

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DENTÍSTICA RESTAURADORA**

CAMILA FALCONI PAEZ

**OS FLAVONÓIDES NANOENCAPSULADOS PODEM SER UMA SOLUÇÃO PARA
A ADESÃO À DENTINA AFETADA POR CÁRIES?
UM ESTUDO *IN VITRO*.**

**PONTA GROSSA
2024**

CAMILA FALCONI PAEZ

**OS FLAVONÓIDES NANOENCAPSULADOS PODEM MELHORAR A ADESÃO
EM DENTINA AFETADA POR CÁRIES?
UM ESTUDO *IN VITRO*.**

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Dentística Restauradora. Linha de Pesquisa: Propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Galvão Arrais
Coorientador: Prof. Dr. Andrés Dávila Sánchez

PONTA GROSSA

2024

F184 Falconi Páez, Camila
Os flavonoides nanoencapsulados podem melhorar a adesão em dentina afetada por cáries? um estudo *in vitro* / Camila Falconi Páez. Ponta Grossa, 2024. 65 f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia - Área de Concentração: Dentística Restauradora), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Galvão Arrais.
Coorientador: Prof. Dr. Andrés Dávila Sánchez.

1. Flavonoides. 2. Quercetina. 3. Naringina. 4. Adesivos Dentais. I. Arrais, Cesar Augusto Galvão. II. Dávila Sánchez, Andrés. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Dentística Restauradora. IV.T.

CDD: 617.6

CAMILA FALCONI PAEZ

OS FLAVONOIDES NANOENCAPSULADOS PODEM
MELHORAR A ADESÃO EM DENTINA AFETADA POR CÁRIES?

UM ESTUDO *IN VITRO*.

Dissertação apresentada como pré-requisito
para obtenção do título de Mestre na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, no
curso de Mestrado em Odontologia - Área de
Concentração em Dentística Restauradora.
Linha de Pesquisa: Propriedades físico-
químicas e biológicas dos materiais.

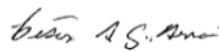
Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2024



Profa. Dra. Nara Hellen Campanha Bombarda
Doutora em Odontologia
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Mario Felipe Gutierrez Reyes
Doutor em Odontologia
Universidad de los Andes



Prof. Dr. Cesar Augusto Galvão Arrais
Doutor em Odontologia
Universidade Estadual de Ponta Grossa

DADOS CURRICULARES

CAMILA FALCONI PAEZ

NASCIMENTO

28.01.1997
Quito – Ecuador

FILIAÇÃO

Cecilia Beatriz Páez Zamora
Rogelio Alonso Falconi Solorzano

2015 - 2020

Curso de Graduação em Odontologia
da Universidad San Francisco de
Quito. Quito – Ecuador.

2022 – 2024

Curso de Pós-graduação em
Odontologia da Universidade Estadual
de Ponta Grossa (UEPG), nível de
Mestrado em Odontologia – Área de
Concentração em Dentística
Restauradora.

2022 - CURSANDO

Curso de Pós-graduação em Prótese e
Dentística. Universidade Tuiuti de
Paraná. Curitiba – PR –Brasil

Dedico este trabalho...

Aos meus pais **Alonso e Cecilia**, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todas as minhas decisões. Sem vocês, nada disto seria possível.

Obrigada por todas as palavras animadoras, as chamadas de todos os dias para que não me sinta sozinha, por todas as orações, por ter me motivado a procurar mais do que se tem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por ter me guiado e dado forças para sempre seguir em frente, por estar sempre ao meu lado. Devo a Ele a oportunidade que tive de chegar aonde cheguei. Muitas pessoas têm essa capacidade, mas não têm a oportunidade.

A **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, por me ter dado esta maravilhosa oportunidade de crescer profissionalmente e me abrir as portas ao mundo das pesquisas na odontologia.

A minha **família**, meus pais e minhas irmãs, por acreditar sempre em mim. Agradeço também porque, apesar da grande distância, conseguimos sempre manter-nos juntos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Cesar Augusto Galvão Arrais**, sou muito grata por todas as orientações que recebi, por me guiar em cada passo deste projeto. Obrigada pela paciência para minhas perguntas e para entender meu portunhol. Admiro o seu trabalho, sua maneira de ensinar e de motivar aos seus alunos. Sinto que estes anos do mestrado cresci muito profissionalmente graças aos seus ensinamentos.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Andrés Dávila Sánchez**, que me inspirou a crescer profissionalmente. Sou muito grata por todo o conhecimento, por todas as reuniões, e principalmente por me fazer acreditar no meu potencial.

A minha amiga doutoranda **Alejandra Nunez**, por me ter acompanhado em todo o processo laboratorial. Por ter me ensinado com muita paciência cada método. Aprendi muito com você, obrigada.

A **Prof. Dra. Bruna Hilgemberg**, por ter dedicado tempo para me explicar e dar-me dicas no meu projeto.

A minha família da Pos-Graduação, **Claudia, Byron, Tobia e Jorge**, por todos os bons momentos vividos, pela convivência, pela ajuda, por tornar meus dias mais alegres.

A meus **amigos e colegas do mestrado e doutorado**, graças por seu carinho e amizade. Sempre lembrarei dos momentos juntos, de todas nossas reuniões, congressos, aulas.

A **Ana Vitória**, pelo auxílio direto no laboratório, por sua vontade de aprender, sua dedicação.

A **Jana**, por ter me ensinado muito sobre microbiologia. Graças por seu carinho e paciência.

Aos **professores** que fazem parte do Programa de Pós-Graduação, pelos ensinamentos teóricos e práticos que contribuíram com meu crescimento profissional.

Ao **Brasil**, por ter me recebido com os braços abertos. Desde criança eu quis estudar no Brasil, e finalmente consegui realizar meu sonho.

A **CAPES** pela concessão de bolsa de estudo durante meu segundo ano de meu curso de mestrado.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta participaram de mais essa etapa em minha vida. Obrigada por tudo.

RESUMO

FALCONI PAEZ, C. **Os flavonoides nanoencapsulados podem melhorar a adesão em dentina afetada por cáries? Um estudo *in vitro***. Ponta Grossa, 2023. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Dentística Restauradora). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2023.

Objetivo: Avaliar o efeito da adição de flavonoides nanoencapsulados em dois adesivos universais utilizados em modo *total-etch* na resistência de união resina-dentina (μ TBS), na nanoinfiltração (NI) e a caracterização da camada híbrida em dentina afetada por cárie (DAC). **Material e métodos:** Foi utilizado um método microbiológico para criar uma DAC em 60 molares humanos. A quercetina (Q) e a naringina (N) nanoencapsuladas foram incorporadas no Prime&Bond Universal (PBU; Dentsply-Sirona) e no Single Bond Universal (SBU, 3M) e distribuídas aleatoriamente em 6 grupos: 1) PBU C (controle), 2) PBUN, 3) PBUQ, 4) SBU C (controle), 5) SBUN, 6) SBUQ. Um bloco de 4 mm de espessura de resina composta (TPH Spectrum, Denstply Sirona) foi construído sobre a superfície da DAC e fotopolimerizado de acordo com as instruções do fabricante. Os espécimes foram seccionados em palitos de resina-dentina (0,8 mm²). A análise μ TBS e NI da interface resina-dentina foi avaliada após 24 h (TI) e após 6 meses de armazenamento em água (TA). Além disso, o perfil químico dos flavonoides na camada híbrida foi avaliado. Os resultados foram analisados utilizando o teste ANOVA não paramétrico de três vias com medidas repetidas seguido do teste post hoc de Bonferroni ($\alpha = 5\%$). **Resultados:** Todos os grupos contendo flavonoides apresentaram maiores valores de μ TBS e NI após TA ($p < 0.05$). Os grupos PBUQ e SBUQ apresentaram os valores μ TBS mais elevados e valores NI mais baixos quando comparado com o grupo controle. O grupo PBU apresentou valores NI mais elevados quando comparado com o grupo SBU após o TI ($p < 0,05$), e esses valores diminuíram após TA ($p < 0,05$). Q e N foram identificados na camada híbrida do SBU e PBU, assim como a infiltração adesiva. **Conclusão:** O uso de flavonoides nanoencapsulados pode melhorar a longevidade da interface de união criada por sistema adesivo universal aplicado em DAC.

Palavras-chave: Adesivos Dentais; Flavonoides; Quercetina; Naringina

ABSTRACT

FALCONI PAEZ, C. **Can nanoencapsulated flavonoids improve adhesion in caries affected dentin? An *in vitro* study.** Ponta Grossa, 2023. Tese (Mestrado em Odontologia – Dentística Restauradora). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2023.

Objective: To evaluate the effect of the addition of nanoencapsulated flavonoids in two universal adhesives used in a total-etch mode on the microtensile bond-strength (μ TBS), nanoleakage (NL), and the characterization of hybrid layer in artificial caries-affected dentin (CAD). *Material and methods:* A microbiological method was used to create an artificial CAD in 60 human molars. Nanoencapsulated quercetin (Q) and naringin (N) were incorporated to Prime&Bond Universal (PBU; Dentsply-Sirona) and Single Bond Universal (SBU, 3M) and randomly allocated into 6 groups: 1) PBUC (control), 2) PBUN, 3) PBUQ, 4) SBU C (control), 5) SBUN, 6) SBUQ. A 4-mm thick block of resin composite (TPH Spectrum, Denstply Sirona) was built upon the flat bonded CAD surface and light-cured following the manufacturer's instructions. Specimens were sectioned into resin-dentin sticks ($0,8\text{mm}^2$). A μ TBS and NL tests were performed after 24 h (IT) and after 6 months of water storage (WS). In addition, the characterization of the hybrid layer was evaluated. The results were analyzed using non-parametric three-way repeated measures way ANOVA test with repeated measures followed by Bonferroni's post hoc test ($\alpha = 5\%$). *Results:* All flavonoids groups improved μ TBS and NL values after WS ($p < 0.05$). The Q group showed the higher μ TBS values and lower NL values when compared to C. PBU showed higher NL values when compared to SBU after IT ($p < 0.05$), and those values decreased after WS ($p < 0.05$). Q and N were identified in the hybrid layer of SBU and PBU, as well as the adhesive infiltration. *Conclusion:* The use of nanoencapsulated flavonoids may improve the durability of the bonding interface created by universal bonding systems on CAD.

Key Words: Dental Adhesives, Flavonoids, Quercetin, Naringin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema dos grupos adesivos utilizados neste estudo	29
Figura 2. Representação ilustrativa da distribuição dos espécimes em cada um dos testes realizados neste estudo	31
Figura 3. Sequência da estratégia adesiva.	35
Figura 4. Sequência para o teste de μ TBS.....	36
Figura 5. Sequência para o teste de NI.....	38
Figura 6. Espectrômetro micro-Raman utilizado neste estudo	39
Figura 7. Porcentagem (%) do tipo de fraturas para os diferentes tempos (TI e TA).....	41
Figura 8. Imagens FEG-SEM representativas da interface de união à DAC dos grupos experimentais após TI e após TA	43
Figura 9. Espectros (micro-Raman) representativos da camada híbrida de dois sistemas adesivos universais contendo flavonoides	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes para a solução de cárie artificial.....	33
Tabela 2. Sistemas adesivos universais utilizados neste estudo.....	34
Tabela 3. Média (desvio padrão) de μ TBS (MPa) dos adesivos universais (SBU & PBU) de acordo com o momento e os grupos experimentais	40
Tabela 4. Média (desvio padrão) da NI (%) dos adesivos universais (SBU & PBU) de acordo com o momento e os grupos experimentais	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ANOVA	Análise de variância
Ca ²⁺	Calcio
C	Controle
DAC	Dentina Afetada por Cárie
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FEG-SEM	Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GC	Grau de conversão
HEMA	2-Hidroxietil Metacrilato
MMPS	Metaloproteinases
N	Naringina
NI	Nanoinfiltração
pH	Potencial hidrogeniônico
PBU	Single Bond Universal
PCL	Policaprolactona
Q	Quercetina
SBU	Prime Bond Universal
TGF-β1	Fator de crescimento transformador- β1
Zn ²⁺	Zinc
μm	Micrometros
μTBS:	Teste de Microtração
10-MDP	10-Metacriloiloxiecil dihidrogênio

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
μ	Micro
$>$	Maior
$<$	Menor
p	Significância estatística
n	Número amostral
$=$	Igual
$\%$	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Cárie dentaria	17
2.2	Tópico: sistemas adesivos	20
2.3	Tópico: flavonoides	25
3	PROPOSIÇÃO	28
3.1	Objetivo geral:.....	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Formulação do adesivo conteúdo flavonoides nano-encapsulados	29
4.2	Preparação das amostras	30
4.3	Cálculo amostral	32
4.4	Indução microbiológica de cárie	32
4.5	Procedimento adesivo	33
4.6	Teste de μ TBS	35
4.7	Teste de nanoinfiltração (NI).....	37
4.8	Identificação dos flavonoides na camada híbrida	38
4.9	Análise estatística	39
5	RESULTADOS.....	40
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	64

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a cárie dentária é um grande problema de saúde pública, sendo considerada como uma das doenças crônicas globais com 60-90% de prevalência (Pitts et al. ¹ 2017). A cárie dentaria é um processo dinâmico que consiste na destruição do tecido duro dentário devido à perda mineral (Machiulskiene et al. ² 2020). As bactérias endógenas produzem ácido orgânico fraco como produto da fermentação de carboidratos, levando a variações dos valores locais de pH (Pitts et al. ¹ 2017). Os períodos de alternância de desmineralização e remineralização dentária causados pelas alterações do pH resultam na corrosão e na formação de lesões de cárie (Tabata et al. ³ 2021). Além disso, se a perda mineral continuar ocorrendo, haverá um aumento da porosidade da dentina intertubular, permitindo a penetração dos ácidos e bactérias em regiões mais profundas no dente, resultando em dentina cariada (Isolan et al. ⁴ 2018; Mazzoni et al. ⁵ 2015).

A dentina cariada envolve desmineralização e quebra da matriz de colágeno, resultando em duas camadas distintas: a camada externa conhecida como dentina infetada e a camada interna conhecida como dentina afetada (Alves et al. ⁶ 2013; Epasinghe et al. ⁷ 2016). A dentina afetada por cárie (DAC) tem menor contaminação e pode se remineralizar, enquanto a dentina infetada por cárie apresenta alterações que comprometem a adesão e precisa ser removida no momento da restauração (Costa et al. ⁸ 2017). A DAC apresenta túbulos preenchidos por cristais ácido-resistentes que interferem na formação de *tags* resinosos (Alves et al. ⁶ 2013; Ceballos et al. ⁹ 2003). Portanto, a DAC é considerada como um substrato desafiador para a adesão e clinicamente relevante, comumente visto na prática odontológica (Isolan et al. ⁴ 2018; Costa et al. ⁸ 2017; Marquezan et al. ¹⁰ 2009).

O controle da cárie através do tratamento restaurador é uma tendência na prática clínica. Os compósitos de resina são um dos materiais mais utilizados para este fim, tendo demonstrado uma taxa de sucesso de 48% num período de 33 anos (Da Rosa Rodolpho et al. ¹¹ 2022). No entanto, a baixa longevidade das restaurações do compósito é atribuída à degradação da camada híbrida, que é definida como a união micromecânica entre a matriz de colágeno da dentina e a resina composta (Leme-Kraus et al. ¹² 2017). A instabilidade da união resina-dentina deixa algumas fibras de colágeno desprotegidas e suscetíveis para que as bactérias cariogênicas alcancem o substrato dentinário, afetando a estabilidade e longevidade

das restaurações (Islam et al. ¹³ 2012; Epasinghe et al. ¹⁴ 2014; Tjaderhane et al. ¹⁵ 2015; Schulze et al. ¹⁶ 2005).

A aplicabilidade dos flavonoides é amplamente investigada. Estudos têm demonstrado melhorias na estabilidade e na longevidade da adesão à dentina (Epasinghe et al. ⁷ 2016; Davila-Sanchez et al. ¹⁷ 2020; Davila-Sanchez et al. ¹⁸ 2021; Paik et al. ¹⁹ 2022). No estudo de Epasinghe et al. (2012), a incorporação da proantocianidina em um adesivo (sem encapsulamento) demonstrou resultados favoráveis na redução da nanoinfiltração (Epasinghe et al. ²⁰ 2012). No estudo de Hiraishi et al. (2013), os resultados do tratamento com hesperidina, proantocianidina e a epigallocatequina galato demonstraram melhorias nas propriedades mecânicas e na resistência à degradação hidrolítica (Hiraishi et al. ²¹ 2013). Além disso, Dávila-Sánchez et al. (2021) demonstraram que a utilização dos flavonoides como pré-tratamento leva a uma melhoria no desempenho de adesão em dentina hígida (Davila-Sanchez et al. ¹⁸ 2021). A incorporação de agentes bioativos que possuem numerosas funções, como os flavonoides, tem sido uma abordagem promissora de estudo (Yang et al. ²² 2017).

Os flavonoides são polifenóis naturais cuja estrutura base é constituída por um anel de benzo- γ -pirona unido com um grupo fenilo. Por um lado, a Quercetina (Q) é um flavonoide que pertence ao grupo flavonol e pode ser encontrada em maçãs, cebolas, chá e vinho tinto (Russo et al. ²³ 2012). Estudos demonstraram que a Q apresenta efeitos anti-carcinogênicos, anti-bacterianos, anti-inflamatórios, antioxidantes e vasodilatadores (Rauf et al. ²⁴ 2018; Taherkhani et al. ²⁵ 2020; Ramos et al. ²⁶ 2006; Maleki et al. ²⁷ 2019; Chopra et al. ²⁸ 2000; Serban et al. ²⁹ 2016). Por outro lado, a Naringina (N) faz parte do grupo flavonona que podem ser encontrados principalmente em tomates, toranjas e outras frutas cítricas (Chen et al. ³⁰ 2016). A literatura tem revelado que a naringina possui propriedades anti-bacterianas, anti-oxidantes, anti-inflamatórias e anti-carcinogênicas (Céliz et al. ³¹ 2011; Aihaiti et al. ³² 2021; Memariani et al. ³³ 2021). Devido ao seu grupo glicosídeo, ambos flavonoides apresentam uma pequena estrutura molecular que é capaz de penetrar na dentina desmineralizada e aumentar o efeito da re-mineralização (Epasinghe et al. ⁷ 2016). No estudo de Dávila-Sánchez et al (2020), a Q e a N demonstraram uma melhoria imediata no desempenho da adesão e na longevidade ao ser utilizados como *primers* em um sistema de adesivo universal em DAC (Davila-Sanchez et al. ¹⁷ 2020). Apesar dos benefícios do uso de flavonoides como primers, o passo adicional no

procedimento adesivo, aumenta o tempo de trabalho e a dificuldade da técnica restauradora.

O uso de nanocapsulas é um sistema reservatório de substâncias ativas aptas para promover uma melhor liberação do ativo de uma maneira mais controlada (Schmaltz et al. ³⁴ 2013; Budel et al. ³⁵ 2020). A policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático que ao ser utilizado para nanoencapsular a N e Q em adesivos universais, mostrou resultados promissores nas propriedades mecânicas da interface adesiva em dentina hígida (Hilgemberg ³⁶ 2022). No entanto, até o momento, ainda não foi avaliado o efeito em DAC. Por conseguinte, o objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o efeito de dois adesivos universais contendo Q e N nano-encapsuladas nas propriedades adesivas (μ TBS: resistência de união à microtração, NI: nanoinfiltração) e na propriedade mecânica (espectrometria micro-Raman) em DAC no modo *total-etch*. As seguintes hipóteses nulas foram testadas: a) não há diferenças significativas nos valores de μ TBS e NI quando se utilizam adesivos universais com flavonoides nanoencapsulados em DAC no após 24h (TI); b) os valores de μ TBS e NI após 6 meses de armazenamento em água (TA) não serão diferentes daqueles antes do envelhecimento; c) não há diferenças entre os sistemas adesivos utilizados em μ TBS e NI; d) não serão detectados os espectros dos flavonoides na camada híbrida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cárie dentária

A odontologia remonta a 5.000 AC, quando as pessoas pensavam que a cárie dentária era o resultado de um "verme de dente". O termo "cárie dentária" apareceu na literatura por volta de 1634; derivado do antigo irlandês *ara-chrinn* e da palavra latina *cariēs*, que significa decadência (Conrads e About ³⁷ 2018). O termo foi utilizado para descrever apenas orifícios nos dentes, sem conhecimento de sua etiologia e patogênese (Bowen ³⁸ 2016). Os conceitos sobre a cárie dentária evoluíram ao longo de muitos séculos, desde o final de 1800 com a descoberta do envolvimento de microrganismos (Russell ³⁹ 2009). A cárie dentária é um grande problema de saúde onde a maioria das crianças e adultos é acometida pela doença, afetando aproximadamente 3,1 bilhões de pessoas (44%) com grande impacto na qualidade de vida (Kassebaum et al. ⁴⁰ 2015).

O processo dinâmico de cárie envolve interações entre a estrutura do dente, o biofilme microbiano formado na superfície do dente e os açúcares, bem como influências salivares e genéticas (Pitts et al. ¹ 2017). Esta doença multifatorial pode estar relacionada a três fatores principais: bactérias orais na placa dentária, presença de carboidratos fermentáveis e superfície dentária disponível. Outros fatores contribuintes responsáveis por aumentar ou diminuir a velocidade da cárie podem ser: características da superfície, hábitos de higiene oral, hábitos alimentares, qualidade e quantidade de saliva, etc (Mathur e Dhillon ⁴¹ 2018).). Esses fatores podem levar a uma rápida alternância de períodos entre desmineralização e re-mineralização que causa uma mudança no equilíbrio fisiológico entre o mineral do dente e os biofilmes microbianos orais (Yoshihara et al. ⁴² 2020). A desmineralização é definida como a perda de mineral do dente devido a ácidos, enquanto a re-mineralização é o ganho líquido de mineral em tecido previamente desmineralizado (Machiulskiene et al. ² 2020).

A cárie dentária geralmente começa na superfície do esmalte e abaixo dela, onde a estrutura mineral cristalina do dente é desmineralizada por ácidos orgânicos produzidos por bactérias do biofilme a partir do metabolismo de carboidratos fermentáveis da dieta. As bactérias podem ser mantidas perto da superfície por forças de Van Der Waal entre as camadas externas da bactéria (adesinas) e o filme de

condicionamento. A complexidade do biofilme aumenta quando as espécies colonizadoras secundárias se ligam aos colonizadores iniciais, levando a interações microbianas antagônicas e sinérgicas. O resultado é a formação de uma matriz que retém o biofilme na superfície e influencia o movimento e a penetração de moléculas dentro do biofilme, causando um efeito protetor às bactérias (Pitts et al. ¹ 2017).

Quando os ácidos se acumulam na fase fluida do biofilme, o pH cai causando a interface biofilme-esmalte subsaturada, onde o ácido desmineraliza parcialmente a camada superficial do dente. A perda de minerais leva ao aumento da porosidade que alarga os espaços entre os cristais do esmalte, permitindo que os ácidos se difundam mais profundamente no dente, resultando em grande desmineralização abaixo da superfície. O pH do fluido do biofilme pode retornar à neutralidade uma vez que esteja suficientemente saturado com o potencial tamponante da saliva, interrompendo a desmineralização e promovendo a redeposição de minerais. No entanto, se a desmineralização ocorrer por tempo suficiente, haverá início de lesões de cárie. Esta primeira fase do processo de cárie é clinicamente importante, porque a lesão pode ser revertida modificando os fatores causadores (Pitts et al. ¹ 2017).

Durante a fase de desmineralização, a um pH local de 5.5, as bactérias orais produzem ácido orgânico que solubiliza a hidroxiapatita. Estudos iniciais de lesões de cárie encontraram maiores proporções e incidências de *S. mutans* e *S. sobrinus*; a presença de lactobacilos em lesões avançadas (Loesche ⁴³ 1986; Scheie e Petersen ⁴⁴ 2004). O ácido produzido pelas bactérias erode o esmalte superficial, porém, devido aos íons de cálcio e fosfato salivares, a superfície é continuamente remineralizada. Se o ácido permanecer em contato com o dente durante longos períodos de tempo, pode causar a desmineralização sub-superficial do esmalte, que é visível como manchas brancas. Em progressão posterior, a mancha branca pode quebrar a continuidade do esmalte, formando uma cavidade (Mathur e Dhillon ⁴¹ 2018).

A sua ativação ocorre quando a ponte do predomínio com o zinco catalítico é rompida por outras MMPs, cisteína catépsinas ou outras proteinases, ou por alterações de pH. As catépsinas participam intracelularmente em diversos processos como a renovação normal das proteínas, a apoptose e o processamento de pró-proteínas; e extracelularmente atuam diretamente na degradação da matriz extracelular e contribuem para cascatas proteolíticas que promovem a capacidade de degradação. Ao contrário das MMPs, que atuam num ambiente neutro, as cisteína

catepsinas têm atividade num pH ligeiramente ácido, entre 5 e 6 (Tjaderhane et al. 15 2015).

O ambiente ácido criado pelas bactérias facilita a atividade funcional das MMPs endógenas (Mazzoni et al. 5 2015). Em humanos, existem 23 membros da família das MMPs divididos em seis grupos com base na homologia e especificidade do substrato: collagenases, galtinases, matrilisinas, MMPs do tipo membrana, estromelisinases e outras MMPs. As MMP-8 e MMP-9 são as MMPs salivares mais abundantes e predominam nas lesões de cárie. São enzimas dependentes de Zn^{2+} e Ca^{2+} , capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz extracelular. Sua ativação ocorre quando a ponte do prodomínio com o zinco catalítico é rompida por outras MMPs, cisteína catepsinas ou outras proteinases, ou por alterações de pH. As catepsinas participam intracelularmente em diversos processos como a renovação normal das proteínas, apoptose e o processamento de pró-proteínas; e extracelularmente atuam diretamente na degradação da matriz extracelular e contribuem para cascatas proteolíticas que promovem a capacidade de degradação. Ao contrário das MMPs, que atuam num ambiente neutro, as cisteína catepsinas têm atividade num pH levemente ácido, entre 5 e 6 (Tjaderhane et al. 15 2015).

Além disso, foi relatado que o TGF- β 1 (fator de crescimento transformador- β 1) desempenha um papel importante na regulação do complexo dentina-polpa (Tjaderhane et al. 15 2015). Aumenta MMP-2 (Boushell et al. 45 2011), MMP-9 (Zehnder et al. 46 2011) e MMP-20 (Sulkala et al. 47 2002) nos túbulos dentinários de dentes cariados. Quando as MMPs e as cisteínas catepsinas são activadas com atividade de telopeptidase, eles clivam o telopeptídeo C-terminal, o que leva à perda do quinto componente molecular, resultando na perda da periodicidade do colágeno. À medida que a desmineralização avança, mais minerais intrafibrilares e telopeptídeos C-terminais são perdidos (Tjaderhane et al. 15 2015). Esta perda provoca a perda de minerais intrafibrilares que poderiam explicar a correlação da perda gradual da periodicidade do colágeno com a perda de minerais na dentina (Deyhle et al. 48 2011).

Durante o desenvolvimento da lesão cáriosa, os odontoblastos representam o primeiro mecanismo de defesa que expressa os TLRs 2 e 4. Esses receptores são ativados após o contato com moléculas comuns na superfície do agente patogénico, permitindo o reconhecimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Conrads e About 37 2018). Eles também induzem a secreção de moléculas antibacterianas

como as β -defensinas e o óxido nítrico pelos odontoblastos que limitam a progressão das bactérias cariogênicas para a polpa. Após a ativação dos seus recetores, os odontoblastos segregam quimiocinas pró-inflamatórias que levam ao recrutamento de células dendríticas, causando a eliminação de agentes patogênicos (Keller et al. ⁴⁹ 2010).

A progressão da cárie induz diversas modificações na dentina, contribuindo para reduções em suas propriedades físicas e mecânicas (Isolan et al. ⁴ 2018; Ekambaram et al. ⁵⁰ 2015; Hass et al. ⁵¹ 2021; Peixoto et al. ⁵² 2015). A dentina cariada é constituída por duas camadas distintas: uma camada externa infetada e uma camada interna de dentina afetada. A camada infetada pela cárie é caracterizada por ser altamente desmineralizada e contém fibrilas de colágeno irreversivelmente desnaturadas. Por outro lado, a camada afetada pela cárie é parcialmente desmineralizada e fisiologicamente re-mineralizável. A dentina intertubular afetada pela cárie está parcialmente desmineralizada e apresenta uma elevada porosidade e exposição das fibras de colágeno, juntamente com uma diminuição da energia de superfície (Kuboki et al. ⁵³ 1977). Em lesões cariosas moderadas de dentina, além dos efeitos antimicrobianos, os odontoblastos são responsáveis por iniciar a secreção de dentina terciária para proteger a polpa subjacente (Conrads e About ³⁷ 2018).

A ativação do complemento pulpar leva à síntese de uma estrutura molecular complexa conhecida como complexo de ataque à membrana. Esta estrutura complexa é produzida pelos fibroblastos e é responsável por matar as bactérias cariogênicas. Quando este complexo se liga às paredes das bactérias, cria numerosos orifícios que permitem a entrada de electrólitos e água, destruindo as bactérias. Além disso, os fibroblastos também iniciam o processo de regeneração da dentina através do recrutamento de células estaminais e da regeneração nervosa, criando a dentina terciária (Jeanneau et al. ⁵⁴ 2015).

2.2 Tópico: sistemas adesivos

A história dos adesivos dentais começou em 1949, quando o Dr. Hagger registou a patente do primeiro adesivo dentário chamado "Sevriton Cavity Seal". Este produto continha um adesivo chamado dimetacrilato de ácido glicerol-fosfórico e baseava-se em monómeros ácidos capazes de condicionar para formar ligações físicas/químicas

entre a restauração e o substrato (Söderholm ⁵⁵ 2007). Mais tarde, em 1952, Mcleand e Kramer relataram pela primeira vez que o "Sevriton Cavity Seal" se ligava quimicamente à estrutura dentária (McLean ⁵⁶ 1952). Posteriormente, um dos maiores avanços na odontologia adesiva foi introduzido por Buonocore, condicionamento ácido. A dissolução do tecido dental duro superficial demonstrou ser eficaz pelo condicionamento com ácido fosfórico (Buonocore ⁵⁷ 1955). Na década de 1970, pela primeira vez, o conceito de *smear layer* foi utilizado para se referir ao responsável pelo bloqueio da adesão à dentina, conforme visto num microscópio eletrônico de varredura (SEM) (Eick et al. ⁵⁸ 1970). A *smear layer* é conhecida como uma camada de 1,0 µm de resíduos de corte causados pela alteração da camada superior do tecido dentário durante o preparo cavitário (Bowen et al. ⁵⁹ 1984). Quando os orifícios dos túbulos dentinários são obstruídos por detritos a uma profundidade de 1 a 5 µm, são conhecidos como *smear plugs*. Também relacionado ao preparo cavitário e sua composição tem as características do tecido que foi removido. Em condições clínicas, uma camada de *smear layer* se comporta como uma verdadeira barreira física, portanto, um certo grau de condicionamento é necessário antes da ligação química à superfície da dentina (Pashley et al. ⁶⁰ 1988).

O mecanismo pelo qual o adesivo se adere ao esmalte e à dentina baseia-se na desmineralização superficial seguida da infiltração de monômeros de resina (Van Meerbeek et al. ⁶¹ 2011; Nakabayashi et al. ⁶² 1982). Após a polimerização, os monómeros de resina tornam-se micro mecanicamente interligados nas porosidades criadas. A retenção micromecânica pode ser obtida de duas maneiras: rugosidade mecânica e por condicionamento químico (Van Meerbeek et al. ⁶³ 2020).

Na dentina, este processo é conhecido como hibridização (Nakabayashi et al. ⁶² 1982), que envolve a formação da camada híbrida que contém fibrilas de colágeno infiltradas por resina (Pashley et al. ⁶⁴ 2011). A dentina sempre foi mais desafiadora, onde a corrosão desempenha um papel importante na adesão. Quanto mais profunda a dentina é condicionada, mais difícil será a infiltração da resina até a profundidade de desmineralização. Assim como, durante a secagem do ar, a dentina nunca deve ser seca por muito tempo porque as fibrilas de colágeno colabam e dificilmente podem ser infiltrados pela resina. Recomenda-se esfregar ativamente a superfície da dentina com um *microbrush* para intensificar a interação do monômero funcional com a dentina e o adesivo utilizado (Hardan et al. ⁶⁵ 2023).

No esmalte, as microporosidades criadas pelo condicionamento ácido dissolvem seletivamente os prismas do esmalte até uma profundidade de 4 a 6 μm , expondo uma rede de colágeno livre de hidroxiapatita (Van Meerbeek et al. ⁶³ 2020). O condicionamento ácido permite a penetração de agentes adesivos hidrofóbicos comuns por atração capilar (Gwinnett e Matsui ⁶⁶ 1967), resultando em tags de macro-resina. Nos núcleos do esmalte-prisma, os cristais de hidroxiapatita são diluídos pela desmineralização, criando poços profundamente condicionados onde a resina é atraída por ação capilar para formar tags de micro-resina (Van Meerbeek et al. ⁶³ 2020). Como resultado, causa um selamento eficaz da restauração das margens a longo prazo e uma proteção contra a degradação (De Munck et al. ⁶⁷ 2003).

Os adesivos atuais podem ser classificados de acordo com sua estratégia de adesão, seja no modo *total-etch* ou no modo *self-etch*. Os adesivos *total-etch* são caracterizados por uma etapa inicial de condicionamento ácido, seguido de um procedimento de enxague que provoca a remoção completa da *smear layer* e dos *smear plugs* (Cardoso et al. ⁶⁸ 2011). O condicionamento ácido promove a desmineralização da dentina a uma profundidade de 3 a 5 μm , expondo as fibrilas de colágeno (Van Meerbeek et al. ⁶⁹ 1992), expondo uma rede de colágeno livre de hidroxiapatita permitindo uma retenção micro-mecânica (Van Meerbeek et al. ⁶³ 2020). É considerada a melhor abordagem para o esmalte, pois tem eficácia comprovada a longo prazo. Clinicamente, ao enxaguar o ácido fosfórico, o esmalte é visto em uma cor branca fosca (Van Meerbeek et al. ⁶³ 2020).

Existem dois tipos de adesivos *total-etch*, os de dois ou de três passos, dependendo se o primer e o agente de união estão separados em dois frascos ou combinados em um único frasco (Van Meerbeek et al. ⁷⁰ 2003). Quando o primer é aplicado geralmente apresenta propriedades hidrofílicas como HEMA dissolvido em solventes orgânicos como água, etanol ou acetona. é responsável por promover a re-expansão das redes de colágeno e melhorar a molhabilidade, enquanto os solventes deslocam a água da superfície da dentina, preparando a rede de colágeno para a infiltração do adesivo-resina (Nakabayashi e Takarada ⁷¹ 1992). Na etapa de adesão, um adesivo (livre de solvente) é aplicado na superfície, levando à penetração de monómeros hidrofóbicos resultando na formação de uma camada híbrida após a polimerização. Num adesivo de dois passos, o primer e o adesivo são combinados e apresentam uma capacidade reduzida de infiltrar o substrato dentinário desmineralizado. Eles são mais susceptíveis aos efeitos da degradação hidrolítica. A

sensibilidade da técnica está relacionada à própria etapa de condicionamento (Cardoso et al. ⁶⁸ 2011).

Por outro lado, os adesivos autocondicionantes podem ser sistemas de um ou dois passos, dependendo se a solução de primer autocondicionante é separada ou combinada com o agente de união (Van Meerbeek et al. ⁷⁰ 2003). Um adesivo *self-etch* tem uma composição menos ácida quando comparado com o ácido fosfórico. A fim de possibilitar o condicionamento ácido, a maioria dos adesivos autocondicionantes contém água como meio ionizante e os adesivos autocondicionantes disponíveis sem água requerem uma técnica chamada “ligação úmida”. Consiste em deixar a superfície com água suficiente para que possa ser auto-condicionada. O desempenho adesivo vai depender do monômero funcional da solução adesiva, da sua estrutura molecular e da sua afinidade com a hidroxiapatita (Van Meerbeek et al. ⁷² 2011).

A capacidade de desmineralização de um sistema autocondicionante é limitada e pode comprometer a adesão ao esmalte porque a sua falta de potencial para desmineralizar a fase mineral do esmalte não permite que o adesivo crie porosidades micro-retentivas adequadas (Pashley et al. ⁶⁴ 2011). Devido a sua exposição limitada ao colágeno, os adesivos *self-etch* são menos vulneráveis à biodegradação enzimática (Van Meerbeek et al. ⁶³ 2020). Ao contrário dos adesivos *total-etch*, os adesivos *self-etch* não requerem um passo de condicionamento separado, pois contêm monômeros ácidos que são capazes de dissolver a smearlayer e remineralizar a dentina/esmalte subjacente (Tay et al. ⁷³ 2000). As características da camada híbrida, quando aplicado um adesivo autocondicionante, dependem da capacidade dos seus monômeros funcionais em desmineralizar o substrato dental. Portanto, podem ser classificados de acordo com a sua agressividade no condicionamento, em fortes ($\text{pH} \leq 1$), intermédios ($\text{pH} \geq 1.5$) e suaves ($\text{pH} \approx 2$). Os adesivos *self-etch* mais fortes produzem efeitos de desmineralização profunda semelhantes aos dos sistemas *total-etch*. Os adesivos *self-etch* suaves desmineralizam a dentina parcialmente, onde a sua camada híbrida não é mais profunda do que $1 \mu\text{m}$ (De Munck et al. ⁷⁴ 2005).

Recentemente, os adesivos universais simplificaram o conceito tradicional, sendo concebidos como um adesivo “tudo-em-um” que permite ao dentista decidir o modo de aplicação, seja em *total-etch*, *self-etch*, ou condicionamento seletivo do esmalte (Rosa et al. ⁷⁵ 2015; Muñoz et al. ⁷⁶ 2013). Como mencionado anteriormente, o modo *total etch* envolve o condicionamento com ácido fosfórico seguido de enxague com

água antes da aplicação do adesivo, enquanto o modo *self-etch* envolve o uso de monómeros com um grupo funcional azídico, como fosfato ou carboxilato, que condicionam e infiltram à dentina. A abordagem *self-etch* tem um desempenho inferior ao da abordagem *total-etch* no esmalte, através da qual o esmalte precisa ser seletivamente condicionado com ácido fosfórico (Van Meerbeek et al.⁶³ 2020).

O desempenho dos adesivos universais depende do seu pH, do substrato e da estratégia adesiva utilizada. A utilização de ácido fosfórico produz macro e microporosidades que provocam a dissolução da hidroxiapatita na superfície do esmalte. Este processo aumenta a área de superfície do substrato, permitindo a infiltração de monômeros de resina no esmalte. Quando os adesivos universais são utilizados no modo *self-etch*, não conseguem condicionar o esmalte à mesma profundidade que o ácido fosfórico apresentam menor resistência de união ao esmalte sem condicionamento prévio. Portanto, independentemente do pH, o desempenho do adesivo universal no esmalte é melhorado pelo uso de condicionamento prévio com ácido fosfórico (Cuevas-Suárez et al.⁷⁷ 2019).

O pH do adesivo universal influencia a adesão à dentina. Quando usado como *total-etch*, o condicionamento ácido solubiliza o conteúdo mineral da dentina, permitindo a infiltração de monómeros na rede de colágeno. Em seguida, através da polimerização in situ, forma-se a camada híbrida, proporcionando uma retenção micromecânica. A resistência de união à dentina dos adesivos universais de força intermédia apresenta valores mais baixos devido à presença de monômeros não polimerizados remanescentes após a fotoativação que continuam a desmineralizar a dentina devido ao seu alto nível de acidez. Por conseguinte, afeta a estabilidade das interações químicas com a matriz de colágeno. Enquanto um adesivo ultra-suave, utilizado no modo *total-etch*, permite uma retenção micro-mecânica através da hibridização da dentina. Um adesivo universal suave não depende da estratégia de adesão utilizada, podendo ser utilizado numa abordagem multimodal (Cuevas-Suárez et al.⁷⁷ 2019).

A estabilidade dos adesivos universais tem sido atribuída à presença do monómero 10-MDP que aumenta a resistência mecânica e evita a degradação ao longo do tempo (Cuevas-Suárez et al.⁷⁷ 2019). Esse adesivos formam uma nano camada estável através da formação de sais insolúveis de MDP-Ca que protegem as fibras de colágeno (Gutiérrez et al.⁷⁸ 2022). O 10-MDP foi originalmente desenvolvido pela Kuraray e utilizado com sucesso no adesivo padrão-ouro, Clearfil; foi comprovada

a sua interação química estabilizadora com o Ca, pois também condiciona efetivamente a dentina (Ahmed et al. ⁷⁹ 2020). Além disso, a sua longa cadeia de carbônio hidrofóbica cobre a superfície da dentina criando uma maior extensão de adesão química (Van Landuyt et al. ⁸⁰ 2008)

Um dos substratos mais desafiadores para adesão é a dentina afetada por cárie. Clinicamente, a escavação de cáries resulta frequentemente num substrato complexo que envolve áreas de dentina infetada por cárie, afetada por cárie, esclerótica, erodida e hígida. A remoção da cárie é limitada à dentina externa altamente infetada e desnaturada, preservando a camada interna de dentina afetada pela cárie (Yoshiyama et al. ⁸¹ 2002). A presença de dentina cariada resulta numa camada híbrida mais espessa e com menor resistência de união quando comparada com à dentina hígida (Alves et al. ⁶ 2013; Lima et al. ⁸² 2018; Macedo et al. ⁸³ 2009; Meraji et al. ⁸⁴ 2018). Este substrato é caracterizado por uma baixa resistência coesiva devido ao seu alto grau de desmineralização e sua matriz desorganizada. Além de apresentar uma redução mineral, a dentina afetada por cárie sofre uma importante perda na cristalinidade de sua fase mineral remanescente e alterações na estrutura secundária de seus componentes orgânicos, resultando em propriedades mecânicas inferiores (Hosoya e Tay ⁸⁵ 2007). Este substrato altamente permeável resulta numa penetração desproporcional dos monómeros resinosos, devido à presença de moldes minerais resistentes ao ácido, formados por fosfatos β -tricalcíticos (Yoshiyama et al. ⁸¹ 2002; Sakoolnamarka et al. ⁸⁶ 2003; Daculsi et al. ⁸⁷ 1987). Este *cluster* mineral é depositado nos túbulos dentinários durante as fases iniciais da reação da dentina contra a progressão da cárie (Nakajima et al. ⁸⁸ 2005).

2.3 Tópico: flavonoides

Em 1930, a primeira substância isolada foi feita a partir de uma laranja que se acreditava ser um novo membro de uma nova classe de vitaminas e foi designada como vitamina P. No entanto, mais tarde tornou-se claro que a substância era um flavonoide, a rutina, e desde então foram identificadas mais de 4000 variedades de flavonóides (Chirumbolo ⁸⁹ 2011). Os flavonoides são um grupo de compostos naturais que podem ser encontrados na dieta diária do ser humano. Estes compostos naturais com estruturas polifenólicas encontram-se maioritariamente em vegetais, frutos, sementes, chá, café e vinho (Krysa et al. ⁹⁰ 2022).

Quimicamente, a estrutura do esqueleto dos flavonoides consiste num anel heterocíclico com um átomo de oxigênio que contém dois anéis de benzeno (Middleton ⁹¹ 1998). Em outras palavras, a estrutura básica é uma aglicona, um anel de seis membros condensado com anéis de benzeno. Os flavonoides podem ser classificados com base nas diferenças da sua estrutura química, referindo-se à quantidade e à localização dos grupos hidroxilo e metilo, ao tamanho das moléculas, à quantidade de moléculas de hidratos de carbono, ao tipo de ligação glicosídica e à presença de grupos sulfona. As classes de flavonoides incluem: flanois, flavononas, flavonas, isoflavonas, e antocianidinas (Peterson e Dwyer ⁹² 1998). A posição do anel benzenóide divide a classe dos flavonóides em flavonóides (2 posições) e isoflavonóides (3 posições). Os flavonóis diferem das flavanonas pelo grupo hidroxilo na posição 3 e por uma ligação dupla C2-C3(Chen ⁹³ 2018)

O interesse recente por estas substâncias foi estimulado pelos potenciais benéficos para a saúde. Tem sido relatado que exercem vários efeitos farmacológicos, tais como atividades: anti-inflamatórias, anti-oxidantes e anti-cancerígenas (Kasote et al. ⁹⁴ 2015). Além disso, os flavonoides têm a capacidade de induzir sistemas enzimáticos protetores. Muitos estudos têm sugerido efeitos protetores dos flavonoides contra doenças infecciosas (bacterianas e virais) e degenerativas, como as doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças relacionadas com a idade (Kumar e Pandey ⁹⁵ 2013)

A principal característica dos flavonóides é a sua capacidade antioxidante, que depende da disposição dos seus grupos funcionais. Por conseguinte, as configurações, a substituição e o número total de grupos hidroxilo influenciam substancialmente os mecanismos da atividade antioxidante. A configuração hidroxilo do anel B é o componente mais significativo, pois é responsável pela doação de hidrogênio e de um eletro aos radicais hidroxilo, peroxinitrito e peroxilo, estabilizando-os, formando um radical flavonoide relativamente estável (Rice-Evans et al. ⁹⁶ 1996). A atividade antioxidante consiste em bloquear as reações em cadeia dos radicais livres através da quelação dos íons, especialmente o ferro e o cobre, que participam no início destas reações e reduzem as espécies reativas de oxigênio a formas estáveis e não reativas. Os flavonoides podem inibir a atividade das enzimas que participam nas reações em cadeia dos radicais livres como: xantina oxidase (5-LOX), proteína quinase (15-LOX), lipoxigenase (12-LOX), ciclo-oxigenase (COX 1 e 2). Também,

diminuem a síntese da prostaglandina PGE₂, do leucotrieno B₄ e do tromboxano A₂ (Krysa et al.⁹⁰ 2022).

A literatura mostra que os flavonoides que possuem uma ligação 2-3 insaturada em conjugação com uma função 4-oxo são antioxidantes mais potentes do que os flavonoides que não possuem uma ou ambas características. Este fato pode ser explicado devido à conjugação entre os anéis A e B, que permite um efeito de ressonância do núcleo aromático, proporcionando estabilidade ao radical flavonoide (Rice-Evans et al.⁹⁶ 1996). O heterociclo dos flavonóides contribui para a atividade antioxidante ao permitir a conjugação entre o 3-OH livre e o anel aromático. A remoção de um 3-OH anula a conjugação, o que compromete a capacidade de eliminação dos radicais (Bors et al.⁹⁷ 1990). A atividade antioxidante pode dar origem as atividades anti-alérgicas, anti-inflamatórias, anti-microbianas, anti-câncer, anti-diarreicas, cardioprotectoras, hipoglicêmicas e/ou anti-diabéticas (Kumar e Pandey⁹⁵ 2013; Jurasekova et al.⁹⁸ 2014)

Como mencionado anteriormente, os flavonoides são um grupo amplamente distribuído de compostos fenólicos vegetais que provêm das células vegetais fotossintetizantes e são parte integrante da dieta humana e animal. Sendo fotoquímicos, os flavonoides não podem ser sintetizados por seres humanos e animais. Os flavonóides presentes nos alimentos são geralmente responsáveis pela cor, sabor, prevenção da oxidação das gorduras e proteção das vitaminas e enzimas. As maiores quantidades de flavonoides encontradas na dieta humana incluem as isoflavonas da soja, os flavonóis e as flavonas (Yao et al.⁹⁹ 2004). Os flavonoides são sintetizados pelas plantas em resposta a uma infecção microbiana. Foi demonstrado que vários flavonoides, incluindo apigenina, galangina, glicosídeos de flavona e flavonol, isoflavonas, flavanonas e chalconas, possuem atividade antibacteriana (Cushnie e Lamb¹⁰⁰ 2005).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral:

1. Avaliar o efeito *in vitro* da incorporação de flavonoides nanoencapsulados em dois adesivos universais utilizados no modo *total-etch* nas propriedades adesivas da interface de união em DAC.

3.2 Objetivos específicos

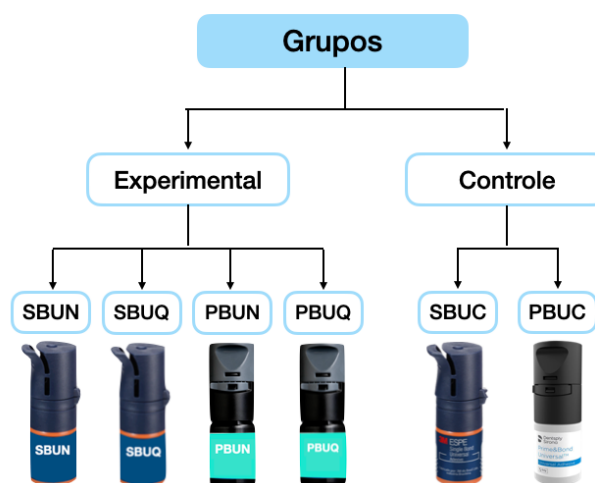
1. Avaliar a μ TBS e NI formada pela aplicação de adesivos universais com partículas nano-encapsuladas de Q e N em DAC após TI.
2. Avaliar a μ TBS e NI de adesivos universais contendo partículas nano-encapsuladas de Q e N em DAC após TA.
3. Avaliar o desempenho de dois sistemas adesivos universais de diferentes marcas na μ TBS e NI.
4. Identificar os espectros dos flavonoides em adesivos universais na camada híbrida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pela Comissão de ética em Pesquisa na Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob o número do parecer: 5.508.845

Um total de 60 molares permanentes humanos hígidos e intactos foram fornecidos pelo Banco de Dentes Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa para a realização de diferentes testes. Os dentes foram alocados aleatoriamente em 6 grupos (Figura 1). Flavonoides nano-encapsulados foram incorporados em dois adesivos universais, PBUC [Prime Bond Universal] e SBUC [Single Bond Universal], originando os grupos: 1) SBUN [com Naringina], 2) SBUQ [com Quercetina], 3) PBUN [com Naringina], 4) PBUQ [com Quercetina], 5) PBUC [sem flavonoides], 6) SBUC [sem flavonoides].

Figura 1. Esquema dos grupos adesivos utilizados neste estudo



Fonte: O autor

4.1 Formulação do adesivo conteúdo flavonoides nano-encapsulados

Para esta parte do experimento, foi utilizada a metodologia proposta num estudo prévio (Hilgemberg ³⁶ 2022).

Uma solução mãe foi obtida a partir da mistura do flavonoide nanoencapsulado e liofilizado com o adesivo universal. No total, quatro soluções mães foram obtidas: PBUN, PBUQ, SBUN, SBUQ. A solução mãe consiste em colocar 10 mg de flavonoide nanoencapsulado para cada 1 ml de adesivo. Para isso, as nanocápsulas foram pesadas na balança analítica (AW220, Shimadzu, Kyoto, Japão) e colocadas nos frascos contendo os adesivos. Os adesivos foram submetidos à agitação em um misturador (Univórtex, Unisciences, SP, Brasil), por tempo padronizado de 2 minutos, até obter uma solução homogênea. A manipulação do adesivo foi feita com o auxílio da micropipeta Labmate 10 UI (PRLabor, São José, SC) e ponteiros descartáveis. Após este passo, as soluções mães foram armazenadas sob refrigeração em frascos âmbar para manter as suas propriedades até o momento do uso.

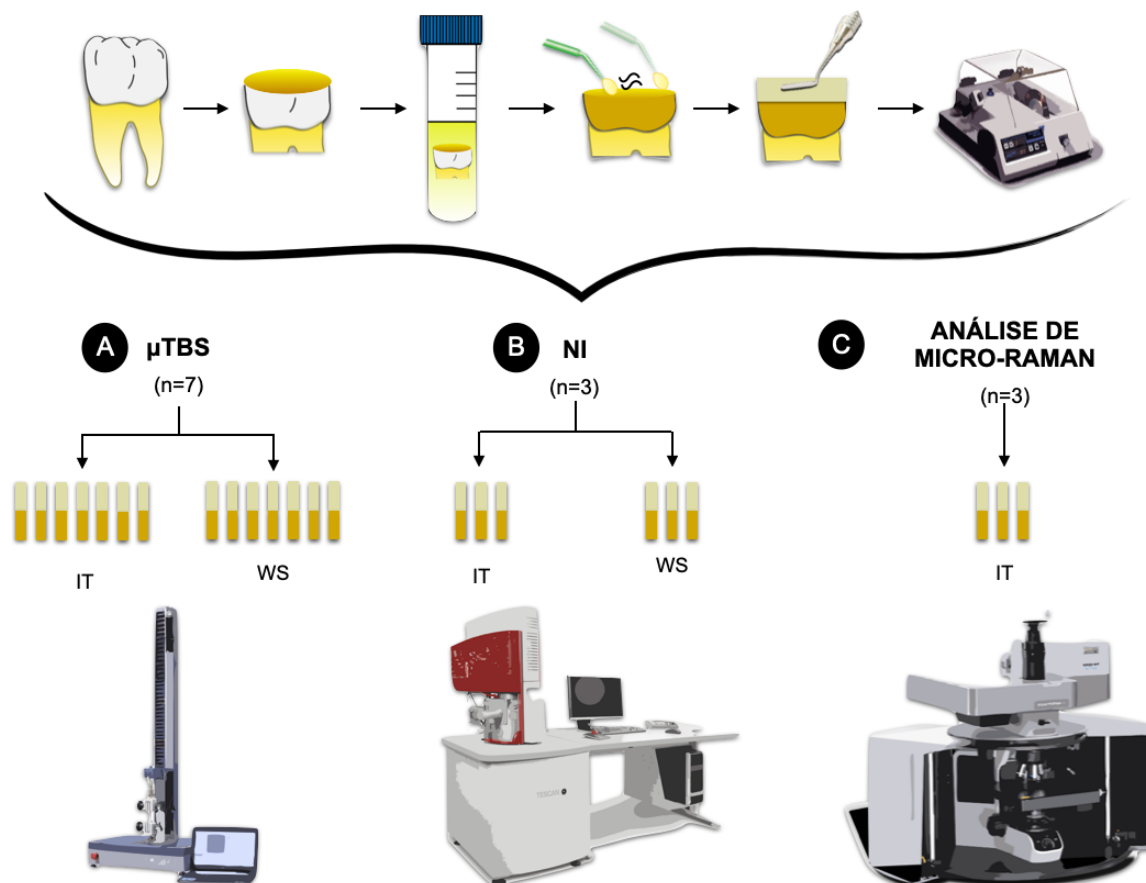
Baseado nos dados obtidos no estudo prévio (Hilgemberg ³⁶ 2022), se utilizou uma concentração de 1000µg/ml. O resultado da equação consiste em que cada 100µL das soluções mãe devem ser colocados 900 µl do adesivo puro. A manipulação do adesivo foi feita com o auxílio da micropipeta Labmate 10 UI (PRLabor, São José, SC) e ponteiros descartáveis. Para misturar as soluções, foi utilizado um misturador Univórtex (Unisciences, SP, Brasil), por tempo padronizado de 2 minutos, até obter uma solução homogênea. Os adesivos foram armazenados sob refrigeração em frascos âmbar para manter as suas propriedades até o momento do uso.

4.2 Preparação das amostras

Sessenta molares humanos hígidos foram utilizados neste estudo. Os dentes foram aleatoriamente alocados nos grupos experimentais e nos grupos controles (Figura 1) para avaliação nos diferentes testes (Figura 2).

Para cada amostra deste experimento, foram cortadas as raízes dos molares 1mm apical à junção amelo-cementaria usando a máquina de corte de gesso (VH Softline, Essence Dental, Araraquara, São Paulo, Brasil). Depois, o esmalte da superfície oclusal do molar foi removido na mesma máquina de gesso, de 3 mm $\pm$ 1 mm até a exposição da dentina. A superfície oclusal ficou, plana, perpendicular ao longo eixo do dente e sem lacunas de esmalte.

Figura 2. Representação ilustrativa da distribuição dos espécimes em cada um dos testes realizados neste estudo



Fonte: o autor

4.3 Cálculo amostral

O tamanho amostral foi calculado utilizando um G*Power software versão 3.1.9.7 (G*Power, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany), considerando $\alpha = 0.05$, $\beta = 0.20$, parâmetros obtidos de um estudo prévio (Davila-Sanchez et al.¹⁷ 2020) feito em DAC ($\eta^2_p = 0,2$ e $f = 0,5$). O tamanho mínimo da amostra foi de 5 amostras por grupo. Considerando uma possível taxa de perda de 25%, o tamanho mínimo da amostra deve ser de 7 amostras por grupo.

Além disso, para a análise de NL e o análises de micro-Raman da camada híbrida foram testadas três amostras por grupo com base em estudos anteriores (Hass et al.⁵¹ 2021; Muñoz et al.¹⁰¹ 2015).

4.4 Indução microbiológica de cárie

Lesões microbiológicas artificiais foram induzidas na superfície oclusal de 60 molares humanos utilizando o método microbiológico descrito por Marquezan (Marquezan et al.¹⁰ 2009):

Em todas as superfícies dos espécimes, foi aplicada uma camada de verniz de unhas (Risqué Reinvente o Normal, Risqué), com a exceção da superfície oclusal. Os espécimes foram esterilizados em uma autoclave a vapor (Phoenix Ind. Brasileira, Araraquara, SP, Brasil) por 15 minutos a 121°C. Depois, os espécimes foram transferidos para um tubo Falcon de 8 ml contendo uma solução de cárie artificial (componentes descritos na Tabela 1) com o pH em torno de 4,0. Os espécimes foram incubados em um frasco anaeróbico (5% CO₂) a 37 °C e a cada 48h, foram transferidos para outro tubo Falcon de 8ml contendo uma nova solução de cárie artificial. Após 14 dias, todos os espécimes foram esterilizados novamente como descrito anteriormente e lavados com água destilada (Marquezan et al.¹⁰ 2009).

Posteriormente, o esmalte circundante dos dentes foi cuidadosamente eliminado com pontas diamantadas n° 4137 (KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil) em alta rotação com irrigação constante. Para retirar a dentina infetada da superfície oclusal dos dentes, as superfícies foram polidas manualmente sob irrigação por 30s utilizando uma lixa de carbeto de silício de granulação 600 (Extex, Enfield, Connecticut, USA).

Tabela 1. Componentes para a solução de cárie artificial

Material	Quantidade
Cultura de infusão de coração de cérebro	111g
Extrato de levedura	15g
Sacarose	60g
Água destilada	3000mL
Cultura primária de <i>S. mutans</i>	100uL

4.5 Procedimento adesivo

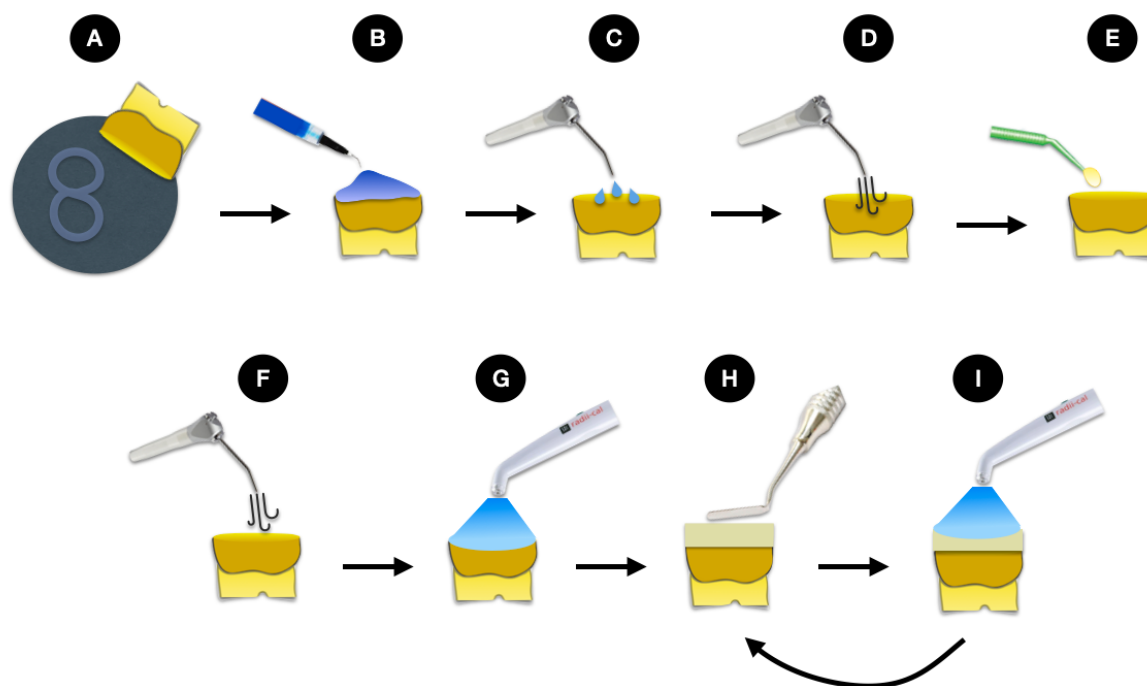
Para o procedimento adesivo, foram utilizados os adesivos Scotch Bond Universal (3M Oral Care, Saint Paul, MN, USA) e o Prime & Bond Universal (Dentsply Sirona, Konstanz, Baden-Württemberg, Germany). Tanto para o grupo controle (sem flavonoides) como para o grupo experimental (adesivos com flavonoides nano encapsulados), foram seguidas as instruções do fabricante (Tabela 2; Figura 3). O condicionamento no dente foi feito com ácido fosfórico 37% por 15 segundos, seguido pela lavagem abundante com água por 30 segundos. Um leve jato de ar foi aplicado, homogeneizando a umidade do substrato e evitando que a superfície da dentina ficasse seca. Os sistemas adesivos foram aplicados ativamente sobre a superfície oclusal por 20 segundos, seguido por um suave jato de ar de 5 segundos. Depois, a superfície foi fotoativada por 10s usando um aparelho fotopolimerizador a base de LED com uma intensidade de 800 mW/cm^2 (Radii Plus, SDI Limited, Victoria, Austrália), aferida por meio de um radiômetro digital (Curing Radiometer Model 100, Demetron Research Corporation, Danburg, CT, EUA). Após os procedimentos adesivos, uma resina composta microhíbrida (TPH Spectrum, Dentsply Sirona, Konstanz, Baden-Württemberg, Germany) foi colocada sobre a superfície dentinária em dois incrementos de 2 mm de espessura, sendo cada incremento fotoativado por 20s com o mesmo aparelho fotopolimerizador, resultando em um bloco de resina composta com 4 mm de altura (Figura 3). Um único operador realizou todos os procedimentos adesivos.

Tabela 2. Sistemas adesivos universais utilizados neste estudo

Adesivos	Fabricante	Composição	Aplicação
Single Bond Universal (SBU) 	3M Oral Care St Paul, MN, USA	Monômeros de fosfatos de MDP; resinas de dimetacrilato; HEMA; copolímero de acrílico; ácido itacônico; nanopartículas; etanol; água; CQ; silano	1. Aplicar ativamente adesivo por 20 segundos nas superfícies de dentina condicionada 2. Secar com suave jato de ar por 5s 3. Fotoativação por 10s
Prime&Bond Universal (PBU) 	Dentsply Sirona, Konstanz, Baden- Württemberg, Germany	Resina acrílica modificada com ácido fosfórico Acrilato multifuncional Acrilato bifuncional Acrilato ácido Isopropanol Água Iniciador Estabilizador	1. Aplicar ativamente adesivo por 20 segundos nas superfícies de dentina condicionada 2. Secar com suave jato de ar por 5s 3. Fotoativação por 10s

Fonte: Dados obtidos pela página oficial 3M ESPE e DENTSPLY SIRONA

Figura 3. Sequência da estratégia adesiva.



Fonte: o autor

*(A) eliminação da dentina infetada; (B) condicionamento ácido; (C) lavagem; (D) secagem; (E) aplicação do adesivo; (F) secagem para a evaporação do solvente; (G) fotoativação; (H) colocação de resina composta 2mm; (I) fotoativação. Os passos (H) e (I) são repetidos para obter um bloco de resina de 4mm.

4.6 Teste de μ TBS

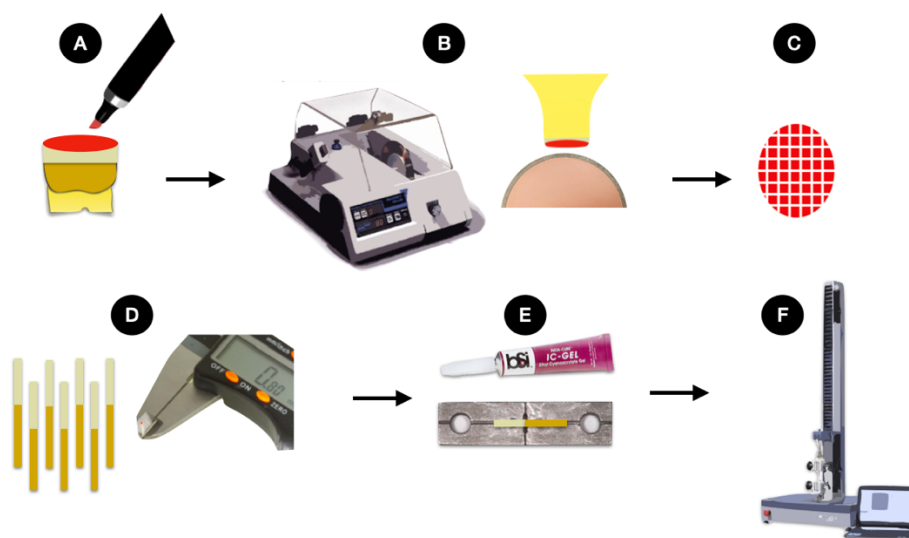
Vinte e quatro horas após os 60 dentes serem restaurados e armazenados em recipientes escuros em água desionizada a 37°C, os dentes foram seccionados em três sentidos, vertical (vestíbulo-lingual), horizontal (mésio-distal), e transversal, originando espécimes na forma de palitos (0,8mm²). Foram escolhidos quatorze palitos de cada dente para testá-los depois do TI (n = 7) e após envelhecimento natural em água destilada por 6 meses (n = 7). A área dos palitos foi medida com um paquímetro digital (Absolut Digimatic 131, Mitutoyo, Tokyo, Japão) com a máxima precisão (0,01 mm) para o cálculo dos valores de resistência de união.

Os espécimes selecionados para envelhecimento foram armazenados em água destilada em estufa úmida à 37°C durante um período de 6 meses, para simular a

degradação da interface de união. Após a mensuração da área de secção transversal os palitos foram colados nas garras de Geraldeli (Odeme Biotechnology, Joaçaba, Santa Catarina, Brasil) com uma cola à base de resina de cianoacrilato (Super Bonder Gel, Loctite, São Paulo, Brasil) e testados numa máquina de ensaios universais (Kratos, Cotia, São Paulo, Brasil) com velocidade de 0,5 mm/min com célula de carga de 100N até rompimento da interface do palito (Figura 4).

O tipo de fratura foi avaliado utilizando um microscópio óptico (SZH-131, Olympus, Tokuyo, Japan) a 40x (Davila-Sanchez et al. ¹⁷ 2020; Gutiérrez et al. ⁷⁸ 2022; Nonato et al. ¹⁰² 2022) as fraturas foram classificadas em coesivas (falha exclusivamente entre a resina composta ou a dentina), em adesiva (falha na interface resina-dentina) ou adesiva mista (falha na interface resina dentina que incluiu falha coesiva nas áreas circundantes).

Figura 4. Sequência para o teste de μ TBS



Fonte: o autor

* (A) superfície oclusal pintada com caneta permanente para identificação de cada grupo; (B) dente fixado com cera pegajosa e cortado com um disco diamantado; (C) corte vestibulo lingual e mesio distal do dente; (D) mensurações da largura e espessura do mesmo palito com paquímetro digital; (E) aplicação da cola nas garras de Microtração, deixando a interfase do palito no espaço central da garra; (F) adaptação das garras na máquina de ensaios universais para realizar a microtração.

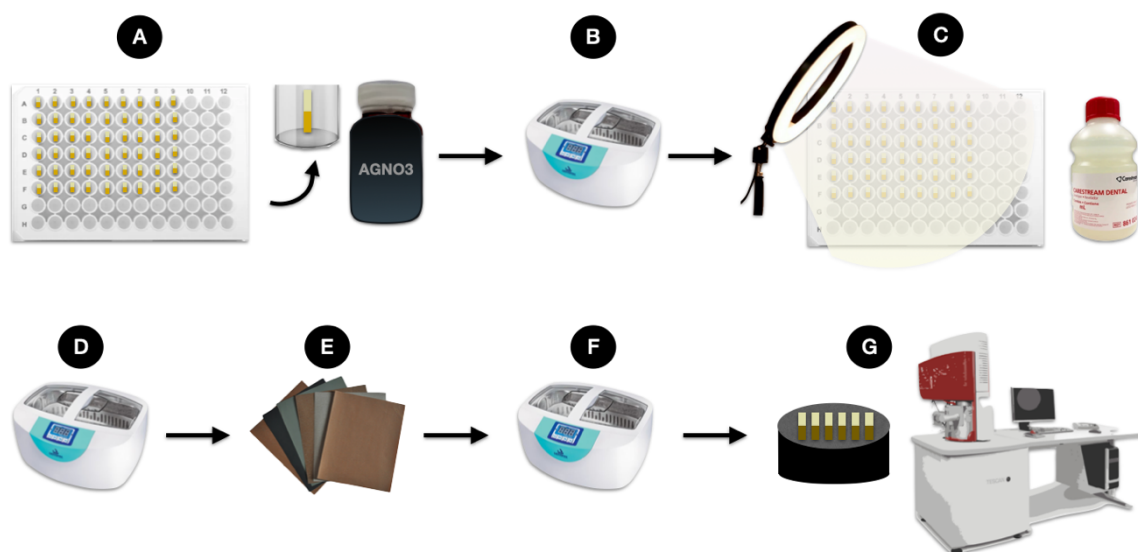
4.7 Teste de nanoinfiltração (NI)

Três dentes foram restaurados por grupo como previamente explicado, e nove palitos provenientes de cada grupo e tempo (após TI e após TA) foram utilizados para a análise de NI. Os palitos foram imersos em uma microplaca com uma solução aquosa (pH=7,0) de nitrato de prata amoniacal 50% em peso (Tay et al. ¹⁰³ 2002) e armazenados por 24 h em ausência de luz. Após o tempo de infiltração, os palitos foram lavados com água destilada e imersos em solução reveladora (Kodak, Rochester, Nova Iorque, EUA) por 8 h sob luz fluorescente, para a redução dos íons de prata ao longo das nanoporosidades da interface de união.

Os palitos foram novamente lavados em água corrente e foi feito o polimento uniforme das amostras sob irrigação constante com água com lixas de granulações 1000, 1200, 1500, 2000, 2500 e 4000 e pastas diamantadas com granulações decrescentes de 6, 3, 1 e 0,25 μm (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA). As amostras foram fixadas com cianoacrilato em stubs de alumínio e depois foram lavadas na cuba ultrassônica por 8 min seguidos de escoamento de água sobre a superfície por 2 min entre cada lixa e pasta de polimento (Figura 5). Para o processo de desidratação, as amostras foram deixadas em um dessecador contendo sílica coloidal por 24 h para serem metalizadas em carbono/ouro (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein).

As interfaces resina-dentina foram analisadas em no FEG-SEM (Mira 3, TESCAN, Czech Republic). Um operador que desconhecia a origem dos palitos a serem analisados realizou três fotomicrografias com aumento 1000X da interface dente-restauração de cada um dos palitos. A porcentagem relativa de nitrato de prata nas áreas ocupadas pela camada híbrida e camada de adesivo foram consideradas na mensuração automatizada da NI utilizando o Image J software para Mac OS (National Institutes of Health, EUA) (Schneider et al. ¹⁰⁴ 2012).

Figura 5. Sequência para o teste de NI



Fonte: o autor

* (A) Palitos imersos em nitrato de prata, deixados em um ambiente escuro sem luz por 24 horas; (B) Palitos lavados com água destilada; (C) palitos imersos na solução reveladora por 8 horas; (D) palitos lavados na cuba com água destilada; (E) uso de lixas para polimento dos palitos; (F) palitos lavados na cuba com água destilada; (G) palitos analisados após serem metalizados em carbono/oro no FEG.

4.8 Identificação dos flavonoides na camada híbrida

Três espécimes de cada dente foram polidos utilizando lixas de SiC de granulação 1500, 2000 e 2500 por 15 segundos cada. Em seguida, foram limpos em cuba ultrassônica por 8 minutos em água destilada e armazenados em água por 24 horas a 37°C. O espectrômetro micro-Raman (Senterra, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha) foi inicialmente calibrado para redefinir o zero utilizando padrões de silício com valores de coeficientes conhecidos. Os seguintes parâmetros micro-Raman foram empregados: laser de Neônio de 10 mW com comprimento de onda de 785 nm, resolução espacial de aproximadamente 3 mm, resolução espectral de aproximadamente 5 cm^{-1} e ampliação de 100x (Olympus UK, Londres, Reino Unido) para um diâmetro de feixe de ≈ 1 mm. Os espectros foram adquiridos com um tempo de acumulação de 60 segundos e 3 coadições. Quinze pontos começando pela camada adesiva até a dentina em intervalos de 1 μm , foram

escaneados usando o formato x-y-z controlado pelo computador. Após a aquisição, os dados foram filtrados para picos e ruídos de alta frequência. Apenas os espectros da camada híbrida foram processados e analisados através do software Spectragryph versão 1.2.16.1 (Am Dummelsmoos, Oberstdorf, Alemanha). Espectros adicionais das regiões de dentina pura e adesivo puro foram coletados para comparação.

Figura 6. Espectrômetro micro-Raman utilizado neste estudo



Fonte: o autor

4.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro Wilk e Levene para verificar a distribuição dos dados e homogeneidade de variâncias. Ao observar uma distribuição não normal, os resultados para μ TBS e NI foram submetidos a um teste ANOVA não paramétrico de três fatores com medidas repetidas, seguido do teste de Bonferroni de comparações múltiplas. A análise estatística foi pré-definida com um nível de significância $\alpha = 5\%$, utilizando um software estatístico comercial (Statistics 9, SPSS Inc, IBM Company, Armonk, Nova Iorque, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Teste de mitrotração (μ TBS)

Os valores de μ TBS são apresentados na Tabela 3. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no IT ($p>0,05$). No entanto, foi observada uma diferença significativa nos valores do TI e aqueles observados após o TA para todos os grupos. Enquanto os valores de μ TBS diminuíram significativamente ao longo do tempo para o grupo C ($p<0,05$), foram observados valores significativamente maiores nos grupos N e Q após TA ($p<0,05$). Após o TA, os grupos Q e N apresentaram valores significativamente superiores ($p<0,05$) àqueles observados no grupo C. Os espécimes do grupo Q apresentaram o valor mais elevado de μ TBS ($p<0,05$) após TA. O padrão de falha foi predominantemente adesiva em todos os grupos experimentais e momentos (Gráfico 1).

Tabela 3. Média (desvio padrão) de μ TBS (MPa) dos adesivos universais (SBU & PBU) de acordo com o momento e os grupos experimentais

Grupo	TI			TA		
	PBU	SBU	Total	PBU	SBU	Total
C	23.9 (4.6)	21.5 (0.6)	22.7 (3.4) ^{Ba}	19.1 (1.7)	18.5 (1.5)	18.8 (1.6) ^{Aa}
N	22.6 (2.2)	23.9 (2.7)	23.3 (2.5) ^{Aa}	26.9 (3.2)	24.6 (1.0)	25.7 (2.6) ^{Bb}
Q	23.5 (1.4)	22.3 (1.9)	22.9 (1.7) ^{Aa}	32.0 (2.7)	29.4 (3.0)	30.7 (3.1) ^{Bc}

Tempos: TI (tempo imediato 24h); TA (tempo de 6 meses de armazenamento).

Médias seguidas de letras iguais (maiúsculas entre colunas na mesma linha; minúsculas entre linhas na mesma coluna) não são significativamente diferentes ($\alpha=5\%$)

Tabela 4. Média (desvio padrão) da NI (%) dos adesivos universais (SBU & PBU) de acordo com o momento e os grupos experimentais

Grupo	TI			TA		
	PBU	SBU	Total	PBU	SBU	Total
C	9.5 (2.7)	9.6 (4.8)	9.6 (3.9) ^{Aa}	12.5 (3.4)	12.7 (3.0)	12.6 (3.2) ^{Bc}
N	11.7 (3.5)	8.3 (3.2)	10.0 (3.7) ^{Ba}	7.6 (2.0)	8.1 (2.8)	7.8 (2.4) ^{Ab}
Q	9.9 (4.6)	8.0 (2.6)	8.9 (3.8) ^{Ba}	5.1 (2.1)	6.2 (2.4)	5.6 (2.3) ^{Aa}
Total	10.3 (3.8) ^{Bb}	8.6 (3.7) ^{Aa}		8.4 (4.0) ^{Aa}	9.0 (3.8) ^{Aa}	

Tempos: TI (tempo imediato 24h); TA (tempo de 6 meses de armazenamento).

Médias seguidas de letras iguais segundo o momento (maiúsculas entre colunas na mesma linha; minúsculas entre linhas na mesma coluna) e segundo o adesivo (maiúsculas entre o mesmo adesivo em diferente momento; minúsculas entre adesivos no mesmo momento) não são significativamente diferentes ($\alpha = 5\%$)

Figura 8. Imagens FEG-SEM representativas da interface de união à DAC dos grupos experimentais após TI e após TA

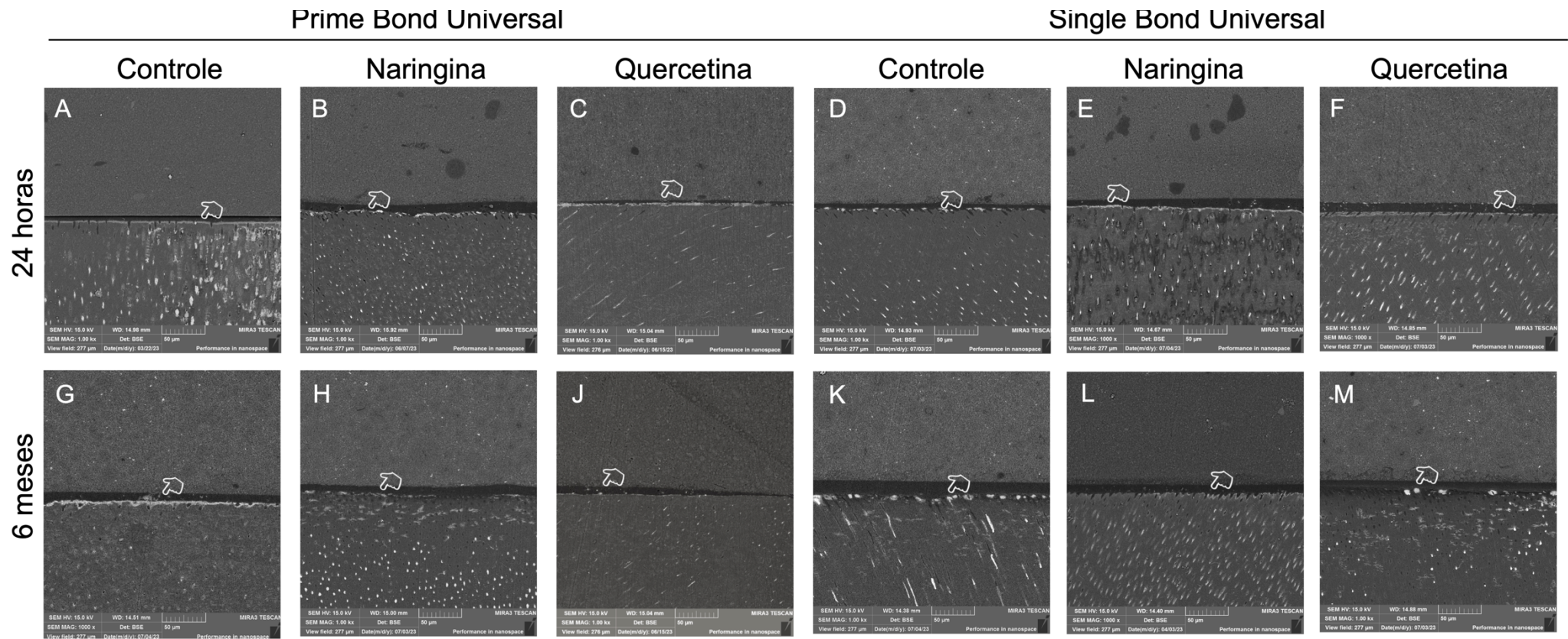


Figura 8. Imagens FEG-SEM representativas da interface de união à DAC dos grupos experimentais após TI e após TA

Imagens de TI (A-F) e TA (G-L) de acordo com os diferentes grupos experimentais a uma ampliação de 1,00 kx. Áreas de NI são observadas dentro da camada híbrida (indicadas por ponteiro branco).

Fonte: o autor

5.3 Identificação dos flavonoides na camada híbrida

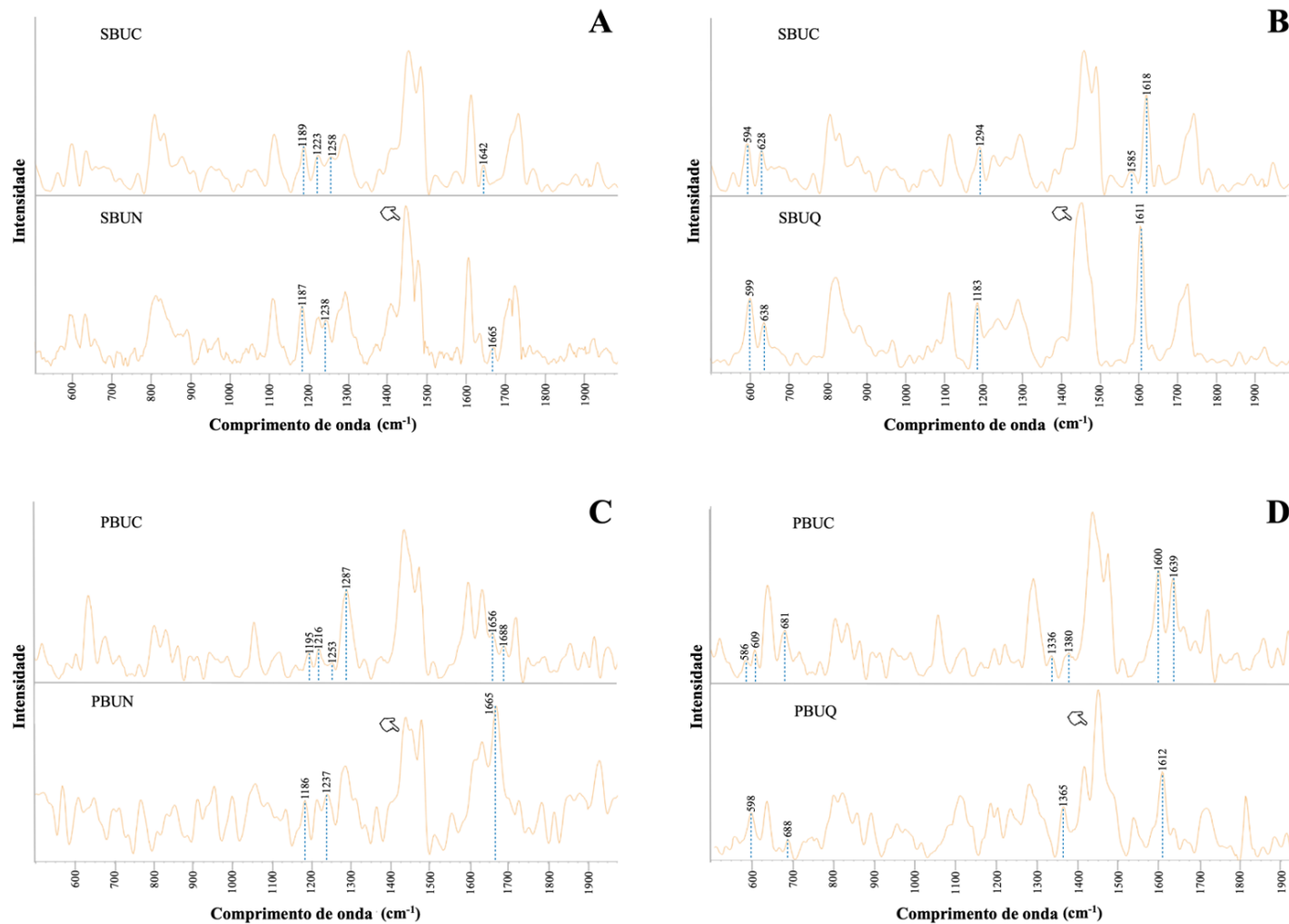
Os espectros do micro-Raman da camada híbrida de cada grupo experimental, em comparação com o grupo de controle, são mostrados na Figura 8. Todos os grupos controles apresentam picos específicos para compreender as diferenças/semelhanças em comparação aos grupos experimentais. A semelhança entre os picos dos grupos controles e dos grupos experimentais reflete sua base de metacrilato idêntica. A precisão do arranjo experimental se estende à variação na posição absoluta do pico em até 5 cm^{-1} (Van Meerbeek et al. ¹⁰⁵ 1993).

Os espectros adquirido na camada híbrida gerada por SBU é mostrado nas Figuras 8A e 8B. A Figura 8A exibe o pico característico do grupo carbonila da naringina a 1665 cm^{-1} , juntamente com as bandas do anel, anéis A e B a 1187 cm^{-1} e o anel C a 1238 cm^{-1} . Na Figura 8B, a quercetina exibe os picos característicos do grupo carbonila em uma vibração de estiramento a 1611 cm^{-1} e na vibração de flexão a 638 cm^{-1} , juntamente com os picos provenientes de OH^- a 599 cm^{-1} e 1183 cm^{-1} .

Quanto ao PBU, o espectro micro-Raman é mostrado nas Figuras 8C e 8D. A Figura 8C exibe o pico do grupo carbonila da naringina a 1665 cm^{-1} , anéis A e B a 1186 cm^{-1} e o anel C a 1237 cm^{-1} . Para a Figura 8D, a quercetina exibe os picos característicos da carbonila em uma vibração de estiramento a 1612 cm^{-1} e na vibração de flexão a 688 cm^{-1} , juntamente com picos de OH^- a 598 cm^{-1} e 1365 cm^{-1} .

O ponteiro branco indica infiltração adesiva em todos os grupos experimentais em 1450 cm^{-1} . O grupo SBUQ apresentou uma coalescência de pico, enquanto o PBUQ apresentou um deslocamento de pico, resultando em números de onda mais altos em 1450 cm^{-1} .

Figura 9. Espectros (micro-Raman) representativos da camada híbrida de dois sistemas adesivos universais contendo flavonoides



Espectros de adesivos universais SBU (A, B) e PBU (C,D) contendo N (A, C) e Q (B, D). A infiltração adesiva é observada na camada híbrida (ponteiro branco).

Fonte: o autor

6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que os sistemas adesivos universais com flavonoides nanoencapsulados aumentaram os valores de μ TBS e reduziram a NI na interface adesiva após 6 meses de armazenamento em água. Assim, a primeira hipótese nula foi aceita, mas a segunda foi rejeitada. De fato, estudos anteriores (Davila-Sanchez et al.¹⁸ 2021; Paik et al.¹⁹ 2022; Silva et al.¹⁰⁶ 2022) demonstraram que a utilização de agentes reticuladores de colágeno pode melhorar as propriedades bioquímicas e biomecânicas, reduzindo a biodegradação e preservando a estabilidade da adesão a longo prazo na dentina hígida. No entanto, ao contrário da dentina hígida, a DAC é um substrato clinicamente mais relevante com propriedades mecânicas inferiores que comprometem a eficácia da adesão.

Neste estudo, a DAC foi induzida artificialmente seguindo o protocolo de Marquezan et al. (Marquezan et al.¹⁰ 2009). Independentemente da ausência de oclusão tubular dentinária com minerais *whitlockite*, a DAC artificial parece promover a desmineralização na dentina intertubular que se assemelha à DAC natural (Lenzi et al.¹⁰⁷ 2013) e uma abertura dos túbulos dentinários (Marquezan et al.¹⁰⁸ 2010). Portanto, o aumento da porosidade causado pela perda mineral na DAC permite um condicionamento mais profundo (Nakajima et al.⁸⁸ 2005) que permite uma penetração mais profunda dos adesivos nos túbulos dentinários. O principal componente tecnológico dos adesivos universais é o monômero 10-MDP, que provoca uma ligeira descalcificação da hidroxiapatita que leva à liberação de cálcio (Carrilho et al.¹⁰⁹ 2019). Subsequentemente, forma uma ligação MDP-Ca estável que proporciona uma adesão micro-mecânica e química (Perdigao et al.¹¹⁰ 2021). Esses fatores poderiam explicar a falta de diferença significativa nos valores de μ TBS para todos os grupos após o tempo imediato.

Por outro lado, foi observada uma queda significativa nos valores de μ TBS para o grupo controle após 6 meses de armazenamento em água, o que corrobora estudos anteriores sobre adesivos universais e envelhecimento em armazenamento em água (Ahmed et al.⁷⁹ 2020; Abdelaal et al.¹¹¹ 2016). Neste estudo, os espécimes foram armazenados em água destilada a 37°C durante 6 meses, para poder simular um período de envelhecimento de médio a longo prazo (Armstrong et al.¹¹² 2017). É bem sabido que as camadas híbridas são instáveis em ambientes aquosos devido à

degradação hidrolítica do adesivo e das fibras de colágeno que desaparecem com o tempo (Mazzoni et al.⁵ 2015; Breschi et al.¹¹³ 2008).

Vários estudos demonstraram que a incorporação de agentes reticuladores de colágeno em adesivos dentários pode ser uma solução para aumentar a longevidade da interface adesiva-dentina (Leme-Kraus et al.¹² 2017; Davila-Sanchez et al.¹⁷ 2020; Porto et al.¹¹⁴ 2021). Da mesma forma, verificou-se no presente estudo que a aplicação de agentes de reticulação também melhorou a adesão ao longo do tempo. No entanto, essa aplicação foi feita em DAC com flavonóides nanoencapsulados incorporados em adesivos universais. Este fato pode ser atribuído às propriedades da nanocápsula de policaprolactona (PCL) e dos flavonóides utilizados neste estudo. A PCL é um poliéster alifático de baixa viscosidade conhecido por ter uma boa resistência química à água, ao óleo e aos solventes (Siracusa et al.¹¹⁵ 2008). Uma das suas vantagens é que proporciona uma liberação controlada do ingrediente ativo, durante um período que pode durar vários dias a semanas (Grabnar e Kristl¹¹⁶ 2011). Assim, é possível que a nanocápsula de PCL tenha atuado como um transportador de Q e N para áreas mais profundas dos túbulos dentinários, onde uma liberação lenta e controlada de flavonoides causou valores mais elevados de μ TBS após 6 meses de armazenamento em água, quando comparado com o grupo de controle.

Os agentes reticuladores exógenos de colágeno obtidos através da utilização de flavonoides fornece uma solução eficaz para preservar a dentina desmineralizada, tal como refletido nos nossos resultados e em outros estudos (Epasinghe et al.¹⁴ 2014; Davila-Sanchez et al.¹⁷ 2020; Bedran-Russo et al.¹¹⁷ 2007; Gotti et al.¹¹⁸ 2015). Os flavonoides têm atividades antioxidantes que inibem a produção de radicais livres e eliminam os radicais derivados do oxigênio (Maleki et al.²⁷ 2019). As propriedades antioxidantes dos flavonoides dependem da sua estrutura química: os hidrogênios fenólicos que lhes permitem doar moléculas e os padrões de substituição específicos dentro da estrutura (Li e Wang¹¹⁹ 2016; Chen et al.¹²⁰ 2019). Por conseguinte, após 6 meses de armazenamento em água, o colágeno exposto na parte inferior da camada híbrida foi reforçado pelos flavonoides, provavelmente devido à elevada reatividade dos seus grupos hidroxila (Mondal e Syed¹²¹ 2020; Zhai et al.¹²² 2010).

No entanto, ao comparar os grupos experimentais, os espécimes de Q exibiram valores de μ TBS mais elevados do que os espécimes de N após seis meses de armazenamento em água. A Q interage com as fibrilas colágenas mediante quatro

tipos de forças: i) forças de Van der Waals: permite a interação com a contraparte hidrofóbica de outras moléculas (Hiraishi et al. ²¹ 2013), ii) forças eletrostáticas: aumenta a energia livre de superfície (Hass et al. ⁵¹ 2021), iii) forças hidrofóbicas: promove a incorporação na estrutura do colágeno (Fang et al. ¹²³ 2012) e iv) ligações de hidrogênio: permite a interação com grupos carbonilo das fibrilas de colágeno (Epasinghe et al. ¹⁴ 2014; Yang et al. ¹²⁴ 2009). Adicionalmente, os seus grupos funcionais hidroxila na posição C-5 e C-3 mostraram ser mais eficientes na indução da característica eletrofílica responsiva, exibindo assim uma maior capacidade antioxidante (Jurasekova et al. ⁹⁸ 2014; Mondal e Syed ¹²¹ 2020), enquanto a N possui anéis fenólicos A e B que não estão conjugados devido à hibridação do C2 e C3 sp^3 . Como resultado, o anel B é quase perpendicular aos anéis A e C, causando uma menor capacidade antioxidante (Céliz et al. ³¹ 2011). Além disso, a N é moderadamente solúvel em água, o que provoca um impedimento estérico para eliminar radicais livres (Alam et al. ¹²⁵ 2014). Nesse sentido, poder-se-ia afirmar que os flavonoides apresentam efeitos antioxidantes quando aplicados à DAC.

Curiosamente, os resultados da NI dos grupos controle, Q e N parecem estar correlacionados aos valores de μ TBS mostrados na Tabela 2. Em outras palavras, quanto maior a porcentagem de deposição de prata dentro da camada híbrida, menor a resistência de união observada nesses grupos. Foi demonstrado que o aumento gradual da penetração de nitrato de prata dentro da camada híbrida aumenta devido à penetração de água, o que resulta em uma menor resistência de união (Okuda et al. ¹²⁶ 2002). No entanto, ao comparar os sistemas adesivos, o PBU apresentou maior porcentagem de NI no momento imediato quando comparado ao SBU, e uma redução significativa após 6 meses de armazenamento em água. Portanto, a terceira hipótese nula foi parcialmente aceita.

A expressão do NI é usada para investigar áreas de infiltração incompleta que deixam colágeno desprotegido e nanoporosidades dentro da camada híbrida (Mazzoni et al. ⁵ 2015). A DAC é um substrato que apresenta valores mais altos de NI devido ao aumento de sua alteração morfológica, que pode resultar em uma hibridização de dentina menor e propriedades mecânicas reduzidas (Isolan et al. ⁴ 2018). Ambos adesivos universais foram usados no modo *total-etch*, o que pode ter causado um aumento na permeabilidade, levando à separação de fases dos componentes hidrofóbicos e hidrofílicos da resina (Spencer e Wang ¹²⁷ 2002). Além disso, o adesivo PBU é composto de isopropanol, um solvente altamente solúvel em água que torna o

adesivo mais propenso à degradação precoce (Gutiérrez et al. ¹²⁸ 2019). Isso poderia explicar os altos valores de NI do PBU quando comparado ao SBU após o momento imediato. No entanto, é difícil explicar a interação entre o PBU e os flavonoides que, de alguma forma, produziram um efeito oxidativo maior após 6 meses de armazenamento em água, já que o fabricante não fornece informações detalhadas sobre a tecnologia *Active Guard*.

Os grupos experimentais com flavonoides nanoencapsulados apresentaram valores mais baixos de NI quando comparados ao grupo de controle, após 6 meses de armazenamento em água. Isso pode ser explicado pelo efeito antioxidante da quercetina e da naringina, a alta reatividade de seus grupos hidroxila contribui com um átomo de hidrogênio, resultando em radicais livres menos reativos e estáveis (Mondal e Syed ¹²¹ 2020). No entanto, como mencionado anteriormente, as propriedades antioxidantes dependem do posicionamento estrutural dos grupos funcionais assim como a configuração dos grupos hidroxila (Céliz et al. ³¹ 2011). Com base em sua estrutura, os flavonoides se dividem em subclasses, como flavanol, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianidinas (Maleki et al. ²⁷ 2019). A quercetina, como parte do grupo dos flavonóis, apresenta uma estrutura de 3', 4'-catecol no anel B que aumenta a peroxidação, permitindo a eliminação mais eficaz dos radicais peroxil, superóxido e peroxinitrito (Pandey et al. ¹²⁹ 2017). Por outro lado, a naringina pertence ao grupo das flavonas, onde sua falta de sistema catecol na oxidação leva à formação de radicais instáveis com reduzido potencial de eliminação (Sekher Pannala et al. ¹³⁰ 2001). Esse aspecto pode explicar os resultados mais baixos da NL da quercetina em comparação com a naringina após 6 meses de armazenamento em água.

Depósitos descontínuos de prata foram identificados após o tempo imediato na base da camada híbrida por FEG-SEM, provavelmente devido à ligação de éster desprotegida dos materiais à base de metacrilato que são suscetíveis à hidrólise (Cardoso et al. ⁶⁸ 2011). Por outro lado, menor depósitos de prata foram observados nas interfaces adesivas quando os flavonoides foram usados após 6 meses de armazenamento em água. Esses resultados podem ser explicados pela capacidade das moléculas de flavonoides de modificar a dinâmica da água na dentina, diminuindo os níveis de água na matriz extracelular e, conseqüentemente, melhorando a infiltração adesiva (Leme-Kraus et al. ¹² 2017; Davila-Sanchez et al. ¹⁷ 2020).

Os resultados atuais de micro-Raman demonstraram a presença de N e Q dentro da camada híbrida, como observado nos espectros de micro-Raman, com os picos característicos de N (carbonyl e bandas de anéis A, B e C) e Q (carbonyl e OH). Semelhante aos nossos resultados, Kryssa et al. relataram o pico de carbonila da naringenina em 1660 cm^{-1} , anéis A e B em 1191 cm^{-1} , anel C em 1235 cm^{-1} ; e o pico de carbonila de Q em 1615 cm^{-1} na vibração de estiramento e nas vibrações de flexão em 690 cm^{-1} e 642 cm^{-1} , os picos de OH na flexão fora do plano em 599 cm^{-1} e na flexão no plano em 1179 cm^{-1} e 1367 cm^{-1} (Krysa et al. ⁹⁰ 2022). Vale ressaltar que a forma glicosídica da naringenina é N, que apresenta bandas semelhantes, pois o espectro é baseado no núcleo de flavanona (Krysa et al. ⁹⁰ 2022). Além disso, o grupo alquil C-H em 1450 cm^{-1} foi escolhido como medida da penetração adesiva resina-dentina (Daood et al. ¹³¹ 2015) e, conforme visto em nossos resultados, o uso de flavonoides não prejudica a adesão ao CAD. A coalescência de pico em SBUQ pode ser atribuída aos grupos hidroxila de Q, bem como ao grupo catecol no anel B, pois apresenta mais conformadores e reatividade do que N (Uyeki et al. ¹³² 2023), enquanto o deslocamento de pico em PBUQ provavelmente está associado à presença de uma ligação dupla em $C2=C3$ (Daood et al. ¹³¹ 2015).

Algumas limitações devem ser consideradas no presente estudo. Apesar das melhorias observadas nas propriedades mecânicas dos adesivos universais com flavonoides nanoencapsulados, os resultados não podem ser extrapolados para um cenário clínico. Existem diversos fatores que podem influenciar as propriedades e a qualidade do sistema adesivo em um cenário clínico complexo, como a experiência do operador, as características da dentina à qual estamos aderindo, hábitos do paciente, entre outros. Além disso, nosso estudo avaliou exclusivamente o modo de condicionamento total em adesivos universais. Portanto, os resultados obtidos em nossa pesquisa não devem ser generalizados para outros sistemas adesivos, como em um sistema autocondicionante. Estudos adicionais são necessários para abordar essas questões.

7 CONCLUSÕES

Dentro das limitações do atual estudo in vitro, é possível concluir que:

1. Não foram encontradas diferenças significativas na resistência de união entre todos os grupos no TI.
2. O uso de flavonoides nanoencapsulados pode melhorar a longevidade dos sistemas de adesivos universais quando foram aplicados a DAC.
3. A Q foi mais eficaz do que a N em μ TBS e NI após 6 meses de armazenamento em água
4. A detecção de flavonoides dentro da camada híbrida é valiosa para confirmar a capacidade de penetração das nanopartículas e o potencial dos flavonoides neste estudo, especialmente em relação à resistência de união e à nanoinfiltração

REFERÊNCIAS

1. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; May 25;3:17030.
2. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res*. 2020;54(1):7-14.
3. Tabata M, Ratanaporncharoen C, Ishihara N, Masu K, Sriyudthsak M, Kitasako Y, et al. Surface analysis of dental caries using a wireless pH sensor and Raman spectroscopy for chairside diagnosis. *Talanta*. 2021; Dec 1;235:122718.
4. Isolan CP, Sarkis-Onofre R, Lima GS, Moraes RR. Bonding to Sound and Caries-Affected Dentin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Adhes Dent*. 2018;20(1):7-18.
5. Mazzoni A, Tjaderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015; Feb;94(2):241-51.
6. Alves FB, Lenzi TL, Reis A, Loguercio AD, Carvalho TS, Raggio DP. Bonding of simplified adhesive systems to caries-affected dentin of primary teeth. *J Adhes Dent*. 2013; Oct;15(5):439-45.
7. Epasinghe DJ, Yiu C, Burrow MF. Effect of flavonoids on remineralization of artificial root caries. *Aust Dent J*. 2016; Jun;61(2):196-202.
8. Costa AR, Garcia-Godoy F, Correr-Sobrinho L, Naves LZ, Raposo LH, Carvalho FG, et al. Influence of Different Dentin Substrate (Caries-Affected, Caries-Infected, Sound) on Long-Term μ TBS. *Braz Dent J*. 2017; Jan-Feb;28(1):16-23.
9. Ceballos L, Camejo DG, Victoria Fuentes M, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM, et al. Microtensile bond strength of total-etch and self-etching adhesives to caries-affected dentine. *J Dent*. 2003; Sep;31(7):469-77.
10. Marquezan M, Corrêa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol*. 2009; Dec;54(12):1111-7.
11. Da Rosa Rodolpho PA, Rodolfo B, Collares K, Correa MB, Demarco FF, Opdam NJM, et al. Clinical performance of posterior resin composite restorations after up to 33 years. *Dent Mater*. 2022; Apr;38(4):680-8.

12. Leme-Kraus AA, Aydin B, Vidal CM, Phansalkar RM, Nam JW, McAlpine J, et al. Biostability of the Proanthocyanidins-Dentin Complex and Adhesion Studies. *J Dent Res.* 2017; Apr;96(4):406-12.
13. Islam S, Hiraishi N, Nassar M, Yiu C, Otsuki M, Tagami J. Effect of natural cross-linkers incorporation in a self-etching primer on dentine bond strength. *J Dent.* 2012; Dec;40(12):1052-9.
14. Epasinghe DJ, Yiu CK, Burrow MF, Tsoi JK, Tay FR. Effect of flavonoids on the mechanical properties of demineralised dentine. *J Dent.* 2014; Sep;42(9):1178-84.
15. Tjaderhane L, Buzalaf MA, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'. *Caries Res.* 2015;49(3):193-208.
16. Schulze KA, Oliveira SA, Wilson RS, Gansky SA, Marshall GW, Marshall SJ. Effect of hydration variability on hybrid layer properties of a self-etching versus an acid-etching system. *Biomaterials.* 2005; Mar;26(9):1011-8.
17. Davila-Sanchez A, Gutierrez MF, Bermudez JP, Mendez-Bauer ML, Hilgemberg B, Sauro S, et al. Influence of flavonoids on long-term bonding stability on caries-affected dentin. *Dent Mater.* 2020; Sep;36(9):1151-60.
18. Davila-Sanchez A, Gutierrez MF, Bermudez JP, Mendez-Bauer L, Pulido C, Kiratcz F, et al. Effects of Dentine Pretreatment Solutions Containing Flavonoids on the Resin Polymer-Dentine Interface Created Using a Modern Universal Adhesive. *Polymers (Basel).* 2021; Apr 2;13(7).
19. Paik Y, Kim JH, Yoo KH, Yoon SY, Kim YI. Dentin Biomodification with Flavonoids and Calcium Phosphate Ion Clusters to Improve Dentin Bonding Stability. *Materials (Basel).* 2022; Feb 17;15(4).
20. Epasinghe DJ, Yiu CK, Burrow MF, Tay FR, King NM. Effect of proanthocyanidin incorporation into dental adhesive resin on resin-dentine bond strength. *J Dent.* 2012; Mar;40(3):173-80.
21. Hiraishi N, Sono R, Sofiquil I, Yiu C, Nakamura H, Otsuki M, et al. In vitro evaluation of plant-derived agents to preserve dentin collagen. *Dent Mater.* 2013; Oct;29(10):1048-54.
22. Yang H, Li K, Yan H, Liu S, Wang Y, Huang C. High-performance therapeutic quercetin-doped adhesive for adhesive-dentin interfaces. *Sci Rep.* 2017; Aug 15;7(1):8189.

23. Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol.* 2012; Jan 1;83(1):6-15.
24. Rauf A, Imran M, Khan IA, Ur-Rehman M, Gilani SA, Mehmood Z, et al. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. *Phytother Res.* 2018; Nov;32(11):2109-30.
25. Taherkhani A, Moradkhani S, Orangi A, Jalalvand A, Khamverdi Z. Molecular docking study of flavonoid compounds for possible matrix metalloproteinase-13 inhibition. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2020; Dec 14;32(6):1105-19.
26. Ramos FA, Takaishi Y, Shirotori M, Kawaguchi Y, Tsuchiya K, Shibata H, et al. Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. *J Agric Food Chem.* 2006; May 17;54(10):3551-7.
27. Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem.* 2019; Nov 30;299:125124.
28. Chopra M, Fitzsimons PE, Strain JJ, Thurnham DI, Howard AN. Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clin Chem.* 2000; Aug;46(8 Pt 1):1162-70.
29. Serban MC, Sahebkar A, Zanchetti A, Mikhailidis DP, Howard G, Antal D, et al. Effects of Quercetin on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc.* 2016; Jul 12;5(7).
30. Chen R, Qi QL, Wang MT, Li QY. Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharm Biol.* 2016; Dec;54(12):3203-10.
31. Céliz G, Daz M, Audisio MC. Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains. *J Appl Microbiol.* 2011; Sep;111(3):731-8.
32. Aihaiti Y, Song Cai Y, Tuerhong X, Ni Yang Y, Ma Y, Shi Zheng H, et al. Therapeutic Effects of Naringin in Rheumatoid Arthritis: Network Pharmacology and Experimental Validation. *Front Pharmacol.* 2021;12:672054.
33. Memariani Z, Abbas SQ, UI Hassan SS, Ahmadi A, Chabra A. Naringin and naringenin as anticancer agents and adjuvants in cancer combination therapy: Efficacy and molecular mechanisms of action, a comprehensive narrative review. *Pharmacol Res.* 2021; Sep;171:105264.
34. Schmaltz C, Santos JVd, Guterres SS. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. 2013. 2013; 2013-01-22;16(13/14):6.

35. Budel RG, da Silva DA, Moreira MP, Dalcin AJF, da Silva AF, Nazario LR, et al. Toxicological evaluation of naringin-loaded nanocapsules in vitro and in vivo. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020; Apr;188:110754.
36. Hilgemberg B. Análise das propriedades mecânicas da interface de união e resistência de união de adesivos contendo flavonoides: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2022.
37. Conrads G, About I. Pathophysiology of Dental Caries. *Monogr Oral Sci*. 2018;27:1-10.
38. Bowen WH. Dental caries - not just holes in teeth! A perspective. *Mol Oral Microbiol*. 2016; Jun;31(3):228-33.
39. Russell RR. Changing concepts in caries microbiology. *Am J Dent*. 2009; Oct;22(5):304-10.
40. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res*. 2015; May;94(5):650-8.
41. Mathur VP, Dhillon JK. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. *Indian J Pediatr*. 2018; Mar;85(3):202-6.
42. Yoshihara K, Nagaoka N, Nakamura A, Hara T, Hayakawa S, Yoshida Y, et al. Three-dimensional observation and analysis of remineralization in dentinal caries lesions. *Sci Rep*. 2020; Mar 9;10(1):4387.
43. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986; Dec;50(4):353-80.
44. Scheie AA, Petersen FC. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; Jan 1;15(1):4-12.
45. Boushell LW, Nagaoka H, Nagaoka H, Yamauchi M. Increased matrix metalloproteinase-2 and bone sialoprotein response to human coronal caries. *Caries Res*. 2011;45(5):453-9.
46. Zehnder M, Wegehaupt FJ, Attin T. A first study on the usefulness of matrix metalloproteinase 9 from dentinal fluid to indicate pulp inflammation. *J Endod*. 2011; Jan;37(1):17-20.
47. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res*. 2002; Sep;81(9):603-7.

48. Deyhle H, Bunk O, Muller B. Nanostructure of healthy and caries-affected human teeth. *Nanomedicine*. 2011; Dec;7(6):694-701.
49. Keller JF, Carrouel F, Colomb E, Durand SH, Baudouin C, Msika P, et al. Toll-like receptor 2 activation by lipoteichoic acid induces differential production of pro-inflammatory cytokines in human odontoblasts, dental pulp fibroblasts and immature dendritic cells. *Immunobiology*. 2010;215(1):53-9.
50. Ekambaram M, Yiu CKY, Matinlinna JP. Bonding of resin adhesives to caries-affected dentin – A systematic review. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2015; 2015/09/01;61:23-34.
51. Hass V, da Maceno Oliveira TB, Cardenas AFM, de Siqueira FSF, Bauer JR, Abuna G, et al. Is it possible for a simultaneous biomodification during acid etching on naturally caries-affected dentin bonding? *Clin Oral Investig*. 2021; Jun;25(6):3543-53.
52. Peixoto AC, Bicalho AA, Isolan CP, Maske TT, Moraes RR, Cenci MS, et al. Bonding of Adhesive Luting Agents to Caries-affected Dentin Induced by a Microcosm Biofilm Model. *Oper Dent*. 2015; May-Jun;40(3):E102-11.
53. Kuboki Y, Ohgushi K, Fusayama T. Collagen biochemistry of the two layers of carious dentin. *J Dent Res*. 1977; Oct;56(10):1233-7.
54. Jeanneau C, Rufas P, Rombouts C, Giraud T, Dejou J, About I. Can Pulp Fibroblasts Kill Cariogenic Bacteria? Role of Complement Activation. *J Dent Res*. 2015; Dec;94(12):1765-72.
55. Söderholm KJ. Dental adhesives how it all started and later evolved. *J Adhes Dent*. 2007;9 Suppl 2:227-30.
56. McLean JWK, I.R.H. A clinical and pathological evaluation a sulphinic acid activated resin for use in restorative dentistry. *Br Dent J*. 1952;93:255-69.
57. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res*. 1955; Dec;34(6):849-53.
58. Eick JD, Wilko RA, Anderson CH, Sorensen SE. Scanning electron microscopy of cut tooth surfaces and identification of debris by use of the electron microprobe. *J Dent Res*. 1970; Nov-Dec;49(6):Suppl:1359-68.
59. Bowen RL, Eick JD, Henderson DA, Anderson DW. Smear layer: removal and bonding considerations. *Oper Dent Suppl*. 1984;3:30-4.

60. Pashley DH, Tao L, Boyd L, King GE, Horner JA. Scanning electron microscopy of the substructure of smear layers in human dentine. *Arch Oral Biol.* 1988;33(4):265-70.
61. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, J DM, K.L VL. State of the art of self-etch adhesives. *Dental Materials.* 2011; 2011/01/01/;27(1):17-28.
62. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982; May;16(3):265-73.
63. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Van Landuyt K, Yoshida Y, Peumans M. From Buonocore's Pioneering Acid-Etch Technique to Self-Adhering Restoratives. A Status Perspective of Rapidly Advancing Dental Adhesive Technology. *J Adhes Dent.* 2020;22(1):7-34.
64. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dental Materials.* 2011; 2011/01/01/;27(1):1-16.
65. Hardan L, Bourgi R, Cuevas-Suarez CE, Devoto W, Zarow M, Monteiro P, et al. Effect of Different Application Modalities on the Bonding Performance of Adhesive Systems to Dentin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cells.* 2023; Jan 3;12(1).
66. Gwinnett AJ, Matsui A. A study of enamel adhesives. The physical relationship between enamel and adhesive. *Arch Oral Biol.* 1967; Dec;12(12):1615-20.
67. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res.* 2003; Feb;82(2):136-40.
68. Cardoso MV, de Almeida Neves A, Mine A, Coutinho E, Van Landuyt K, De Munck J, et al. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Aust Dent J.* 2011; Jun;56 Suppl 1:31-44.
69. 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; Aug;71(8):1530-40.
70. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent.* 2003; May-Jun;28(3):215-35.

71. Nakabayashi N, Takarada K. Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dent Mater.* 1992; Mar;8(2):125-30.
72. 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; Jan;27(1):17-28.
73. Tay FR, Sano H, Carvalho R, Pashley EL, Pashley DH. An ultrastructural study of the influence of acidity of self-etching primers and smear layer thickness on bonding to intact dentin. *J Adhes Dent.* 2000; Summer;2(2):83-98.
74. De Munck J, Vargas M, Iracki J, Van Landuyt K, Poitevin A, Lambrechts P, et al. One-day bonding effectiveness of new self-etch adhesives to bur-cut enamel and dentin. *Oper Dent.* 2005; Jan-Feb;30(1):39-49.
75. Rosa WL, Piva E, Silva AF. Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2015; Jul;43(7):765-76.
76. Muñoz MA, Luque I, Hass V, Reis A, Loguercio AD, Bombarda NH. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent.* 2013; May;41(5):404-11.
77. Cuevas-Suárez CE, da Rosa WLO, Lund RG, da Silva AF, Piva E. Bonding Performance of Universal Adhesives: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *J Adhes Dent.* 2019;21(1):7-26.
78. Gutiérrez MF, Alegría-acevedo LF, Núñez A, Méndez-Bauer L, Ñaupari-Villasante R, de Souza JJ, et al. In vitro biological and adhesive properties of universal adhesive systems on sound and caries-affected dentine: 18 months. *International Journal of Adhesion and Adhesives.* 2022; 2022/04/01;114:103107.
79. Ahmed MH, Yoshihara K, Mercelis B, Van Landuyt K, Peumans M, Van Meerbeek B. Quick bonding using a universal adhesive. *Clin Oral Investig.* 2020; Aug;24(8):2837-51.
80. Van Landuyt KL, Yoshida Y, Hirata I, Snauwaert J, De Munck J, Okazaki M, et al. Influence of the chemical structure of functional monomers on their adhesive performance. *J Dent Res.* 2008; Aug;87(8):757-61.
81. Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Itou K, et al. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. *J Dent Res.* 2002; Aug;81(8):556-60.
82. Lima JFM, Wajngarten D, Islam F, Clifford J, Botta AC. Effect of adhesive mode and chlorhexidine on microtensile strength of universal bonding agent to sound and caries-affected dentins. *Eur J Dent.* 2018; Oct-Dec;12(4):553-8.

83. Macedo GV, Yamauchi M, Bedran-Russo AK. Effects of chemical cross-linkers on caries-affected dentin bonding. *J Dent Res*. 2009; Dec;88(12):1096-100.
84. Meraji N, Nekoofar MH, Yazdi KA, Sharifian MR, Fakhari N, Camilleri J. Bonding to caries affected dentine. *Dent Mater*. 2018; Sep;34(9):e236-e45.
85. Hosoya Y, Tay FR. Hardness, elasticity, and ultrastructure of bonded sound and caries-affected primary tooth dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007; Apr;81(1):135-41.
86. Sakoolnamarka R, Burrow MF, Tyas MJ. Interfacial micromorphology of three adhesive systems created in caries-affected dentin. *Am J Dent*. 2003; Jun;16(3):202-6.
87. Daculsi G, LeGeros RZ, Jean A, Kerebel B. Possible physico-chemical processes in human dentin caries. *J Dent Res*. 1987; Aug;66(8):1356-9.
88. Nakajima M, Kitasako Y, Okuda M, Foxton RM, Tagami J. Elemental distributions and microtensile bond strength of the adhesive interface to normal and caries-affected dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005; Feb 15;72(2):268-75.
89. Chirumbolo S. Quercetin as a potential anti-allergic drug: which perspectives? *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2011; Jun;10(2):139-40.
90. Krysa M, Szymanska-Chargot M, Zdunek A. FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids - A review. *Food Chem*. 2022; Nov 1;393:133430.
91. Middleton E, Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol*. 1998;439:175-82.
92. Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*. 1998; 1998/12/01;18(12):1995-2018.
93. Chen L. Dietary phenolic compound with the presence of C2=C3 double bond take the pre-emptive opportunities to enhance its biological effects. 2018.
94. Kasote DM, Katyare SS, Hegde MV, Bae H. Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences*. 2015;11(8):982-91.
95. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:162750.
96. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(7):933-56.
97. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*. 1990;186:343-55.

98. Jurasekova Z, Domingo C, Garcia-Ramos JV, Sanchez-Cortes S. Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. *Phys Chem Chem Phys*. 2014; Jul 7;16(25):12802-11.
99. Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomás-Barberán FA, Datta N, Singanusong R, et al. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr*. 2004; Summer;59(3):113-22.
100. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; Nov;26(5):343-56.
101. Muñoz MA, Luque-Martinez I, Malaquias P, Hass V, Reis A, Campanha NH, et al. In vitro longevity of bonding properties of universal adhesives to dentin. *Oper Dent*. 2015; May-Jun;40(3):282-92.
102. Nonato RF, Moreira PHA, Silva DOD, Ferreira MWC, Reis A, Cardenas AFM, et al. Long-term Evaluation of Bonding Performance of Universal Adhesives based on Different Dentinal Moisture Levels. *J Adhes Dent*. 2022; Nov 8;24(1):395-406.
103. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent*. 2002; Sep-Nov;30(7-8):371-82.
104. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012; 2012/07/01;9(7):671-5.
105. Van Meerbeek B, Mohrbacher H, Celis JP, Roos JR, Braem M, Lambrechts P, et al. Chemical characterization of the resin-dentin interface by micro-Raman spectroscopy. *J Dent Res*. 1993; Oct;72(10):1423-8.
106. Silva JC, Cetira Filho EL, Silva PGB, Costa FWG, Saboia VPA. Is dentin biomodification with collagen cross-linking agents effective for improving dentin adhesion? A systematic review and meta-analysis. *Restor Dent Endod*. 2022; May;47(2):e23.
107. Lenzi T, Mendes F, Rocha R, Raggio D. Effect of Shortening the Etching Time on Bonding to Sound and Caries-affected Dentin of Primary Teeth. *Pediatric dentistry*. 2013; 09/01;35:129-33.
108. Marquezan M, Osorio R, Ciamponi AL, Toledano M. Resistance to degradation of bonded restorations to simulated caries-affected primary dentin. *Am J Dent*. 2010; Feb;23(1):47-52.

109. Carrilho E, Cardoso M, Marques Ferreira M, Marto CM, Paula A, Coelho AS. 10-MDP Based Dental Adhesives: Adhesive Interface Characterization and Adhesive Stability-A Systematic Review. *Materials (Basel)*. 2019; Mar 7;12(5).
110. Perdigao J, Araujo E, Ramos RQ, Gomes G, Pizzolotto L. Adhesive dentistry: Current concepts and clinical considerations. *J Esthet Restor Dent*. 2021; Jan;33(1):51-68.
111. Abdelaal M, Niazy M, Hafez R, Yassen A. The Effect of using Cross-Linking Agent with Nano-Adhesive on the Bonding to Sound and Caries Affected Dentin. *Al-Azhar Dental Journal for Girls*. 2016;3(4):247-56.
112. Armstrong S, Breschi L, Ozcan M, Pfeifferkorn F, Ferrari M, Van Meerbeek B. Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (muTBS) approach. *Dent Mater*. 2017; Feb;33(2):133-43.
113. 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; Jan;24(1):90-101.
114. Porto I, Rocha ABB, Ferreira IIS, de Barros BM, Avila EC, da Silva MC, et al. Polyphenols and Brazilian red propolis incorporated into a total-etching adhesive system help in maintaining bonding durability. *Heliyon*. 2021; Feb;7(2):e06237.
115. Siracusa V, Rocculi P, Romani S, Rosa MD. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2008; 2008/12/01;19(12):634-43.
116. Grabnar PA, Kristl J. The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers. *J Microencapsul*. 2011;28(4):323-35.
117. Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007; Jan;80(1):268-72.
118. Gotti VB, Feitosa VP, Sauro S, Correr-Sobrinho L, Leal FB, Stansbury JW, et al. Effect of antioxidants on the dentin interface bond stability of adhesives exposed to hydrolytic degradation. *J Adhes Dent*. 2015; Feb;17(1):35-44.
119. Li X, Wang Q. Analysis of the inherent instability of the interpolating moving least squares method when using improper polynomial bases. *Engineering Analysis with Boundary Elements*. 2016; 2016/12/01;73:21-34.

120. Chen G-L, Fan M-X, Wu J-L, Li N, Guo M-Q. Antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids from lotus plumule. *Food Chemistry*. 2019; 2019/03/30;277:706-12.
121. Mondal DS, Syed TR. Flavonoids: A vital resource in healthcare and medicine (Includes their effective action on COVID-19). *Pharmacology & Pharmacy*. 2020; 04/24;8:91-104.
122. Zhai W, Lü X, Chang J, Zhou Y, Zhang H. Quercetin-crosslinked porcine heart valve matrix: Mechanical properties, stability, anticalcification and cytocompatibility. *Acta Biomaterialia*. 2010; 2010/02/01;6(2):389-95.
123. Fang M, Liu R, Xiao Y, Li F, Wang D, Hou R, et al. Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin-dentin bonds. *J Dent*. 2012; Jun;40(6):458-66.
124. Yang X, Wu D, Du Z, Li R, Chen X, Li X. Spectroscopy Study on the Interaction of Quercetin with Collagen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 2009/05/13;57(9):3431-5.
125. Alam MA, Subhan N, Rahman MM, Uddin SJ, Reza HM, Sarker SD. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Adv Nutr*. 2014; Jul;5(4):404-17.
126. Okuda M, Pereira PN, Nakajima M, Tagami J, Pashley DH. Long-term durability of resin dentin interface: nanoleakage vs. microtensile bond strength. *Oper Dent*. 2002; May-Jun;27(3):289-96.
127. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res*. 2002; Dec 5;62(3):447-56.
128. Gutiérrez MF, Alegría-Acevedo LF, Méndez-Bauer L, Bermudez J, Dávila-Sánchez A, Buvinic S, et al. Biological, mechanical and adhesive properties of universal adhesives containing zinc and copper nanoparticles. *Journal of Dentistry*. 2019; 2019/03/01;82:45-55.
129. Pandey SK, Manogaran D, Manogaran S, Schaefer HF, 3rd. Quantification of Hydrogen Bond Strength Based on Interaction Coordinates: A New Approach. *J Phys Chem A*. 2017; Aug 17;121(32):6090-103.
130. Sekher Pannala A, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; Apr 20;282(5):1161-8.

131. Daood U, Swee Heng C, Neo Chiew Lian J, Fawzy AS. In vitro analysis of riboflavin-modified, experimental, two-step etch-and-rinse dentin adhesive: Fourier transform infrared spectroscopy and micro-Raman studies. *Int J Oral Sci.* 2015; Jun 26;7(2):110-24.
132. Uyeki SC, Pacheco CM, Simeral ML, Hafner JH. The Raman Active Vibrations of Flavone and Quercetin: The Impact of Conformers and Hydrogen Bonding on Fingerprint Modes. *J Phys Chem A.* 2023; Feb 16;127(6):1387-94.

ANEXOS A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise das propriedades mecânicas e resistência da interface de união de adesivos universais contendo flavonoides em dentina afetada por cáries.

Pesquisador: Cesar Augusto Galvão Arrais

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60015122.9.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.507.845

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa:

Análise das propriedades mecânicas e resistência da interface de união de adesivos universais contendo flavonoides em dentina afetada por cáries. O estudo utilizará 60 molares permanente livres de cáries (N=60) alocados aleatoriamente em 6 grupos, com as variáveis: Naringina + Scotch Bond Universal, Quercetina + Scotch Bond Universal, Naringina + Prime&Bond Elect Universal, Quercetina + Prime&Bond Elect Universal, grupo controle Scotch Bond Universal, grupo controle Prime&Bond Elect Universal.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito in vitro da adesão mediante o uso de adesivos universais misturados com flavonoides encapsulados em modo "total etch" nas propriedades mecânicas e na morfologia da interface de união em dentina afetada por cáries.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar a nanodureza e módulo de elasticidade da interface de união formada pela aplicação de dois adesivos universais de diferentes marcas

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvararanas, Bloco da Reitoria, sala 22

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3282

E-mail: propespsecretaria@uepg.br