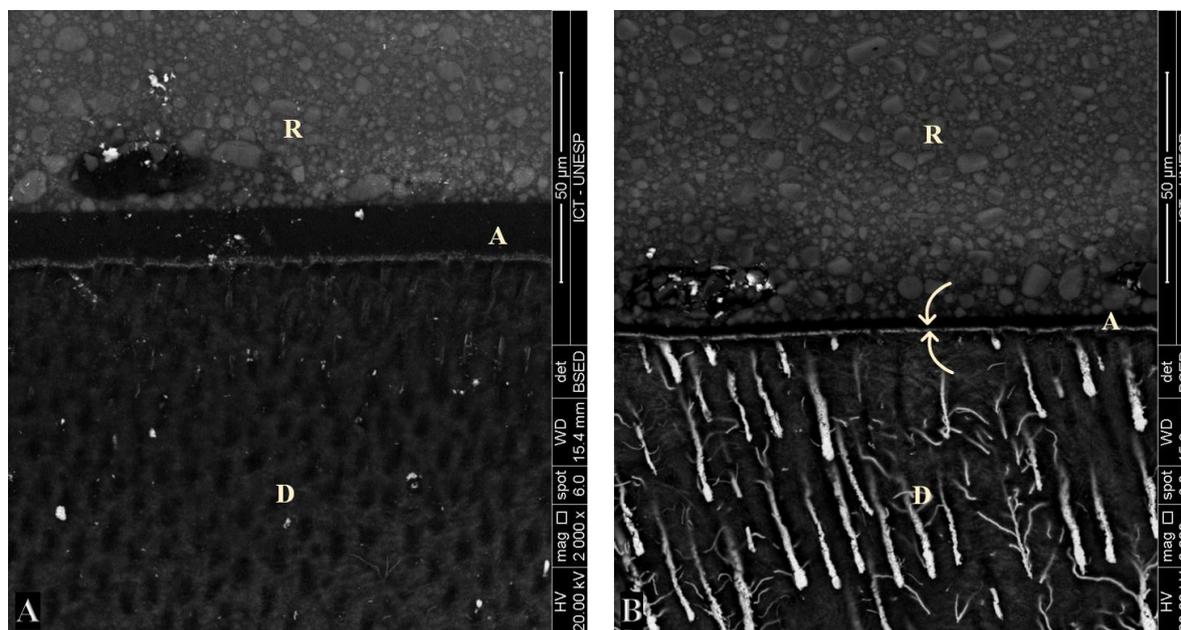
Figura 28 – Imagens ilustrativas da nanoinfiltração do grupo AF



Legenda: A) Grupo AF 24h; B) Grupo AF 12 meses. R: resina; A: adesivo; D: dentina; Setas: espessura da camada infiltrada por prata; Indicador: regiões de acúmulo de prata na interface adesiva. Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o grupo AP, a análise da nanoinfiltração da interface adesiva em ambos os períodos (Figura 29 A e B) apresentou diferença entre os períodos de armazenamento. Para o período de 24 horas, não foi detectado nenhum indicio de nanoinfiltração (score 0) contudo, após 12 meses a interface exibiu mais de 50 % de nanoinfiltração na área avaliada (score 3).

Figura 29 – Imagens ilustrativas da nanoinfiltração do grupo AP

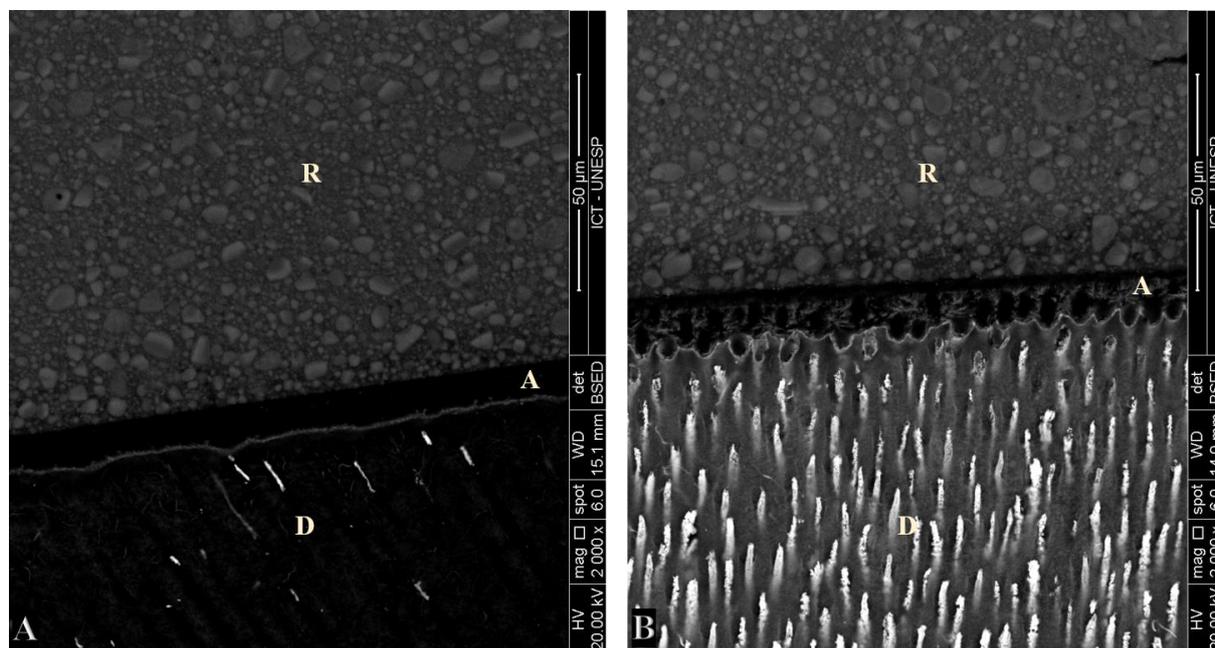


Legenda: A) Grupo AP 24h; B) Grupo AP 12 meses. R: resina; A: adesivo; D: dentina; Setas: espessura da camada infiltrada por prata.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O grupo SE (Figura 30 A e B) para o período de 24 h não apresentou nanoinfiltração (score 0). E após 12 meses de armazenamento, o índice se manteve igual sem alteração do score (0).

Figura 30 – Imagens ilustrativas da nanoinfiltração do grupo SE



Legenda: A) Grupo SE 24h; B) Grupo SE 12 meses. R: resina; A: adesivo; D: dentina.
Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

A odontologia adesiva tem avançado a cada dia, através dos esforços de cientistas ao redor do mundo que não se contentam apenas em comodamente aceitar fundamentos já estabelecidos, mas que se prestam a constantemente questionar os “comos” e os “porquês”, a fim de compreender de onde viemos, onde estamos e traçar rotas para o conhecimento ainda não alcançado.

Assim sendo, realizamos este estudo a fim de compreender não apenas o efeito dos diferentes protocolos de condicionamento na resistência de união à dentina, mas também visando entender como o condicionamento ácido poderia afetar a disponibilização de minerais na dentina; qual seria o seu efeito nas fibras colágenas, abundantemente presentes na dentina e protagonistas na formação da camada híbrida; o impacto desses condicionadores na ativação das enzimas endógenas e de que modo afetariam a qualidade da interface adesiva.

O estudo das características físico-químicas do substrato dentinário é essencial para a compreensão do mecanismo de adesão, pois a formação da interface resina-dentina envolve uma série de tratamentos no substrato que alteram completamente suas propriedades. A dentina que é hidrofílica, cristalina, relativamente impermeável e ácido-lábil antes do condicionamento, se torna mais hidrofóbica, orgânica, altamente permeável e ácido-resistente após o procedimento adesivo (Breschi et al., 2018; Frassetto et al., 2016). Além disso, a literatura ainda não é consensual quanto à possibilidade das fibrilas colágenas serem desnaturadas durante o condicionamento ácido (El Feninat et al., 1998; Habelitz et al., 2002; Yang et al., 2005).

Nesse estudo foi realizada a caracterização química do substrato dentinário por espectroscopia FTIR, antes e após a realização dos diferentes protocolos de condicionamento ácido. De acordo com Eliades et al. (Eliades et

al., 1997), esse tipo de análise é capaz de demonstrar a mobilidade conformacional das cadeias de polipeptídeos, provendo valiosas informações à respeito das alterações conformacionais na estrutura do colágeno induzidas pelos agentes de condicionamento, contribuindo para a compreensão da resposta estrutural do tecido frente à desmineralização.

Através dessa análise foi possível identificar quimicamente na dentina os espectros de absorvância dos grupos fosfato, carbonato, amida, anéis pirrolídínicos e água (Figuras 16, 17, 18 e 19). Sendo o grupo amida (I, II e III) e os anéis pirrolídínicos considerados os indicadores de absorvância da região da banda de colágeno na dentina (Botta et al., 2012).

O espectro de absorvância analisado previamente à aplicação do condicionamento ácido mostrou diferença entre os espécimes analisados, para as concentrações dos componentes químicos (Figuras 16 e 18), o que era esperado considerando a variabilidade inerente ao substrato dentinário humano. Contudo, após a aplicação dos diferentes condicionamentos as diferenças seguiram um padrão de acordo com cada grupo analisado.

Pode-se observar que após a aplicação do ácido fosfórico (Figura 17), houve uma diminuição acentuada na intensidade do pico dos grupos fosfato e carbonato, que pode ser explicada pela desmineralização promovida pelo AF que causa o deslocamento desses grupos da estrutura da hidroxiapatita. Contudo, a intensidade do pico do grupo amida aumentou, indicando uma maior detecção do colágeno no substrato condicionado, já que as Amidas I e II são consideradas as principais bandas de absorção no infravermelho dos peptídeos presentes no colágeno (Botta et al., 2012), com uma ligeira alteração na intensidade de absorção das bandas de Amida III e anéis pirrolídínicos.

Quando analisado o condicionamento realizado com o AP (Figura 19), percebe-se que a sua ação foi menos agressiva para os grupos fosfato e carbonato sendo que, para o último houve um ligeiro aumento na intensidade de

absorbância, sugerindo que esse condicionamento permite que haja uma maior disponibilização de cristais de hidroxiapatita na superfície do colágeno. Sendo que este pode ser identificado, devido à presença das bandas de Amida I, II e III que apresentaram um ligeiro aumento e dos anéis pirrolidínicos que também sofreram uma leve alteração na intensidade de absorbância.

Através da análise da razão entre as absorbâncias das bandas de Amida III (1235 cm^{-1}) e anéis pirrolidínicos (1450 cm^{-1}), é possível determinar a integridade da estrutura do colágeno, pois a primeira é sensível à presença da estrutura secundária do tropocolágeno e a segunda é independente. Assim sendo, quando a razão gira em torno de 1, consideramos que a estrutura manteve sua integridade, já quando o valor é próximo de 0,5 provavelmente a estrutura do colágeno encontra-se desnaturada (Botta et al., 2012; Sylvester et al., 1989).

Os resultados obtidos através da caracterização química do substrato auxiliam no esclarecimento das controvérsias associadas à desnaturação do colágeno após a realização do condicionamento ácido do substrato dentinário (El Feninat et al., 1998; Habelitz et al., 2002; Yang et al., 2005), pois para ambos condicionamentos os valores encontrados AF (0,95) e AP (0,80) se aproximaram de 1, indicando que não houve a desnaturação da estrutura.

Embora, ambos condicionamentos não tenham afetado a estrutura helicoidal do colágeno, é evidente as diferenças entre as interações químicas do substrato e os ácidos empregados. O AF é um ácido mais agressivo ao tecido dentinário, que expõe grande quantidade de fibras colágenas. Já o AP condiciona o substrato, expondo as fibras colágenas de modo mais superficial e mantém uma maior quantidade de fosfato e carbonato na estrutura, o que teoricamente favoreceria a adesão química ao substrato e manteria uma concentração maior de minerais, protegendo então as fibras colágenas.

Durante o procedimento adesivo, o condicionamento dentinário é realizado a fim de expor as fibras colágenas e facilitar a formação da camada

híbrida. Contudo, quando não ocorre o completo encapsulamento das fibras colágenas pelos monômeros resinosos, as mesmas podem ser dissolvidas e se tornarem sítios de degradação na interface adesiva (Van Strijp et al., 2003). Além disso, a exposição da matriz extracelular do colágeno por estímulos endógenos ou exógenos, como pelo uso de ácido, pode causar alterações nos mecanismos regulatórios das MMP's (Mazzoni et al., 2006; Pashley et al., 2004).

Neste estudo a degradação colagenolítica mediante à aplicação dos diferentes protocolos de condicionamento ácido foi realizada através da mensuração da concentração das proteases endógenas MMP's e CAT-K no colágeno. Pois, embora uma pequena fração dessas proteases sejam extraídas pelo condicionamento ácido (Mazzoni et al., 2007; De Munck et al., 2009) , a maior parte delas permanece ligada a matriz na sua forma ativa, podendo induzir a lenta hidrolização do colágeno (Pashley et al., 2004).

Estudos prévios sugerem que MMP's e cisteíno catepsinas podem agir sinergicamente, já que normalmente estão posicionadas próximas umas das outras e localizadas perto do seu substrato de ação (Breschi et al., 2018) como por exemplo, o mesmo espaço no colágeno tanto na dentina sadia ou cariada (Vidal et al., 2014), indicando uma possível cascata enzimática entre essas duas classes de proteases (Nascimento et al., 2011; Tersariol et al., 2010).

De acordo com os dados analisados a H_0A foi rejeitada (Tabela 1), pois a realização do condicionamento ácido afetou a concentração de marcadores, sendo que para o AF o colágeno apresentou maior concentração de ICTP_{PT} (67,12 ng/mg) quando comparado a AP (45,68 ng/mg) (Figura 20), indicando que o AF não inibe a atividade das MMP's (Tezvergil-Mutluay et al., 2013).

Embora a literatura apresente resultados controversos quanto à capacidade do ácido fosfórico promover a ativação das MMP's, sugerindo que a sua utilização em alguns casos até poderia promover a redução da atividade

colagenolítica por meio da desnaturação das MMP's e cisteíno-catepsinas (Nishitani et al., 2006; Pashley et al., 2004), os achados do presente estudo contribuem de modo significativo sugerindo que o uso desse ácido possui maior potencial de ativação das MMP's do que o AP, dando à literatura mais subsídios para a compreensão da interação entre o substrato, o ácido fosfórico e as metaloproteinases.

Quando analisada a concentração de CTX (Tabela 1), os resultados apresentaram valores baixos, sugerindo que a atividade da CAT-K foi bem pequena, não havendo diferença entre AF com CTX_{PT} igual a 1,13 ng/mg e AP com CTX_{PT} de 0,74 ng/mg, o que pode ter sido ocasionado pela concentração do AP utilizado nesse estudo (25 %) (Figura 21). Uma concentração reduzida foi utilizada por Ozcan et al. (Ozcan et al., 2015), que investigaram a liberação de CTX entre AP (10%) e AF, constatando que o primeiro apresentou resultado estatisticamente significativo em relação ao segundo, indicando que o uso de AP promove maior ativação de CAT-K. Contudo, considerando a concentração por nós utilizada (25 %), tanto AP quanto AF afetaram a liberação dos fragmentos de CTX do colágeno de maneira similar

Nesse estudo foi verificada a baixa concentração de CTX quando comparada a quantidade de ICTP, o que corrobora com estudos prévios (Tezvergil-Mutluay et al., 2012; Turco et al., 2016). Tal achado pode estar associado ao pH do meio de incubação das amostras (pH 7,2) que é um pouco acima do pH ótimo para CAT-K (pH 5,5) (Karsdal et al., 2011; Tezvergil-Mutluay et al., 2015) contudo, a literatura ainda é controversa nesse ponto, refletindo a necessidade de mais estudos para elucidação dos mecanismos envolvidos na liberação de CTX (Turco et al., 2018).

Uma baixa concentração de ICTP (1,55 ng/mg) e CTX (0,02 ng/mg) pode ser verificada no grupo controle (água deionizada), indicando atividade das proteases dentinárias que pode ter sido ocasionada pela utilização do ácido

fosfórico 10 % para a desmineralização da dentina. Contudo, apesar dessas enzimas serem ativadas por ácidos, Pashley et al. (Pashley et al., 2004) demonstraram que o colágeno pode sofrer degradação ao longo do tempo mesmo em condições assépticas devido à ação das proteases intrínsecas presentes na matriz, relacionadas a outros mecanismos que também podem induzir a ativação das mesmas (Ozcan et al., 2015). As proformas de MMP's no grupo controle podem ter sido ativadas por outras biomoléculas como por exemplo, a ação das pequenas integrinas glicoproteínas N-ligadas (SIBLINGs) como, a sialoproteína óssea, uma fosfoproteína SIBLING, que pode ativar proformas da MMP-2, enquanto a proteína 1 da matriz dentinária (SIBLING) é capaz de ativar a MMP-9 (Fedarko et al., 2004). Além disso, a ativação de outras proformas das MMP's pode ser realizada via MMP-2 (Nagase, 1997) ou Cisteíno-catepsinas (Tersariol et al., 2010).

Uma das limitações do presente estudo, foi a não quantificação de ICTP e CTX mediante a utilização do sistema adesivo, o que se justifica pelo fato da metodologia empregada não permitir esse tipo de análise, já que ao se aplicar o sistema adesivo no disco de colágeno e inseri-lo no meio de incubação, a resultante não seria a avaliação dos produtos liberados do substrato, mas sim dos subprodutos do adesivo.

Contudo, em estudos prévios em que diferentes metodologias foram empregadas foi possível analisar a atividade das MMP's e Cisteíno catepsinas mediante os diferentes protocolos de condicionamento ácido, total ou autocondicionante (Mazzoni et al., 2013, 2011a, 2006).

Mazzoni et al. (Mazzoni et al., 2013), demonstraram através da aplicação de diferentes marcas de adesivos de condicionamento ácido total e autocondicionantes, o aumento da atividade das MMP-2 e MMP-9 bem como, Marchesi et al. (Marchesi et al., 2014) demonstraram o aumento da atividade dessas MMP's após o uso de SBU, independentemente do tipo de protocolo de

condicionamento empregado. Tais achados sugerem que, essas proteases podem exercer um papel fundamental na degradação da camada híbrida e redução da resistência adesiva longitudinalmente, pois os monômeros acídicos resinosos são capazes de ativar formas latentes de MMP's (pro-MMPs) via ativação das cisteíno-catepsinas, pela exposição dos domínios catalíticos outrora bloqueados por pro-peptídeos (Tallant et al., 2010).

Considerando que além de favorecer a degradação proteolítica, as MMP's afetam as propriedades mecânicas do colágeno, o que poderia induzir a degradação da interface adesiva (Agee et al., 2000; Causton and Johnson, 1979; De Munck et al., 2009), foi que o estudo em questão se propôs a correlacionar o tipo de protocolo de condicionamento ácido empregado com a resistência à tração do colágeno.

De acordo com os resultados obtidos a utilização do AF afetou significativamente a resistência à tração do colágeno ($1,03 \pm 0,20$ MPa)^A, quando comparado aos grupos AP ($1,65 \pm 0,33$ MPa)^B e controle ($1,84 \pm 0,15$ MPa)^B (Figura 22), o que nos leva a acreditar que o uso desse ácido possa afetar não apenas a expressão das endoproteases, mas também a qualidade do colágeno (Hu et al., 2015) que futuramente será incorporado na camada híbrida.

Considerando que a adesão dentina-resina é resultante da infiltração dos monômeros resinosos no substrato dentinário, e que a sua estabilidade e durabilidade podem ser alcançadas por meio do completo encapsulamento das fibras colágenas pelo sistema adesivo, protegendo-as da degradação, é que o teste de microtração foi empregado nesse estudo, a fim de realizar a análise longitudinal da resistência adesiva.

De acordo com os resultados obtidos, não houve diferença entre os protocolos de condicionamento (Tabela 2), AF ($40,13 \pm 8,94$ MPa)^A, AP ($43,51 \pm 4,95$ MPa)^A e SE ($45,52 \pm 8,91$ MPa)^A, quando analisados em tempo imediato (24 h), o que indica que o condicionamento experimental com o AP foi

comparável aos convencionais (AF e SE) do ponto de vista mecânico (Figura 23).

O fato de AF e SE apresentarem resultados semelhantes era previsível, pois de acordo com a metanálise realizada por Rosa et al. (Da Rosa et al., 2015), o sistema adesivo universal SBU apresenta desempenho semelhante independentemente da estratégia de condicionamento empregada, quando analisado em tempo imediato, sendo esse o mesmo resultado encontrado para outros sistemas adesivos universais. Porém, o desempenho de AP de modo semelhante aos condicionamentos convencionais se mostrou promissor quanto a possibilidade de se estabelecer um novo protocolo de condicionamento dentinário para esses adesivos.

Contudo, os resultados imediatos devem ser analisados com cautela, pois a intenção de se realizar o condicionamento com AP previamente ao uso do SBU era permitir que houvesse uma maior disponibilização de cristais de hidroxiapatita na superfície da trama colágena mesmo após a realização do condicionamento ácido, o que foi comprovado pelos achados da espectroscopia FTIR, permitindo dessa forma, o estabelecimento das ligações químicas entre os grupos carboxílico e fosfato presentes no adesivo com a hidroxiapatita presente no substrato.

Após 12 meses de armazenamento, os resultados encontrados não apresentaram diferença estatisticamente significantes entre si (Tabela 2), AF ($30,06 \pm 8,32$ MPa)^A, AP ($24,35 \pm 7,08$ MPa)^A e SE ($30,35 \pm 6,66$ MPa)^A, evidenciando que ambos os protocolos de condicionamento, do ponto de vista micromecânico, se desempenharam da mesma forma (Figura 23).

Os resultados encontrados requerem a rejeição parcial da hipótese de nulidade H_0B , pois o fator tempo foi significativo do ponto de vista estatístico ($p > 0,0001$), porém o mesmo não foi verdade para o protocolo de condicionamento e para a interação entre esses fatores (Tabela 3). Apesar da literatura apresentar

poucos estudos nos quais sistemas adesivos universais como SBU tenham sido avaliados longitudinalmente, resultados semelhantes foram encontrados em alguns estudos prévios que compararam o desempenho longitudinal de SBU, sob condicionamento ácido total e autocondicionante, não encontrando diferença estatística entre os condicionamentos, mas verificando a redução da resistência adesiva ao longo do tempo (Marchesi et al., 2014; Tekçe et al., 2016).

O presente estudo parece ser o primeiro a associar o uso de um sistema adesivo universal ao protocolo de condicionamento ácido com AP, o que impede comparações diretas. Contudo, estudos anteriores relataram resultados favoráveis ao empregar o AP associado ao uso de cimentos autocondicionantes obtendo resultados favoráveis em termos de resistência adesiva (Pavan et al., 2010; Stona et al., 2013).

Os principais fatores associados à deterioração da interface adesiva em dentina são a biodegradação longitudinal da matriz colágena e a hidrólise do adesivo na camada híbrida. Em um estudo inovador realizado por Lin et al. (Hu et al., 2015), os resultados obtidos evidenciaram que existe uma correlação negativa entre a degradação da matriz colágena e a resistência à microtração nos primeiros meses após a realização da restauração.

O delineamento experimental empregado no presente estudo, não permite de realização uma correlação direta entre os resultados de degradação colagenolítica. Porém, a análise global dos diferentes testes empregados permite a formulação de conjecturas.

Apesar dos protocolos de condicionamento aplicados à dentina não diferirem entre si estatisticamente de acordo com cada período de avaliação. Para o tempo imediato o AF exibiu os menores valores para resistência à microtração. Tal desempenho pode estar relacionado, a menor adesão química entre os monômeros funcionais presentes no SBU (10 – MDP e VCP) e o substrato (Sezinando et al., 2016), devido à intensa redução de fosfato e

carbonato que sugere menor quantidade de hidroxiapatita disponível para ligação (Figura 16). Além disso, a concentração de fragmentos de ICTP foi maior quando o AF foi utilizado (Tabela 1), corroborando com estudos que indicam o aumento da atividade das MMP's e a menor resistência à tração do colágeno, após o condicionamento com AF (Ozcan et al., 2015; Tjäderhane et al., 2013a).

Em contrapartida, o condicionamento com o AP exibiu valor superior de resistência à microtração quando comparado à AF em tempo imediato. Tal resultado, sugere que a desmineralização parcial da dentina (Figura 18) pode ter afetado positivamente o desempenho do sistema adesivo, já que os monômeros funcionais interagem com a hidroxiapatita presente na dentina por meio de interações iônicas favorecendo a adesão química (Yoshida et al., 2001). Bem como, os resultados referentes à degradação colagenolítica sugerem que o AP é menos agressivo quanto à ativação das MMP's e resistência à tração do colágeno (Ozcan et al., 2015).

De fato, a análise de resistência à microtração para o período de 12 meses de armazenamento não identificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Contudo, a comparação entre os períodos de 24 h e 12 meses indicou que o grupo que apresentou maior estabilidade ao longo do tempo foi AF (Tabela 2). Já os grupos AP e SE, apresentaram redução significativa na resistência adesiva. Esses dados interpretados à luz da degradação colagenolítica podem ser correlacionados aos achados de De Vito-Moraes et al. (DeVito-Moraes et al., 2016), sugestivos de que o uso do ácido fosfórico 37 % pode modular a atividade das MMPs tornando a degradação mais lenta. Por isso, especulamos que a menor redução do valor de resistência adesiva após 12 meses encontrado para AF, não indica ausência de degradação mediada por MMP'S e CAT-K, mas sim uma atividade mais lenta ao longo do tempo (DeVito-Moraes et al., 2016).

Os resultados obtidos na análise fractográfica (Figura 23), mostraram que AF e SE apresentaram maior número de falhas adesivas associadas às mistas em ambos os períodos de armazenamento, corroborando com os achados da literatura quando SBU foi empregado (Marchesi et al., 2014). Contudo AP apresentou alta incidência de falhas coesivas em resina e dentina respectivamente, 42 e 13 %, para o tempo de análise imediato, porém após 12 meses apresentou índice de fraturas adesiva associadas às mistas de 62 %, o que pode sugerir que ao contrário de AF e SE, esse ácido possa melhorar a sua união com o substrato ao longo do tempo, tornando-se comparável aos demais, em termos de qualidade de hibridização (Figura 24).

Com intuito de averiguar a qualitativamente o desempenho da interface adesiva mediante o uso de AF, AP e SE nos diferentes períodos de armazenamento é que foi realizada a análise ilustrativa por MEV (Figuras 25, 26 e 27).

A análise da interface adesiva do grupo AF 24 h (Figura 25 A), mostrou uma camada adesiva adequada, com a formação da camada híbrida e numerosos e espessos *tags* resinosos penetrando profundamente na dentina, o que condiz com a agressividade do ácido empregado, que é capaz de promover uma desmineralização profunda da dentina entre 5 a 10 μm (Breschi et al., 2018). Porém após 12 meses de armazenamento, (Figura 25 B) apesar da permanência da camada adesiva, foi possível observar em seu topo (região apontada pelo indicador na Figura 24 B) sinais de separação entre o adesivo e a resina composta. Além disso, houve a redução da quantidade de *tags* resinosos na dentina bem como, a diminuição da espessura dos mesmos e da profundidade de penetração. Assim, de acordo com a análise realizada, é possível sugerir que o uso do AF afetou negativamente o comportamento morfológico da interface adesiva após 12 meses de armazenamento, exibindo sinais de degradação tanto do adesivo quanto da resina.

Já a análise da interface adesiva obtida com AP (Figura 26), para o tempo imediato (Figura 26 A) exibiu a disposição adequada da camada adesiva, com uma discreta formação da camada híbrida e alguns *tags* resinosos finos, porém com profunda penetração na dentina, o que pode ser devido à parcial desmineralização promovida por esse ácido. Contudo, após 12 meses de armazenamento, foi possível observar uma ligeira redução na espessura da camada adesiva, com sinais de separação entre o adesivo e a resina composta (região apontada pelo indicador na Figura 26 B) e significativo encurtamento dos *tags* resinosos, se assemelhando ao padrão do condicionamento exibido pelo modo autocondicionante (SE). Tais achados são sugestivos da associação com o os resultados obtidos com o teste de resistência à microtração, nos quais após o período de armazenamento AP apresentou significativa redução da sua resistência adesiva comparando-se ao SE.

Ao analisarmos a interface adesiva promovida pelo protocolo SE (Figura 27), para o período de 24 h (Figura 27 A) foi possível observar a adequada disposição da camada adesiva, com ausência de formação da camada híbrida e discretos *tags* resinosos. Porém, análise após 12 meses de armazenamento (Figura 27 B), apresentou redução significativa da camada adesiva, sinais de degradação extensa e separação da camada adesiva da resina (região apontada pelo indicador na Figura 27 B), exibindo a presença de raros *tags* resinosos. Tal achado condiz com os resultados de resistência à microtração, que evidenciam a significativa redução da resistência adesiva de SE após o período de armazenamento.

Quando AF, AP e SE são comparados quanto a análise da interface adesiva, no período de 24 h, não se pode dizer que há diferenças quanto à qualidade da interface, pois todos os protocolos empregados interagiram de acordo com o esperado para a proposta, exibindo a adequada formação da interface adesiva. O que corrobora com estudos prévios utilizando SBU sob os

protocolos AF e SE (Tekçe et al., 2016) e indica o bom comportamento de AP, previamente ao uso do SBU.

Embora todos os protocolos tenham exibido sinais de degradação longitudinal em concordância com os resultados obtidos através da análise da resistência adesiva, os protocolos AF e AP parecem ter se comportado melhor quando considerada a qualidade da interface adesiva em relação ao desempenho do SE. O que nos leva a especular, guardada as devidas proporções, a possibilidade de AP ser comparável à AF quanto a qualidade da interface resina-dentina, já que os resultados de microtração associados à análise qualitativa não demonstram diferença significativa entre esses protocolos.

Contudo, é importante ressaltar que os indícios de degradação da interface adesiva assim como, a redução da camada de adesivo e diminuição dos em quantidade e tamanho dos *tags* resinosos, podem servir como sítios de contínua degradação longitudinal assim como também, os defeitos presentes na interface podem representar sítios de nanoinfiltração (Sano, 2006).

Os índices de nanoinfiltração nesse estudo foram comparados por meio de um score sendo que, a análise de AF, AP e SE para o período de 24 h (Figuras 28 A, 29 A e 30 A), revelou que para o tempo imediato todos os protocolos de condicionamento receberam score 0, indicando a ausência de nanoinfiltração. Tal achado concorda com a literatura quando considerados os grupos AF e SE (Muñoz et al., 2013). Considerando, que esse é o primeiro estudo a associar o uso do AP com SBU, não é possível fazer comparações. Contudo, especula-se que para o parâmetro nanoinfiltração AP, tempo imediato, se assemelharia aos protocolos convencionais, pois a nanoinfiltração imediata está fortemente correlacionada a capacidade de infiltração e selamento do adesivo (Sezinando et al., 2015).

Contudo após 12 meses de armazenamento, tal índice exibiu resultados diferentes de acordo com o protocolo adotado sendo que, AF e AP (Figuras 28

B e 29 B) apresentaram nanoinfiltração em mais de 50 % da área avaliada (score 3) enquanto que, SE (Figura 30 B) permaneceu sem indícios de nanoinfiltração (score 0) para o período em questão. Esse resultado pode ser comparado ao encontrado por Marchesi et al. (Marchesi et al., 2014), que demonstrou menor nanoinfiltração longitudinal para SE quando comparado à AF, sendo esse desempenho atribuído à ação protetora do 10-MDP exercida sobre as fibras de colágeno (Yoshida et al., 2012; Yoshihara et al., 2011) e também do VCP, que também se une quimicamente à dentina (Sezinando et al., 2016; Yoshida et al., 2001, 2000).

De acordo com Sano et al. (Sano, 2006), a absorção de nitrato de prata é capaz de ocupar espaços nanométricos ao redor das fibras colágenas que não foram completamente encapsuladas pelos monômeros resinosos, regiões onde a água não foi deslocada pelo adesivo ou em áreas em que não houve a completa conversão dos monômeros. Além disso, em se tratando da nanoinfiltração longitudinal, o armazenamento em água pode causar degradação hidrolítica e eluição dos produtos somada à perda da integridade do colágeno (Kim et al., 2010).

Como dito anteriormente, as comparações não são possíveis, já que a proposta do estudo em questão traz a inovação de um protocolo de condicionamento experimental associado ao uso de um sistema adesivo universal, algo ainda não relatado na literatura. Além do que, essa classe de sistemas adesivos é relativamente nova e ainda não existem muitos estudos longitudinais disponíveis. Assim sendo, existe a possibilidade de resultados diferentes pudessem ser encontrados se um tempo maior de armazenamento fosse empregado.

Além disso, pouco se sabe a respeito da ação do ácido poliacrílico quanto a ativação das MMP's e CAT-K no colágeno. Sendo também necessária a investigação da influência desse ácido em dentina mineralizada após a

aplicação do sistema adesivo universal na ativação das MMP's e cisteíno-catepsinas, o que evidencia a necessidade de mais estudos variando as marcas dos sistemas adesivos universais e realizando análises em um tempo maior de armazenamento.

7 CONCLUSÃO

Desse modo, ao considerarmos todas as análises, podemos concluir que o uso do ácido poliacrílico 25 % previamente à aplicação de SBU pode ser realizado, pois o mesmo apresenta resultados semelhantes aos protocolos de condicionamento convencionais. Contudo, o fato do mesmo não apresentar características superiores, o torna uma escolha menos atrativa em relação aos demais protocolos. Todavia, ao ser comparado com o ácido fosfórico pode representar um tipo de condicionamento menos agressivo ao substrato. Assim sendo, o autocondicionamento ainda parece ser a melhor opção para sistemas adesivos universais que possuam monômeros funcionais em sua composição.

REFERÊNCIAS*

Agee K, Zhang Y, Pashley DH. Effects of acids and additives on the susceptibility of human dentine to denaturation. *J Oral Rehabil.* 2000. doi: 10.1046/j.1365-2842.2000.00492.x. PMID: 10672150.

Al-Assaf K, Chakmakchi M, Palaghias G, Karanika-Kouma A, Eliades G. Interfacial characteristics of adhesive luting resins and composites with dentine. *Dent Mater.* 2007. doi: 10.1016/j.dental.2006.06.023. PMID: 16934865.

Anchieta RB, Oliveira FG, Sundfeld RH, Rahal V, Machado LS, Alexandre RS, et al. Analysis of hybrid layer thickness, resin tag length and their correlation with microtensile bond strength using a total etch adhesive to intact dentin. *Acta Odontol Latinoam.* 2011. PMID: 22550821.

Andrew Chan KL, Kazarian SG. Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. *Chem Soc Rev.* 2016. doi: 10.1039/c5cs00515a. PMID: 26488803.

Armstrong S, Breschi L, Özcan M, Pfefferkorn F, Ferrari M, Van Meerbeek B. Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μ TBS) approach. *Dent Mater.* 2017. doi: 10.1016/j.dental.2016.11.015. PMID: 28007396.

Bachmann L, Gomes ASL, Zezell DM. Collagen absorption bands in heated and rehydrated dentine. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2005. doi: 10.1016/j.saa.2005.03.025. PMID: 15950533.

Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, et al. Dentine biomodification: Strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater.* 2014. doi: 10.1016/j.dental.2013.10.012. PMID: 24309436.

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

Botta SB, Ana PA, Santos MO, Zezell DM, Matos AB. Effect of dental tissue conditioners and matrix metalloproteinase inhibitors on type I collagen microstructure analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2012. doi: 10.1002/jbm.b.32666. PMID: 22287052.

Boukpepsi T, Menashi S, Camoin L, TenCate JM, Goldberg M, Chaussain-Miller C. The effect of stromelysin-1 (MMP-3) on non-collagenous extracellular matrix proteins of demineralized dentin and the adhesive properties of restorative resins. *Biomaterials*. 2008. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.07.035. PMID: 18760468.

Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, Cadenaro M, Tjäderhane L, et al. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dent Mater*. 2018. doi: 10.1016/j.dental.2017.11.005. PMID: 29179971.

Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008. doi: 10.1016/j.dental.2007.02.009. PMID: 17442386.

Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK. *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*. 2005. doi: 10.1007/b103818.

Carvalho RM, Tjäderhane L, Manso AP, Carrilho, M. R. &, Carvalho CAR. Dentin as a bonding substrate. *Endod Top*. 2012. doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00274.x.

Causton BE, Johnson NW. Changes in the dentine of human teeth following extraction and their implication for in-vitro studies of adhesion to tooth substance. *Arch Oral Biol*. 1979. doi: 10.1016/0003-9969(79)90145-6. PMID: 383050.

Dayan D, Binderman I, Mechanic GL. A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. *Arch Oral Biol*. 1983. doi: 10.1016/0003-9969(83)90126-7. PMID: 6307237.

DeVito-Moraes AG, Francci C, Vidal CMP, Scaffa PMC, Nesadal D, Yamasaki

LC, et al. Phosphoric acid concentration affects dentinal MMPs activity. *J Dent*. 2016. doi: 10.1016/j.jdent.2016.06.002. PMID: 27327109.

Dickinson DP. Cysteine peptidases of mammals: Their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002. doi: 10.1177/154411130201300304. PMID: 12090464.

Eckert GJ, Platt JA. A statistical evaluation of microtensile bond strength methodology for dental adhesives. *Dent Mater*. 2007. doi: 10.1016/j.dental.2006.02.007. PMID: 16540162.

Eliades G, Palaghias G, Vougiouklakis G. Effect of acidic conditioners on dentin morphology, molecular composition and collagen conformation in situ. *Dent Mater*. 1997.

Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Fisher LW. Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *FASEB J*. 2004. doi: 10.1096/fj.03-0966fje. PMID: 14766790.

El Feninat F, Ellis TH, Sacher E, Stangel I. Moisture-dependent renaturation of collagen in phosphoric acid etched human dentin. *J Biomed Mater Res*. 1998. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(19981215)42:4<549::AID-JBM10>3.0.CO;2-L. PMID: 9827678.

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

Fukegawa D, Hayakawa S, Yoshida Y, Suzuki K, Osaka A, Van Meerbeek B. Chemical interaction of phosphoric acid ester with hydroxyapatite. *J Dent Res*. 2006. doi: 10.1177/154405910608501014. PMID: 16998137.

Fukuda R, Yoshida Y, Nakayama Y, Okazaki M, Inoue S, Sano H, et al. Bonding efficacy of polyalkenoic acids to hydroxyapatite, enamel and dentin. *Biomaterials*. 2003. doi: 10.1016/S0142-9612(02)00575-6. PMID: 12615476.

Fung DT, Wang VM, Laudier DM, Shine JH, Basta-Pljakic J, Jepsen KJ, et al. Subrupture tendon fatigue damage. *J Orthop Res*. 2009. doi: 10.1002/jor.20722. PMID: 18683881.

Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol*. 1976. doi: 10.1016/S0003-9969(76)80003-9. PMID: 1066114.

Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem*. 1999. doi: 10.1074/jbc.273.48.32347. PMID: 9822715.

Grunenwald A, Keyser C, Sautereau AM, Crubézy E, Ludes B, Drouet C. Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals: A validated FTIR methodology. *J Archaeol Sci*. 2014. doi: 10.1016/j.jas.2014.05.004.

Gu L, Mazzoni A, Gou Y, Pucci C, Breschi L, Pashley DH, et al. Zymography of Hybrid Layers Created Using Extrafibrillar Demineralization. *J Dent Res*. 2018. doi: 10.1177/0022034517747264. PMID: 29172973.

Habelitz S, Balooch M, Marshall SJ, Balooch G, Marshall GW. In situ atomic force microscopy of partially demineralized human dentin collagen fibrils. *J Struct Biol*. 2002. doi: 10.1016/S1047-8477(02)00029-1. PMID: 12217661.

Hanabusa M, Mine A, Kuboki T, Momoi Y, Van Ende A, Van Meerbeek B, et al. Bonding effectiveness of a new “multi-mode” adhesive to enamel and dentine. *J Dent*. 2012. doi: 10.1016/j.jdent.2012.02.012. PMID: 22381614.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007. doi: 10.1080/00016350600963640. PMID: 17354089.

Hariri I, Shimada Y, Sadr A, Ichinose S, Tagami J. The effects of aging on shear bond strength and nanoleakage expression of an etch-and-rinse adhesive on human enamel and dentin. *J Adhes Dent*. 2012. doi: 10.3290/j.jad.a22192. PMID: 22043472.

HASHIMOTO M, FUJITA S, ENDO K, OHNO H. Effect of dentinal water on bonding of self-etching adhesives. *Dent Mater J*. 2009. doi: 10.4012/dmj.28.634. PMID: 19822996.

Heintze SD, Rousson V, Mahn E. Bond strength tests of dental adhesive systems and their correlation with clinical results - A meta-analysis. *Dent Mater*. 2015. doi: 10.1016/j.dental.2015.01.011. PMID: 25711699.

Hiraishi N, Tochio N, Kigawa T, Otsuki M, Tagami J. Monomer-collagen interactions studied by saturation transfer difference NMR. *J Dent Res*. 2013. doi: 10.1177/0022034512474310. PMID: 23340212.

Hu L, Xiao YH, Fang M, Gao Y, Huang L, Jia AQ, et al. Effects of type I collagen degradation on the durability of three adhesive systems in the early phase of dentin bonding. *PLoS One*. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0116790. PMID: 25689141.

Inoue S, Van Meerbeek B, Abe Y, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, et al. Effect of remaining dentin thickness and the use of conditioner on micro-tensile bond strength of a glass-ionomer adhesive. *Dent Mater*. 2001. doi: 10.1016/S0109-5641(01)00003-3. PMID: 11445212.

Karsdal MA, Woodworth T, Henriksen K, Maksymowych WP, Genant H, Vergnaud P, et al. Biochemical markers of ongoing joint damage in rheumatoid arthritis - current and future applications, limitations and opportunities. *Arthritis Res Ther*. 2011. doi: 10.1186/ar3280. PMID: 21539724.

Khanarian NT, Boushell MK, Spalazzi JP, Pleshko N, Boskey AL, Lu HH. FTIR-I compositional mapping of the cartilage-to-bone interface as a function of tissue region and age. *J Bone Miner Res*. 2014. doi: 10.1002/jbmr.2284. PMID: 24839262.

Kim J, Mai S, Carrilho MR, Yiu CKY, Pashley DH, Tay FR. An all-in-one adhesive does not etch beyond hybrid layers. *J Dent Res*. 2010. doi: 10.1177/0022034510363665. PMID: 20200420.

Kramer RZ, Bella J, Brodsky B, Berman HM. The crystal and molecular structure of a collagen-like peptide with a biologically relevant sequence. *J Mol*

Biol. 2001. doi: 10.1006/jmbi.2001.4849. PMID: 11469863.

Landis WJ, Jacquet R. Association of calcium and phosphate ions with collagen in the mineralization of vertebrate tissues. *Calcif Tissue Int.* 2013. doi: 10.1007/s00223-013-9725-7. PMID: 23543143.

Lawson NC, Robles A, Fu CC, Lin CP, Sawlani K, Burgess JO. Two-year clinical trial of a universal adhesive in total-etch and self-etch mode in non-carious cervical lesions. *J. Dent.* 2015 . doi: 10.1016/j.jdent.2015.07.009. PMID: 26231300.

Li H, Burrow MF, Tyas MJ. Nanoleakage patterns of four dentin bonding systems. *Dent Mater.* 2000. doi: 10.1016/S0109-5641(99)00085-8. PMID: 11317409.

Lin A, McIntyre NS, Davidson RD. Studies on the adhesion of glass-ionomer cements to dentin. *J Dent Res.* 1992. doi: 10.1177/00220345920710111401. PMID: 1401448.

Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res.* 2011. doi: 10.1177/0022034510391799. PMID: 21220360.

Liu Y, Wang Y. Proanthocyanidins' efficacy in stabilizing dentin collagen against enzymatic degradation: MALDI-TOF and FTIR analyses. *J Dent.* 2013. doi: 10.1016/j.jdent.2013.03.007. PMID: 23578472.

Loguercio AD, De Paula EA, Hass V, Luque-Martinez I, Reis A, Perdigão J. A new universal simplified adhesive: 36-Month randomized double-blind clinical trial. *J Dent.* 2015. doi: 10.1016/j.jdent.2015.07.005. PMID: 26159382.

Lopes C de CA, Limirio PHJO, Novais VR, Dechichi P. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. *Appl Spectrosc Rev.* 2018. doi: 10.1080/05704928.2018.1431923.

Makishi P, André C, Ayres A, Martins A, Giannini M. Effect of Storage Time on Bond Strength and Nanoleakage Expression of Universal Adhesives Bonded

to Dentin and Etched Enamel. *Oper Dent*. 2016. doi: 10.2341/15-163-L. PMID: 26666389.

Makishi P, Thitthaweerat S, Sadr A, Shimada Y, Martins AL, Tagami J, et al. Assessment of current adhesives in class I cavity: Nondestructive imaging using optical coherence tomography and microtensile bond strength. *Dent Mater*. 2015. doi: 10.1016/j.dental.2015.06.013. PMID: 26183294.

Marchesi G, Frassetto A, Mazzoni A, Apolonio F, Diolosà M, Cadenaro M, et al. Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-Year in vitro study. *J Dent*. 2014. doi: 10.1016/j.jdent.2013.12.008. PMID: 24373855.

Marimoto A, Cunha L, Yui K, Huhtala M, Barcellos D, Prakki A, et al. Influence of Nd:YAG Laser on the Bond Strength of Self-etching and Conventional Adhesive Systems to Dental Hard Tissues. *Oper Dent*. 2013. doi: 10.2341/11-383-L. PMID: 23215546.

Marshall GW. Dentin: microstructure and characterization. *Quintessence Int*. 1993. doi: 10.1016/0029-7844(94)00457-O. PMID: 8272499.

Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol*. 2000. doi: 10.1016/S0003-9969(00)00052-2. PMID: 10869489.

Mazzoni A, Breschi L, Carrilho M, Nascimento FD, Orsini G, Ruggeri Jr A, et al. A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part II: enzymes, serum proteins, and growth factors. *Endod Top*. 2012. doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00268.x.

Mazzoni A, Carrilho M, Papa V, Tjäderhane L, Gobbi P, Nucci C, et al. MMP-2 assay within the hybrid layer created by a two-step etch-and-rinse adhesive: Biochemical and immunohistochemical analysis. *J Dent*. 2011a. doi: 10.1016/j.jdent.2011.04.004. PMID: 21554921.

Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GAM, Papa S, Mazzotti G, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res*. 2007. doi: 10.1177/154405910708600509. PMID: 17452564.

Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Ruggeri A, et al. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *J Dent*. 2011b. doi: 10.1016/j.jdent.2011.01.001. PMID: 21215789.

Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*. 2006. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.040. PMID: 16687171.

Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A, et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: Correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2009. doi: 10.1002/jbm.a.31920. PMID: 18335530.

Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, et al. Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res*. 2013. doi: 10.1177/0022034512467034. PMID: 23128110.

Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015. doi: 10.1177/0022034514562833. PMID: 25535202.

Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological Aspects of the Resin-Dentin Interdiffusion Zone with Different Dentin Adhesive Systems. *J Dent Res*. 1992. doi: 10.1177/00220345920710081301. PMID: 1506519.

Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent*. 2003. PMID: 12760693.

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

Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2011. doi: 10.1016/j.dental.2010.10.023. PMID: 21109301.

Miguez P, Pereira P, Atsawasuwan P, Yamauchi M. Collagen Cross-linking and Ultimate Tensile Strength in Dentin. *J Dent Res*. 2004. doi: 10.1177/154405910408301014. PMID: 15381724.

Mitra SB, Lee CY, Bui HT, Tantbirojn D, Rusin RP. Long-term adhesion and mechanism of bonding of a paste-liquid resin-modified glass-ionomer. *Dent Mater*. 2009. doi: 10.1016/j.dental.2008.09.008. PMID: 19041127.

Miura J, Nishikawa K, Kubo M, Fukushima S, Hashimoto M, Takeshige F, et al. Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine. *Arch Oral Biol*. 2014. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.10.012. PMID: 24370182.

Moura SK, Santos JFF, Ballester RY. Morphological characterization of the tooth/adhesive interface. *Braz Dent J*. 2006. doi: 10.1590/S0103-64402006000300001. PMID: 17262121.

De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: Methods and results. *J Dent Res*. 2005. doi: 10.1177/154405910508400204. PMID: 15668328.

De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci*. 2010. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00758.x. PMID: 20831584.

De Munck J, Van Den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res*. 2009. doi: 10.1177/0022034509346952. PMID: 19861692.

Muñoz MA, Luque I, Hass V, Reis A, Loguercio AD, Bombarda NHC. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent*. 2013. doi: 10.1016/j.jdent.2013.03.001. PMID: 23499568.

Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*. 1997. PMID: 9165065.

Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982. doi: 10.1002/jbm.820160307. PMID: 7085687.

Nakabayashi N, Pashley D. *Hybridization of Dental Hard Tissues.* Chicago Quintessence. 1998.

Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J. Dent. Res.* 2011 . doi: 10.1177/0022034510391906. PMID: 21248362.

Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2006. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00342.x. PMID: 16630309.

Obermajer N, Jevnikar Z, Doljak B, Kos J. Role of cysteine cathepsins in matrix degradation and cell signalling. *Connect Tissue Res.* 2008. doi: 10.1080/03008200802143158. PMID: 18661341.

Orsini G, Jr AR, Mazzoni A, Nato F, Manzoli L, Putignano A, et al. A review of the nature , role , and function of dentin non-collagenous proteins . Part 1 : proteoglycans and glycoproteins. *Endod Top.* 2012. doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00268.x.

Ozcan S, Seseogullari-Dirihan R, Uctasli M, Tay FR, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Effect of polyacrylic acid on dentin protease activities. *Dent Mater.* 2015. doi: 10.1016/j.dental.2015.04.018. PMID: 26003232.

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

Parikh SJ, Chorover J. FTIR spectroscopic study of biogenic Mn-oxide formation by *Pseudomonas putida* GB-1. *Geomicrobiol J.* 2005. doi: 10.1080/01490450590947724.

Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996. doi: 10.1177/10454411960070020101. PMID: 8875027.

Pashley DH, Agee KA, Wataha JC, Rueggeberg F, Ceballos L, Itou K, et al. Viscoelastic properties of demineralized dentin matrix. *Dent Mater*. 2003. doi: 10.1016/S0109-5641(03)00016-2. PMID: 14511727.

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

Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakajima M, Yoshiyama M, Shono Y, et al. The microtensile bond test: a review. *J Adhes Dent*. 1999. doi: 10.1016/S1091-0012(99)00040-8 [pii]. PMID: 11725659.

Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011. doi: 10.1016/j.dental.2010.10.016. PMID: 21112620.

Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent*. 2007. PMID: 17380802.

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

Pavan S, Dos Santos PH, Berger S, Bedran-Russo AKB. The effect of dentin pretreatment on the microtensile bond strength of self-adhesive resin cements. *J Prosthet Dent*. 2010. doi: 10.1016/S0022-3913(10)60134-5. PMID: 20875530.

Perdigão J. Dentin bonding-Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater*. 2010. doi: 10.1016/j.dental.2009.11.149. PMID: 20005565.

Perdigão J, Sezinando A, Monteiro PC. Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. *Am J Dent*. 2012. PMID: 22988685.

Pereira CNDB, Daleprane B, Barbosa PF, Moreira AN, De Magalhães CS. Qualitative evaluation of scanning electron microscopy methods in a study of the resin cement/dentine adhesive interface. *Microsc Microanal*. 2014. doi: 10.1017/S143192761301369X. PMID: 24188716.

Pioch T, Staehle HJ, Duschner H, García-Godoy F. Nanoleakage at the composite-dentin interface: A review. *Am J Dent*. 2001. PMID: 11699747.

Prati C, Montanari G, Biagini G, Fava F, Pashley DH. Effects of dentin surface treatments on the shear bond strength of vitrabond. *Dent Mater*. 1992. doi: 10.1016/0109-5641(92)90048-H. PMID: 24753797.

Rainey JK, Goh MC. A statistically derived parameterization for the collagen triple-helix. *Protein Sci*. 2009. doi: 10.1110/ps.0218502. PMID: 12381857.

Roeder L, Pereira PNR, Yamamoto T, Ilie N, Armstrong S, Ferracane J. Spotlight on bond strength testing - Unraveling the complexities. *Dent Mater*. 2011. doi: 10.1016/j.dental.2011.08.396. PMID: 21944280.

Da Rosa WLDO, Piva E, Da Silva AF. Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2015. doi: 10.1016/j.jdent.2015.04.003. PMID: 25882585.

Sano H. Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. *J Dent Res*. 2006. doi: 10.1177/154405910608500102. PMID: 16373674.

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

Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Horner JA, Matthews WG, Pashley DH. Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. *Oper Dent*. 1995a. PMID: 8700762.

Sano H, Yoshiyama M, Ebisu S, Burrow MF, Takatsu T, Ciucchi B, et al. Comparative SEM and TEM observations of nanoleakage within the hybrid layer. *Oper Dent*. 1995b. PMID: 8700785.

Sato C, Rodrigues FA, Garcia DM, Vidal CMP, Pashley DH, Tjäderhane L, et al. Tooth bleaching increases dentinal protease activity. *J Dent Res*. 2013. doi: 10.1177/0022034512470831. PMID: 23242228.

Schlueter RJ, Veis A. The Macromolecular Organization of Dentine Matrix Collagen. II. Periodate Degradation and Carbohydrate Cross-Linking. *Biochemistry*. 1964. doi: 10.1021/bi00899a010. PMID: 14235325.

Sezinando A, Luque-Martinez I, Muñoz MA, Reis A, Loguercio AD, Perdigão J. Influence of a hydrophobic resin coating on the immediate and 6-month dentin bonding of three universal adhesives. *Dent Mater*. 2015. doi: 10.1016/j.dental.2015.07.002. PMID: 24508503.

Sezinando A, Serrano ML, Pérez VM, Muñoz RAG, Ceballos L, Perdigão J. Chemical Adhesion of Polyalkenoate-based Adhesives to Hydroxyapatite. *J Adhes Dent*. 2016. doi: 10.3290/j.jad.a36222. PMID: 27341385.

Shinno Y, Ishimoto T, Saito M, Uemura R, Arino M, Marumo K, et al. Comprehensive analyses of how tubule occlusion and advanced glycation end-products diminish strength of aged dentin. *Sci Rep*. 2016. doi: 10.1038/srep19849. PMID: 26797297.

Silva ZS, Botta SB, Ana PA, França CM, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA, et al. Effect of papain-based gel on type I collagen - spectroscopy applied for microstructural analysis. *Sci Rep*. 2015. doi: 10.1038/srep11448. PMID: 26101184.

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

Spencer P, Ye Q, Park J, Misra A, Bohaty BS, Singh V, et al. Durable Bonds at the Adhesive/Dentin Interface: An Impossible Mission or Simply a Moving Target? *Brazilian Dent Sci*. 2012. PMID: 24855586.

Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, et al. Adhesive/dentin interface: The weak link in the composite restoration. *Ann*

Biomed Eng. 2010. doi: 10.1007/s10439-010-9969-6. PMID: 20195761.

Stona P, Borges GA, Montes MAJR, Júnior LHB, Weber JBB, Spohr AM. Effect of polyacrylic acid on the interface and bond strength of self-adhesive resin cements to dentin. *J Adhes Dent*. 2013. doi: 10.3290/j.jad.a29531. PMID: 23560256.

Van Strijp AJP, Jansen DC, DeGroot J, Ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res*. 2003. doi: 10.1159/000068223. PMID: 12566641.

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

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2007. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.08.009. PMID: 17045563.

Suppa P, Breschi L, Ruggeri A, Mazzotti G, Prati C, Chersoni S, et al. Nanoleakage within the hybrid layer: A correlative FEISEM/TEM investigation. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2005. doi: 10.1002/jbm.b.30217. PMID: 15678495.

Sylvester MF, Yannas I V., Salzman EW, Forbes MJ. Collagen banded fibril structure and the collagen-platelet reaction. *Thromb Res*. 1989. doi: 10.1016/0049-3848(89)90463-5. PMID: 2506660.

Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2010. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.04.003. PMID: 19374923.

Tanumiharja M, Burrow MF, Tyas MJ. Microtensile bond strengths of glass ionomer (polyalkenoate) cements to dentine using four conditioners. *J Dent*. 2000. doi: 10.1016/S0300-5712(00)00009-9. PMID: 10785303.

Tay F, King N, Chan K, Pashley D. How can nanoleakage occur in self-etching adhesive systems that demineralize and infiltrate simultaneously? *J Adhes Dent*.

2002. doi: Article. PMID: 12666745.

Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent*. 2002. doi: 10.1016/S0300-5712(02)00064-7. PMID: 12554121.

Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res*. 2002. doi: 10.1177/154405910208100708. PMID: 12161459.

Tekçe N, Tuncer S, Demirci M, Balci S. Do matrix metalloproteinase inhibitors improve the bond durability of universal dental adhesives? *Scanning*. 2016. doi: 10.1002/sca.21293. PMID: 26763084.

Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, et al. Cysteine Cathepsins in Human Dentin-Pulp Complex. *J Endod*. 2010. doi: 10.1016/j.joen.2009.12.034. PMID: 20171366.

Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Mazzoni A, Carvalho RM, Carrilho M, Tersariol IL, et al. Can quaternary ammonium methacrylates inhibit matrix MMPs and cathepsins? *Dent Mater*. 2015. doi: 10.1016/j.dental.2014.10.006. PMID: 25467953.

Tezvergil-Mutluay A, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, Agee KA, Key WO, Scheffel DLS, et al. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. *J Dent Res*. 2013. doi: 10.1177/0022034512466264. PMID: 23103634.

Tezvergil-Mutluay A, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, Agee KA, Key WO, Scheffel DLS, et al. Effect of Phosphoric Acid on the Degradation of Human Dentin Matrix. *J Dent Res*. 2012. doi: 10.1177/0022034512466264. PMID: 23103634.

Tian F, Zhou L, Zhang Z, Niu L, Zhang L, Chen C, et al. Paucity of nanolayering in resin-dentin interfaces of MDP-based adhesives. *J Dent Res*. 2015. doi: 10.1177/0022034515623741. PMID: 26701351.

Tjäderhane L. Dentin Bonding: Can We Make it Last? *Oper Dent*. 2015. doi:

10.2341/14-095-BL. PMID: 25615637.

Tjäderhane L, Buzalaf MAR, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: The era of “dentin degradomics.” *Caries Res.* 2015. doi: 10.1159/000363582. PMID: 25661522.

Tjäderhane L, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH. Dentin basic structure and composition-an overview. *Endod Top.* 2009. doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00269.x.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998. doi: 10.1177/00220345980770081001. PMID: 9719036.

Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, et al. Optimizing dentin bond durability: Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater.* 2013a. doi: 10.1016/j.dental.2012.08.004. PMID: 22901826.

Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer—A review. *Dent Mater.* 2013b. doi: 10.1016/j.dental.2013.07.016. PMID: 23953737.

Tonial D, Ghiggi PC, Lise AA, Burnett LH, Oshima HMS, Spohr AM. Effect of conditioner on microtensile bond strength of self-adhesive resin cements to dentin. *Stomatologija.* 2010. doi: 103-02 [pii]. PMID: 21063136.

Turco G, Cadenaro M, Maravić T, Frassetto A, Marsich E, Mazzoni A, et al. Release of ICTP and CTX telopeptides from demineralized dentin matrices: Effect of time, mass and surface area. *Dent Mater.* 2018. doi: 10.1016/j.dental.2017.12.003.

Turco G, Frassetto A, Fontanive L, Mazzoni A, Cadenaro M, Di Lenarda R, et al. Occlusal loading and cross-linking effects on dentin collagen degradation in physiological conditions. *Dent Mater.* 2016. doi: 10.1016/j.dental.2015.11.026.

PMID: 26743966.

Ubal dini ALM, Baesso ML, Medina Neto A, Sato F, Bento AC, Pascotto RC. Hydrogen peroxide diffusion dynamics in dental tissues. *J Dent Res*. 2013. doi: 10.1177/0022034513488893. PMID: 23632810.

Uno S FWJ. Function of the hybrid zone as a stress-absorbing layer in resin-dentin bonding. *Oper Dent*. 1995. doi: Article.

Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: A critical review. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2009. doi: 10.1002/jbm.b.31253. PMID: 18975378.

Weis A. Mineralization in Organic Matrix Frameworks. *Rev Mineral Geochemistry*. 2003. doi: 10.2113/0540249.

Vidal CMP, Tjäderhane L, Scaffa PM, Tersariol IL, Pashley D, Nader HB, et al. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. *J Dent Res*. 2014. doi: 10.1177/0022034513516979. PMID: 24356440.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003. doi: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D. PMID: 12730128.

Wagner A, Wendler M, Petschelt A, Belli R, Lohbauer U. Bonding performance of universal adhesives in different etching modes. *J Dent*. 2014. doi: 10.1016/j.jdent.2014.04.012. PMID: 24814138.

Wilson CR. Methods for Analysis of Gastrointestinal Toxicants. *Compr. Toxicol*. Second Ed. 2010 . doi: 10.1016/B978-0-08-046884-6.00845-9.

Yamauchi M, Shiiba M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. *Methods Mol Biol*. 2008. doi: 10.1007/978-1-60327-84-7_7. PMID: 18373252.

Yang B, Adelung R, Ludwig K, Bößmann K, Pashley DH, Kern M. Effect of structural change of collagen fibrils on the durability of dentin bonding.

Biomaterials. 2005. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.01.024. PMID: 15769538.

Yoshida Y, Inoue S. Chemical analyses in dental adhesive technology. *Jpn Dent Sci Rev.* 2012. doi: 10.1016/j.jdsr.2012.03.001. PMID: 6995.

Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, Yoshioka M, Snauwaert J, Abe Y, et al. Adhesion to and decalcification of hydroxyapatite by carboxylic acids. *J Dent Res.* 2001. doi: 10.1177/00220345010800061701. PMID: 11499514.

Yoshida Y, VanMeerbeek B, Nakayama Y, Snauwaert J, Hellemans L, Lambrechts P, et al. Evidence of chemical bonding at biomaterial-hard tissue interfaces. *J Dent Res.* 2000. doi: 10.1177/00220345000790020301. PMID: 10728971.

Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, et al. Self-assembled nano-layering at the adhesive interface. *J Dent Res.* 2012. doi: 10.1177/0022034512437375. PMID: 22302145.

Yoshihara K, Yoshida Y, Hayakawa S, Nagaoka N, Irie M, Ogawa T, et al. Nanolayering of phosphoric acid ester monomer on enamel and dentin. *Acta Biomater.* 2011. doi: 10.1016/j.actbio.2011.04.026. PMID: 21575747.

Yoshioka M, Yoshida Y, Inoue S, Lambrechts P, Vanherle G, Nomura Y, et al. Adhesion/decalcification mechanisms of acid interactions with human hard tissues. *J Biomed Mater Res.* 2002. doi: 10.1002/jbm.1216. PMID: 11745537.

Yuan Y, Shimada Y, Ichinose S, Tagami J. Qualitative analysis of adhesive interface nanoleakage using FE-SEM/EDS. *Dent Mater.* 2007. doi: 10.1016/j.dental.2006.03.015. PMID: 16765432.

Zhang Z yi, Tian F cong, Niu L na, Ochala K, Chen C, Fu B ping, et al. Defying ageing: An expectation for dentine bonding with universal adhesives? *J Dent.* 2016. doi: 10.1016/j.jdent.2015.11.008. PMID: 26655173.

Zheng P, Zaruba M, Attin T, Wiegand A. Effect of different matrix metalloproteinase inhibitors on microtensile bond strength of an etch-and-rinse and a self-etching adhesive to dentin. *Oper Dent.* 2014. doi: 10.2341/13-162-L. PMID: 24815915.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL: Caracterização da interface adesiva sob diferentes condicionamentos *in vitro* à dentina humana

Pesquisador: Lucélia Lemes Gonçalves

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60315716.4.0000.0077

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.784.538

Apresentação do Projeto:

Sistemas adesivos universais tem como proposta serem utilizados sob condicionamento ácido total ou autocondicionante em dentina. Contudo, estudos tem questionado os resultados obtidos com o uso do ácido fosfórico (30-40%), sugerindo que essa estratégia pode prejudicar a performance dessa nova classe de sistemas adesivos. O objetivo desse estudo será caracterizar a interface adesiva resina-dentina sob diferentes formas de condicionamento ácido total (fosfórico 32% ou poliacrílico 25%), e autocondicionante, nos tempos de armazenamento imediato (24h) e longitudinal,

12 meses (12 m). Cento e trinta e oito molares humanos hígidos serão preparados para a obtenção de espécimes de dentina e divididos aleatoriamente em grupos, do seguinte modo: G1) ácido fosfórico 32% 24 h; G2) ácido fosfórico 32% 12 m; G3) ácido poliacrílico 25% 24 h; G4) ácido poliacrílico 25% 12 m; G5) autocondicionante 24 h; G6) autocondicionante 12 m. Todas as amostras serão tratadas com o sistema adesivo

Single Bond Universal (3M/ESPE) e restauradas (exceto as que serão submetidas à análise de espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier - FTIR). A caracterização da interface adesiva será realizada através das seguintes análises: 1) teste de resistência de união microtração (n=60); 2) nanoinfiltração (n=18); 3) microscopia eletrônica de varredura (n=12); 4) microscopia

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

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



Continuação do Parecer: 1.784.538

eletrônica de transmissão (n=12); 5) FTIR (n=6) e 6) análise da degradação colágenolítica sob a ação de diferentes protocolos de condicionamento ácido dentinário nos tempos de armazenamento imediato (24h) e longitudinal, 6 meses (6 m). Os resultados serão submetidos a uma análise exploratória para a seleção do teste estatístico mais adequado dentro das condições experimentais desse estudo (p0,05).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Visando a caracterização "in vitro" da interface adesiva em dentina sob diferentes condicionamentos, nos tempos imediato (24h) e longitudinal (12 meses), os objetivos do presente projeto serão os seguintes: 1) avaliar a resistência adesiva à microtração; 2) avaliar a nanoinfiltração com o auxílio dos microscópios de luz e de varredura eletrônica; 3) analisar por microscopia eletrônica de varredura a interface adesiva; 4) analisar a interface em microscopia eletrônica de transmissão; 5) caracterizar quimicamente o substrato dentinário antes e após o condicionamento, com espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier - FTIR (somente para o tempo imediato)

Objetivo Secundário:

6) Subprojeto PDSE- analisar a degradação colágenolítica sob a ação de diferentes protocolos de condicionamento ácido dentinário nos tempos imediato (24h) e longitudinal (6 meses).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não existem riscos associados à pesquisa.

Benefícios:

A obtenção de conhecimento à respeito do comportamento de uma nova classe de sistemas adesivos sob diferentes tipos de condicionamento dentinário a fim de melhorar o seu desempenho ao longo do tempo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os monômeros resinosos funcionais contidos na formulação do Single Bond Universal são promissores em se tratando de ligações químicas com o substrato dentinário e mostram resultados favoráveis quanto à melhora na longevidade da interface adesiva. Contudo, o condicionamento da superfície dentinária com o ácido fosfórico (37-40%) mostra-se incompatível com a proposta desse sistema adesivo,

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

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



Continuação do Parecer: 1.784.538

evidenciando resultados longitudinais desfavoráveis. A avaliação de um ácido amplamente estudado e que se mostra promissor quanto às interações químicas propostas por esse tipo de adesivo como o ácido poliacrílico é muito interessante (Inoue et al. 2001; Van Meerkeek et al. 1998; Yoshida et al. 2000; Poggio et al. 2014). Pois, trata-se de um material popular na odontologia, de fácil aquisição e manipulação, que se adequa ao objetivo proposto. Espera-se que o padrão de condicionamento dentinário obtido com o ácido poliacrílico promova uma excelente adesão química e micromecânica, que reflita em uma interface adesiva mais resistente ao desafio longitudinal.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos de acordo.

Recomendações:

A pesquisadora deverá enviar relatório científico ao final da pesquisa para não incorrer na penalidade de não ter submissão avaliada pelo CEP, até o atendimento da recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ND

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer da relator(a).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_798530.pdf	25/09/2016 13:16:25		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMODMB.pdf	25/09/2016 13:15:34	Lucélia Lemes Gonçalves	Aceito
Folha de Rosto	FolhaR.pdf	25/09/2016 13:12:52	Lucélia Lemes Gonçalves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PDSE.pdf	22/09/2016 18:14:07	Lucélia Lemes Gonçalves	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

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

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



Continuação do Parecer: 1.784.538

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 20 de Outubro de 2016

Assinado por:
Vera Lúcia Ignácio Molina
(Coordenador)

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