

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

MARIO FELIPE GUTIÉRREZ REYES

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE EM UM
SISTEMA ADESIVO CONVENCIONAL NAS PROPRIEDADES
MICROBIOLÓGICAS, MECÂNICAS E ADESIVAS À DENTINA**

PONTA GROSSA

2016

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

MARIO FELIPE GUTIÉRREZ REYES

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE EM UM
SISTEMA ADESIVO CONVENCIONAL NAS PROPRIEDADES
MICROBIOLÓGICAS, MECÂNICAS E ADESIVAS À DENTINA**

Dissertação apresentada para obtenção do título mestre em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia - Área de Concentração: Clínica Integrada. Linha de Pesquisa: Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais Odontológicos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio

PONTA GROSSA

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Gutiérrez Reyes, Mario Felipe

G984 Efeito da incorporação de nanopartículas de cobre em um sistema adesivo convencional nas propriedades microbiológicas, mecânicas e adesivas à dentina/ Mario Felipe Gutiérrez Reyes. Ponta Grossa, 2016. 80f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia - Área de Concentração: Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa. Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago. Coorientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio.

1.Dentina. 2.Adesivos convencionais. 3.Resistência de união. 4.Grau de conversão. 5.Nanoinfiltração. I.Farago, Paulo Vitor. II. Loguercio, Alessandro Dourado. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Odontologia. IV. T.

CDD: 617.6

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIO FELIPE GUTIÉRREZ REYES

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE EM UM SISTEMA
ADESIVO CONVENCIONAL NAS PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS, MECÂNICAS E
ADESIVAS À DENTINA**

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 Clínica Integrada.

Ponta Grossa, 23 de fevereiro de 2016



Prof. Dr. Paulo Vitor Farago - Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa/UEPG



Profª. Drª. Viviane Hass
Centro Universitário do Maranhão/CEUMA



Profª. Drª. Alessandra Reis Silva Logécio
Universidade Estadual de Ponta Grossa/UEPG

DADOS CURRICULARES

MARIO FELIPE GUTIÉRREZ REYES

NASCIMENTO	26.11.1983 Santiago - Chile
FILIAÇÃO	Jeannette del Carmen Reyes García Mario Segundo Gutiérrez Cortés
2002 – 2007	Curso de Graduação em Odontologia da Universidad de Chile (UCh). Santiago – Chile.
2011 – 2013	Curso de Especialização em Reabilitação Oral, Universidade Finis Terrae (UFT). Santiago – Chile.
2014 – 2016	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), nível de Mestrado em Odontologia - Área de Concentração em Clínica Integrada.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Jeannette Reyes e Mario Gutiérrez,

Pela sua paciência, por aceitar que a distância ia nos separar por um tempo, mas que tudo valeria a pena. Por me ensinar o caminho certo desde sempre, e por me demonstrar que apenas os sonhadores cumprem os seus sonhos.

Aos meus irmãos Diego Gutiérrez Reyes e Ariel Gutiérrez Reyes, por sempre ser o apoio fraterno, por fazer com que a distância não exista y poder dar risadas como se estivéssemos juntos.

Aos meus avós, tios e primos, por nunca deixar de me apoiar, e por sempre acreditar e apoiar cada passo que eu dou.

A Florencia Reyes Suárez, minha afilhada, minha prima, e sobre tudo, a menina dos meus olhos, que me faz não desistir quando tudo parece se opor.

A Deus

Por sempre me mostrar o caminho, por nunca me deixar sozinho e acreditar em mim quando nem eu mesmo acreditava.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, por me aceitar como orientado, pelo apoio e compreensão neste longo caminho. Muito obrigado pela confiança depositada em mim e por acreditar sempre no projeto.

Aos Professores. Dr. Alessandro Loguercio e Dr^a. Alessandra Reis, muito obrigado pela paciência, pela confiança e pelo carinho. Agradecerei sempre sua humildade em passar os seus conhecimentos, o incentivo e as oportunidades que vocês sempre me ofereceram.

A Professora Denise Wambier, pelo apoio em todo momento, e pelo carinho de sempre.

Ao Prof. Dr. João Carlos Gomes e a Prof^a. Dr^a. Osnara Maria Mongruel Gomes, pela oportunidade de participar do curso de Mestrado.

Gostaria de agradecer ao Brasil, país abençoado por Deus e bonito por natureza, que me acolheu como um deles, e ao povo brasileiro, que sempre me faz sentir em casa.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, e ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Odontologia, na pessoa da sua coordenadora Prof^a. Dr^a. Denise Wambier e do seu vice coordenador Prof. Dr. Alessandro Loguercio.

À Faculdade de Odontologia da Universidade do Chile, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. Jorge Gamonal, pela confiança e mim depositada.

Ao Instituto de Pesquisa em Ciências Odontológicas da Universidade do Chile, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. Alejandro Escobar, por me permitir e facilitar em todo momento a realização do meu Mestrado, e pelo apoio sempre.

Ao grupo de Fisiologia da Universidade do Chile, carinhosamente chamado de “FisioTeam”, Professores Doutores Rodolfo Miralles, Saúl Valenzuela, Hugo Santander, Aler Fuentes, Claudia Zúñiga, Rosa Cordova, Carmen Palazzi, por ser

sempre como uma família pra mim, e me aconselhar e ajudar sempre e em todo momento.

Ao Prof. Dr. Jorge Perdigão, por ter me dado a oportunidade de visitar e trabalhar na Universidade de Minnesota. Muito obrigado pelos ensinamentos.

Ao meu amigo e irmão Jorge Pailover, por ser um grande parceiro neste caminho, e por me aguentar sempre. Por ser sempre como um irmão.

A Luisa Alegria e Cindy Pérez, por ser como umas irmãs, umas grandes parceiras neste longo caminho, e sempre estar dispostas a ajudar.

A minha amiga, colega, dupla e parceira Pâmela Malaquias, por me ajudar sempre, por sua humildade em me ensinar e pela paciência quando nada dava certo. Sem dúvida você se transformou em uma irmã para mim.

A Viviane Hass, obrigado sempre pelo carinho, amizade e apoio em momentos difíceis. Você se tornou uma grande mestre neste caminho, e sua sabedoria e humildade nunca esquecerei.

A Miguel Muñoz e Issis Luque, por sua inestimável ajuda em todo momento e por ser sempre um apoio. Vocês sempre serão o reflexo do que eu gostaria de ser como pesquisador e como pessoa.

A Thalita, minha amiga, por ser sempre a felicidade no grupo, e pela sua ajuda inestimável. Você será uma grande pesquisadora sem dúvida alguma.

A Sibelli Parreiras, por ser sempre como uma irmã para mim, por sempre manter seu bom senso de humor, e por me ajudar sempre quando precisei.

A Anna Luiza, Eveline Martini, Thais Bakaus, Cinthia Baggio, Carolina Escobar, Driellen Zarpellon, pela amizade, tempo dedicado e as intenções de sempre ajudar.

Aos meus amigos “*importados*”, Patrício Runnacles, Andrés Dávila, Andrés Montenegro, Camilo Pulido, Miguel, por todos os momentos vividos.

A Simone, Josiane, Vanessa, Raquel e Milton pelo apoio técnico nos laboratórios, e pela sua amizade.

A todos os professores do Programa de pós-graduação em Odontologia da UEPG que transmitiram seus conhecimentos durante o curso.

Aos funcionários do Programa de pós-graduação em Odontologia da UEPG.

RESUMO

GUTIÉRREZ MF. **Efeito da incorporação de nanopartículas de cobre em um sistema adesivo convencional nas propriedades microbiológicas, mecânicas e adesivas à dentina.** [Dissertação – Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Clínica Integrada - Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016].

Objetivos: Este estudo avaliou o efeito da adição de nanopartículas de cobre, em diferentes concentrações, em um sistema adesivo convencional (CON) simplificado Ambar [FGM] sobre a atividade antimicrobiana (AAM), grau de conversão de corpos de prova de adesivos (GC-c) e na interface de união a dentina (GC-i), resistência máxima à tração (RT), sorção cumulativa de água (SO), solubilidade (SB) e liberação de cobre (LC) durante 28 dias, bem como a resistência de união (RU) e nanoinfiltração (NI) na interface de união à dentina nos tempos imediatos (IM) e após 1 ano (1A).

Material e métodos: Sete sistemas adesivos experimentais foram formulados de acordo com a adição de nanopartículas de cobre (0 [controle], 0,0075, 0,015, 0,06, 0,1, 0,5 e 1%) no sistema adesivo Ambar. Foi testada a atividade antimicrobiana dos adesivos formulados contra *Streptococcus mutans* por meio de ensaios de difusão em ágar. Para GC-c, as amostras foram construídas e testadas após 24 h por meio de espectrofotometria no infravermelho com Transformação de Fourier (FTIR) e espectroscopia de micro-Raman. Para RT, as amostras foram testadas depois de 24 horas e 28 dias. Para SO e SB, depois de confeccionados os espécimes, eles foram armazenados em água e as propriedades medidas por 28 dias. Para LC, as amostras foram armazenadas em solução de ácido nítrico a 2% e as propriedades medidas durante 28 dias. O esmalte oclusal de trinta e cinco molares foi removido e os adesivos foram aplicados na superfície da dentina depois de condicionamento com ácido fosfórico a 37%. Depois de restaurações de resina composta, os espécimes foram seccionados longitudinalmente para se obter espécimes (palitos) de resina-dentina (0,8 mm²). Os espécimes foram testados em tensão a 0,5 mm/min no IM ou 1A (RU). Para NI, 2 espécimes de cada dente foram preparados e analisados em MEV e testados no IM ou 1A. Para GC-i, 2 espécimes foram preparados e analisados sob espectroscopia de micro-Raman. Os dados do RT foram analisados por uma análise de variância de 2 fatores. Para AAM, SO, SB, e liberação de cobre, os dados foram analisados por análise de variância de fator único, e para RU e NI os dados foram submetidos a análise de variância de 2 fatores para medidas repetidas. Também foi feito o teste *post hoc* de Tukey para múltiplas comparações. A significância estatística foi predefinida em $\alpha = 0,05$. *Resultados:* A adição de nanopartículas de cobre adicionou propriedades antimicrobianas aos adesivos em todas as concentrações ($p < 0,05$), e não influenciou a RT, SO e SB ($p > 0,05$). LC elevadas foram observadas em adesivos com maior concentração de nanopartículas de cobre ($p < 0,05$). A adição de 1% de nanopartículas de cobre diminuiu significativamente o GC-c e GC-i. Após 1 ano, decréscimos significativos de RU e aumentos de NI foram observados no grupo controle ($p < 0,05$). Decréscimos significativos de RU e aumentos de NI não foram

observados nos adesivos contendo cobre ($p > 0,05$). *Conclusão:* A adição de nanopartículas de cobre em concentrações de até 0,5% no sistema adesivo convencional simplificado Ambar pode ser uma alternativa para adicionar atividade antimicrobiana e aumentar a estabilidade a longo prazo das interfaces resina-dentina, sem comprometer as propriedades mecânicas dos adesivos.

Palavras-chave: Dentina; Adesivos Convencionais; Resistência de união; Grau de conversão; Nanoinfiltração; Resistência a tração; Sorção e solubilidade; Liberação de cobre; Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

GUTIÉRREZ MF. **Effect of inclusion of copper nanoparticles in etch and rinse adhesive systems on microbiological and mechanical properties, and the durability of resin–dentine interfaces.** [Thesis – Master of Science in Dentistry – Concentration Area: Integrated Clinic - State University of Ponta Grossa; 2015].

Objectives: This study evaluated the effect of addition of copper nanoparticles at different concentrations into a simplified etch-and-rinse (ER) adhesive system (Ambar [AM]) on antimicrobial activity (AMA), degree of conversion of adhesives discs (DC-d) and dentin-resin interface (DC-i), the ultimate tensile strength (UTS), 28-day cumulative water sorption (WS), solubility (So) and copper release (CR) as well as immediate (IM) and 1-year (1Y) resin–dentine bond strength (μ TBS) and nanoleakage (NL). *Methods:* Seven experimental adhesive systems were formulated according to the addition of copper nanoparticles (0 [control], 0.0075, 0.015, 0.06, 0.1, 0.5 and 1%) in AM adhesive system. We tested the antimicrobial activity of synthesized adhesives against *Streptococcus mutans* using agar diffusion assays. For DC-d, specimens were constructed and tested after 24 h for FTIR and micro-Raman spectroscopy. For UTS, specimens were tested after 24 h and 28 days. For WS and So, after specimens build-up, they were stored in water and the properties measured for 28 days. For CR, specimens were stored in 2% nitric acid solution and the properties were measured for 28 days. The occlusal enamel of thirty-five molars was removed and adhesives were applied to dentine surface after 37% phosphoric acid etching. After composite resin build-ups, specimens were longitudinally sectioned to obtain resin–dentine bonded sticks (0.8 mm²). Specimens were tested in tension at 0.5 mm/min in IM or 1Y (μ TBS). For NL, 2 bonded sticks from each tooth were prepared and analyzed under SEM in IM or 1Y. For DC-i, 2 bonded sticks were prepared and analyzed under micro-Raman spectroscopy. The μ TBS and NL data of each adhesive were subjected to two-way repeated measures ANOVA. For UTS, WS, So, copper release, DC-d and DC-i data of each adhesive were subjected to a one-way ANOVA. Tukey's post hoc test was used for pair-wise comparisons ($\alpha = 0.05$). *Results:* The addition of copper nanoparticles provided antimicrobial properties to the adhesives at all concentrations ($p < 0.05$), and did not influence UTS, WS and SO ($p > 0.05$). Higher CR was observed in adhesives with higher concentration of copper nanoparticles ($p < 0.05$). The addition of 1% of copper nanoparticles decreased the DC-d and DC-i significantly. After 1Y, significant reductions of μ TBS and increases of NL were observed in the control group ($p < 0.05$). Reductions of μ TBS and increase of NL over time were not observed for copper-containing adhesives. *Conclusion:* The addition of copper nanoparticles in concentrations up to 0.5% in the simplified ER Ambar adhesive system may be an alternative to provide antimicrobial properties, increase the long-term stability of resin–dentine interfaces, without reducing adhesives' mechanical properties evaluated.

Keywords: Dentin; Etch-and-rinse; Adhesives; Resin–dentine bond strength; Degree of conversion; Nanoleakage; Ultimate tensile strength; Water sorption and solubility; Copper release; Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Diagrama explicativo das etapas 1 e 2 do trabalho.....	32
Figura 2.	Diagrama explicativo das etapas 3 e 4 do trabalho.....	32
Figura 3.	Confecção de corpos de prova de adesivo (CPA)	34
Figura 4.	Ágar infusão cérebro e coração utilizado no estudo.....	35
Figura 5.	Espectros (FTIR) representativos, obtidos do sistema adesivo Ambar não polimerizado, e após sua fotoativação. As setas indicam os picos de referência (1610 cm^{-1}) e reativo (1640 cm^{-1})	36
Figura 6.	Espectrômetro micro-Raman utilizado neste estudo.....	38
Figura 7.	Espectros (micro-Raman) representativos, obtidos do sistema adesivo Ambar não polimerizado, e após sua fotoativação. As setas indicam os picos de referência (1609 cm^{-1}) e reativo (1639 cm^{-1})	38
Figura 8.	Confecção de corpos de prova de adesivo (CPA), para teste de resistência máxima à tração	39
Figura 9.	Sequência para o teste máxima resistência a tração	40
Figura 10.	Curva analítica de regressão linear de cobre, a partir de soluções padrão na faixa de 0 a 1 ppm	42
Figura 11.	Preparo da superfície de dentina. (A) dente hígido; (B) superfície oclusal planificada e em dentina; (C) desgaste de todas as bordas periféricas de esmalte	45

- Figura 12.** Estratégia adesiva convencional. (A) condicionamento ácido; (B) lavagem e secagem; (C) aplicação do adesivo; (D) secagem para evaporação do solvente; (E) aplicação de segunda camada do adesivo; (F) fotoativação. Todos os procedimentos realizados segundo as indicações do fabricante, os quais estão discriminados na Tabela 1 46
- Figura 13.** Restauração dos dentes após aplicação das variáveis adesivas. (A) Colocação da resina composta; (B) adaptação de cada incremento (3); (C) fotoativação de cada incremento 47
- Figura 14.** Sequência de corte para a obtenção dos palitos. (A) superfície oclusal das coroas de resina compostas pintadas com caneta marcadora permanente de cores diferentes para identificação dos palitos de cada grupo. (B) dente fixado com cera pegajosa ao dispositivo da máquina de corte montada com um disco diamantado; (C) duas sequências perpendiculares de corte, uma no eixo x e outra no eixo y, permitiram a obtenção dos palitos para o teste de resistência de união.....48
- Figura 15.** Sequência para o teste de microtração. (A) mensuração da largura e da espessura do mesmo palito, com paquímetro digital, para o cálculo da área da interface adesiva. (B) cola de cianocrilato em gel (que permite controle da aplicação). (C) aplicação da cola nas extremidades do palito, protegendo a interface (D) adaptação das garras na máquina de ensaios universais após a polimerização da cola.....49
- Figura 16.** Preparação de amostras para NI: (A) palitos imersos em uma solução aquosa de nitrato de prata (pH=7,0); (B) armazenados por 24 h sob total escuridão; (C) após lavagem, imersos em solução reveladora por 8 h sob luz fluorescente; (D) palitos revelados, montados em stubs de alumínio para facilitar o polimento uniforme; (E) palitos dessecados em sílica por 24 h; (F) palitos metalizados para a análise de MEV.....51

Figura 17.	Avaliação de grau de conversão do adesivo na zona da camada híbrida, na interface de união a dentina	53
Figura 18.-	Tamanho de partícula medido através de microscopia de força atômica (AFM).....	54
Figura 19.	Histograma de tamanhos de partícula e sua frequência (%), medido através de Zeta Sizer.....	54
Figura 20.	Tamanho de partícula medido através de microscópio eletrônico de varredura por efeito de campo (FEG).....	55
Figura 21.	Análise composicional das nanopartículas de cobre, obtida por Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS).....	55
Figura 22.	Liberação de cobre (ppm acumulativo) de todas as condições experimentais, após 28 dias de armazenamento em solução aquosa de 2% de ácido nítrico	59
Figura 23.	Imagens (MEV) representativas da interface de união à dentina, obtidas em cada condição experimental, no tempo imediato (IM) e após um ano (1A). RE, resina; CH, camada híbrida; DE, dentina.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sistema adesivo utilizado, composição, modo de aplicação e número de lote	30
Tabela 2.	Modelos matemáticos relacionados aos experimentos de liberação de cobre	43
Tabela 3.	Resultados dos halos de inibição obtidos com os adesivos contendo nanopartículas de cobre contra <i>S. mutans</i>	56
Tabela 4.	Médias e desvios-padrão dos dados do grau de conversão (GC, %), obtidos em cada condição experimental por meio de FTIR e micro-Raman (integrada [i] e altura [a])	57
Tabela 5.	Médias e desvios-padrão dos dados da resistência máxima a tração (RT, Mpa), obtidos em cada condição experimental	57
Tabela 6.	Sorção de água e solubilidade ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) das condições experimentais aos 28 dias de armazenamento em água.....	58
Tabela 7.	Dados de liberação de cobre a partir dos corpos de prova de adesivo, ajustados à equação biexponencial.....	59
Tabela 8.	Liberação de cobre em % e ppm de todas as condições experimentais, após 28 dias de armazenamento em solução aquosa de 2% de ácido nítrico.....	60
Tabela 9.	Médias e desvios-padrão dos dados de resistência de união à dentina (RU, Mpa) no tempo imediato e após um ano.....	61
Tabela 10.	Médias e desvios-padrão dos dados de nanoinfiltração (NI, %) no tempo imediato e após um ano	62

Tabela 11. Médias e desvios-padrão dos dados de grau de conversão (GC, %) no tempo imediato 64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1A	Após 1 ano
A	Fratura adesiva
AAM	Atividade antimicrobiana
A/M	Fratura adesiva/mista
AM	Ambar
C	Fraturas coesivas
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CON ou Con	Estratégia Adesiva Convencional
CPA	Corpo de prova de adesivo
FP	Número de falhas prematuras
FTIR	Espectrofotometria no infravermelho com transformação de Fourier
GC-c	Grau de conversão em corpos de prova
GC-i	Grau de conversão na interface
I	Integral
IM	Imediato
LC	Liberação de Cobre
LED	Diodo emissor de luz, pela frase em inglês <i>Light Emitting Diode</i>
MDP	10 - Metacriloiloxidecil dihidrogênio fosfato
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NI	Nanoinfiltração
Nº ou n	Número
np	Não polimerizado
p	Polimerizado
pH	Potencial hidrogeniônico
RT	Resistência máxima à tração
RU	Resistência de União à microtração
SO	Sorção cumulativa de água
SB	Solubilidade
SiC	Carbeto de silício

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

#	Número
%	Porcentagem
=	Igual
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou menos
≈	Aproximadamente
μm	Micrometro
cm ⁻¹	Centímetro (s) recíproco (s) ou centímetro (s) inverso (s)
s	Segundo (s)
min	Minuto (s)
MPa	Mega Pascal
mm	Milímetro (s)
mm ²	Milímetro (s) quadrado (s)
mm/min	Milímetro (s) por minuto
mW	MiliWatts
mW/cm ²	MiliWatts por centímetro (s) quadrado
°C	Grau (s) Celsius
n	Número de corpos de prova
N	Newton
nm	Nanômetro
X	Número de vezes
rpm	Rotações por minuto
ppm	partes por milhão
h	Hora (s)
α	Nível de significância
p	Valor de probabilidade

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	22
2.	OBJETIVOS	27
2.1.	OBJETIVO GERAL	27
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3.	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE COBRE	28
3.1.1.	Análise Morfológica.....	28
3.1.1.1.	<i>Microscopia de força atômica (AFM)</i>	28
3.1.1.2.	<i>Z-Sizer</i>	28
3.1.1.3.	<i>Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG)</i>	28
3.1.2.	Análise composicional.....	29
3.1.2.1 .	<i>Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)</i>	29
3.2.	SISTEMAS ADESIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
3.3.	EXPERIMENTO 1 (Etapa 1)	32
3.3.1.	Teste de atividade antimicrobiana (AAM)	33
3.3.1.1.	<i>Confecção dos corpos-de-prova</i>	33
3.3.1.2.	<i>Teste de difusão em ágar</i>	34
3.3.2.	Grau de conversão (GC) de corpos-de-prova de adesivo (<i>in vitro</i>).....	35
3.3.2.1.	<i>Espectrometria no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i> .	35
3.3.2.2.	<i>Espectrometria micro-Raman</i>	36
3.4.	EXPERIMENTO 2 (Etapa 2)	39
3.4.1.	Teste de resistência máxima à tração (RT)	39
3.4.2.	Sorção de água (SO) e solubilidade (SB)	40
3.4.3.	Comportamento de liberação do cobre a partir de corpos de prova de adesivos	

3.5. EXPERIMENTO 3 (Etapa 3 e 4)	45
3.5.1. Preparação dos dentes e procedimentos adesivos	45
3.5.2. Teste de resistência de união à dentina por microtração (RU)	48
3.5.3. Avaliação da Nanoinfiltração (NI) por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)	50
3.5.4. Grau de conversão (GC) de adesivo na interface de união à dentina	52
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
4. RESULTADOS	54
4.1. Testes morfológicos e composicionais	54
4.1. Atividade antimicrobiana (AAM).....	56
4.2. Grau de conversão (GC) dos corpos de prova de adesivo (<i>in vitro</i>)	56
4.3. Resistência máxima à tração (RT).....	57
4.4. Sorção de água (SO) e solubilidade (SB)	58
4.5. Comportamento de liberação do cobre a partir dos corpos de prova de adesivo 58	
4.6. Teste de resistência de união à microtração (RU), nanoinfiltração (NI) e grau de conversão (GC) do adesivo na interface de união a dentina	60
4.6.1. Resistência de união à microtração (RU)	60
4.6.2. Nanoinfiltração (NI) na interface de união à dentina	61
4.6.3. Grau de conversão (GC) do adesivo na interface de união à dentina	64
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO A – Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (COEP / UEPG)	77

1. INTRODUÇÃO

Durante décadas, diversos materiais têm sido usados em restaurações diretas em dentes posteriores, tais como amálgama e resina composta. Nos últimos anos, devido à uma crescente demanda por restaurações estéticas, resinas compostas ganharam um papel proeminente, tornando-se o material restaurador mais amplamente utilizado, representando 65% das restaurações colocadas atualmente nos Estados Unidos (Christensen ¹ 2010; Lynch et al. ² 2014; Rasines Alcaraz et al. ³ 2014; Moraschini et al. ⁴ 2015). Sua alta resistência ao desgaste, a estética natural e a facilidade de colocação torna a resina composta desejável para ambos, pacientes e clínicos, e seu baixo custo e maior preservação da estrutura dental remanescente sadia, são vantagens quando comparado com as restaurações indiretas (Brunthaler et al. ⁵ 2003; da Rosa Rodolpho et al. ⁶ 2006; Da Rosa Rodolpho et al. ⁷ 2011; Opdam et al. ⁸ 2014).

Apesar do aumento no seu uso e o significativo desenvolvimento científico, a preocupação mais importante a respeito de restaurações adesivas diretas atualmente, é a sua limitada durabilidade *in vivo* (Peumans et al. ⁹ 2005; Heintze et al. ¹⁰ 2010), o que resulta em um grande gasto com assistência odontológica destinada à troca deste tipo de restaurações, superando os 5 bilhões de dólares anualmente nos Estados Unidos (Jokstad et al. ¹¹ 2001; Spencer et al. ¹² 2010).

Dentistas ainda gastam uma quantidade significativa de tempo substituindo restaurações, contribuindo para o ciclo repetitivo restaurador descrito por Elderton há mais de 3 décadas (Elderton ¹³ 1988). Fatores relacionados ao paciente, operador, dente, tamanho da cavidade e materiais têm sido relatados na literatura como potencialmente relevantes para falhas de restaurações (da Rosa Rodolpho et al. ⁶ 2006; Da Rosa Rodolpho et al. ⁷ 2011; Opdam et al. ⁸ 2014; Bernardo et al. ¹⁴ 2007; Opdam et al. ¹⁵ 2010), embora evidências sobre esses fatores ainda sejam limitadas.

A longevidade de restaurações pode ser afetada, em especial, pelo acúmulo de biofilme e placa *in vivo*, em comparação com outros materiais restauradores (Beyth et al. ¹⁶ 2007). A produção de ácido a partir do biofilme pode levar à cáries adjacentes nas margem das restaurações. Essa reincidência é a principal razão para o fracasso da restauração e é uma das maiores causas de sua substituição, estimada atualmente entre 50-70% de todas as restaurações realizadas (Jokstad et al. ¹¹ 2001; Deligeorgi

et al.¹⁷ 2001; Featherstone¹⁸ 2004; Sakaguchi¹⁹ 2005; ten Cate²⁰ 2006; Demarco et al.²¹ 2012).

Essa falha pode estar relacionada à falta de selamento da interface dente/restauração, o que resulta na diminuição de resistência desta interface aos agentes internos - enzimas proteolíticas - e externos - fluidos e microrganismos (Spencer et al.¹² 2010; Perdigão et al.²² 2013; Tjäderhane et al.²³ 2013). Esta interface adesiva dente/restauração é produzida pela interação de um sistema adesivo sobre os tecidos dentários duros, após a substituição de minerais removidos desses tecidos por monômeros resinosos, formando um polímero interligado micro-mecanicamente com os substratos dentais (Nakabayashi et al.²⁴ 1982).

Por outro lado, a biodegradação das interfaces adesivas tem sido o foco de estudos recentes e esse processo ainda não está completamente elucidado (Liu et al.²⁵ 2011). No entanto, sabe-se que a biodegradação inicia-se com a extração dos monômeros resinosos que se infiltraram na matriz de dentina, através de espaços vazios nanométricos cheios de água, seguido pelo ataque enzimático das fibrilas de colágeno expostas (Spencer et al.¹² 2010; Sano²⁶ 2006; Reis et al.²⁷ 2013).

Cerca de 50% em volume de dentina é composto de minerais, sendo o restante colágeno do tipo I e proteínas não-colagenosas (30% em vol.) e água (20% em vol.) (Tjäderhane et al.²⁸ 2012). Durante a adesão de restaurações de resina composta, o componente mineral da superfície e subsuperfície da dentina é removida, ou totalmente pelo condicionamento ácido prévio nos adesivos convencionais (CON) (*etch-and-rinse*, no idioma Inglês), ou parcialmente com *primers* ácidos em adesivos autocondicionantes (AC) (*self-etch*, em inglês). A matriz de colágeno exposto em seguida, é infiltrada com monômeros resinosos adesivos. Na realidade, os monômeros adesivos não são capazes de encapsular completamente a matriz de colágeno, deixando fibras de colágeno expostas totalmente ou parcialmente, na parte inferior da camada híbrida, sem a proteção de resina polimerizada (Spencer et al.¹² 2010; Spencer e Swafford²⁹ 1999; Wang e Spencer³⁰ 2002; Wang e Spencer³¹ 2003). A falta de proteção de monômeros resinosos e da presença de água deixa as fibras de colágeno desmineralizadas vulneráveis à degradação hidrolítica dependente do tempo. A degradação das fibras de colágeno e componentes hidrofílicos do adesivo leva à destruição da camada híbrida e a perda de força de união à dentina ao longo do tempo (Reis et al.²⁷ 2013).

Pashley e cols. foram os primeiros a demonstrar o papel de enzimas derivadas do hospedeiro sobre a degradação das fibrilas colágenas por meio de análise da atividade colagenolítica exercida por metaloproteinases (MMPs) da dentina (Pashley et al.³² 2004). Essas MMPs já haviam sido investigadas previamente e comprovada sua presença e expressão no complexo dentina-polpa (Tjäderhane et al.³³ 1998; Sulkala et al.³⁴ 2001; Sulkala et al.³⁵ 2002).

Alguns autores, recentemente, estudaram em detalhe a presença, o papel e a função das enzimas metaloproteinases (MMPs) que degradam a matriz de colágeno, e catepsinas cisteína (CTs) em dentina (Tjäderhane et al.³⁶ 2013; Vidal et al.³⁷ 2014). O aumento do conhecimento sobre a função dessas enzimas na degradação da camada híbrida levou a extensa atividade de pesquisa com o objetivo de evitar a atividade preteolítica/colagenolítica na interface de união à dentina. Essa avaliação incide sobre as diferentes estratégias que têm sido desenvolvidas para controlar e prevenir a perda do colágeno da camada híbrida e força adesiva, relacionada com enzimas hidrolíticas.

As MMPs constituem uma família de endopeptidases zinco- e cálcio-dependentes, que são capazes de degradar os componentes da matriz extracelular (Verma e Hansch³⁸ 2007; Visse e Nagase³⁹ 2003), e que regulam os mecanismos fisiológicos e patológicos dos tecidos à base de colágeno na sua forma natural ou desnaturada (Carrilho et al.⁴⁰ 2009; Collares et al.⁴¹ 2013). Formas latentes de MMPs são liberadas, a partir da dentina, após a dissolução de compostos inorgânicos, como resultado do pH ácido local. No entanto, o mecanismo exato de ativação das MMPs em meio ácido necessita ainda ser melhor elucidado (Perdigao et al.²² 2013). De um modo semelhante, como observado durante o processo da doença cárie, as MMPs podem também ser liberadas a partir da matriz de dentina, durante o passo de condicionamento ácido (Mazzoni et al.⁴² 2006) ou com uso de *primers* acídicos (Nishitani et al.⁴³ 2006), nos protocolos adesivos. As fibras colágenas expostas sem proteção mineral tornam-se susceptíveis à degradação enzimática, que pode ser mediada por MMPs da dentina que são expostas e ativadas durante o ataque ácido (Pashley et al.³² 2004).

Para tentar resolver esses problemas (lesões de cárie adjacente à margem da restauração e degradação da camada híbrida), têm sido incorporados antimicrobianos e inibidores de MMPs e CTs, ao protocolo adesivo ou incorporados aos sistemas adesivos (Perdigao et al.²² 2013). A clorexidina (CHX) é um agente antimicrobiano

muito utilizado, que tem um amplo espectro de atividade contra as bactérias orais (Mohammadi e Abbott ⁴⁴ 2009) e grande substantividade (Carrilho et al. ⁴⁵ 2010). Além disso, tem sido recentemente estudada como o mais importante inibidor de proteases (Pashley et al. ³² 2004) e CTs (Scaffa et al. ⁴⁶ 2012) ajudando na preservação da camada híbrida. Por outro lado, epigallocatequina -3-galato (Du et al. ⁴⁷ 2012; Yun et al. ⁴⁸ 2004), galardina (Breschi et al. ⁴⁹ 2010), tetraciclina (Stanislawczuk et al. ⁵⁰ 2011), sais de quaternário de amônio, como o brometo de 12-metacriloxidodecilpiridínio (MDPB) (Donmez et al. ⁵¹ 2005; Tezvergil-Mutluay et al. ⁵² 2011) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Jacques e Hebling ⁵³ 2005; Sauro et al. ⁵⁴ 2009) também têm mostrado efeitos antimicrobianos e/ou inibidores das MMPs e CTs, preservando a camada híbrida.

Alguns autores (Melo et al. ⁵⁵ 2013; Zhang et al. ⁵⁶ 2012) recentemente estudaram a incorporação de quaternário de amônio dimetacrilato (QADM) e nanopartículas de prata (NAg) em *primers* e incluídos em adesivos dentinários, mostrando capacidade antimicrobiana, provocando uma diminuição na viabilidade do biofilme, sem interferir na resistência da adesão.

As propriedades antimicrobianas das nanopartículas de prata são bem estabelecidas (Kim et al. ⁵⁷ 2007; Rai et al. ⁵⁸ 2009; Soni e Salopek-Soni ⁵⁹ 2004) e os mecanismos de ação bactericida foram propostos. Contudo, as propriedades antimicrobianas das nanopartículas de cobre têm sido pouco estudadas, embora tenham um potencial como agente bactericida na Odontologia (Ingle et al. ⁶⁰ 2014; Ruparelia et al. ⁶¹ 2008; Thneibat et al. ⁶² 2008; Usman et al. ⁶³ 2013; Argueta-Figueroa et al. ⁶⁴ 2015; Sabatini et al. ⁶⁵ 2015).

Yoon et al. relataram os efeitos antibacterianos de nanopartículas de prata e cobre usando cepas de *E. coli* e *Bacillus subtilis*, onde as nanopartículas de cobre demonstraram atividade antibacteriana superior em comparação com as nanopartículas de prata (Yoon et al. ⁶⁶ 2007). Além da atividade antimicrobiana superior, o cobre é mais barato, e mais disponível em relação à prata, portanto, a síntese de nanopartículas de cobre tem um melhor custo-benefício. Uma vantagem adicional de nanopartículas de cobre é que elas oxidam e formam nanopartículas de óxido de cobre, podendo facilmente misturar-se com polímeros ou macromoléculas e sendo relativamente estáveis em termos de propriedades químicas e físicas (Usman et al. ⁶⁷ 2012).

Baseado no exposto, a concentração ideal de cobre que pode ser adicionada a um adesivo para expressar atividade antimicrobiana e produzir interfaces de união à dentina estáveis, sem comprometer outras propriedades mecânicas, deve ser investigada. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de cobre em um sistema adesivo convencional simplificado, em diferentes concentrações, sobre a atividade antimicrobiana (AAM), grau de conversão de corpos-de-prova de adesivos (GC-c) e na interface de união à dentina (GC-i), resistência máxima à tração (RT), sorção cumulativa de água (SO), solubilidade (SB) e liberação de cobre (LC) durante 28 dias, bem como sobre a resistência de união (RU) e nanoinfiltração (NI) na interface de união à dentina, nos tempos imediatos (IM) e após 1 ano (1A).

As seguintes hipóteses nulas foram testadas: (1) as diferentes concentrações de cobre não irão resultar em diferenças nas propriedades mecânicas do adesivo; (2) as diferentes concentrações de cobre não irão resultar em diferenças na resistência de união e nanoinfiltração, nos tempos imediatos (IM) e após 1 ano (1A).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de cobre em diferentes concentrações, em um sistema adesivo convencional simplificado, nas propriedades microbiológicas, mecânicas e adesivas à dentina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de cobre (0%; 0,0075%; 0,015%; 0,060%; 0,1%; 0,5% e 1%) em um sistema adesivo convencional simplificado (Ambar-FGM) na atividade antimicrobiana.

2.2.2. Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de cobre (0%; 0,0075%; 0,015%; 0,060%; 0,1%; 0,5% e 1%) em um sistema adesivo convencional simplificado (Ambar-FGM) na resistência máxima à tração, sorção, solubilidade e a liberação de cobre ao longo do tempo.

2.2.3. Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de cobre (0%; 0,0075%; 0,015%; 0,060%; 0,1%; 0,5% e 1%) em um sistema adesivo convencional simplificado (Ambar-FGM) nas propriedades adesivas (grau de conversão, resistência de união, nanoinfiltração) no tempo imediato.

2.2.4. Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de cobre (0%; 0,0075%; 0,015%; 0,060%; 0,1%; 0,5% e 1%) em um sistema adesivo convencional simplificado (Ambar-FGM) nas propriedades adesivas (resistência de união, nanoinfiltração) ao longo do tempo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, com parecer sob número 1.065.446 (Anexo A).

3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE COBRE

As nanopartículas de cobre (99.9% puro, 40-60 nm, SkySpring Nanomaterials, Inc., Houston, TX, EUA) foram caracterizadas morfolologicamente (microscopia de força atômica [AFM], potencial Z, microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo [FEG]) e quimicamente (espectroscopia de energia dispersiva de raios X [EDS]).

3.1.1. Análise Morfológica

3.1.1.1. Microscopia de força atômica (AFM)

O tamanho das nanopartículas de cobre foi analisado em um microscópio de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) da marca Shimadzu (SPM-9600: Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). As imagens foram obtidas no modo contato intermitente, empregando-se um cantiléver com constante elástica de aproximadamente 0,06 N/m (valor nominal) e uma ponta com raio de aproximadamente 12 nm (modelo SNL-10). A taxa de varredura foi de 1 Hz.

3.1.1.2. Z-Sizer

O tamanho das nanopartículas de cobre foi analisado pelo Zetasizer (Nano-Zs90 Nanoseries; Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido), usando espalhamento dinâmico de luz com um ângulo de 90°, medindo a difusão das partículas movendo-se por movimento Browniano, e convertendo o tamanho e a distribuição de tamanhos utilizando à relação de Stokes Einstein.

3.1.1.3. Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG)

O tamanho das nanopartículas de cobre foi analisado em um microscópio eletrônico de varredura por efeito de campo (FEG) (MIRA3 LM; Tescan, Warrendale, PA, EUA). Foi utilizado uma tensão de aceleração de elétrons de 10 kV e ampliação das imagens em 40 e 60 kx. A partir das fotomicrografias obtidas pelo FEG, foi

possível determinar o tamanho médio das partículas pelo programa de computador Mira^{TC} do FEG.

3.1.2. Análise composicional

3.1.2.1. Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)

A análise por EDS foi realizada para determinar a pureza das nanopartículas de cobre, medindo a porcentagem de cobre das nanopartículas em pó, e para determinar se existe mistura com outros elementos. Para efetuar a análise composicional foi utilizado FEG acoplado com EDS.

3.2. SISTEMAS ADESIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram formulados adesivos experimentais utilizando o sistema adesivo convencional simplificado Ambar [AM] (FGM Prod. Odont., Ltda, Joinville, SC, Brasil), com solvente à base de água e etanol. Esse adesivo é convencional simplificado, ou seja, preconiza a técnica de condicionamento ácido previamente à aplicação do adesivo e se apresenta em um único frasco. A Tabela 1 mostra a sua composição detalhada, modo de aplicação e número de lote.

Tabela 1. Sistema adesivo utilizado, composição, modo de aplicação e numero de lote

Adesivo	Composição	Modo de aplicação	Número de lote
Ambar (AM – FGM Prod. Odontológicos, Joinville, SC, Brasil)	Monômeros metacrilatos (UDMA e MDP), fotoiniciadores, co-iniciadores, estabilizadores, nanopartículas de sílica inerte e etanol	1. Aplicar ácido fosfórico na dentina por 15 s. 2. Lavar por 15 s. Secar com papel absorvente. Manter a dentina úmida 3. Aplicar vigorosamente duas camadas de adesivo por 20 s (10 s por cada camada) 4. Aplicar suavemente jato de ar por 10 s para evaporar o solvente 5. Polimerizar por 10 s	260714 260813

UDMA = Urethanedimethacrylate; **MDP** = methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate. **Fonte:** O autor.

O sistema adesivo selecionado sofreu acréscimo em sua fórmula original de nanopartículas de cobre (99.9% puro, 40-60 nm, SkySpring Nanomaterials, Inc., Houston, TX, EUA) em diferentes concentrações (% em peso): 0 % (controle, material comercial), 0,0075%, 0,015%, 0,06%, 0,1%, 0,5% e 1%. Inicialmente, um estudo piloto foi realizado utilizando as concentrações de 0,0075, 0,015 e 0,060%. As nanopartículas de cobre foram adicionadas ao adesivo por agitação em um misturador Speedmix (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA). O estudo foi dividido em quatro etapas descritas a seguir:

- (i) avaliação do potencial microbiológico e grau de conversão de corpos de prova de adesivo (Diagrama 1).
- (ii) avaliação de resistência máxima à tração, sorção e solubilidade, liberação de cobre em corpos de prova de adesivo, imediata e após 28 dias (Diagrama 1).
- (iii) avaliação imediata das propriedades adesivas, resistência de união, nanoinfiltração e grau de conversão (Diagrama 2).
- (iv) avaliação ao longo do tempo (1 ano) da resistência de união e nanoinfiltração (Diagrama 2).

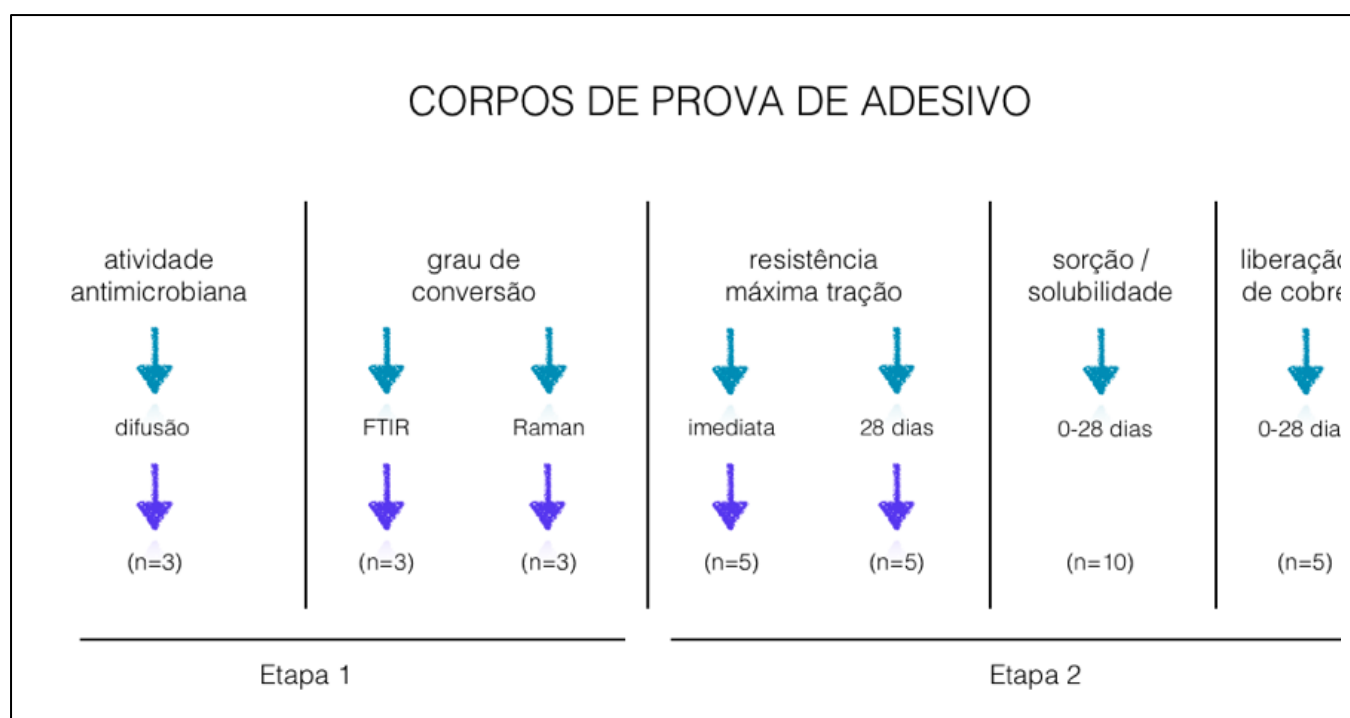


Figura 1. Diagrama explicativo das etapas 1 e 2 do trabalho. **Fonte:** O Autor.

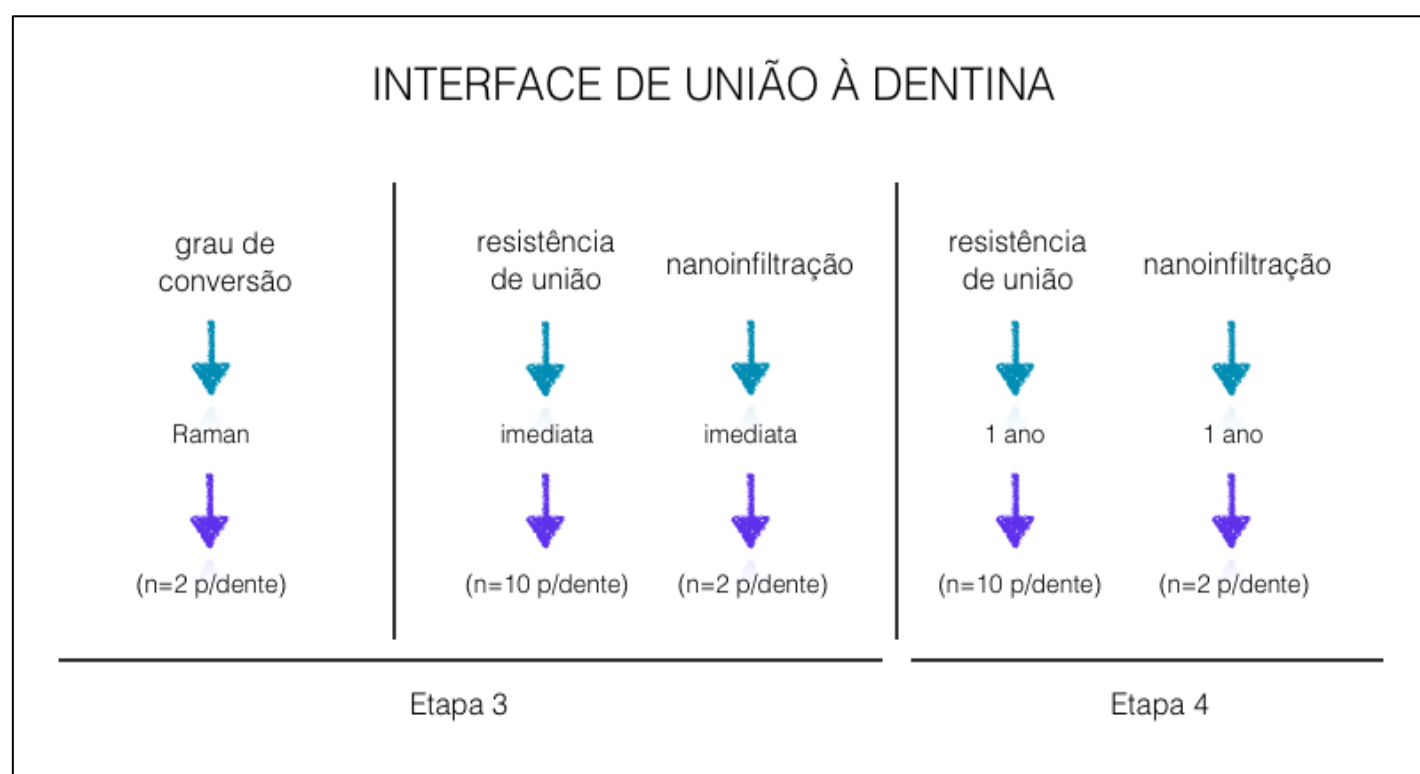


Figura 2. Diagrama explicativo das etapas 3 e 4 do trabalho. **Fonte:** O autor.

3.3. EXPERIMENTO 1 (Etapa 1)

3.3.1. Teste de atividade antimicrobiana (AAM)

Nesta etapa foi testada a atividade antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), de corpos de prova feitos com os adesivos experimentais contendo as diferentes concentrações de cobre (Bottino et al. ⁶⁸ 2013; Feitosa et al. ⁶⁹ 2014).

3.3.1.1. Confecção dos corpos-de-prova

Três corpos de prova de adesivo (CPA) de cada condição experimental (n=3) foram produzidos em uma matriz metálica cilíndrica (5,0 mm de diâmetro e 1,0 mm de espessura; Odeme Prod Odont Ltda, Joaçaba, SC, Brasil). Aplicou-se vaselina na base da matriz, em seguida, uma matriz de poliéster foi colocada em contato com a base da matriz. Depois de isolar a matriz com vaselina, os adesivos experimentais foram gotejados dentro da matriz até o completo preenchimento. Todas as bolhas de ar visíveis dos adesivos foram cuidadosamente retiradas com auxílio de um microaplicador (Microbrush® FGM, Prod. Odont. Ltda, Joinville, SC, Brasil). Em seguida, eles foram submetidos à evaporação do solvente com jato de ar livre de água por 40 s a uma distância de 10 cm.

Uma matriz de vidro foi colocada sobre o adesivo e a superfície foi fotoativada com um aparelho fotopolimerizador a base de LED por 60 s com uma intensidade de 1200 mW/cm² (Radii-cal, SDI, Bayswater, Victoria, Austrália). A densidade de energia adotado (4,8 J/cm²) permitiu a remoção dos espécimes da matriz sem sofrer deformação permanente. Os CPA foram removidos cuidadosamente da matriz com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo também removidas todas as rebarbas de adesivo (Figura 3). Todos os materiais utilizados para a confecção dos CPA foram esterilizados, para evitar contaminação. Os CPA foram armazenados a 37°C por 24 h, e desinfetados por meio de exposição à luz ultravioleta (30 min/lado).

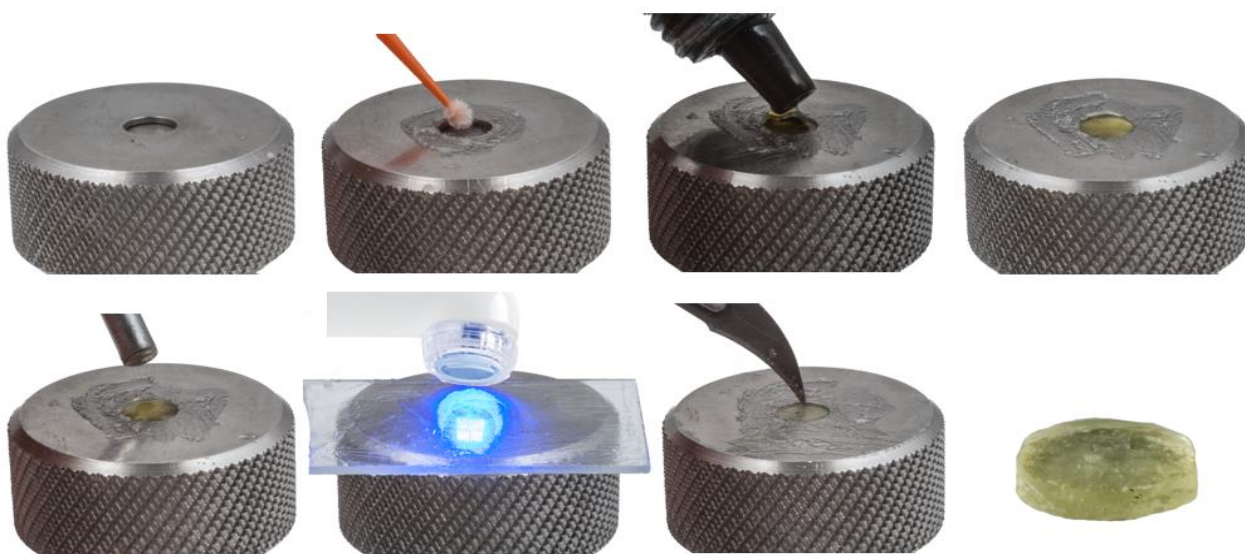


Figura 3. Confeção de corpos de prova de adesivo (CPA). **Fonte:** O autor.

3.3.1.2. Teste de difusão em ágar

Os três CPA por cada condição experimental ($n = 3$) foram testados contra culturas de *S. mutans* semeadas em ágar BHI (Agar infusão cérebro e coração, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil)(Figura 4). *S. mutans* foi cultivado aerobicamente em caldo de soja trípico (Disco Laboratories, Detroit, MI, EUA) durante 24 h em 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, 100 µL da suspensão bacteriana foi semeada sobre BHI para criar o cultivo (Gregson et al. ⁷⁰ 2012; Huang et al. ⁷¹ 2012) e os CPA foram colocados. O diâmetro da zona de inibição de crescimento em torno de cada CPA foi determinada em milímetros, com um paquímetro digital (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Kanagawa, Tóquio, Japão), após 96 h de incubação em condições microaerofílicas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Os testes foram realizados em triplicata.



Figura 4. Ágar infusão cérebro e coração utilizado no estudo. **Fonte:** O autor.

3.3.2. Grau de conversão (GC) de corpos-de-prova de adesivo (*in vitro*)

3.3.2.1. Espectrometria no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Uma gota (10 μL) da solução de adesivo de cada uma das concentrações estudadas foram colocados individualmente entre tiras de acetato de 8 mm x 8 mm para obter uma película fina de aproximadamente 8 mm de diâmetro. Antes de cobrir as gotas de adesivo com as tiras de acetato, foi aplicado sobre elas um jato de ar (10 s) para permitir a evaporação do solvente.

Um espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR; IRPrestige-21, Shimadzu, Tóquio, Japão) do material não polimerizado foi registrado e, em seguida as amostras foram fotoativadas durante 10 s a $1200 \text{ W} / \text{cm}^2$ (Radii-cal, SDI, Bayswater, Victoria, Austrália). Cada amostra foi cuidadosamente removida com uma lâmina de bisturi fina e armazenada durante 24 h em ambiente escuro e seco, até que a análise FTIR do GC foi realizada. O espectro foi obtido com 32 varreduras a 1 cm^{-1} de resolução por o método de transmissão. A percentagem de ligações carbônicas duplas que não reagiram (% C = C) foi determinada a partir da razão das intensidades de absorbância de C = C alifática (altura do pico, a 1640 cm^{-1}) contra o padrão interno, antes e depois da polimerização do espécime. A absorbância da ligação aromática

carbono-carbono (altura do pico a 1610 cm^{-1}) foi usada como um padrão interno. O GC foi determinado subtraindo a % de $\text{C}=\text{C}$ de 100%. Três amostras foram testadas para cada grupo.

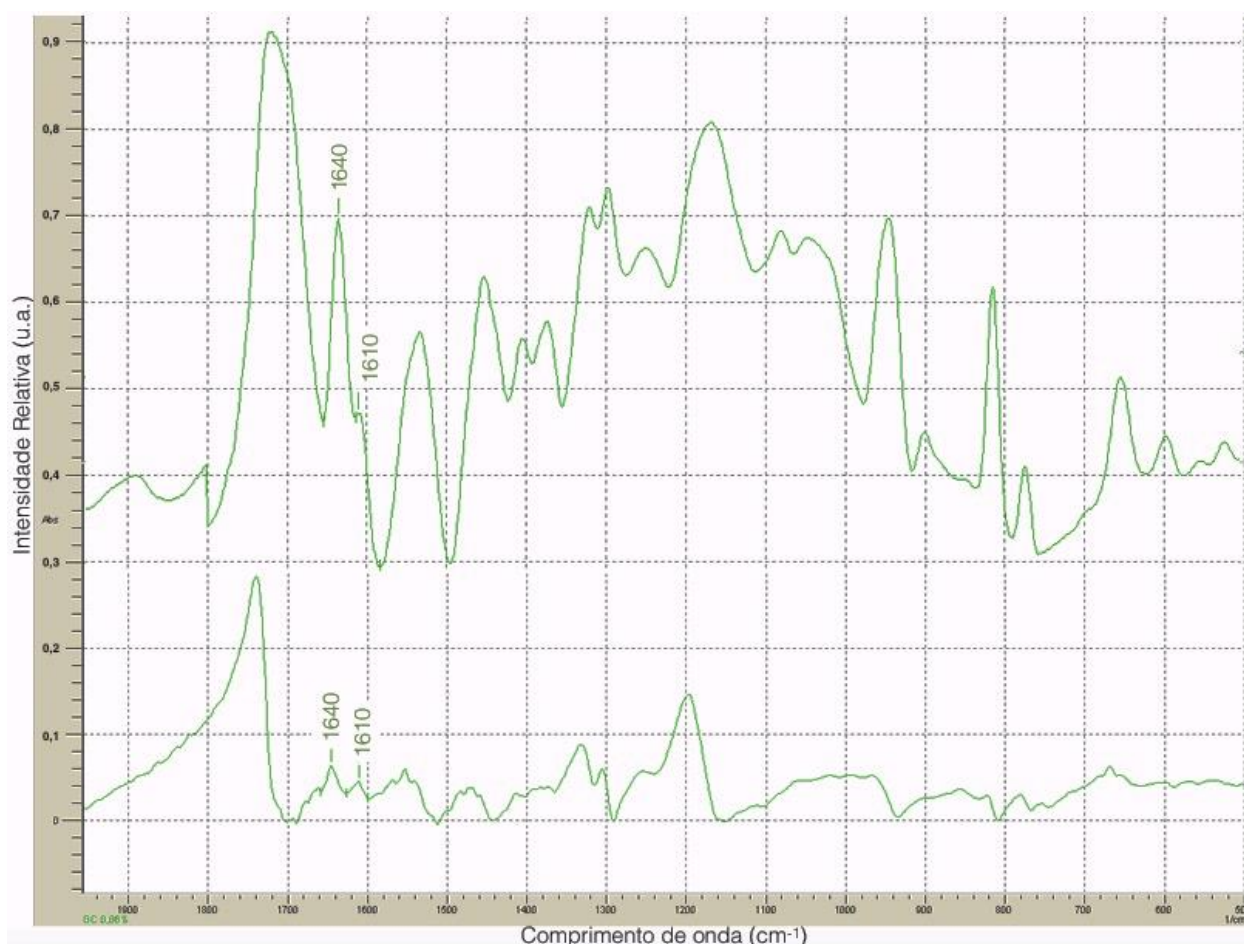


Figura 5. Espectros (FTIR) representativos, obtidos do sistema adesivo Ambar não polimerizado, e após sua fotoativação. As setas indicam os picos de referência (1610 cm^{-1}) e reativo (1640 cm^{-1}). **Fonte:** O autor

3.3.2.2. Espectrometria micro-Raman

Três CPA ($n=3$) de cada condição experimental foram produzidos (como descrito para a atividade microbiológica) para análise do grau de conversão, medido por meio de espectrometria de micro-Raman (Senterra equipment, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha). Antes das análises, o equipamento foi calibrado para redefinir o zero utilizando padrões de silício com

valores de coeficientes conhecidos. As análises foram realizadas sob os seguintes parâmetros: laser de Neônio com 532 nm de comprimento de onda a 5 mW de potência; resolução espacial de $\approx 3 \mu\text{m}$; resolução espectral de $\approx 5 \text{ cm}^{-1}$, com 10 s de tempo de acumulação e 5 coadições, em magnificação de 20X para um laser de $\approx 1 \mu\text{m}$ de diâmetro. A análise iniciou obtendo-se os espectros com os picos de referência dos adesivos não polimerizados (np). Para isso, cada sistema adesivo não polimerizado (np) foi dispensado em uma placa de vidro, a qual foi levada ao espectrofotômetro para leitura conforme os parâmetros já descritos.

A leitura dos adesivos polimerizados (p) foi realizada diretamente nos corpos de prova. Considerando as ligações duplas dos carbonos alifáticos (1639 cm^{-1} , pico reativo, no qual são detectadas as mudanças) e aromáticos (1609 cm^{-1} , pico referência, estável sem mudanças). Para ambas as análises (np e p) foram determinados os valores da integrada (i) e a altura (a) dos picos registrados utilizando o software do equipamento Opus Spectroscopy 6.5 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha).

Assim, o GC das ligações duplas do monômero convertido em polímero foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: (Stanislawczuk et al. ⁷² 2014)

$$GC \% = \left[1 - \frac{I_{\text{Reativo}}(p)_{1639} / I_{\text{Referência}}(p)_{1609}}{I_{\text{Reativo}}(np)_{1639} / I_{\text{Referência}}(np)_{1609}} \right] \times 100$$

As análises espectrais foram obtidas de três sítios aleatoriamente selecionados em cada CPA. A partir disso, foi possível a obtenção das médias de cada CPA, as quais foram utilizadas na análise estatística ($n = 3$). As leituras iniciais (np) também foram realizadas em triplicata.



Figura 6. Espectrômetro micro-Raman utilizado neste estudo. **Fonte:** Hass, 2015.

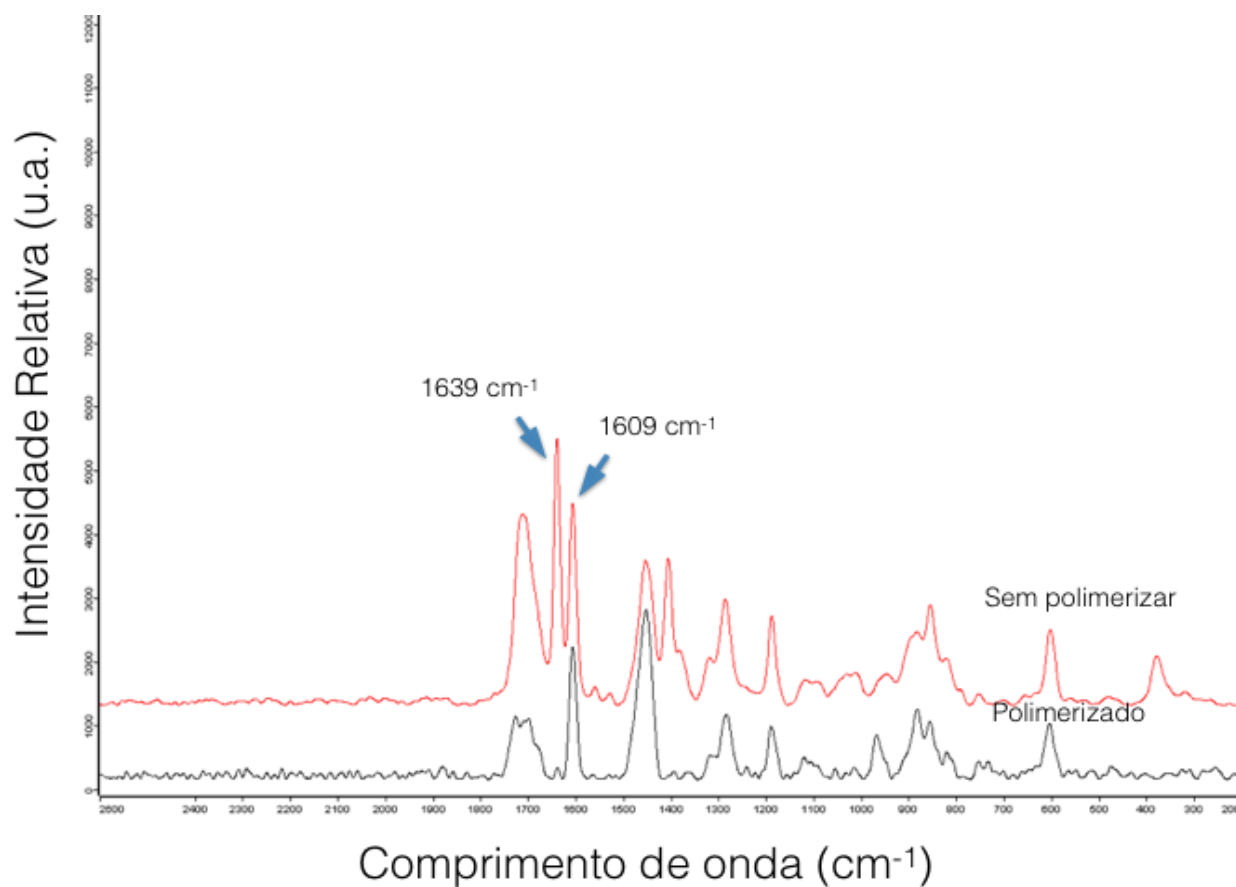


Figura 7. Espectros (micro-Raman) representativos, obtidos do sistema adesivo Ambar não polimerizado, e após sua fotoativação. As setas indicam os picos de referência (1609 cm^{-1}) e reativo (1639 cm^{-1}). **Fonte:** O autor.

3.4. EXPERIMENTO 2 (Etapa 2)

3.4.1. Teste de resistência máxima à tração (RT)

Dez CPA (n=10) de cada condição experimental foram produzidos em uma matriz metálica no formato de ampulheta (10 mm de comprimento, 2 mm de largura, e 1 mm de profundidade; Odeme Prod Odont Ltda, Joaçaba, SC, Brasil). Aplicou-se vaselina na base da matriz, em seguida, uma matriz de poliéster foi colocada em contato com a base da matriz. Depois de isolar a matriz com vaselina, os adesivos experimentais foram gotejados dentro da matriz até o completo preenchimento. Todas as bolhas de ar visíveis dos adesivos foram cuidadosamente retiradas com auxílio de um microaplicador (Microbrush® FGM, Prod. Odont. Ltda, Joinvile, SC, Brasil). Em seguida, eles foram submetidos à evaporação do solvente com jato de ar livre de água por 40 s a uma distância de 10 cm.

Uma matriz de vidro foi colocada sobre o adesivo e a superfície foi fotoativada com um aparelho fotopolimerizador a base de LED por 60 s com uma intensidade de 1200 mW/cm^2 (Radii-cal, SDI, Bayswater, Victoria, Austrália). A densidade de energia adotado ($4,8 \text{ J/cm}^2$) permitiu a remoção dos espécimes da matriz sem sofrer deformação permanente. Os CPA foram removidos cuidadosamente da matriz com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo também removidas todas as rebarbas de adesivo (Figura 8).



Figura 8. Confecção de corpos de prova de adesivo (CPA), para teste de resistência máxima à tração
Fonte: O autor.

Metade dos espécimes (n=5) foi testada imediatamente [IM] após o preparo e a outra metade (n=5) depois de ser armazenados em água por 28 dias [28d] a 37°C. Os espécimes foram fixados individualmente em garras de Geraldeli aplicando em cada um dos extremos do CPA cola de cianoacrilato gel (Loctite Superbonder Power Easy Gel, Henckel, São Paulo, São Paulo, Brasil). Após o tempo de polimerização da cola, as garras com os CPA foram acopladas na máquina de ensaios universal (Instron 3343; Instron Norwood, Mass, EUA) e estes foram testados por tração a uma velocidade de 0,5 mm/min com célula de carga de 100 N até rompimento da interface (Stanislawczuk et al. ⁷³ 2014) (Figura 9).



Figura 9. Sequência para o teste de máxima resistência a tração. **Fonte:** O autor.

3.4.2. Sorção de água (SO) e solubilidade (SB)

Dez discos de adesivo de cada condição experimental (n=10) foram produzidos (como descrito para a atividade microbiológica).

A especificação ISO 4049 foi empregada na determinação da SO e SB (⁷⁴ ; Ito et al. ⁷⁵ 2005; Malacarne et al. ⁷⁶ 2006; Reis et al. ⁷⁷ 2007). Imediatamente após a polimerização, os espécimes foram colocados em dessecadores, os quais foram transferidos para uma estufa pré-condicionada a 37°C, e deixados em repouso por 5

dias. Depois disso, foram pesados em intervalos de 24 h até que a variação de massa entre dois dias consecutivos fosse menor que 0,2 mg. Um paquímetro digital foi usado para medir a espessura e o diâmetro dos espécimes, com precisão de 0,01 mm, para calcular o volume (V) de cada amostra (em mm³).

Em seguida, cada espécime foi colocado num eppendorf selado contendo 10 mL de água destilada (pH 7,2) a 37°C. Após intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 28 dias de tempo de armazenamento, cada espécime foi removido da estufa e deixado à temperatura ambiente durante 30 min. Em seguida, as peças foram lavadas em água corrente, limpas delicadamente com um papel macio e absorvente, e pesadas em uma balança analítica (*m*₂), retornando para os frascos com 10 mL de água fresca.

Após o tempo de armazenamento de 28 dias, as amostras foram secas em dessecadores contendo sílica gel a 37°C, as quais permaneceram em repouso durante 10 dias ou até que as variações de massa fossem inferiores a 0,2 mg, obtendo-se uma massa constante (*m*₃). Em seguida, foi medido cada resultado de massa contra a massa pré-eppendorf (*m*₁) para o cálculo da variação da massa depois de cada intervalo de tempo fixo, durante os 28 dias de armazenamento em água. Foram relacionadas as mudanças na massa contra o tempo de armazenamento para obter a cinética de SO durante todo o período de armazenamento em água. A SO e a SB ao longo dos 28 dias de armazenamento de água foram calculados utilizando as seguintes fórmulas : $SO = (m_2 - m_3) / V$ e $SB = (m_1 - m_3) / V$ (Stanislawczuk et al. ⁷³ 2014).

3.4.3. Comportamento de liberação do cobre a partir de corpos de prova de adesivos

Foi utilizada uma série de soluções padrão contendo 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1 ppm (mg·L⁻¹) de cobre para se obter uma curva com uma regressão linear entre os valores de absorção e concentrações de cobre, usando espectrometria de absorção atômica de chama (AA240FS Fast Sequential Atomic Absorption Spectrometer; Varian Inc., Lake Forest CA, EUA). Confirmou-se a absorbância máxima de cobre em 324,8 nm (Figura 10).

Foram produzidos quatro novos CPA de cada material, armazenados

individualmente em 10 mL de uma solução pré-misturada de água ultra pura e de ácido nítrico, em concentração de 2% (V/V) de HNO₃. Em intervalos de tempo apropriados (1, 3 e 12 h e 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias), utilizou-se 1 mL dessas soluções de armazenamento, ao qual foram adicionados 100 µL de ácido nítrico, e em seguida, foi completado até um volume final de 5 mL com água ultra pura. Foram obtidos os valores de absorção dessas soluções em 324,8 nm, os quais foram convertidos para quantidade de cobre (software SpectrAA CFR; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), considerando a curva analítica de regressão linear. Uma quantidade igual de solução de HNO₃ a 2% foi adicionada nas soluções de armazenamento para substituir o volume removido. Depois de cada adição da solução de HNO₃ a 2%, foi feita uma correção matemática (Correção de Bolton) para compensar a diluição.

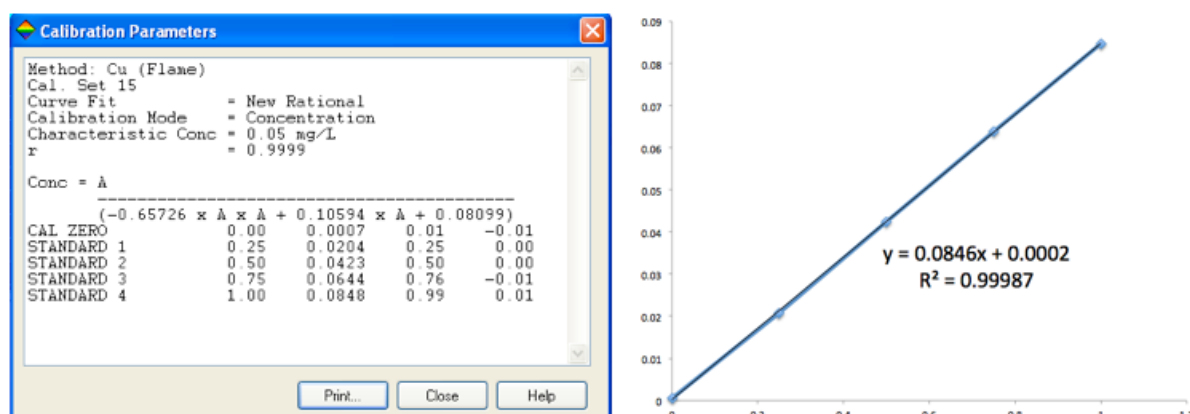


Figura 10. Curva analítica de regressão linear de cobre, a partir de soluções padrão na faixa de 0 a 1 ppm. **Fonte:** O autor.

A liberação cumulativa foi obtida para 28 dias e foi representada como ppm (mg/L) de cobre liberado de cada condição experimental.

A avaliação matemática dos perfis de liberação *in vitro* foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo monoexponencial, ao modelo biexponencial, ao modelo de ordem zero, ao modelo de Weibull e ao modelo Monolag (Tabela 2), considerando os resultados do critério de seleção de modelo (MSC), do coeficiente de correlação, do ajuste gráfico e da coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade para cada modelo.

Tabela 2. Modelos matemáticos relacionados aos experimentos de liberação de cobre:

Modelo	Equação
Monoexponencial	$\%D = 100(1 - e^{-kt})$
Biexponencial	$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$
Ordem zero	$\%D = kt$
Weibull	$\%D = 100[1 - e^{-(t/TD)^b}]$
Monolag	$\%D = 100[1 - e^{-k(t-x)}]$

Onde: % D, o percentual do fármaco dissolvido no tempo; t, k, α e β , as constantes cinéticas de dissolução verificadas; A e B, as concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução; TD, o tempo no qual 63,2 % do fármaco é dissolvido; b, o parâmetro relacionado às características estruturais e geométricas da forma farmacêutica. **Fonte:** O autor.

O modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas ou lei das potências foi também aplicado, permitindo a obtenção dos parâmetros a e n, com a finalidade de ampliar a informação sobre o mecanismo de liberação do cobre a partir dos corpos de prova de adesivo (Stanislawczuk et al. ⁷² 2014).

$$ft = at^n$$

Onde: a, a constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica; n, o expoente de liberação que é indicativo do mecanismo de liberação; ft representa a fração do fármaco dissolvido no tempo t.

Para sistemas esféricos, a lei das potências apresenta duas interpretações físico-químicas distintas. Quando n assume um valor inferior a 0,43, isso indica que a liberação da substância é controlada por difusão (mecanismo de transporte Fickiano). Quando n é superior a 0,85, indica que a liberação é controlada pelo inchamento do polímero (transporte caso II ou mecanismo de transporte não-Fickiano). Valores de n entre 0,43 e 0,85 estão relacionados com a sobreposição de ambos os fenômenos, denominado de transporte anômalo (Siepmann e Peppas ⁷⁸ 2001; Siepmann e Peppas ⁷⁹ 2001). Os métodos modelo-dependentes destinados à avaliação dos perfis de liberação foram aplicados com o auxílio do software MicroMath Scientist® (versão 2.01, SL, EUA). O software MathWorks Matlab® R2012a (Natick, MA, EUA) foi

utilizado para obter um intervalo de tempo necessário para se atingir uma liberação de 50% do cobre liberado.

3.5. EXPERIMENTO 3 (Etapa 3 e 4)

3.5.1. Preparação dos dentes e procedimentos adesivos

Trinta e cinco molares humanos livres de cárie, obtidos do pacientes com idades entre 18 e 35 anos, foram utilizados. O presente estudo foi aprovado a Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob o número de parecer 1.076.906 (Anexo A).

Os dentes foram desinfetados em cloramina 0,5% e armazenados em água destilada trocada semanalmente até sua utilização, em um prazo máximo de até 3 meses após extração. Com o auxílio de uma politriz (Arotec E, Cotia, São Paulo, Brasil) e usando lixa de carbeto de silício de granulação #180, sob irrigação constante, foi retirado o esmalte oclusal e planificada a superfície dos molares até exposição da dentina. As bordas periféricas de esmalte foram totalmente desgastadas com pontas diamantadas no 4137 (KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil) em alta rotação e irrigação constante, deixando unicamente tecido dentinário. A seguir, as superfícies de dentina foram polidas manualmente sob irrigação por 60 s para a padronização da *smear layer* utilizando lixas de carbeto de silício de granulação #600 (Extec, Enfield, Connecticut, EUA) (Figura 11).

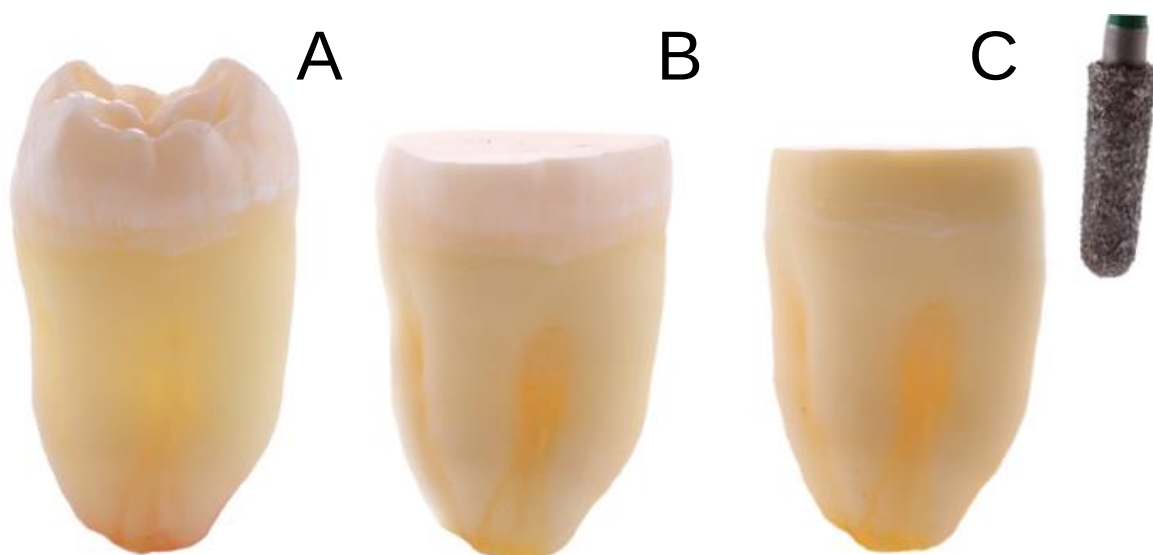


Figura 11. Preparo da superfície de dentina. (A) dente hígido; (B) superfície oclusal planificada e em dentina; (C) desgaste de todas as bordas periféricas de esmalte. **Fonte:** O autor

O adesivo em todas as concentrações, foi aplicado segundo as indicações do fabricante (Tabela 1). Os sistemas adesivos foram fotoativados por 10 s usando o mesmo aparelho fotopolimerizador anteriormente descrito (Figura 12). Após os procedimentos adesivos, todos os dentes foram restaurados com uma resina composta microhíbrida de restauração (Opallis, FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) em três incrementos de 1 mm, sendo cada incremento fotoativado por 40 s com o mesmo aparelho fotopolimerizador (Radii-cal, SDI) (Figura 13). Um único operador realizou todos os procedimentos adesivos. Cinco dentes foram utilizados para cada grupo experimental.

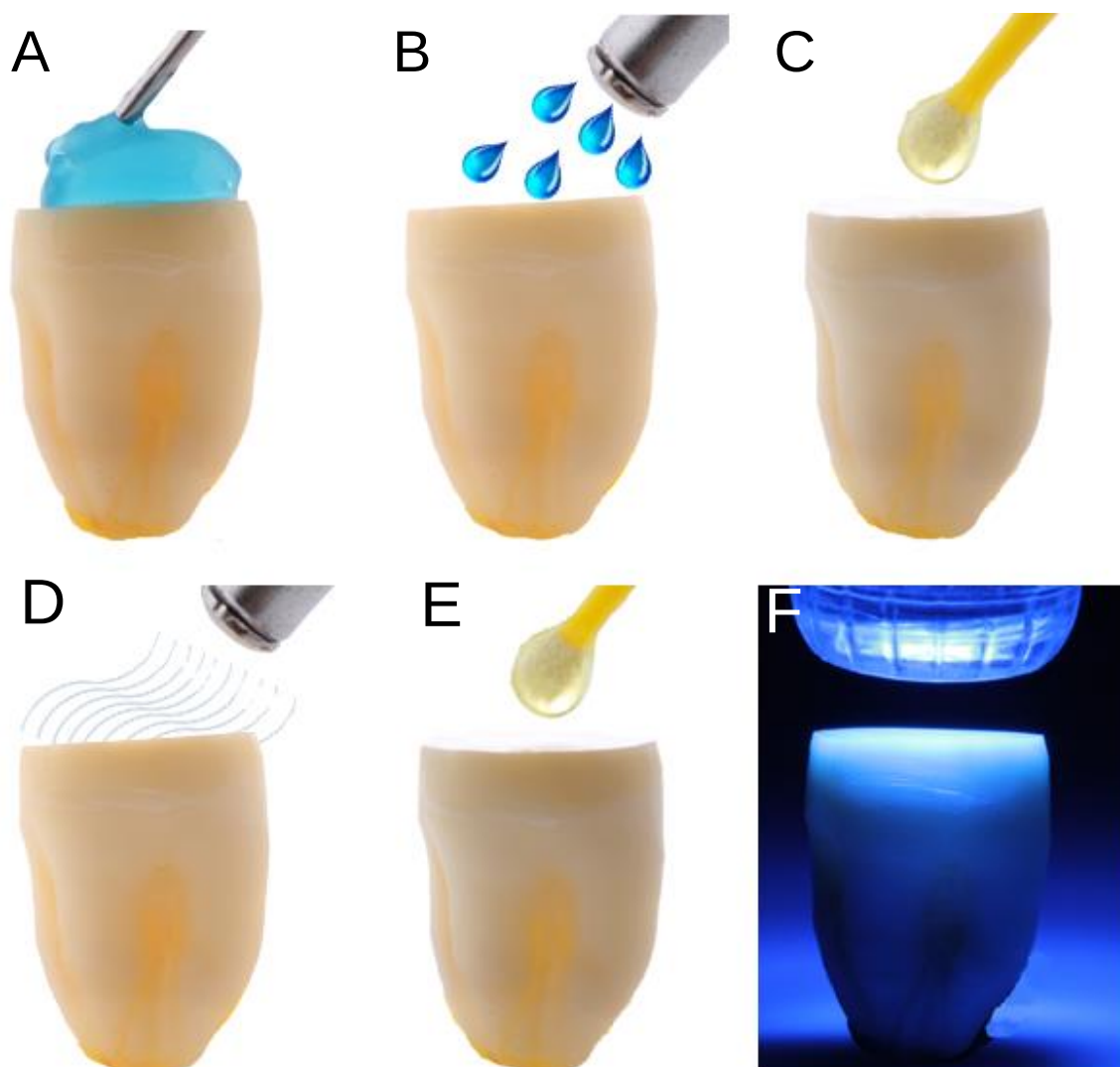


Figura 12. Estratégia adesiva convencional. (A) condicionamento ácido; (B) lavagem e secagem; (C) aplicação do adesivo; (D) secagem para evaporação do solvente; (E) aplicação de segunda camada do adesivo; (F) fotoativação. Todos os procedimentos realizados segundo as indicações do fabricante, os quais estão discriminados na Tabela 1. **Fonte:** O autor.

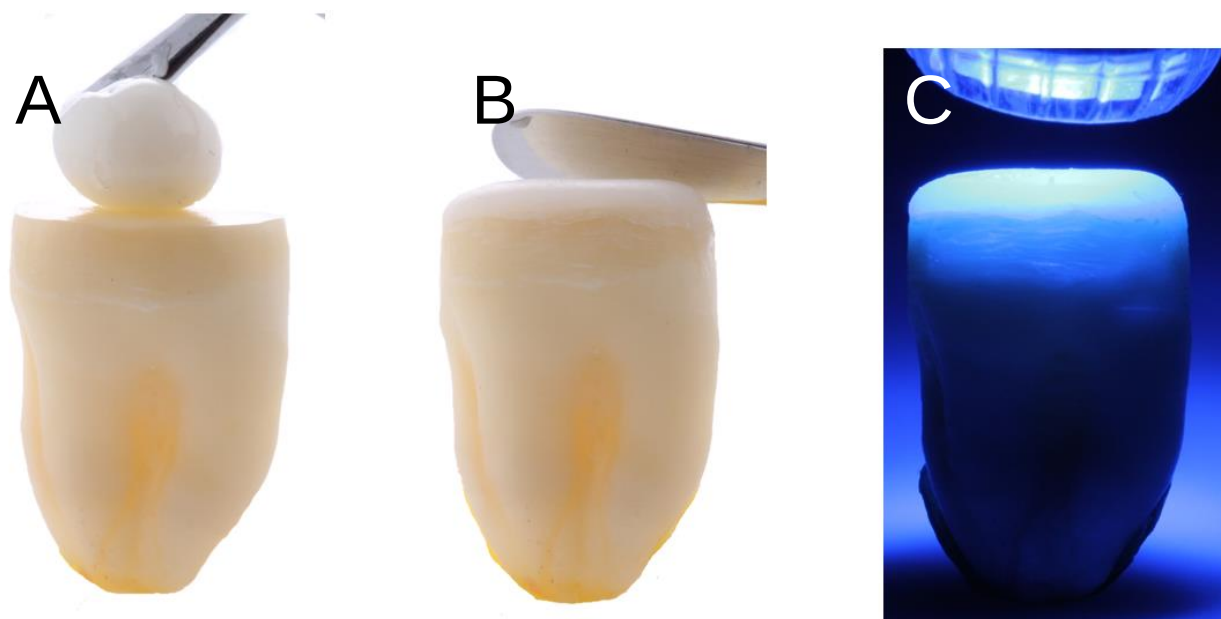


Figura 13. Restauração dos dentes após aplicação das variáveis adesivas. (A) Colocação da resina composta; (B) adaptação de cada incremento (3); (C) fotoativação de cada incremento. **Fonte:** O autor.

Os dentes restaurados foram armazenados em água destilada a 37° C por 24 h e levados a uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, Illinois, EUA). Com ajuda de um disco diamantado (15 HC-4in, Buehler Ltd., Lake Bluff, Illinois, EUA), sob irrigação a 300 rpm, os dentes foram seccionados em cortes perpendiculares no eixo “x” e outra no eixo “y”, obtendo-se espécimes no formato de “palitos” com uma área de secção transversal de $0,8 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ (Figura 14). O número de falhas prematuras (FP) por dente durante a preparação dos palitos foi registrada. A área de secção transversal foi medida com um paquímetro digital e registrada para o subsequente cálculo de microtração (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Kanagawa, Tóquio, Japão). A metade dos palitos de cada dente foi selecionada aleatoriamente para ser testados imediatamente [IM] (24 h) e o restante após 1 ano [1A] de armazenamento em água destilada a 37°C. A água destilada foi trocada e seu pH foi monitorado mensalmente.

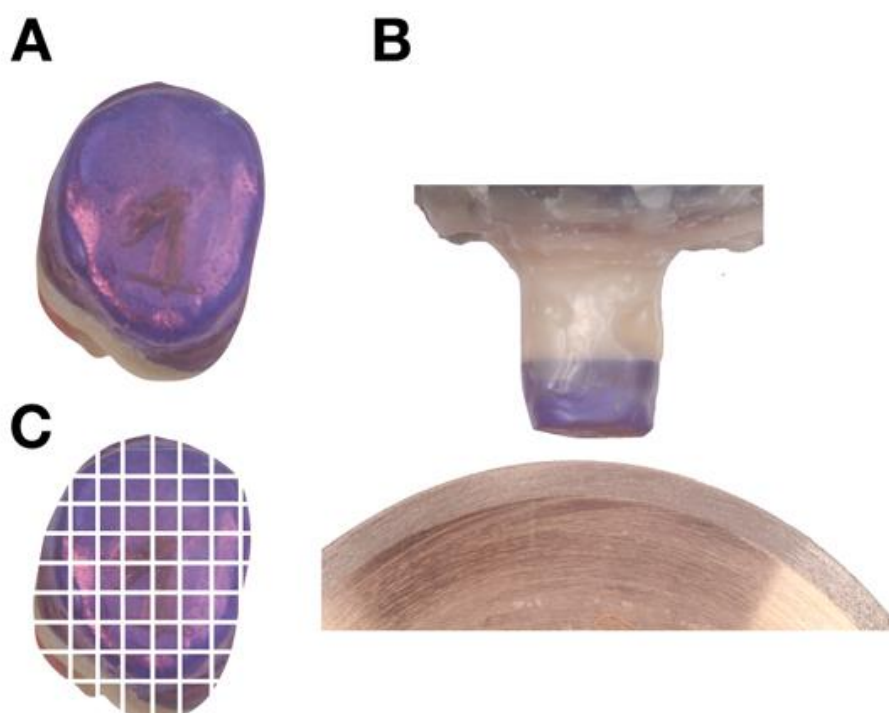


Figura 14. Sequência de corte para a obtenção dos palitos. (A) superfície oclusal das coroas de resina compostas pintadas com caneta marcadora permanente para identificação dos palitos de cada grupo. (B) dente fixado com cera pegajosa ao dispositivo da máquina de corte montada com um disco diamantado; (C) duas sequências perpendiculares de corte, uma no eixo x e outra no eixo y, permitiram a obtenção dos palitos para o teste de resistência de união. **Fonte:** O autor.

3.5.2. Teste de resistência de união à dentina por microtração (RU)

Os palitos obtidos foram colados individualmente em garras de Geraldeli (Odeme Biotechnology, Joaçaba, Santa Catarina, Brasil) (Perdigão et al. ⁸⁰ 2002) aplicando em cada um dos extremos do palito cola de cianocrilato gel (Loctite Superbond Power Easy Gel, Henckel, São Paulo, São Paulo, Brasil) de forma a não contaminar a interface dente-restauração. Após o tempo de polimerização da cola, as garras com os palitos foram acopladas na máquina de ensaios universal (Instron 3343; Instron Norwood, Mass, EUA) e estes foram testados por tração a uma velocidade de 0,5 mm/min com célula de carga de 100 N até rompimento da interface (Figura 15).



Figura 15. Sequência para o teste de microtração. (A) mensuração da largura e da espessura do mesmo palito, com paquímetro digital, para o cálculo da área da interface adesiva. (B) cola de cianocrilato em gel (que permite controle da aplicação). (C) aplicação da cola nas extremidades do palito, protegendo a interface e posicionamento do palito nas garras de microtração deixando a interface adesiva no espaço central da garra; (D) adaptação das garras na máquina de ensaios universais após a polimerização da cola. **Fonte:** O autor.

Utilizando uma lupa estereoscópica com 100x de magnificação (Olympus SZ40, Shinjuku-ku, Tóquio, Japão), a falha de cada palito foi classificada segundo o tipo de fratura como:

- Adesiva, falha na interface adesiva dente/restauração;
- Coesiva em dentina, falha exclusivamente em dentina;
- Coesiva em resina, falha exclusivamente em resina composta;
- Adesiva/Mista, falha na interface adesiva dente/restauração, mas que incluiu falha coesiva dos substratos vizinhos;
- Falhas prematuras, palitos que quebraram antes dos testes.

3.5.3. Avaliação da Nanoinfiltração (NI) por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Três palitos provenientes de cada dente para os tempos IM e 1A, foram reservados para análise de NI. Utilizando eppendorfs (OA12, Odeme Biotechnology, Joaçaba, SC, Brasil), os palitos foram imersos em uma solução aquosa (pH=7,0) de nitrato de prata amoniacal 50% em peso (Tay et al. ⁸¹ 2002) e armazenados por 24 h em ausência de luz. Após o tempo de infiltração, os palitos foram lavados com água destilada abundantemente 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.

Depois, os palitos foram novamente lavados em água corrente e fixados com cianocrilato em *stubs* de alumínio para facilitar o polimento uniforme das amostras, que foi realizado em uma politriz de bancada (ALM 4, Arotec, Cotia, São Paulo, Brasil) sob escoamento contínuo da 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). Entre cada lixa e as pastas de polimento, as amostras foram lavadas em cuba ultrassônica por 8 min seguidos de escoamento de água sobre a superfície por 2 min. As amostras foram deixadas então, por 30 min em cuba ultrassônica. Para o processo de desidratação as amostras foram deixadas em um dessecador contendo sílica coloidal por 24 h para, então, serem metalizadas em carbono/ouro (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) (Figura 16).

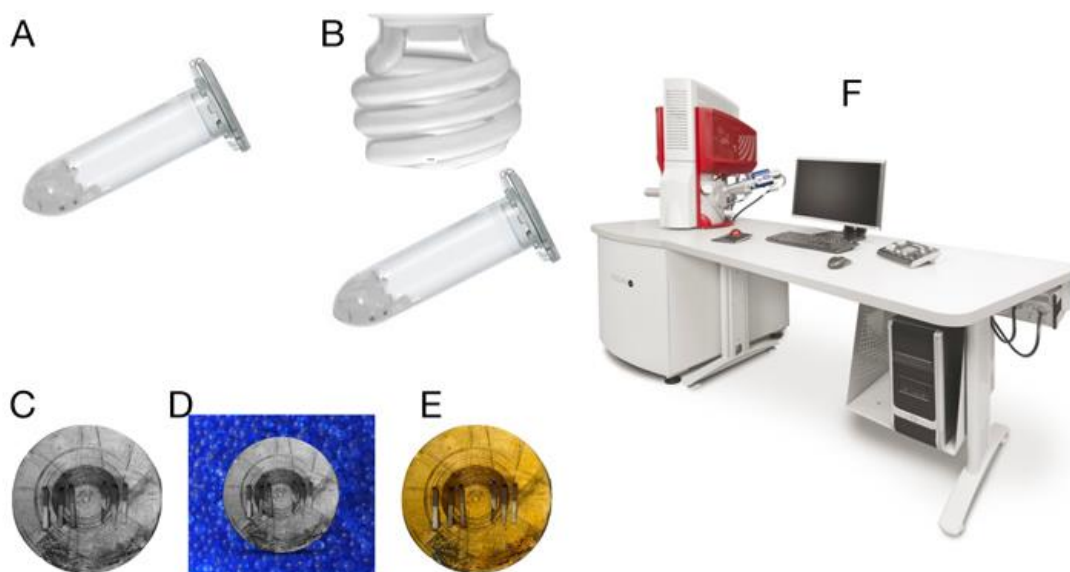


Figura 16. Preparação de amostras para NI: (A) palitos imersos em uma solução aquosa de nitrato de prata (pH=7,0) armazenados por 24 h sob total escuridão; (B) após lavagem, imersos em solução reveladora por 8 h sob luz fluorescente; (C) palitos revelados, montados em stubs de alumínio para facilitar o polimento uniforme; (D) palitos dessecados em sílica por 24 h; (E) palitos metalizados para a análise de MEV (F). **Fonte:** O autor.

As interfaces resina-dentina foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (VEGA SB; Tescan, Warrendale, PA, EUA) em modo de elétrons retroespalhados. Um operador, que desconhecia a origem dos palitos a serem analisados, realizou três fotomicrografias com aumento 1200X da interface dente-restauração de cada um dos palitos, sendo uma no centro e outras duas 3 μ m à esquerda e à direita do centro, para padronizar a aquisição das imagens. 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.⁸² 2012) operado por apenas um avaliador, o qual desconhecia a que grupo experimental pertencia a imagem. Assim, foram obtidas as médias dos valores percentuais de NI dos palitos, no tempo IM e após 1A.

3.5.4. Grau de conversão (GC) de adesivo na interface de união à dentina

Três palitos por cada dente foram selecionados aleatoriamente e submetidos ao teste de GC. Previamente ao teste, os palitos receberam breve polimento com lixa de SiC de granulação 4000 (Buehler Ltd., Lake Bluff, Illinois, EUA) no sentido contrário à interface de união, durante 30 s. A seguir os palitos foram lavados em cuba ultrassônica (Dabi Atlante – 3L, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) por 10 min e armazenados em água destilada a 37°C por 24 h antes da leitura de GC.

A análise de GC foi realizada na camada híbrida com um espectrofotômetro de micro-Raman (Senterra equipment, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha). Antes das análises, o equipamento foi calibrado para redefinir o zero utilizando padrões de silício com valores de coeficientes conhecidos. As análises foram realizadas sob os seguintes parâmetros: laser de Neônio com 532 nm de comprimento de onda a 20 mW de potência; resolução espacial de $\approx 3 \mu\text{m}$; resolução espectral de $\approx 5 \text{ cm}^{-1}$, com 30 s de tempo de acumulação e 6 co-adições, em magnificação de 100X para um laser de $\approx 1 \mu\text{m}$ de diâmetro. A análise iniciou obtendo-se os espectros com os picos de referência dos adesivos não polimerizados (np). Para isso, cada sistema adesivo foi dispensado e misturado em uma placa de vidro, a qual foi levada ao espectrofotômetro para leitura conforme os parâmetros já descritos. A leitura dos adesivos polimerizados (p) foi realizada diretamente na camada híbrida. Considerando as ligações duplas dos carbonos alifáticos (1639 cm^{-1} , pico reativo, para os quais foram verificadas mudanças) e aromáticos (1609 cm^{-1} , pico referência, estáveis sem mudanças). Para ambas as análises (np e p) foram determinados os valores da integrada (I) dos picos registrados utilizando o software do equipamento Opus Spectroscopy 6.5 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha). Assim, o GC das ligações duplas do monômero convertido em polímero foi calculado com a seguinte fórmula: (Stanislawczuk et al. ⁷² 2014)

$$GC \% = \left[1 - \frac{I \text{ Reativo } (p)_{1639} / I \text{ Referência } (p)_{1609}}{I \text{ Reativo } (np)_{1639} / I \text{ Referência } (np)_{1609}} \right] \times 100$$

As análises espectrais foram obtidas de três sítios aleatoriamente selecionados na região intertubular da camada híbrida de cada palito (Figura 18). A partir disso foi

possível a obtenção das médias de cada dente, as quais foram utilizadas na análise estatística ($n = 3$). As leituras iniciais (np) também foram realizadas em triplicata.

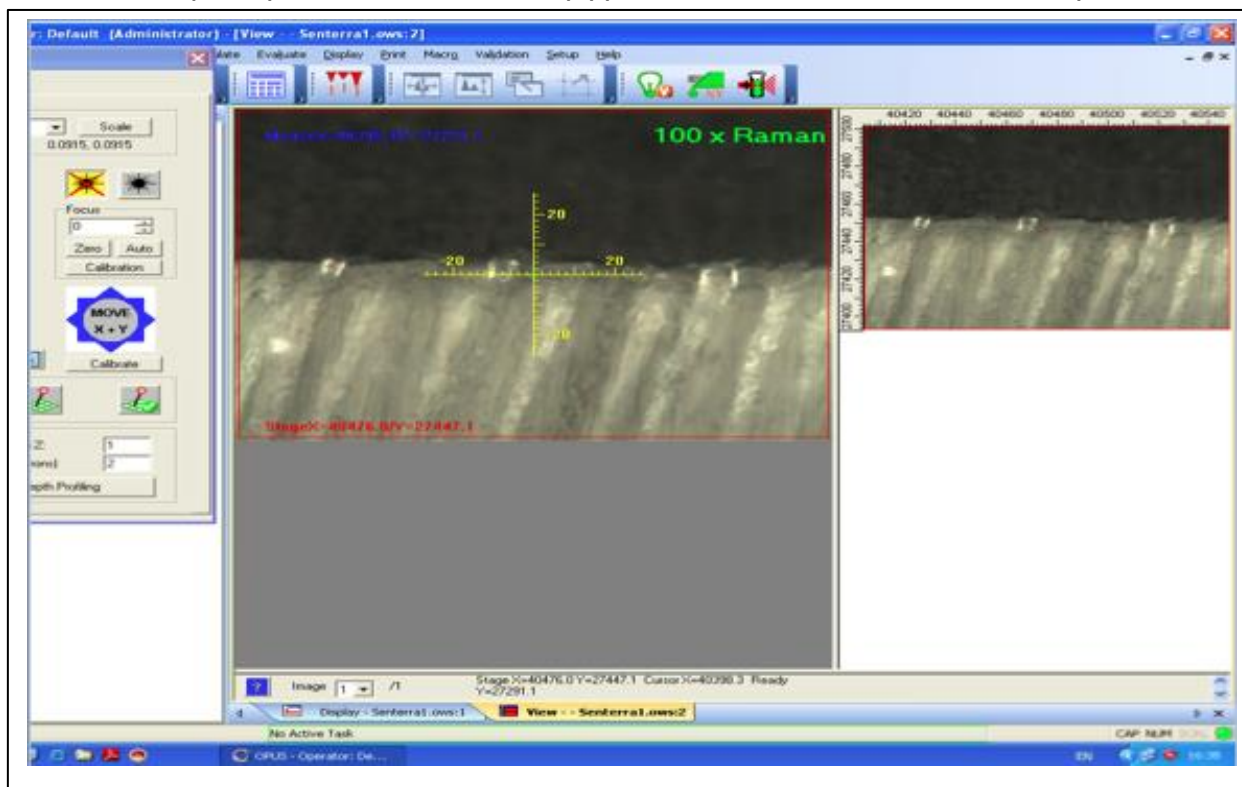


Figura 17. Avaliação de grau de conversão do adesivo, na zona da camada híbrida, na interface de união a dentina. **Fonte:** Hass, 2015.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias e desvios-padrão da RT (MPa), SO (%), SB (%) e liberação de cobre (% e ppm) foram calculados para todas as condições experimentais. Os dados do RT foram analisados por uma análise de variância de 2 fatores com concentração de cobre e período de armazenamento como os principais fatores. Para SO, SB, e liberação de cobre, os dados de 28 dias foram analisados por análise de variância de fator único (concentração de cobre). Para RU e NI, a unidade experimental no estudo foi o hemi-dente, uma vez que metade do dente foi testado IM e a outra metade foi testada após 1A de armazenamento em água. Os valores de RU e de NI de todos os palitos do mesmo hemi-dente foi a média para fins estatísticos. Os dados de RU (MPa) e NL (%) de cada adesivo foram submetidos a análise de variância de 2 fatores para medidas repetidas. A medida repetida foi o dente. Também foi feito o teste *post hoc* de Tukey para múltiplas comparações. A significância estatística foi predefinida em $\alpha = 0,05$

4. RESULTADOS

4.1. Testes morfológicos e composicionais

As análises morfológicas conduzidas por microscopia de força atômica (AFM), potencial Z, microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG)(Figuras 18 a 20) mostraram um tamanho de partículas entre 117 e 265 nm, sendo observada uma aglomeração das partículas na imagem de FEG. A análise composicional (espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)) revelou que a amostra tem uma alta percentagem de átomos de cobre, sem contaminação com outros elementos (Figura 21).

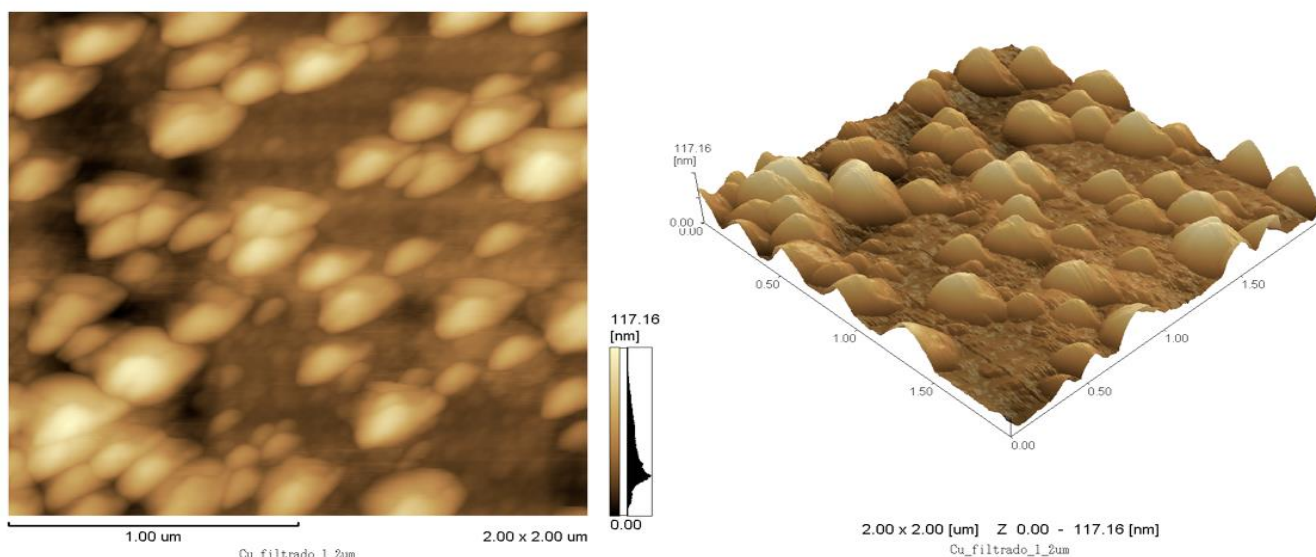


Figura 18. Tamanho de partícula medido através de microscopia de força atômica (AFM). **Fonte:** O autor.

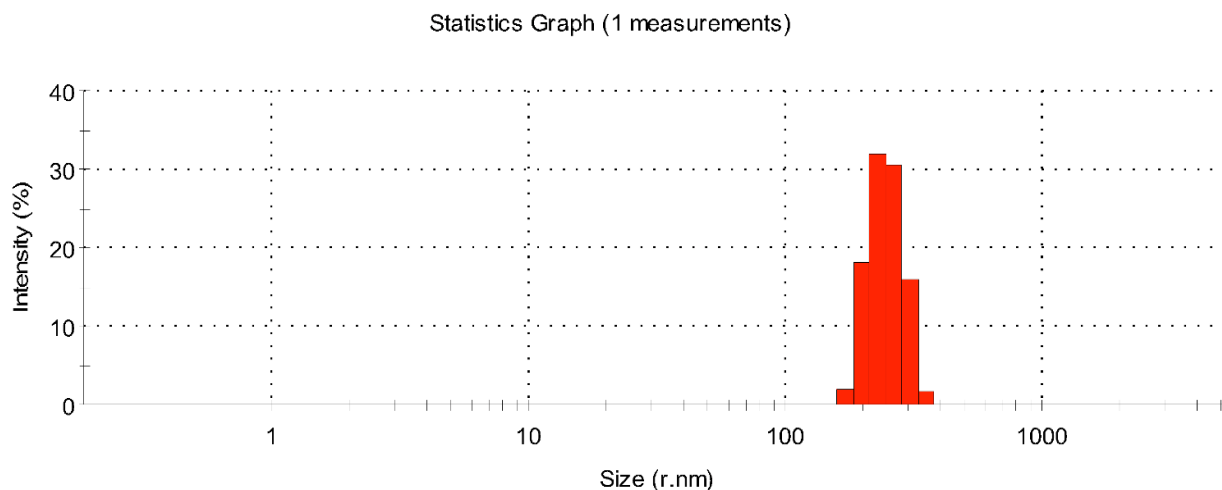


Figura 19. Histograma de tamanhos de partícula e sua frequência (%), medido através de Zeta Sizer. **Fonte:** O autor.

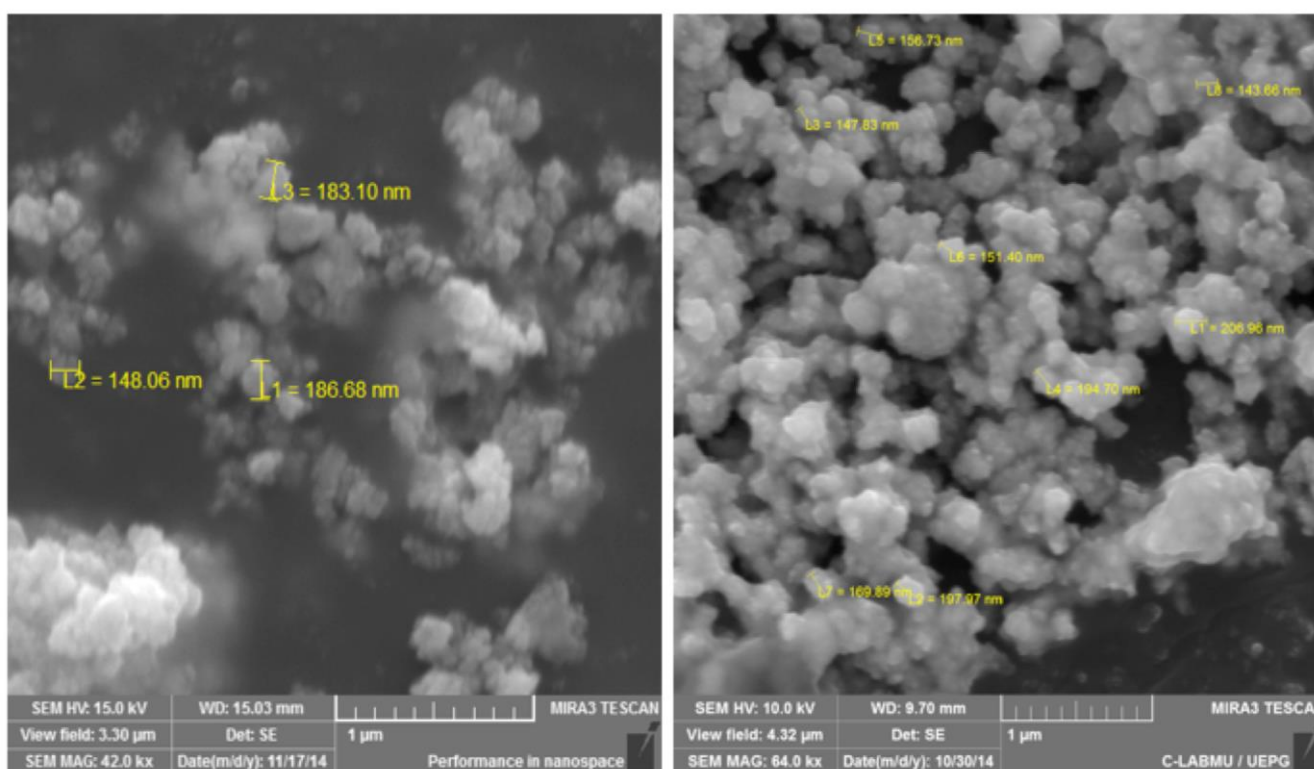


Figura 20. Tamanho de partícula medido através de microscópio eletrônico de varredura por efeito de campo (FEG). **Fonte:** O autor.

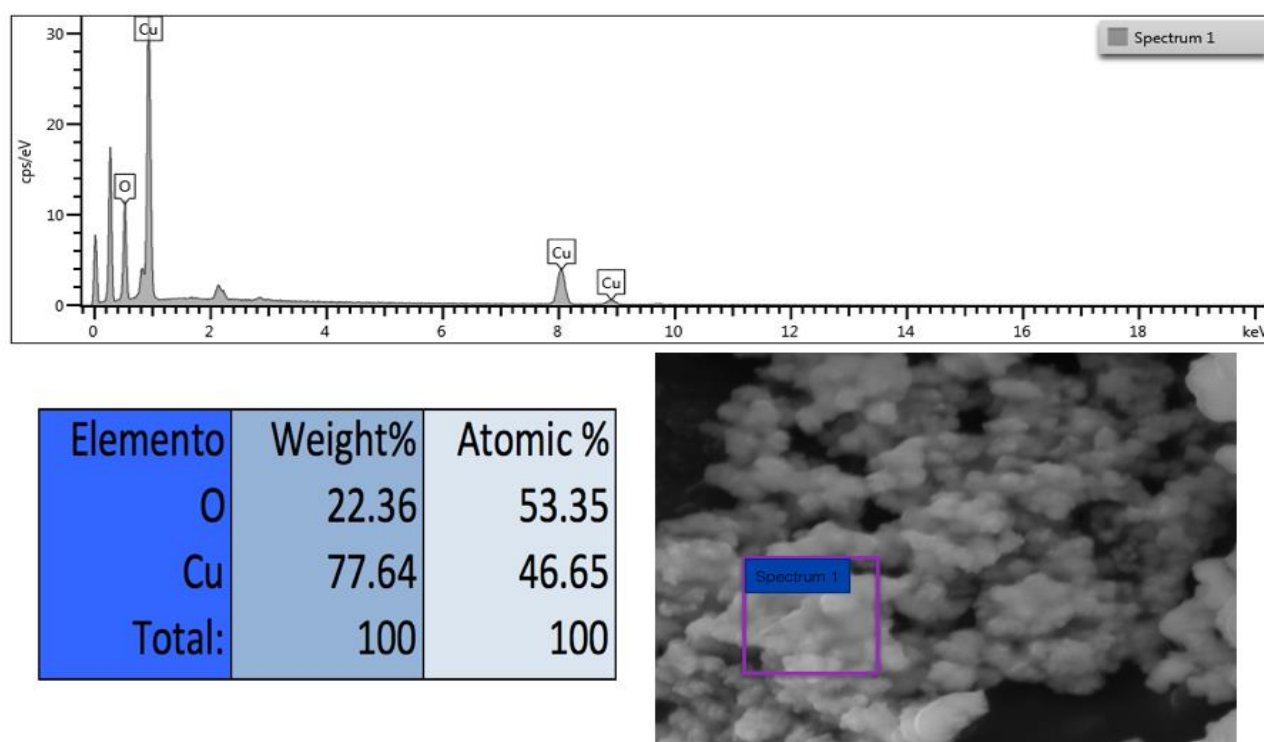


Figura 21. Análise composicional das nanopartículas de cobre, obtida por Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS). **Fonte:** O autor.

4.1. Atividade antimicrobiana (AAM)

A Tabela 3 mostra que, quando testados pelo método de difusão em ágar, todos os adesivos com alguma concentração de cobre demonstraram atividade antimicrobiana contra *S. mutans*, com halos de inibição entre $7,63 \pm 1,03$ e $11,94 \pm 0,47$ mm, quando comparado com o controle (0 % de cobre).

Tabela 3. Resultados dos halos de inibição, obtidos com os adesivos contendo nanopartículas de cobre contra *S. mutans*

Microrganismo	Cobre (%)						
<i>Streptococcus mutans</i>	0 (CT)	0,0075	0,015	0,060	0,1	0,5	1
Diâmetro dos halos (mm) n=3	4,94 A	7,63 B	8,22 B	9,08 B	10,81 C	11,54 C	11,94 C
Desvio Padrão	0,47	1,03	0,96	0,63	0,90	0,81	0,47

(*) Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0.05$). **Fonte:** O autor.

4.2. Grau de conversão (GC) dos corpos de prova de adesivo (*in vitro*)

Os resultados de grau de conversão dos corpos de prova, tanto testados pelo método de FTIR, quanto testados pelo método de espectrometria micro-Raman, estão apresentados na Tabela 4.

No método de FTIR, não se verificou diferença significativa entre os grupos estudados ($p \geq 0,05$). No método de micro-Raman, observou-se uma diminuição significativa do grau de conversão no grupo do adesivo com nanopartículas de cobre em concentração de 1% ($p < 0,05$), quando comparado com os outros grupos, tanto na avaliação da altura do pico, quanto na avaliação da integrada. A comparação entre a medida da integrada e da altura do pico não mostrou diferença significativa ($p \geq 0.05$).

Tabela 4. Médias e desvios-padrão dos dados do grau de conversão (GC, %), obtidos em cada condição experimental, por meio de FTIR e micro-Raman (integrada [i] e altura [a]) (*):

Adesivo	Método		
	FTIR	Micro-Raman (i)	Micro-Raman (a)
0% (controle)	40,44 ± 1,53 A	95,97 ± 0,26 a	95,92 ± 1,60 a
0,0075%	42,15 ± 2,88 A	94,95 ± 0,88 a	95,69 ± 0,38 a
0,015%	42,14 ± 1,40 A	93,27 ± 0,08 a	92,25 ± 0,36 a
0,060%	42,21 ± 0,90 A	94,31 ± 0,49 a	91,70 ± 0,34 a
0,1%	42,90 ± 0,29 A	92,53 ± 1,21 a	91,02 ± 0,50 a
0,5%	40,58 ± 1,51 A	92,56 ± 0,68 a	91,87 ± 0,29 a
1%	42,91 ± 0,45 A	72,64 ± 3,06 b	74,77 ± 4,42 b

(*) As comparações são válidas só dentro de cada método. Para cada método, letras maiúsculas ou minúsculas iguais indicam resultados estatisticamente similares (teste de Tukey, $p \geq 0,05$). **Fonte:** O autor.

4.3. Resistência máxima à tração (RT)

Os resultados de resistência máxima à tração, testados após 24 h (IM) e depois de 28 dias (28d), estão apresentados na Tabela 5. Para RT, não foram registradas diferenças significativas entre as concentrações de nanopartículas de cobre, nem entre os tempos de armazenamento ($p \geq 0,05$).

Tabela 5. Médias e desvios-padrão dos dados do resistência máxima a tração (RT, Mpa), obtidos em cada condição experimental (*)

Adesivo	Tempo	
	24 h	28 dias
0% (controle)	14,28 ± 3,74 A	12,02 ± 1,32 A
0,0075%	15,06 ± 3,82 A	14,82 ± 2,40 A
0,015%	16,50 ± 2,15 A	16,03 ± 1,00 A
0,060%	13,33 ± 1,68 A	13,25 ± 1,83 A
0,1%	16,07 ± 3,35 A	16,01 ± 1,45 A
0,5%	14,30 ± 4,11 A	14,05 ± 2,22 A
1%	13,21 ± 4,09 A	13,10 ± 2,48 A

(*) Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (teste de Tukey, $p \geq 0,05$). **Fonte:** O autor.

4.4. Sorção de água (SO) e solubilidade (SB)

Para SO, a adição de nanopartículas de cobre não alterou a sorção de água do adesivo Ambar ($p \geq 0,05$). Entretanto, para SB, foram observadas diferenças significativas entre o controle e todos os grupos experimentais ($p < 0,01$) (Tabela 6).

Tabela 6. Sorção de água e solubilidade ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) das condições experimentais aos 28 dias de armazenamento em água (*)

Adesivo	Sorção de água ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	Solubilidade ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)
0% (controle)	104,0 $\pm$ 17,9 A	59,6 $\pm$ 1,7 a
0,0075%	101,1 $\pm$ 5,4 A	58,3 $\pm$ 0,5 b
0,015%	100,8 $\pm$ 5,7 A	58,0 $\pm$ 0,8 b,c
0,060%	98,7 $\pm$ 8,6 A	57,5 $\pm$ 0,4 b,c
0,1%	110,4 $\pm$ 5,8 A	57,2 $\pm$ 0,5 c,d
0,5%	98,2 $\pm$ 6,7 A	56,4 $\pm$ 0,4 d,e
1%	103,2 $\pm$ 7,8 A	56,0 $\pm$ 0,3 e

(*) Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (teste de Tukey, $p \geq 0,05$). **Fonte:** O autor.

4.5. Comportamento de liberação do cobre a partir dos corpos de prova de adesivo

A curva analítica de regressão linear, entre os valores de absorbância e as concentrações de cobre, apresentou um coeficiente de correlação de $r = 0,99987$, sendo adequada para determinar a liberação de cobre dos adesivos. Foi realizada uma avaliação matemática dos perfis de liberação *in vitro* e foi selecionado o melhor modelo, considerando o coeficiente de correlação (r), o critério de seleção de modelo (MSC), o ajuste gráfico e a coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade para cada modelo, sendo a equação biexponencial a mais adequada para explicar os resultados experimentais. A Figura 22 resume as taxas de liberação de cobre, enquanto que a Tabela 7 mostra os dados de ajuste ao modelo biexponencial.

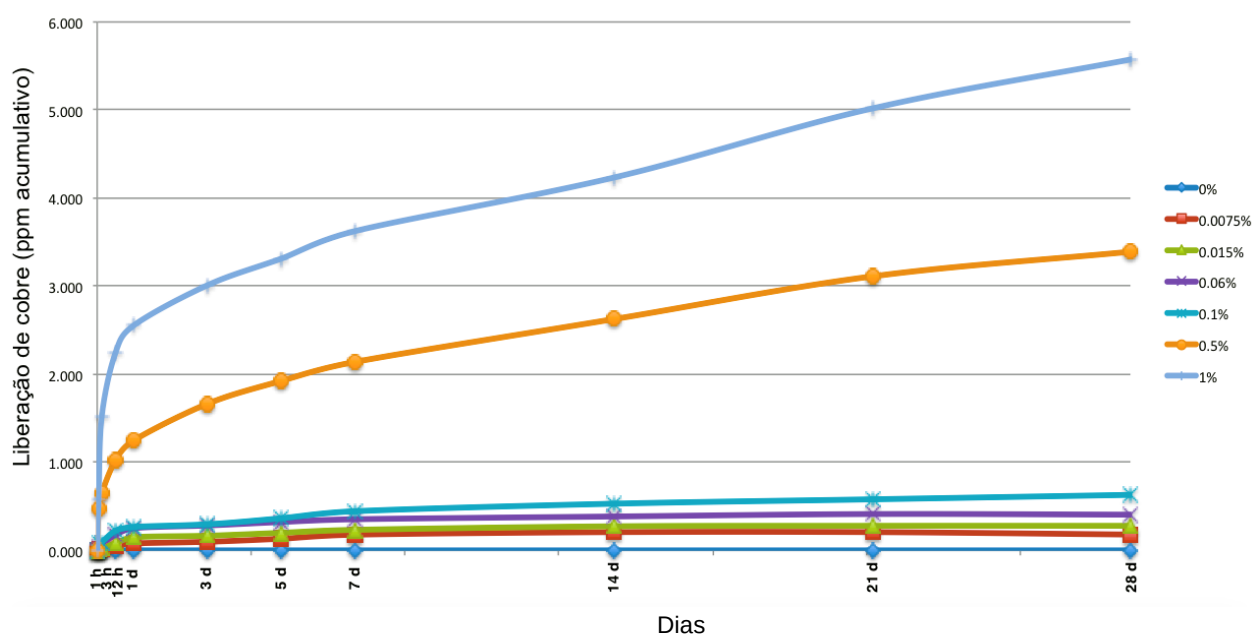


Figura 22. Liberação de cobre (ppm acumulativo) de todas as condições experimentais, após 28 dias de armazenamento em solução aquosa de 2% de ácido nítrico. **Fonte:** O autor.

Tabela 7. Dados de liberação de cobre a partir dos corpos de prova de adesivo, ajustados à equação biexponencial

Adesivo	Modelo biexponencial *			
	MSC	R	α (h ⁻¹)	β (h ⁻¹)
0,0075%	2,84	0,9879	$6,62 \times 10^{-2}$	$3,81 \times 10^{-6}$
0,015%	3,69	0,9948	$7,02 \times 10^{-2}$	$3,68 \times 10^{-6}$
0,060%	3,40	0,9952	$3,91 \times 10^{-2}$	$3,02 \times 10^{-6}$
0,1%	4,24	0,9893	$8,80 \times 10^{-2}$	$3,54 \times 10^{-4}$
0,5%	3,59	0,9932	$1,33 \times 10^{-2}$	$2,96 \times 10^{-5}$
1%	4,16	0,9962	4,8037	$23,59 \times 10^{-2}$

(*) MSC, Critério de seleção de modelo; R, coeficiente de correlação; α e β , constantes cinéticas.

Fonte: O autor.

Tabela 8 mostra a liberação acumulada total de cobre (% e ppm) após 28 dias para todas as condições experimentais. Os CPA contendo 0,0075 e 0,015 % liberaram mais do 18% do seu cobre após 28 dias de armazenamento em uma solução aquosa ao 2% de ácido nítrico. Os CPA dos outros grupos experimentais só liberaram um máximo de um 0,07%. Por outro lado, a análise estatística da concentração em ppm de cobre liberado revelou diferenças significativas entre várias concentrações de cobre ($p < 0,05$).

Tabela 8. Liberação de cobre em % e ppm de todas as condições experimentais, após 28 dias de armazenamento em solução aquosa de 2% de ácido nítrico (*)

Adesivo	Liberação de cobre	
	% da concentração inicial	ppm
0,0075%	$0,28 \pm 0,010$ A	$0,209 \pm 0,008$ a
0,015%	$0,18 \pm 0,010$ B	$0,280 \pm 0,012$ a,b
0,060%	$0,07 \pm 0,001$ C	$0,411 \pm 0,007$ b
0,1%	$0,07 \pm 0,001$ C	$0,665 \pm 0,075$ c
0,5%	$0,07 \pm 0,001$ C	$3,424 \pm 0,026$ d
1%	$0,06 \pm 0,001$ C	$5,572 \pm 0,128$ e

(*) Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (teste de Tukey, $p \geq 0,05$). **Fonte:** O autor.

Foi realizada uma avaliação matemática dos perfis de liberação pelo modelo de Korsmeyer-Peppas, os diferentes grupos mostraram valores de n de 0,42 (0,0075% cobre), 0,21 (0,015% cobre), 0,23 (0,060% cobre), 0,29 (0,1% cobre), 0,31 (0,5% cobre) e 0,25 (1% cobre), após 28 dias. Portanto, todas as concentrações avaliadas apresentaram liberação segundo um mecanismo de difusão Fickiana.

4.6. Teste de resistência de união à microtração (RU), nanoinfiltração (NI) e grau de conversão (GC) do adesivo na interface de união a dentina

4.6.1. Resistência de união à microtração (RU)

Os resultados de resistência de união à microtração, testados após 24 h (IM) e após 1 ano estão apresentados na Tabela 9. Verificou-se um aumento significativo da

resistência de união a microtração no grupo do adesivo com cobre em concentrações de 0,1 e de 0,5% no tempo imediato, quando comparadas com o controle ($p < 0,05$). Após 1 ano, decréscimo significativo de RU foi observado no grupo controle ($p < 0,05$). Decréscimo significativo de RU após um ano não foi observado nos adesivos contendo cobre ($p \geq 0,05$).

Tabela 9. Médias e desvios-padrão dos dados de resistência de união à dentina (RU, Mpa) no tempo imediato e após um ano (*)

Adesivo	Tempo	
	24 h	1 ano
0% (controle)	34,58 ± 2,99 A	26,59 ± 1,01 E
0,0075%	39,37 ± 1,76 A,B	40,37 ± 2,18 A,B
0,015%	40,35 ± 3,03 A,B	40,08 ± 2,16 A,B
0,060%	39,18 ± 1,52 A,B	42,36 ± 2,78 B,C
0,1%	42,82 ± 1,92 B,C	43,03 ± 0,63 B,C,D
0,5%	50,64 ± 3,10 D	48,60 ± 2,45 C,D
1%	37,37 ± 4,70 A,B	39,63 ± 2,95 A,B

(*) Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (teste de Tukey, $p \geq 0,05$). **Fonte:** O autor.

4.6.2. Nanoinfiltração (NI) na interface de união à dentina

Os resultados de nanoinfiltração (NI) na interface de união à dentina, testados depois de 24 h de armazenamento em água (IM), estão apresentados na Tabela 10. Nenhum dos grupos testados apresentou uma interface livre de nanoinfiltração. Observou-se uma diminuição da nanoinfiltração no grupo do adesivo com cobre em concentrações de 0,1; 0,5 e 1% no tempo imediato, quando comparados com o controle ($p < 0,05$). Após 1 ano, um aumento significativo de NI foi observado no grupo controle ($p < 0,05$). Aumento significativo de NI não foi observado nos adesivos contendo cobre após um ano ($p \geq 0,05$) (Figura 23).

Tabela 10. Médias e desvios-padrão dos dados de nanoinfiltração (NI, %), obtidos em cada condição experimental, no tempo imediato e após 1 ano (*)

Adesivo	Tempo	
	24 h	1 ano
0% (controle)	17,51 ± 2,66 A	29,71 ± 4,59 D
0,0075%	11,09 ± 3,48 A,B,C	13,89 ± 3,15 A,B
0,015%	10,91 ± 2,30 A,B,C	13,03 ± 5,10 A,B
0,060%	10,56 ± 1,05 A,B,C	12,90 ± 2,35 A,B
0,1%	8,99 ± 0,33 B,C	9,58 ± 0,84 B,C
0,5%	4,51 ± 1,91 C	6,67 ± 1,98 C
1%	5,88 ± 2,49 C	9,31 ± 2,29 B,C

(*) Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (teste de Tukey, $p \geq 0,05$). **Fonte:** O autor.

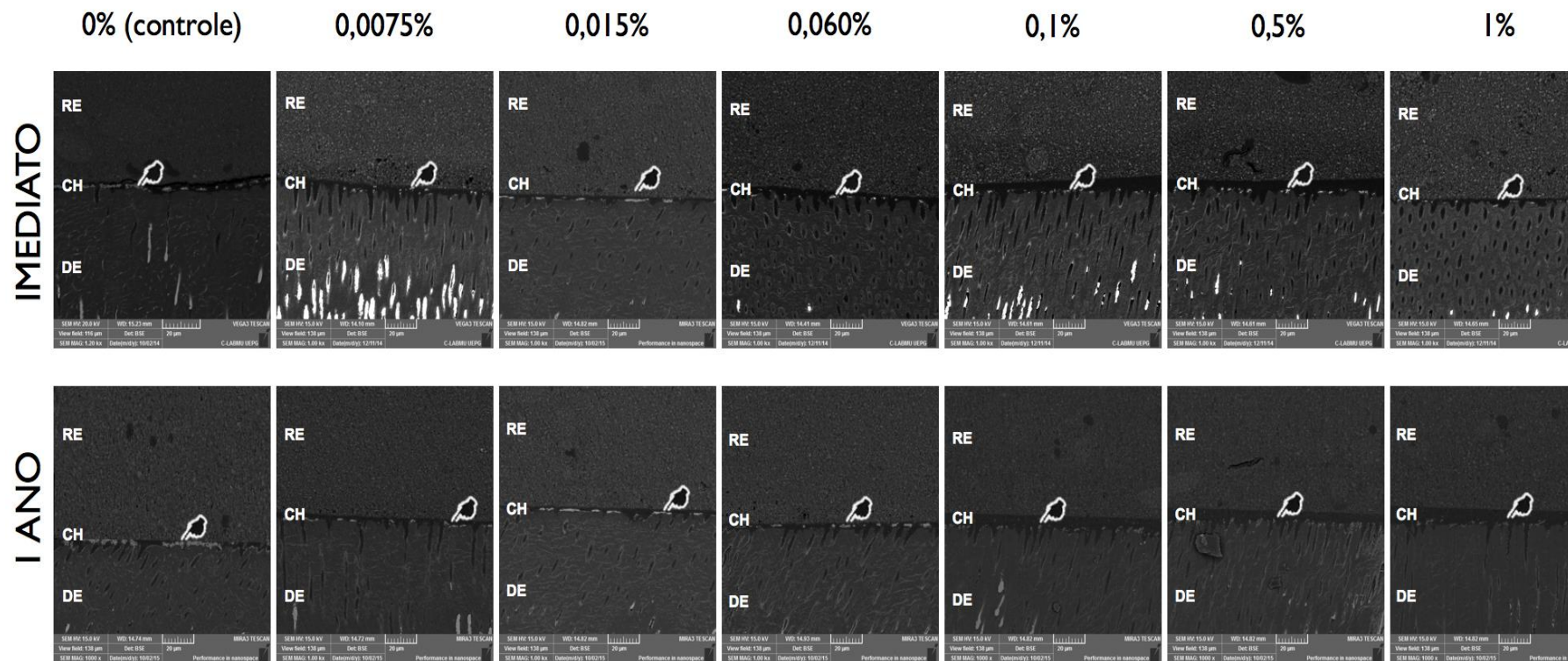


Figura 23. Imagens (MEV) representativas da interface de união à dentina, obtidas em cada condição experimental, no tempo imediato e após 1 ano. RE, resina; CH, camada híbrida; DE, dentina. **Fonte:** O autor.

4.6.3. Grau de conversão (GC) do adesivo na interface de união à dentina

Os resultados de grau de conversão (GC) do adesivo na interface de união à dentina, testados depois de 24 h de armazenamento em água (IM), estão apresentados na Tabela 11. Registrou-se uma diminuição significativa do grau de conversão no grupo do adesivo com cobre em concentração de 1%, quando comparado com os outros grupos experimentais e o controle ($p < 0,05$).

Tabela 11. Médias e desvios-padrão dos dados de grau de conversão (GC, %), obtidos em cada condição experimental, no tempo imediato (*)

Adesivo	GC
0% (controle)	96,17 ± 1,79 A
0,0075%	96,87 ± 0,45 A
0,015%	95,33 ± 0,50 A
0,060%	95,36 ± 1,55 A
0,1%	94,82 ± 1,12 A
0,5%	93,50 ± 2,56 A
1%	85,63 ± 3,42 B

(*) Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (teste de Tukey, $p \geq 0,05$). **Fonte:** O autor.

5. DISCUSSÃO

A incorporação de nanopartículas nos materiais dentários tem sido extensamente estudada nos últimos anos. A incorporação de nanopartículas de prata em cimentos resinosos e adesivos dentários tem mostrado grande capacidade antimicrobiana, bem como melhoria nas propriedades mecânicas e adesivas (Melo et al.⁵⁵ 2013; Zhang et al.⁵⁶ 2012). Nanopartículas de ouro também têm demonstrado uma importante atividade antimicrobiana (Hashimoto et al.⁸³ 2015), embora tenham sido estudadas apenas em solução aquosa e não incorporadas em adesivos ou algum outro material dentário. Nesse panorama, o uso de nanopartículas de cobre em materiais dentários não tem sido muito explorado, embora exista suas potencialidades (Argueta-Figueroa et al.⁸⁴ 2014).

Neste estudo, a incorporação de nanopartículas de cobre na formulação de um adesivo convencional simplificado (Ambar) mostrou uma grande atividade antimicrobiana sobre *S. mutans*, em todas as suas concentrações (0,0075; 0,015; 0,060; 0,1; 0,5 e 1%) quando comparado com o adesivo controle (0% de cobre), como foi demonstrado em outros estudos com concentrações similares (Argueta-Figueroa et al.⁶⁴ 2015; Sabatini et al.⁶⁵ 2015).

Trabalhos prévios já tinham relatado os efeitos antibacterianos de nanopartículas de prata e cobre (Ruparelia et al.⁶¹ 2008; Yoon et al.⁶⁶ 2007), usando cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *B. subtilis*, nos quais as nanopartículas de cobre demonstraram atividade antibacteriana superior, em comparação com as nanopartículas de prata (Yoon et al.⁶⁶ 2007). Uma vantagem adicional das nanopartículas de cobre é que elas sofrem oxidação e formam nanopartículas de óxido de cobre, podendo facilmente misturar-se com polímeros ou macromoléculas e sendo relativamente estáveis em termos de propriedades químicas e físicas (Usman et al.⁶⁷ 2012).

As nanopartículas de cobre têm uma atividade antimicrobiana que é tamanho- e concentração-dependente (Durán et al.⁸⁵ 2010; Prabhu et al.⁸⁶ 2010). O mecanismo pelo qual as nanopartículas de cobre exercem o seu efeito antibacteriano não está muito esclarecido, mas Schrand e cols. mencionam que o efeito das nanopartículas de cobre pode ser devido a interações com grupos -SH que conduzem a desnaturação das proteínas bacterianas (Schrand et al.⁸⁷ 2010). As nanopartículas de cobre exercem seu efeito sobre a membrana celular devido a sua afinidade com

aminas e grupos carboxila presentes na superfície celular (Ren et al.⁸⁸ 2009). Após entrar na célula, nanopartículas podem ligar-se a moléculas de DNA e alterar a estrutura helicoidal por reticulação dentro e entre as cadeias de ácidos nucleicos. Os íons de cobre no interior das células bacterianas também podem interromper processos bioquímicos (Kim et al.⁸⁹ 2000). Uma teoria mais recente é a chamada teoria do “efeito cavalo de troia” (*trojan horse effect*), onde as nanopartículas são capazes de promover degradação/corrosão no ambiente ácido dos lisossomos (pH 5,5) ou proteases, que converte metais a íons, e portanto, substâncias tóxicas. A liberação intercelular de íons livres gera um elevado volume de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias ou pode induzir o mau funcionamento de outras organelas (Sabella et al.⁹⁰ 2014). O mecanismo exato antimicrobiano das nanopartículas de cobre não está, portanto, totalmente conhecido e deve de ser elucidado.

Com relação as propriedades mecânicas, todos os adesivos com diferentes concentrações de cobre, adsorveram/absorveram quantidades significativas de água, principalmente no primeiro dia de armazenamento (Tabela 6), tal como em estudos anteriores (Ito et al.⁷⁵ 2005; Malacarne et al.⁷⁶ 2006; Reis et al.⁷⁷ 2007). Isso sugere a interação da formulação com soluções hidrofílicas, compatíveis com a dentina desmineralizada úmida. Os monômeros mais comuns em sistemas adesivos dentários são hidrofílicos (Van Landuyt et al.⁹¹ 2007) e os seus polímeros resultantes são mais propensos a SO (Ito et al.⁷⁵ 2005; Malacarne et al.⁷⁶ 2006; Reis et al.⁷⁷ 2007; Fabre et al.⁹² 2007) do que os polímeros hidrofóbicos. O adesivo Ambar não contém HEMA na sua composição, o que explica a baixa SO quando comparado com outros adesivos (Stanislawczuk et al.⁷² 2014; Stanislawczuk et al.⁷³ 2014). Neste estudo, a adição de cobre não afetou as propriedades de RT e SO, mas diminuiu a SB e, portanto, não tornou os adesivos mais propensos a degradação precoce, sendo este o primeiro estudo a relatar essas propriedades. Concentrações de até 1% de cobre parecem deixar a RT e SO de adesivos comerciais inalteradas, ou melhoradas, como no caso da SB.

Com respeito à liberação de cobre (ppm), foi observada uma liberação inicial rápida, provavelmente atribuível ao cobre na superfície exterior. Isso foi seguido por um período mais longo de liberação lenta, mas contínua, o que garante o efeito prolongado. A liberação imediata pode ajudar a atingir a concentração eficaz de cobre na interface do adesivo, ao passo que a liberação controlada pode manter essa concentração eficaz de cobre por um longo tempo. Para todos os adesivos contendo

cobre, o expoentes de liberação (n) calculado a partir do modelo Korsmeyer-Peppas resultou em valores menores do que 0,43. Isso indica que o mecanismo que rege a liberação de cobre nos primeiros 28 dias foi de difusão Fickiana (Siepmann e Peppas ⁷⁸ 2001; Siepmann e Peppas ⁷⁹ 2001), caracterizado pelo movimento molecular sistemático do cobre desde áreas de alta concentração para áreas de baixa concentração (Manadas et al. ⁹³ 2002).

Embora a liberação de cobre a partir de uma matriz polimérica para um ambiente aquoso possa ser diferente da liberação de cobre de uma camada fina de adesivo ao substrato desmineralizado e mineralizado, e não se possa extrapolar os presentes resultados ao que poderia acontecer *in vivo*, este é o primeiro estudo que demonstra a liberação de cobre e o seu comportamento a partir da matriz polimérica de um adesivo.

No presente estudo, não foram observadas reduções no grau de conversão dos grupos experimentais em relação ao controle (tanto em corpos de prova como na interface de união à dentina), excetuando o grupo com uma concentração de 1% de cobre (Tabelas 4 e 9). Esse resultado é provavelmente devido ao fato de que baixas concentrações de cobre (até 0,5%) não interferem com a equilibrada mistura monômero / solventes, assim como não agem como um plastificante dentro da rede de polímero. No caso do grupo 1%, depois de 4 meses, pode-se verificar que o adesivo começa a gelificar dentro do frasco, o que pode atrapalhar a polimerização e explicar os menores valores de grau de conversão. Além disso, o cobre mostrou ter um bom grau de compatibilidade química quando foi adicionado em um sistema adesivo (Argueta-Figueroa et al. ⁶⁴ 2015; Sabatini et al. ⁶⁵ 2015).

No entanto, a descoberta mais promissora do presente estudo é que a incorporação de nanopartículas de cobre entre 0,0075 e 0,5% produz sistemas adesivos capazes de prevenir a degradação das interfaces de união à dentina depois de 1 ano de armazenamento em água, quando comparados com o adesivo livre de cobre utilizado no grupo controle. As interfaces de união à dentina produzidas com o adesivo controle mostraram reduções de RU de aproximadamente 23% e aumentos de NI de 70% após 1 ano de armazenamento de água. Estes resultados são explicados pela atividade das collagenolíticas e gelatinolíticas da dentina parcialmente desmineralizada após a aplicação de adesivos convencionais (Mazzoni et al. ⁴² 2006) devido ao ativação de MMPs (Mazzoni et al. ⁴² 2006; Nishitani et al. ⁴³ 2006; Mazzoni et al. ⁹⁴ 2012) e o papel complementar das CTs na degradação do colágeno (Vidal et

al.³⁷ 2014; Tersariol et al.⁹⁵ 2010; Nascimento et al.⁹⁶ 2011). Isto é responsável pela auto-degradação das fibrilas de colágeno parcialmente infiltradas (Pashley et al.³² 2004) e a reduções da resistência de união ao longo do tempo. Além disso, verificou-se um aumento significativo da resistência de união a microtração no grupo do adesivo com cobre em concentrações de 0,1 e de 0,5%, e uma diminuição da nanoinfiltração no grupo do adesivo com cobre em concentrações de 0,1; 0,5 e 1%, no tempo imediato, quando comparadas com o controle. Também, não foi observado decréscimo significativo de RU nem aumento significativo de NI, após 1 ano, nos adesivos contendo cobre (Tabelas 9 e 10).

Esses resultados podem ser explicados pela literatura de duas maneiras. A primeira indica que o cobre tem capacidade de inibição especificamente para MMP-2 (de Souza et al.⁹⁷ 2000), presente na dentina. Porém, estes resultados podem ser controversos, já que existem estudos que mostram que o cobre, utilizado como complexo de cobre-tripeptídeo, poderia, pelo contrário, aumentar os níveis de MMP-2, (Simeon et al.⁹⁸ 1999; Simeon et al.⁹⁹ 2000). Por outro lado, esses estudos também mencionam que o complexo de cobre-tripeptídeo poderia aumentar a secreção de inibidores tissulares de MMPs, especificamente TIMP-1 e TIMP-2, que vão inibir preferentemente a MMP-9 e MMP-2, respectivamente (Simeon et al.⁹⁹ 2000).

Por outro lado, tem estudos que indicam que o cobre pode aumentar a resistência da rede de colágeno, devido a que a enzima reticuladora de colágeno, a lisila-oxidase (LOX), é cobre dependente, tendo assim o cobre um efeito indireto como agente reticulador (*cross-linker*) (Marelli et al.¹⁰⁰ 2015; Rucker et al.¹⁰¹ 1998). Isto poderia ajudar a aumentar a resistência do colágeno e deixá-lo menos susceptível aos efeitos das enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases (MMPs) e catepsinas cisteína (CTs).

Com relação a isso, são necessários novos estudos que avaliem também o efeito das nanopartículas de cobre sobre essas enzimas, para verificar se existe algum efeito de inibição quando são incorporadas em um sistema adesivo.

6. CONCLUSÃO

A adição de nanopartículas de cobre em concentrações de 0,0075 até 0,5% no sistema adesivo convencional simplificado Ambar pode ser uma alternativa para adicionar atividade antimicrobiana contra *S. mutans*, assim como também aumentar a estabilidade a longo prazo das interfaces resina-dentina, sem comprometer as propriedades mecânicas dos adesivos.

REFERÊNCIAS

1. Christensen GJ. Should resin-based composite dominate restorative dentistry today? *Journal of the American Dental Association* (1939). 2010; Dec;141(12):1490-3.
2. Lynch CD, Opdam NJ, Hickel R, Brunton PA, Gurgan S, Kakaboura A, et al. Guidance on posterior resin composites: Academy of Operative Dentistry - European Section. *Journal of dentistry*. 2014; Apr;42(4):377-83.
3. Rasines Alcaraz MG, Veitz-Keenan A, Sahrman P, Schmidlin PR, Davis D, Iheozor-Ejiofor Z. Direct composite resin fillings versus amalgam fillings for permanent or adult posterior teeth. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014;3:Cd005620.
4. Moraschini V, Fai CK, Alto RM, Dos Santos GO. Amalgam and resin composite longevity of posterior restorations: A systematic review and meta-analysis. *Journal of dentistry*. 2015; Sep;43(9):1043-50.
5. Brunthaler A, König F, Lucas T, Sperr W, Schedle A. Longevity of direct resin composite restorations in posterior teeth. *Clinical oral investigations*. 2003; Jun;7(2):63-70.
6. da Rosa Rodolpho PA, Cenci MS, Donassollo TA, Loguercio AD, Demarco FF. A clinical evaluation of posterior composite restorations: 17-year findings. *Journal of dentistry*. 2006; Aug;34(7):427-35.
7. Da Rosa Rodolpho PA, Donassollo TA, Cenci MS, Loguercio AD, Moraes RR, Bronkhorst EM, et al. 22-Year clinical evaluation of the performance of two posterior composites with different filler characteristics. *Dental materials*. 2011; Oct;27(10):955-63.
8. Opdam NJ, van de Sande FH, Bronkhorst E, Cenci MS, Bottenberg P, Pallesen U, et al. Longevity of Posterior Composite Restorations: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of dental research*. 2014; Jul 21.
9. Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2005; Sep;21(9):864-81.
10. Heintze SD, Ruffieux C, Rousson V. Clinical performance of cervical restorations--a meta-analysis. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2010; Oct;26(10):993-1000.
11. Jokstad A, Bayne S, Blunck U, Tyas M, Wilson N. Quality of dental restorations. FDI Commission Project 2-95. *Int Dent J*. 2001;51(3):117-58.
12. Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, et al. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng*. 2010; Jun;38(6):1989-2003.
13. Elderton R. Restorations without conventional cavity preparations. *International dental journal*. 1988;38(2):112-8.
14. Bernardo M, Luis H, Martin M, Leroux B, Rue T, Leitão J, et al. Survival and reasons for failure of amalgam versus composite posterior restorations placed in a randomized clinical trial. *Journal of american dental association*. 2007;138(6):775-83.
15. Opdam NJ, Bronkhorst EM, Loomans BA, Huysmans MC. 12-year survival of composite vs. amalgam restorations. *Journal of dental research*. 2010; Oct;89(10):1063-7.
16. Beyth N, Domb AJ, Weiss EI. An in vitro quantitative antibacterial analysis of amalgam and composite resins. *Journal of dentistry*. 2007; Mar;35(3):201-6.

17. Deligeorgi V, Mjör I, Wilson N. An overview of reasons for the placement and replacement of restorations. *Prim Dent Care*. 2001;8(1):5-11.
18. Featherstone JD. The Continuum of Dental Caries--Evidence for a Dynamic Disease Process. *Journal of dental research*. 2004;83(suppl 1):C39-C42.
19. Sakaguchi RL. Review of the current status and challenges for dental posterior restorative composites: clinical, chemistry, and physical behavior considerations. *Dental materials*. 2005; Jan;21(1):3-6.
20. ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*. 2006; Sep;94(1):1-9.
21. Demarco FF, Correa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJ. Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. *Dental materials*. 2012; Jan;28(1):87-101.
22. Perdigao J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *Journal of esthetic and restorative dentistry*. 2013; Aug;25(4):219-41.
23. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. *Dental materials*. 2013; Oct;29(10):999-1011.
24. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *Journal of biomedical materials research*. 1982;16(3):265-73.
25. Liu Y, Tjaderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in Bonding to Dentin and Experimental Strategies to Prevent Bond Degradation. *Journal of dental research*. 2011;90(8):953-68.
26. Sano H. Microtensile Testing, Nanoleakage, and Biodegradation of Resin-Dentin Bonds. *Journal of dental research*. 2006;85(1):11-4.
27. Reis A, Carrilho M, Breschi L, Loguercio AD. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. *Operative dentistry*. 2013; Jul-Aug;38(4):E1-e25.
28. Tjäderhane L, Carrilho M, Breschi L, Tay F, Pashley D. Dentin basic structure and composition—an overview. *Endodontic topics*. 2012;20(1):3-29.
29. Spencer P, Swafford JR. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. *Quintessence Int*. 1999; Jul;30(7):501-7.
30. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res*. 2002; Jan;59(1):46-55.
31. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *Journal of dental research*. 2003; Feb;82(2):141-5.
32. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen Degradation by Host-derived Enzymes during Aging. *Journal of dental research*. 2004;83(3):216-21.
33. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The Activation and Function of Host Matrix Metalloproteinases in Dentin Matrix Breakdown in Caries Lesions. *Journal of dental research*. 1998;77(8):1622-9.
34. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The Effects of MMP Inhibitors on Human Salivary MMP Activity and Caries Progression in Rats. *Journal of dental research*. 2001;80(6):1545-9.
35. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L. The Localization of Matrix Metalloproteinase-20 (MMP-20, Enamelysin) in Mature Human Teeth. *Journal of dental research*. 2002;81(9):603-7.

36. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldini S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dental materials*. 2013; Jan;29(1):116-35.
37. Vidal CM, Tjaderhane L, Scaffa PM, Tersariol IL, Pashley D, Nader HB, et al. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. *Journal of dental research*. 2014; Mar;93(3):269-74.
38. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2007; Mar 15;15(6):2223-68.
39. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*. 2003; May 2;92(8):827-39.
40. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjaderhane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2009; Jul;90(1):373-80.
41. Collares FM, Rodrigues SB, Leitune VC, Celeste RK, Borba de Araujo F, Samuel SM. Chlorhexidine application in adhesive procedures: a meta-regression analysis. *Journal of adhesive dentistry*. 2013; Feb;15(1):11-8.
42. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjaderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*. 2006; Sep;27(25):4470-6.
43. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(2):160-6.
44. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *International endodontic journal*. 2009; Apr;42(4):288-302.
45. Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dental materials*. 2010; Aug;26(8):779-85.
46. Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *Journal of dental research*. 2012; Apr;91(4):420-5.
47. Du X, Huang X, Huang C, Wang Y, Zhang Y. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive. *Journal of dentistry*. 2012; Jun;40(6):485-92.
48. Yun JH, Pang EK, Kim CS, Yoo YJ, Cho KS, Chai JK, et al. Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. *Journal of periodontal research*. 2004; Oct;39(5):300-7.
49. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dental materials*. 2010; Jun;26(6):571-8.
50. Stanislawczuk R, Costa JA, Polli LG, Reis A, Loguercio AD. Effect of tetracycline on the bond performance of etch-and-rinse adhesives to dentin. *Brazilian oral research*. 2011;25(5):459-65.
51. Donmez N, Belli S, Pashley DH, Tay FR. Ultrastructural Correlates of in vivo/in vitro Bond Degradation in Self-etch Adhesives. *Journal of dental research*. 2005;84(4):355-9.

52. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Uchiyama T, Imazato S, Mutluay MM, Cadenaro M, et al. The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs. *Journal of dental research*. 2011; Apr;90(4):535-40.
53. Jacques P, Hebling J. Effect of dentin conditioners on the microtensile bond strength of a conventional and a self-etching primer adhesive system. *Dental materials*. 2005; Feb;21(2):103-9.
54. Sauro S, Mannocci F, Toledano M, Osorio R, Pashley DH, Watson TF. EDTA or H3PO4/NaOCl dentine treatments may increase hybrid layers' resistance to degradation: a microtensile bond strength and confocal-micropermeability study. *Journal of dentistry*. 2009; Apr;37(4):279-88.
55. Melo MA, Cheng L, Zhang K, Weir MD, Rodrigues LK, Xu HH. Novel dental adhesives containing nanoparticles of silver and amorphous calcium phosphate. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2013; Feb;29(2):199-210.
56. Zhang K, Melo MA, Cheng L, Weir MD, Bai Y, Xu HH. Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2012; Aug;28(8):842-52.
57. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2007; Mar;3(1):95-101.
58. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*. 2009; Jan-Feb;27(1):76-83.
59. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*. 2004; Jul 1;275(1):177-82.
60. Ingle AP, Duran N, Rai M. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014; Feb;98(3):1001-9.
61. Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta biomaterialia*. 2008; May;4(3):707-16.
62. Thneibat A, Fontana M, Cochran MA, Gonzalez-Cabezas C, Moore BK, Matis BA, et al. Anticariogenic and antibacterial properties of a copper varnish using an in vitro microbial caries model. *Operative dentistry*. 2008; Mar-Apr;33(2):142-8.
63. Usman MS, El Zowalaty ME, Shameli K, Zainuddin N, Salama M, Ibrahim NA. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4467-79.
64. Argueta-Figueroa L, Scougall-Vilchis RJ, Morales-Luckie RA, Olea-Mejia OF. An evaluation of the antibacterial properties and shear bond strength of copper nanoparticles as a nanofiller in orthodontic adhesive. *Aust Orthod J*. 2015; May;31(1):42-8.
65. Sabatini C, Mennito AS, Wolf BJ, Pashley DH, Renne WG. Incorporation of bactericidal poly-acrylic acid modified copper iodide particles into adhesive resins. *Journal of dentistry*. 2015; May;43(5):546-55.
66. Yoon KY, Hoon Byeon J, Park JH, Hwang J. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *The Science of the total environment*. 2007; Feb 15;373(2-3):572-5.

67. Usman MS, Ibrahim NA, Shameli K, Zainuddin N, Yunus WM. Copper nanoparticles mediated by chitosan: synthesis and characterization via chemical methods. *Molecules*. 2012;17(12):14928-36.
68. Bottino MC, Kamocki K, Yassen GH, Platt JA, Vail MM, Ehrlich Y, et al. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *Journal of dental research*. 2013; Nov;92(11):963-9.
69. Feitosa SA, Palasuk J, Kamocki K, Geraldini S, Gregory RL, Platt JA, et al. Doxycycline-encapsulated nanotube-modified dentin adhesives. *Journal of dental research*. 2014; Dec;93(12):1270-6.
70. Gregson KS, Shih H, Gregory RL. The impact of three strains of oral bacteria on the surface and mechanical properties of a dental resin material. *Clin Oral Investig*. 2012; Aug;16(4):1095-103.
71. Huang R, Li M, Gregory RL. Effect of nicotine on growth and metabolism of *Streptococcus mutans*. *Eur J Oral Sci*. 2012; Aug;120(4):319-25.
72. Stanislawczuk R, Pereira F, Munoz MA, Luque I, Farago PV, Reis A, et al. Effects of chlorhexidine-containing adhesives on the durability of resin-dentine interfaces. *Journal of dentistry*. 2014; Jan;42(1):39-47.
73. Stanislawczuk R, Reis A, Malaquias P, Pereira F, Farago PV, Meier MM, et al. Mechanical properties and modeling of drug release from chlorhexidine-containing etch-and-rinse adhesives. *Dental materials*. 2014; Apr;30(4):392-9.
74. International Standard Organization 4049. Dentistry: resin based dental fillings. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2000.
75. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials*. 2005; Nov;26(33):6449-59.
76. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2006; Oct;22(10):973-80.
77. Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Influence of water-storage time on the sorption and solubility behavior of current adhesives and primer/adhesive mixtures. *Operative dentistry*. 2007; Jan-Feb;32(1):53-9.
78. Siepmann J, Peppas NA. Mathematical modeling of controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; Jun 11;48(2-3):137-8.
79. Siepmann J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; Jun 11;48(2-3):139-57.
80. Perdigão J, Geraldini S, Carmo AR, Dutra HR. In vivo influence of residual moisture on microtensile bond strengths of one-bottle adhesives. *Journal of esthetic and restorative dentistry*. 2002;14(1):31-8.
81. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *Journal of dentistry*. 2002;30(7-8):371-82.
82. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012; Jul;9(7):671-5.
83. Hashimoto M, Sasaki JI, Yamaguchi S, Kawai K, Kawakami H, Iwasaki Y, et al. Gold Nanoparticles Inhibit Matrix Metalloproteases without Cytotoxicity. *Journal of dental research*. 2015; Jun 3.
84. Argueta-Figueroa L, Morales-Luckie RA, Scougall-Vilchis RJ, Olea-Mejía OF. Synthesis, characterization and antibacterial activity of copper, nickel and bimetallic Cu–Ni nanoparticles for potential use in dental materials. *Prog Nat Sci*. 2014;24(4):321-8.

85. Durán N, Marcato PD, Conti RD, Alves OL, Costa FTM, Brocchi M. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2010;21:949-59.
86. Prabhu BM, Ali SF, Murdock RC, Hussain SM, Srivatsan M. Copper nanoparticles exert size and concentration dependent toxicity on somatosensory neurons of rat. *Nanotoxicology*. 2010; Jun 1;4(2):150-60.
87. Schrand AM, Rahman MF, Hussain SM, Schlager JJ, Smith DA, Syed AF. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010; Sep-Oct;2(5):544-68.
88. Ren G, Hu D, Cheng EW, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International journal of antimicrobial agents*. 2009; Jun;33(6):587-90.
89. Kim JH, Cho H, Ryu SE, Choi MU. Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu²⁺ ion. *Arch Biochem Biophys*. 2000; Oct 1;382(1):72-80.
90. Sabella S, Carney RP, Brunetti V, Malvindi MA, Al-Juffali N, Vecchio G, et al. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*. 2014; Jun 21;6(12):7052-61.
91. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*. 2007; Sep;28(26):3757-85.
92. Fabre HS, Fabre S, Cefaly DF, de Oliveira Carrilho MR, Garcia FC, Wang L. Water sorption and solubility of dentin bonding agents light-cured with different light sources. *Journal of dentistry*. 2007; Mar;35(3):253-8.
93. Manadas R, Pina ME, Veiga F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2002;38:375-99.
94. Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjaderhane L, et al. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *Journal of dental research*. 2012; May;91(5):467-72.
95. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Paakkonen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *Journal of endodontics*. 2010; Mar;36(3):475-81.
96. Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *Journal of dental research*. 2011; Apr;90(4):506-11.
97. de Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2000; Mar;16(2):103-8.
98. Simeon A, Monier F, Emonard H, Gillery P, Birembaut P, Hornebeck W, et al. Expression and activation of matrix metalloproteinases in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺. *J Invest Dermatol*. 1999; Jun;112(6):957-64.
99. Simeon A, Emonard H, Hornebeck W, Maquart FX. The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci*. 2000; Sep 22;67(18):2257-65.
100. Marelli B, Le Nihouannen D, Hacking SA, Tran S, Li J, Murshed M, et al. Newly identified interfibrillar collagen crosslinking suppresses cell proliferation and remodelling. *Biomaterials*. 2015; Jun;54:126-35.

101. Rucker RB, Kosonen T, Clegg MS, Mitchell AE, Rucker BR, Uriu-Hare JY, et al. Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am J Clin Nutr.* 1998; May;67(5 Suppl):996s-1002s.

**ANEXO A – Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da
Universidade Estadual de Ponta Grossa (COEP / UEPG)**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da inclusão de nanopartículas de cobre em sistemas adesivos convencionais.

Pesquisador: Paulo Vitor Farago

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 44731915.3.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.065.446

Data da Relatoria: 28/05/2015

Apresentação do Projeto:

Reincidência de cárie adjacentes às margens é a biodegradação das interfaces adesivas tem sido o foco de estudos recentes. Para tentar resolver esses problemas, tem sido incorporados antimicrobianos e inibidores de MMPs e CTs, ao protocolo adesivo ou aos adesivos. Alguns autores recentemente estudaram a incorporação de nanopartículas de prata (NAg) em adesivos dentinários, mas a incorporação de nanopartículas de cobre não tem sido estudada.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a inclusão de nanopartículas de cobre, variando a concentração, em diferentes sistemas adesivos como forma de possibilitar uma maior durabilidade das restaurações adesivas.

Objetivo Secundário:

Avaliar a inclusão de nanopartículas de cobre sobre a resistência máxima à tração (RT) dos adesivos.

Avaliar a inclusão de nanopartículas de cobre

sobre a solubilidade (SO) dos adesivos. Avaliar a inclusão de nanopartículas de cobre sobre a

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 100.

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 1.065.446

sorção de água (SA) dos adesivos. Avaliar a inclusão de nanopartículas de cobre sobre a resistência de união à microtração (RU) da interfase resina-dentina. Avaliar a inclusão de nanopartículas de cobre sobre a nanoinfiltração (NI) da interfase resina-dentina. Avaliar a inclusão de nanopartículas de cobre sobre o grau de conversão (GC) do adesivo na interfase resina-dentina

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não apresenta riscos para os pesquisadores.

Benefícios:

Os Benefícios para a ciência serão o possível desenvolvimento de um adesivo que poderia ser usado para manter a estabilidade da camada híbrida na interfase resina-dentina. Aquele adesivo representa uma contribuição social e científica na área de Materiais Dentários e Cariologia

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O objetivo deste estudo será avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de cobre, em diferentes concentrações, em

diferentes sistemas adesivos convencionais, nas propriedades de resistência máxima à tração (RT), sorção de água (SA), solubilidade (SO),

resistência de união à microtração (RU), nanoinfiltração (NI) e grau de conversão (GC). As nanopartículas serão incluídas nos sistemas adesivos

Ambar [AM] (FGM) e Single Bond Universal [SBU] (3M). Para RT (n = 8 para cada grupo), as amostras de adesivo serão construídas numa matriz

metálica em forma de ampulheta. Metade das amostras serão testadas depois de 24 horas e após 6, 12 e 18 meses de armazenamento em água.

Para SA e SO (n = 7 para cada grupo), discos de adesivos serão preparados em uma matriz metálica. Após a desidratação, os espécimes serão

pesados e armazenados em água destilada para avaliação da SA, SO e liberação cumulativa de cobre.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Falta a carta de doação dos dentes molares no banco de dentes

Necessário definir o número real de dentes molares a serem utilizados

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 100.

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 1.065.446

Recomendações:

De acordo com as considerações dos termos obrigatórios

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendencia de acordo com a falta a carta de doação dos dentes molares no banco de dentes

Necessário definir o numero real de dentes molares a serem utilizados

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PONTA GROSSA, 15 de Maio de 2015

Assinado por:
ULISSES COELHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 100.

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br

