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

CARLOS ANDRÉS DÁVILA SÁNCHEZ

EFEITO DA APLICAÇÃO DE *PRIMERS* EXPERIMENTAIS À BASE DE FLAVONOIDES NAS PROPRIEDADES ADESIVAS E MECÂNICAS DA DENTINA HÍGIDA E AFETADA POR CÁRIE.

PONTA GROSSA
2017

CARLOS ANDRÉS DÁVILA SÁNCHEZ

EFEITO DA APLICAÇÃO DE *PRIMERS* EXPERIMENTAIS À BASE DE FLAVONOIDES NAS PROPRIEDADES ADESIVAS E MECÂNICAS DA DENTINA HÍGIDA E AFETADA POR CÁRIE

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor na Universidade Estadual de Ponta Grossa no Curso de Doutorado em Odontologia – Área de concentração em Dentística Restauradora.

Orientador Prof. Dr. Cesar Augusto Galvão Arrais
Coorientador Prof. Dr. Alessandro Loguercio

PONTA GROSSA
2017

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

Sánchez, Carlos Andrés Dávila
S211e Efeito da aplicação de primers experimentais à base de flavonoides nas propriedades adesivas e mecânicas da dentina hígida e afetada por cárie/ Carlos Andrés Dávila Sánchez. Ponta Grossa, 2017.
138f.

Tese (Doutorado em Odontologia - Área de Concentração: Dentística Restauradora), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Galvão Arrais.
Coorientador: Prof. Dr. Alessandro Loguercio.

1.Adesivos dentais. 2.Resistência de união. 3.Flavonoides. I.Arrais, Cesar Augusto Galvão. II. Loguercio, Alessandro. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Doutorado em Odontologia. IV. T.

CDD: 617.6

CARLOS ANDRÉS DÁVILA SÁNCHEZ

Efeito da aplicação de primers experimentais à base de flavonoides nas propriedades adesivas e mecânicas de dentina hígida e afetada por cárie.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Dentística Restauradora, Linha de Pesquisa em Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais.

Ponta Grossa, 07 de dezembro de 2017

Prof. Dr. Eduardo Maximiliano Fernandez Godoy
Universidade do Chile

Prof. Dr. Rodrigo Stanislawczuk Grande
Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais

Profª. Drª. Ana Cláudia Rodrigues Chibinski
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. João Carlos Gomes
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. César Augusto Galvão Arrais
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dedicatória:

A todas as pessoas que tem me apoiado ao longo desta extensa caminhada, principalmente a minha família, os colaboradores deste trabalho e a minha futura esposa Fernanda.

Agradecimentos especiais :

Aos **Budas**, pelos seus ensinamentos e suas bênçãos durante esta etapa da minha vida. Que todo este trabalho possa aportar um pequeno grão de areia para benefício de todos os seres.

Aos meus mestres espirituais e Gurús, **Venerável Gueshe Tenzin Tamding** e **Sua Eminência Nyari Tritul Rimpoché**. Os seus ensinamentos de Dharma, transmitidos através dos nossos queridos amigos **Verónica** e **Manuel,** tem me ajudado a me tornar uma melhor pessoa, ser mais feliz, e a enfrentar as adversidades com mais tranquilidade e melhor vontade. O meu agradecimento eterno a cada um de vocês.

À minha noiva, amiga, parceira e futura esposa **Fernanda Copla Schimalesky**. Obrigado pelo amor incondicional, pela paciência e por ser a minha motivação para não desistir e seguir em frente, dando sempre o melhor de mim para te ver feliz. Meus agradecimentos a sua família que tem me acolhido como um filho mais desde o primeiro dia: Sr. **Valmir**, Sra. **Carla**, e **Bia**. Obrigado!

À minha família, meu pai **Ramiro** pela ajuda e apoio para poder realizar meus estudos. Aos meus irmãos **Rami, Ceci, Isa e Cris** pelo apoio, ânimo e bons desejos que sempre tiveram para que concluísse esta etapa. Que sempre possa compartilhar com vocês os frutos deste logro. O brilho da memória da minha mãe **Maria de las Mercedes** permanece em vocês.

Ao meu orientador e mestre, **Prof. Cesar Arrais**, obrigado por me guiar em cada passo para tornar este projeto realidade. Obrigado por me motivar a desenvolver as minhas ideias e me fazer acreditar no meu potencial. Admiro muito seu trabalho e o seu profissionalismo. Hoje sinto que sou um melhor profissional graças aos seus ensinamentos e exemplo de verdadeiro mestre.

Aos meus amigos e família em Ponta Grossa, **Andrés Montenegro**, **Camilo Pulido**, **Jorge Bermudez "Pailo", Felipe Gutierrez**, **Luisa Alegría**, e **Luján Méndez** (a caçulinha). Ao meu orientado de iniciação **Fagner Kiratcz** e meu

amigo **Dair Ditzel**. Graças ao seu carinho, amizade e ajuda posso hoje dedicar estas palavras a vocês. Sempre lembrarei dos momentos juntos aqui.

Aos mestres que contribuíram na minha formação profissional, em especial ao **Prof. Alessandro Loguercio**, que tem me acompanhado em todas as minhas etapas de formação durante o mestrado, especialização e agora doutorado. Obrigado de coração por todos os seus ensinamentos, ajuda e oportunidades para crescer como pessoa e como profissional.

Aos Professores **João Carlos Gomes** e **Osnara Mongruel Gomes**. A sua mente visionaria permitiu que pessoas como eu possamos vir de longe e receber educação de qualidade nesta querida "*alma máter*" a **Universidade Estadual de Ponta Grossa,** que sempre levarei no meu coração.

A todos os professores, que com carinho e paciência contribuíram na minha formação profissional desde a graduação até hoje. Aos professores **Adrian Albujas**, **Alessandra Reis**, **Paulo Vitor Farago**, **Cristian Higashi**, **Carlos Kose**, **Abraham Calixto**. Muito obrigado por tudo! Somos o reflexo das pessoas que nos ajudaram a ser melhores.

Aos **funcionários da UEPG**, as **tia Cleia** e todas as **tias do RU**. As tias da **Esterilização** , da **limpeza**, do **Banco de Dentes Humano**, **Almoxarifado**, a nossa querida secretaria da pós **Bianca Teleska** e todos os que possa ter esquecido de citar agora. Obrigado pelo seu trabalho que é fundamental para que nós possamos focar o nosso esforço no nosso trabalho.

Ao **Brasil**, pais em que nasci e que por coisas da vida não posso "legalmente" dizer que sou, mas que o levo no meu coração e sou infinitamente grato por ter voltado e estudado aqui, sempre foi meu sonho. Obrigado por ter me recebido mais uma vez com braços abertos. Aproveito para agradecer também a **Ponta Grossa** meu segundo lar. Cidade que me abriu as portas e da qual me sinto parte, pontagrossense!

Todos vocês, **mestres**, tem me ajudado a entender e aplicar os valores da ciência, alguns aplicáveis na vida diária também. A todos vocês, mais uma vez OBRIGADO!

*"a. **Questione** a autoridade. Nenhuma **ideia** é **verdadeira** só porque alguém disse. Inclusive **eu***

*b**. Pense** por **s**i **mesmo***

*c**. Questione-se***

*d. **Não acredite** em nada só porque você quer. Acreditar em algo, não faz com que **seja verdade***

*e. **Teste** ideias pela prova obtida após observação e experimentação. Se uma ideia preferida não passar por um teste bem elaborado, está errada! **Esqueça**. **Siga a evidência**, onde quer que ela o leve. Se não houver evidência, não julgue.*

*Finalmente e talvez o mais importante: **Lembre-se, você pode estar errado**.*
Até os melhores cientistas já erraram em algumas coisas. Newton, Einstein, e todos os outros grandes cientistas da historia, todos cometeram erros. Mas é claro, eles eram humanos! A ciência é um jeito de não enganarmos a nós mesmos, e aos outros.

Estes valores sabotam os apelos do fanatismo e da ignorância!"

"Sea que entendamos ideas profundas o no, lo importante es que seamos buenas personas donde quiera que estemos"

S.S. Dalai Lama

DADOS CURRICULARES

Carlos Andrés Dávila Sánchez

NASCIMENTO 25.01.1985	Brasília – Distrito Federal
FILIAÇÃO	Maria de las Mercedes Sánchez Cobo Ramiro Dávila Grijalva
2003 – 2009	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.
2009 – 2010	Curso de Aperfeiçoamento em Operatória Dental e Estética- Universidade Nacional Experimental Rómulo Gallegos (UNERG) Lara, Venezuela
2011-Em Andamento	Professor do Departamento de Operatória Dental e Biomateriais da Universidade São Francisco de Quito (USFQ) – Quito - Equador
2012-2014	Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) - nível de Mestrado – Área de Concentração em Dentística Restauradora. Ponta Grossa – PR –Brasil
2014-2016	Curso de Especialização em Dentística com Ênfase em Estética. Associação Brasileira de Odontologia (ABO). Ponta Grossa – PR –Brasil

2014-2017	Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) - nível de Doutorado – Área de Concentração em Dentística Restauradora. Ponta Grossa – PR –Brasil.

.

RESUMO

DÁVILA-SÁNCHEZ CA. Efeito da aplicação de *primers* experimentais à base de flavonoides sobre as propriedades adesivas e mecânicas de dentina hígida e afetada por cárie**.** Tese – Doutorado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2017.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação de *primers* experimentais à base de flavonoides na resistência de união, nanodureza, módulo de elasticidade e micromorfologia da interface adesiva criada em dentina hígida e dentina afetada por cárie utilizando um adesivo universal aplicado em modo convencional. Superfícies planas de dentina foram expostas em 182 molares permanentes. Noventa e um molares foram armazenados em água, enquanto os outros 91 foram imersos em uma solução de BHI/Sacarose (pH 4.0) e cepas de *Streptococcus mutans* por 14 dias para induzir lesões artificiais de cárie em dentina. Quarenta e nove dentes foram aleatoriamente alocados em 7 grupos (n=7) de acordo com o *primer* experimental usado em cada tipo de substrato (hígido ou afetado por cárie): Controle, sem aplicação de primer (CON), Placebo solução hidroalcoólica com tensoativo (PLA), Proantocinidina (PRO), Quercetina (QER), Naringina (NAR), Rutina (RUT), e Hesperidina (HES). Após o condicionamento, lavagem e secagem das superfícies de dentina, os *primers* foram ativamente aplicados por 1 min para reumedecer a dentina. Após serem restaurados, os espécimes foram seccionados no seu longo eixo até obter palitos retangulares (0,9 mm^2) que foram testados em tração com velocidade de 1 mm/min, tanto após 24 h quanto após 25.000 ciclos em uma máquina de ciclagem térmica (5 ºC / 55 ºC). Para os testes de nanodureza e módulo de elasticidade (n=3), os espécimes foram cortados longitudinalmente até obter duas fatias planas (1,2 mm) e foram analisados em um nanoindentador com uma ponta Berkovich tanto após 24 h quanto após 25.000 ciclos térmicos. Para a análise qualitativa de microinfiltração, 21 dentes (n=3) assistida por corantes em Microscópio confocal (CSLM), o adesivo e a resina composta foram misturados com 0,2% de Rhodamina B (massa) antes dos procedimentos restauradores e duas fatias planas foram obtidas para análise após 24 h e 25.000 ciclos térmicos. As fatias foram imersas em uma solução de Fluoresceína (0,1%) por 4 horas. Quatro imagens da interface adesiva de cada dente foram obtidas em cada momento experimental (24 h ou 25.000 ciclos) a 5 e 10 µm de profundidade. Os resultados foram analisados usando uma análise de variância de medidas repetidas e pós-teste de Bonferroni (α = 0,05). **Resultados:** Os grupos PLA e RUT mostraram os valores mais altos de µTBS em dentina hígida em ambos intervalos (p > 0,05). Na dentina afetada por cárie os grupos RUT e NAR apresentaram os valores mais altos em ambos intervalos. As imagens de CSLM mostraram sinais de infiltração em todos os grupos. PLA, RUT, NAR e PRO mostraram áreas sem infiltração em ambos intervalos e tipo de substrato. As nanopropriedades foram influenciadas pelos grupos experimentais em profundidade dependendo do flavonoide usado. **Conclusão**: O uso de flavonoides poderia ser uma alternativa terapêutica em dentina hígida e afetada por cárie para melhorar as propriedades e longevidade da interface adesiva.

Palavras-chave: Adesivos Dentais. Resistência de União. Flavonoides

ABSTRACT

DÁVILA-SÁNCHEZ CA Effect of the application of experimental flavonoid-primers over the adhesive and mechanical properties of sound and artificially-induced caries-affected dentin. Tese - Doutorado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2017.

The aim of this study was to evaluate the effect of experimental flavonoid primers on bond strength, nanohardness, elastic modulus, and micromorphology of bonding interfaces created on sound and caries-affected dentin using one commercially available universal bonding agent applied in the etch-and-rinse mode. Flat midcoronal dentin surfaces were exposed in 182 permanent molars. Ninety-one molars were stored in water while the other 91 molars were kept in a BHI/Sucrose solution (pH 4.0) with *Streptococcus mutans* strain for 14 days to induce artificial caries-affected dentin. Forty-nine teeth were randomly assigned to 7 groups (n=7) according to the experimental primer applied to each dentin surface condition (sound or caries-affected dentin): Control, in which no primer was applied (CON), Hydroalcoholic solution with surfactant Placebo (PLA), Proanthocianidin (PRO), Quercetin (QER), Naringin (NAR), Rutin (RUT) and Hesperidin (HES). After etching, rinse and drying the dentin surfaces, the primers were actively applied for 1 min to rewet the dentin surface. After bonding and restorative procedures, specimens were sectioned in the long axis to obtain rectangular sticks (0.9 mm^2) that were subjected to microtensile tests (μTBS) at a crosshead speed of 1 mm/min, either 24 h or after 25.000 cycles in a thermocycling machine (5ºC / 55ºC). For nanohardness and elastic modulus (n=3), the specimens were longitudinally sectioned to obtain 2 flat silces (1,2 mm) and were analyzed in a nanohardness device with a Berkovich indenter either after 24 h or after 25.000 (5 ºC / 55 ºC) thermal cycles. For the dye assisted microinfiltration qualitative analysis 21 teeth (n=3) was performed with a Confocal Scanning Laser Microscope (CSLM), both adhesive system and resin composite were mixed with 0.2% (weight) Rhodamine B prior to the restorative procedure and two flat slices were obtained for analysis in 24 h and after 25.000 thermal cycles. The bonding interfaces were immersed in a 0,1%. Fluorescein solution for 4 hours. Four images of bonding interface per specimen where obtained in each experimental time (24 h and 25.000 cycles) at 5 and 10 μm depth. The data were analyzed using two-way repeated measures ANOVA and Bonferroni post-hoc test (α = 0.05). **Results**. PLA and RUT showed the highest μTBS values in sound teeth at both intervals (24h and ageing) (p>0.05), while RUT and NAR showed the highest μTBS values in carious teeth in both stages. CLSM analysis showed signs of microinfiltration for all groups. PLA, RUT, NAR and PRO showed areas of no infiltration in both experiments and intervals. Nanomechanical properties were influenced by experimental groups in deep, dependending on the flavonoid used. **Conclusion:** The use of flavonoids may be an alternative for therapeutic substances in sound or carious dentin to improve their properties and longevity in the adhesive interphase.

Keywords: Dental Adhesives. Bond Strength. Flavonoids

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação ilustrativa da distribuição dos espécimes em cada um dos experimentos realizados neste estudo. 59

Figura 2. Moléculas utilizadas neste estudo. Proantocianidina (A), Hesperidina (B), Quercetina (C), Rutina (D), Naringina (E); SPAN 20 (F) 64

Figura 3. Imagem representativa da captura de imagem nos canais dos lasers do CSLM. A. Excitação do Laser 488 (Fluoresceína), B. Excitaçao do laser 552 (Rhodamina), C. Superposição de Imagens A+B. 69

Figura 4. Imagem representativa da microinfiltração na base da camada híbrida após 24 h nos grupos CONH, QER e HES. Indicador: Infiltração de fluoresceína na base da camada híbrida. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D). 79

Figura 5. Imagem representativa da microinfiltração observada nos grupos RUT, PLA, PRO e NAR. Indicador: camada híbrida sem sinal de infiltração. Flechas: infiltração da fluoresceína apenas até a base dos tags. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D). 79

Figura 6. Imagem representativa de CSLM da microinfiltração observada no grupo CONH (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 μm), após ciclagem térmica de 25.000 ciclos. Indicador: Infiltração na CH e na base da camada de A. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D). 80

Figura 7. Imagem representativa de CSLM (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 μm). da microinfiltração observada nos grupos QER e HES após ciclagem térmica de 25.000 ciclos. Indicador: infiltração de adesivo na base da CH. Setas: infiltração até os tags de adesivo. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D). 80

Figura 8. Imagem representativa de CSLM da microinfiltração observada nos grupos RUT, PRO, PLA após ciclagem térmica de 25.000 ciclos (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 μm). Indicador: infiltração de adesivo na base da CH. Setas: infiltração até os tags de adesivo Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D). 81

Figura 9. Imagem representativa de CSLM (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 5 μm) do padrão de formação de CH observada nos grupos experimentais cariados. Indicador: Ausência de interação do adesivo na interfase. Setas: presencia de tags de adesivo. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D). 92

Figura 10. Imagens representativas de CSLM (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 μm). do padrão de formação de CH menos observado. Superior: Imagem com a superposição dos canais 488 e 552. Inferior: Imagem apenas do canal 552 para mostrar a infiltração do adesivo na dentina porosa formando uma CH mais espessa. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D). 93

Figura 11. Imagens comparativas dos grupos experimentais (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 µm). 1 Grupo CONC, 2 Grupo RUT. 3 Grupo PRO. 4 grupo HES. Indicador: Formação de bolhas generalizada no grupo CONC. Menor quantidade de bolhas nos grupos experimentais 2 RUT, 3 PLA; 4 NAR. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D)..... 94

Figura 12. Imagem representativa de CSLM (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 µm). do grupo HES cariado após a ciclagem térmica. Indicador: áreas de separação da dentina do adesivo. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D)..... 95

Figura 13. Imagens representativa de CSLM (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 µm). dos grupos PLA e CONH observada após ciclagem térmica (25.000 ciclos). Indicador: Espaços de infiltração nas bolhas da base da camada híbrida. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D). 95

Gráfico 1. Média e desvio padrão dos valores de RU dos grupos experimentais (Mpa) do Experimento 1. Dentes Hígidos. Azul: imediato 24 h, Vermelho: após 25.000 ciclos. Linhas superiores indicam igualdade estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre os momentos ($p < 0,05$)..... 72

Gráfico 2. Porcentagem do tipo de fraturas entre os grupos experimentais aplicados em dentina hígida..... 73

Gráfico 3. Porcentagem do tipo de fraturas entre os grupos experimentais aplicados em dentina afetada por cárie. 84

Quadro 1. Fórmula química para obtenção de uma solução hidro-alcóolica de flavonoide ao 6,5%. 61

Quadro 2. Adesivo e *primers* experimentais usados neste estudo 63

Quadro 3. Propriedades Físicas e Químicas das moléculas utilizadas neste estudo..... 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e desvio padrão da nanodureza (Hi) e módulo de elasticidade (Ei) dos grupos experimentais hígidos na camada de adesivo. 74

Tabela 2. Média e desvio padrão da Nanodureza (Hi) e módulo de elasticidade (Ei) dos grupos experimentais hígidos na camada híbrida. 75

Tabela 3. Média e desvio padrão da Nanodureza (Hi) e módulo de elasticidade (Ei) dos grupos experimentais hígidos na dentina a 10 µm. 76

Tabela 4. Média e desvio padrão da Nanodureza (Hi) e módulo de elasticidade (Ei) dos grupos experimentais hígidos na dentina a 20 µm. 77

Tabela 5. Média e desvio padrão dos valores de RU dos grupos experimentais afetados por cárie. 83

Tabela 6. Média e desvio padrão das nanopropriedades dos grupos experimentais afetados por cárie na camada de adesivo. 86

Tabela 7. Média e desvio padrão das nanopropriedades dos grupos experimentais afetados por cárie na camada híbrida. 87

Tabela 8. Média e desvio padrão da nanodureza dos grupos experimentais afetados por cárie na camada de dentina afetada a 10 µm. 89

Tabela 9. Média e desvio padrão do módulo de elasticidade dos grupos experimentais afetados por cárie na camada de dentina afetada a 10µm. 89

Tabela 10. Média e desvio padrão das nanopropriedades dos grupos experimentais afetados por cárie na camada de dentina subjacente à afetada. 90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

10-MDP	10-Metacriloiloxidecil di-hidrogênio
MDPB	12-metacriloiloxidecilpiridinio
4-MET	Ácido carboxílico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ALC	Agente de ligação cruzada
ANOVA	Análise de variância
CH	Camada híbrida
CPs	Cisteínas catepsinas
BAC	Cloreto de benzalcônio
CHX	Clorexidina
CONC	Controle Cariado
CONH	Controle Hígido
EGCG	Epigalocatequinagalato
EUA	Estados Unidos da América
e.g.	*Exempli gratia*
GSE	Extrato de Semente de Uva
PF	Falhas prematuras
g	Grama
HES	Hesperidina
HAP	Hidroxiapatita
H_0	Hipótese nula
h	Hora
MMPs	Metaloproteinases
CMT-3	Metastat
µg	Microgramas
µL	Microlitro
CSLM	Microscopia confocal à laser
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol

Ei	Módulo de elasticidade
mol	Mol
nN	Nanonewton
Hi	Nanodureza
nm	Nanômetro
NAR	Naringina
ISO	Organização Internacional para Padronização
PLA	Placebo
SPAN 20	Polissorbato 20
PRO	Proantocianidina
OPACs	Proantocianidinas oligoméricas
QER	Quercetina
kg	Quilogramas
RU	Resistência de união
RUT	Rutina
AQS	Sais de amônio quaternário
s	Segundo (s)
SE	*Self etch*
SL	*Smear layer*
PBS	Solução salina
μTBS	Teste de microtração
TE	*Total etch*
TC	Termociclagem

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
°C	Graus Celsius
PO_4^{3-}	Grupo fosfato
H_0	Hipótese nula
^{-}OH	Íon hidroxila
>	Maior
±	Mais ou menos
<	Menor
μ	Micro
%	Porcentagem
p	Valor-p

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20

2. REVISÃO DA LITERATURA 23

2.1. O SURGIMENTO DA ODONTOLOGIA ADESIVA 23

2.2. ADESÃO NA ODONTOLOGIA 25

2.2.1. Adesão aos tecidos dentais 26

2.3. CLASSIFICAÇÃO DOS SISTEMAS ADESIVOS 29

2.3.1. Técnica de condicionamento total ou convencional (Total Etch) 29

2.3.2. Classificação dos sistemas adesivos convencionais (Etch and Rinse) 30

2.3.3. Adesivos convencionais de 3 passos. 31

2.3.4. Adesivos convencionais de 2 passos. 31

2.3.5. Classificação dos sistemas adesivos autocondicionantes (Self Etch) 32

2.3.6. Adesivos universais 36

2.3.7. Adesão em dentina afetada por cárie 38

2.3.8. Mecanismos de degradação da camada de adesivo 41

2.3.9. Estratégias para reduzir a degradação da camada híbrida. 46

3. PROPOSIÇÃO 56

3.1. OBJETIVO GERAL 56

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 56

4. MATERIAL E MÉTODOS 57

4.1. Avaliação das propriedades adesivas e mecânicas em dentina hígida e afetada por cárie. 57

4.1.1. Formulação dos primers experimentais. 60

4.1.2. Procedimentos Adesivos 62

4.1.3. Resistência de união. Teste de Microtração (μTBS) 65

4.1.4. Tipo de Fratura 65

4.1.5. Teste de Nanodureza 66

4.1.6. Análise da interface de união e micoinfiltração por meio de Microscopia Eletrônica Confocal Laser 67

4.1.7. Análise Estatística 70

5. RESULTADOS 71

5.1. Dentina hígida 71

5.1. Teste de Microtração 71

5.1.1. Tipo de Fratura 73

5.1.2. Teste de Nanodureza 73

5.1.3. Teste de Microinfiltração assistida por corantes 78

5.2. Dentina afetada por cárie. 81

5.2.1. Teste de Microtração 81

5.2.2. Tipo de Fratura 84

5.2.3. Teste de Nanodureza 84

5.2.4. Teste de Microinfiltração assistida por corantes 91

6. DISCUSSÃO 96

7. CONCLUSÃO 115

8. ANEXO A 137

8.1. Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa. COEP - UEPG 137

1. INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma das principais razões para solicitar atendimento dental. No ocidente, nove em cada dez adultos padecem de cárie dental (Bagramian et al. [1] 2009). Uma vez que o processo começa e as condições são dadas, os carboidratos da fermentação do metabolismo das bactérias acidogênicas resultam na produção de ácidos sobre a estrutura dental, ocasionando desmineralização. Quando a cárie alcança a dentina, metaloproteinases endógenas (Tjärdehane et al. [2] 1998; Tjärdehane et al. [3] 1999, Sulkala et al. [4] 2001) e cisteínas catepsinas são ativadas (Nascimento [5] et al. 2011), gerando desnaturação das fibrilas colágenas, o que compromete as propriedades mecânicas e acelera a degradação do substrato dental (Tersariol et al. [6] 2010; Tjardehane et al. [7] 2013).

Atualmente, a principal opção para o tratamento das lesões cariosas baseia-se no preparo de cavidades conservadoras, utilizando materiais restauradores adesivos à base de resina composta. No entanto, uma das limitações da interface resina-dentina criada pelos sistemas adesivos é a degradação ao longo do tempo, o que compromete a durabilidade das restaurações de resina (Hashimoto et al. [8] 2000; De Munck et [9] al 2005; Sano et al. [10] 2006; Breschi [11] et al. 2008; Frasseto et al. [12] 2016). Com a introdução de procedimentos minimamente invasivos, a realização de restaurações sobre substratos modificados – dentina afetada por cárie (Yoshiyama et al. [13] 2000, Imparato et al. [14] 2017) ou dentina esclerótica – tornou-se comum, um fator importante em termos de longevidade da restauração, considerando que a qualidade da adesão em tais substratos é inferior à observada em dentina hígida (Zanchi et al. [15] 2010; Alves et al. [16] 2013), inclusive com o uso dos recentes sistemas adesivos universais (Lenzi et al. [17] 2015; Nicoloso et al. [18] 2016). Assim, o processo de degradação da interface adesiva nesses substratos é ainda mais rápido quando comparada a adesão em dentina hígida (Perdigão [19] 2010; Tjardehane et al. [7] 2013).

Um protocolo adesivo efetivo na dentina afetada por cárie deveria inibir a atividade das proteases próprias do tecido para preservar a matriz colágena além de contribuir na melhora das propriedades mecânicas do substrato. Neste sentido, os agentes de ligação cruzada tem demostrado ser eficazes na inibição da atividade das MMPs, evitando a degradação do colágeno na dentina aderida (Bedran Russo et al. [20] 2010; Bedran Russo et al. [21] 2007; Bedran Russo et al. [22] 2008; Bedran Russo [23] et al. 2011; Leme-Kraus [24] et al. 2017). Entre este tipo de agentes, o uso de novas substâncias de origem natural como a hesperidina (HES), uma flavona glicosada vasoativa, demostrou ser efetivo em manter as propriedades mecânicas da dentina quando submetida a desafios ácidos em dentes bovinos e humanos (Islam et al. [25] 2012; Castellan et al. [26] 2013). Além disso, a incorporação de HES a um adesivo auto-condicionante proporcionou melhoria na resistência de união (RU) à dentina, mantendo as propriedades mecânicas (módulo elástico e dureza), ao mesmo tempo que reduziu o processo de degradação da matriz colágena após 1 ano de armazenamento em saliva artificial, mostrando um comportamento ainda melhor que aquele observado com proantocianidina (Islam et al. [27] 2014). No entanto, estes estudos não avaliaram os efeitos da HES numa situação mais próxima à clínica, onde a presença de dentina afetada ao final do preparo cavitário seria uma situação frequente.

Comparada com outros agentes de ligação cruzada, a HES e outros flavonoides possuem efeito antimicrobiano sobre sete das oito cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas, além do *Staphylococcus aureus* (Basile et al. [28] 2000; Bakar et al. [29] 2012; Abuelsaad et al. [30] 2013). A combinação de efeitos dos flavonoides e os resultados promissores mostrados pela HES sobre dentina hígida e após desafio ácido, abriram uma nova alternativa para o desenvolvimento de substancias terapêuticas para melhorar a resistência de união de sistemas adesivos em dentina afetada. Dentro dos compostos fenólicos existem outras moléculas de flavonoides, quimicamente similares, que ainda não tem sido o suficientemente estudadas e testadas. Considerando as propriedades dos flavonoides, ditas substâncias poderiam apresentar efeitos benéficos sobre a dentina. A Quercetina (QER) uma aglicona, Rutina (RUT) e Naringina (NAR) (flavonas glicosadas) compartilham

estruturas moleculares e propriedades similares à HES. No entanto, o potencial destas substâncias sobre a melhora e preservação das propriedades adesivas e mecânicas da dentina afetada por cárie e a comparação com a dentina hígida não tem sido avaliada e poderia nos apresentar um panorama mais definido da capacidade terapêutica de ditas substâncias em substratos desafiadores clinicamente relevantes.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os valores de RU, nanodureza na interface adesiva e microinfiltração, utilizando microscopia confocal à laser (CSLM), nos procedimentos adesivos sobre dentina hígida e dentina afetada por cárie, com o uso de um adesivo universal em modo "*total etch*", prévia aplicação de *primers* experimentais de HES, QER, NAR e RUT nos períodos 24 h e após simulação de 2 anos e meio de envelhecimento por meio da técnica de ciclagem térmica. As hipóteses alternativas foram que o uso de *primers* com conteúdo de agentes de ligação cruzada aumentam os (1) valores de RU à dentina, (2) a dureza na interface adesiva, (3) reduzem a infiltração imediatamente e após simulação de envelhecimento de 2 anos e meio, tanto para a dentina hígida quanto para a dentina afetada por cárie, (4) preservam as propriedades adesivas e mecânicas da interface adesiva após 2 anos e meio de envelhecimento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O SURGIMENTO DA ODONTOLOGIA ADESIVA

Antes do desenvolvimento dos sistemas adesivos, a retenção das restaurações baseava-se principalmente na confecção de preparos com retenções macro-mecânicas. O uso de tais técnicas comprometia drasticamente a preservação do tecido dental hígido devido aos requisitos de profundidade e extensão do preparo. Em algumas situações de perda dental mais extensa, dentes vitais deviam receber tratamento endodôntico para obtenção de ancoragem dentro do canal radicular para que desta forma o dente pudesse ser reabilitado (Pashley et al. [31] 2010).

Na história da odontologia adesiva podemos ressaltar dois acontecimentos principais dentre os descobrimentos feitos no século passado, a partir dos quais os paradigmas válidos até esse momento mudariam completamente a nossa prática: 1) A aparição da técnica de condicionamento ácido e 2) o desenvolvimento dos materiais resinosos atuais (Pashley et al. [31] 2010).

A primeira descrição da técnica de condicionamento de esmalte pelo uso de ácido fosfórico por Buonocore [32] em 1955 sentou um novo precedente na Odontologia. Esta técnica mostrava melhor retenção dos materiais resinosos utilizados na época devido a criação de irregularidades na superfície adamantina o que, segundo Buonocore, devia ser o resultado da obtenção de uma maior superfície microscópica de contato. Um estudo posterior de Gwinett e colaboradores [33] demonstrou que a resina era capaz de penetrar pelos espaços criados entre os primas do esmalte condicionados, envolvendo-os. Esta pode ser considerada a primeira vez que uma camada híbrida (CH) real foi observada, embora esse termo tenha sido introduzido posteriormente.

A primeira descrição da molécula de Bis-GMA pelo Prof. Raphael Bowen e colaboradores [34] mostrava um material novo, cujas propriedades podiam se

adaptar a ambientes desafiadores como o meio bucal. Assim o Bis-GMA tornou-se a base da grande maioria dos sistemas de resina composta usados na atualidade. Em anos posteriores, estes descobrimentos contribuiram para a mudança nos conceitos sobre preparos de cavidades convencionais, agora limitando exclusivamente ao tamanho da lesão presente o que permitiu consequentemente, maior conservação dos tecidos dentais. Porém, depois de vários anos de tentativas infrutuosas de gerar materiais adesivos estáveis, a odontologia adesiva só começaria a observar grandes avanços uma vez que os fenômenos da interação da resina e o dente foram compreendidos.

No inicio da década de 1980, Nabakayashi e colaboradores [35] utilizaram pela primeira vez o termo “Camada Híbrida”, uma vez que observou e demonstrou que a resina pode penetrar e infiltrar a dentina condicionada com ácido fosfórico, formando uma estrutura composta nova que possuía uma matriz de resina reforçada pelas fibrilas colágenas. A partir deste momento, novos materiais e técnicas foram descritas até os dias atuais com a finalidade de simplificar a técnica adesiva, garantindo ao mesmo tempo, e pela primeira vez, uma adesão favorável nesse substrato.

Apesar dos grandes avanços na adesão dental, a adesão à dentina ainda continua sendo o “calcanhar de Aquiles” da odontologia adesiva. Na atualidade, os pesquisadores têm dois grandes desafios: por um lado, preservar a camada adesiva (tanto a camada de adesivo quanto a da dentina subjacente evitando sua degradação), e por outra parte tratar ativamente o remanescente dentário (com agentes terapêuticos) para evitar a recorrência lesões cariosas.

A continuação será feita uma descrição dos principais conceitos relacionados à Odontologia adesiva.

2.2. ADESÃO NA ODONTOLOGIA

A adesão pode definir-se como a força que mantém unidas às duas substâncias de diferentes composições. Na odontologia, temos na atualidade a adesão à estrutura dental e a adesão à materiais restauradores, como as cerâmicas ou metais. A adesão que existe entre o sistema adesivo e a estrutura dental é uma união do tipo mecânica. Para este objetivo, a substância e o substrato devem ficar em contato íntimo (distância máxima de 0,0007 μm). Esta união depende, de forma geral, de algumas características do substrato e do sistema adesivo.

Entre estas características básicas que os substratos e a substância devem possuir temos:

a. Umedecimento ou molhamento: As forças que mantém unidas às moléculas de um composto na sua superfície podem ser definidas dependendo do estado em que se encontram. No caso dos sólidos, dita energia é denominada Energia Superficial. Já nos líquidos, o tipo de energia que mantém unidas às moléculas se conhece como Tensão Superficial. Quando um sólido e um líquido entram em contato forma-se um ângulo de contato entre ambos. Para um molhamento melhor, dito ângulo deve ficar próximo do zero. Isso dependerá da presença de uma energia superficial mais alta no substrato dental do que a tensão superficial do adesivo. Um exemplo aplicado à clínica é o uso do ácido fosfórico no esmalte. Quando aplicado, a energia superficial aumenta permitindo o melhor molhamento do adesivo.

b. Viscosidade: A efetividade do adesivo não depende apenas do contato íntimo com o substrato. Além de um bom molhamento, ele deve espalhar-se rápida e facilmente na superfície. Nesse sentido, a viscosidade (mais fluida ou mais viscosa) é diretamente proporcional ao ângulo de contato formado. Adesivos mais espessos dificultam o recobrimento da superfície do substrato devido a sua consistência. Ao mesmo tempo, a chance de incorporar bolhas de ar aumenta, dificultando a penetração do adesivo entre as irregularidades do substrato.

c. Rugosidade Superficial: o aumento da área de contato eleva a capacidade adesiva, pois há mais sítios para permitir a retenção do aderente que penetrou.

2.2.1. Adesão aos tecidos dentais

Dentro da adesão direcionada aos tecidos dentais existem dois substratos onde o clínico realiza procedimentos adesivos, o esmalte e a dentina. As diferenças histológicas e estruturais de ditos substratos tem relação direta com o desempenho dos sistemas adesivos. Por tal motivo, a descrição será feita de forma separada para cada substrato.

Adesão ao esmalte

Devido à comprovada efetividade dos adesivos no esmalte, será feita apenas uma breve descrição e generalidades da adesão a este tecido.

Constituído principalmente por cristais de hidroxiapatita, o esmalte é um tecido poroso altamente calcificado. Com 97% de conteúdo inorgânico e apenas 2% de água em sua composição (Barlett et al. [36] 2013), é considerado o tecido mais duro do corpo humano. As características histológicas do tecido adamantino fazem dele uma barreira semipermeável que permite o passo de algumas substâncias de peso molecular baixo.

As características descritas previamente permitem que o esmalte seja um substrato ideal para a adesão. O sucesso em termos de longevidade e desempenho dos sistemas adesivos em esmalte tem sido amplamente estudada e comprovada ao longo dos anos (De Marco et al. [37] 2015).

Protocolo adesivo para esmalte

Independente do tipo de adesivo a ser usado no esmalte, o protocolo adesivo mais aceito até a atualidade consiste no condicionamento da superfície com ácido fosfórico em concentrações entre 30 e 40% (como são comumente

vendidos no mercado), e tempos que podem oscilar entre 15 e 30 s (Guba et al. [38] 1994). Uma vez feito este passo, o esmalte deve ser lavado abundantemente com água para eliminar todos os resíduos presentes na composição do ácido fosfórico e os produtos resultantes da interação do ácido fosfórico com a hidroxiapatita (Chow and Brown [39] 1973). Este processo de condicionamento ácido oferece algumas vantagens que favorecem a adesão: a) Aumento da superfície de contato do adesivo e b) Aumento da energia superficial do substrato, o que facilita o molhamento do adesivo. Uma vez seca ou mantida levemente úmida a superfície do esmalte, o adesivo deve ser aplicado de forma ativa por um tempo que ajude a volatilizar o solvente do adesivo e penetrar entre as porosidades do esmalte.

Adesão à dentina

Constituindo a maioria da estrutura do dente, a dentina é um tecido conjuntivo mineralizado cuja estrutura histológica difere drasticamente do esmalte. Este tecido encontra-se recoberto pelo esmalte na porção coronária e pelo cimento na porção radicular. Ao mesmo tempo, no interior da dentina aloja-se a polpa (tecido frouxo vascularizado e inervado com quem compartilha a mesma origem embriológica, sendo de origem mesodêrmica), razão pela qual deve considerar-se a dentina como uma extensão, anatomofisiologicamente falando, da polpa.

Considerando a presença maior de tecido orgânico (20 %), na forma de colágeno Tipo 1 principalmente, a presença mais alta de água (10 %) e a menor quantidade de hidroxiapatita (70 % aproximadamente), o tecido dentinário pode ser considerado como um substrato menos favorável para realizar uma adesão duradoura. Além disso, a presença de túbulos dentinários ao longo da dentina fazem dela um tecido altamente permeável e, em consequência, mais suscetível à degradação ao longo do tempo. Outro fator importante nesse sentido é o aumento do diâmetro dos túbulos dentinários em relação à profundidade dentinária e a proximidade com a polpa. Estudos *in vitro* (Yoshiyama et al. [40] 1996, Shono et al. [41] 1999) demonstraram que a adesão de sistemas adesivos convencionais é mais fraca em dentina profunda

quando comparada à dentina média ou rasa. Isto se deve principalmente ao aumento da pressão intrapulpar nas regiões mais profundas e ao diâmetro que os túbulos dentinários apresentam nesta região. Em resumo, regiões mais profundas apresentam uma dentina mais úmida, permeável e rica em túbulos dentinários mais amplos, o que dificulta a hibridização com o adesivo, resultando em valores menores de RU.

Smear Layer

Além do exposto anteriormente, um fato importante para aderir à dentina é a formação de uma camada de esfregaço (*Smear Layer*, pelo seu nome em inglês – SL) decorrente da instrumentação rotatória sobre este tecido. Dentro da composição desta camada temos, além dos resíduos de dentina instrumentada, a presença de saliva, sangue, bactérias, fragmentos de materiais restauradores e óleo que se ligam à dentina intertubular e penetram nos túbulos dentinários (conhecida também como *Smear Plugs*). Esta camada pode apresentar espessura variável, geralmente entre 1 e 5 μm, que pode mudar dependente do tipo de instrumental rotatório usado e a sua irrigação. O uso de pontas de diamante ao invés de pontas de carbeto de tungstênio ou aço, da mesma forma que a falta de refrigeração, podem acrescentar a espessura desta camada de esfregaço (Pashley et al. [42] 1984).

As mudanças e avanços no desenvolvimento de novos sistemas adesivos tem sido realizados em função do substrato dentinário. Nesse contexto algumas classificações de sistemas adesivos baseiam-se na interação do produto com a SL, como aquelas que classificam os sistemas adesivos em gerações. Esta classificação difere entre autores, o que a torna complexa e confusa. Uma classificação aceita e mais utilizada entre os pesquisadores separa os sistemas adesivos em dois grandes grupos:

1) Os que promovem o condicionamento ácido total prévio, ou técnica convencional
2) Os adesivos que não precisam de condicionamento ácido prévio ou autocondicionantes.

Recentemente, um novo tipo de adesivo foi introduzido no mercado. Estes adesivos, denominados “adesivos universais”, podem ser usados em modo convencional (*Total Etch* - TE*)* ou como adesivos autocondicionantes (*Self Etch* - SE). Portanto, nesta revisão eles serão descritos dentro de um terceiro grupo.

2.3. CLASSIFICAÇÃO DOS SISTEMAS ADESIVOS

2.3.1. Técnica de condicionamento total ou convencional (Total Etch)

Quando a revolucionária Técnica de condicionamento total (condicionamento simultâneo da dentina e o esmalte) foi introduzida pela primeira vez por Fusayama [43], houve resistência e rejeição entre os dentistas dos Estados Unidos e da Europa. A razão principal foi que nesse momento, acreditava-se que o uso de ácido fosfórico à 40% poderia gerar efeitos negativos sobre a polpa. Um estudo posterior demonstrou que o uso de ácido fosfórico em dentina com uma espessura maior a 0,5mm não produziu nenhum tipo de efeito adverso na polpa desde que a dentina condicionada fosse selada e protegida da infiltração por bactérias. Comprovou-se assim que o efeito sobre a polpa observado nos EUA e Europa não era decorrente do efeito do ácido fosfórico *per se,* e sim por uma infiltração de bactérias nesta (Pashley [44] 1992)

Estes efeitos não foram observados no Japão devido a filosofia de manejo de tecidos implementada por eles. A técnica proposta preconizava a remoção parcial do tecido cariado, eliminando apenas a dentina infectada e limitando os preparos à dentina afetada. Nesse sentido, as características da dentina afetada diferem das da dentina hígida, tornando-a um substrato menos permeável para a penetração de irritantes até a polpa (Tagami et al. [45] 1992).

O papel da água nesta técnica adesiva também é fundamental para o seu sucesso. O fato do esmalte e a dentina serem condicionados simultaneamente gerava um efeito secundário, que nessa época, não se

pensava que poderia gerar um efeito negativo sobre a técnica. Acostumava-se entre os clínicos secar completamente o esmalte até observar o aspecto esbranquiçado da superfície após o condicionamento ácido como forma de corroborar o efeito do ácido fosfórico, o que indiretamente acarretava a secagem da dentina e produzia o colapso dos espaços interfibrilares das fibrilas colágenas expostas que serviam como espaço para a penetração e infiltração de solventes e monômeros. Esta técnica denominada *dry bonding* (técnica adesiva no substrato seco) produzia valores de RU inferiores a aqueles próprios da contração do material polimérico (Asmussen e Munksgaard [46] 1985), o que resultava no desprendimento das paredes aderidas, gerando sítios de infiltração e colonização bacteriana que pudessem irritar a polpa.

Após o insucesso da técnica seca, Kanca [47] em 1992 encontrou que a água servia como um excelente agente para re-umedecer a superfície da dentina. Este descobrimento o levou a introduzir o novo conceito de adesão à dentina denominado *wet bonding* (união em substrato úmido). Esta técnica melhorou a força de união entre a dentina e o adesivo, permitindo um melhor selamento da dentina e menos sensibilidade pós-operatória. A RU à dentina aproximou-se aos valores encontrados em esmalte, e com isso, a era da adesão segura e reproduzível em dentina começou.

2.3.2. Classificação dos sistemas adesivos convencionais (Etch and Rinse)

A técnica convencional baseia-se em três etapas: (a) infiltração de monômeros resinosos pela (b) camada superficial de dentina previamente desmineralizada e cuja SL é totalmente removida para a posterior (c) polimerização do adesivo.

O uso do ácido fosfórico sobre o substrato dentinário apresenta dois efeitos principais, por um lado a desmineralização dos cristais de hidroxiapatita, o que permite que a exposição de um tecido frouxo rico em fibrilas de colágeno que aumenta a permeabilidade e a pressão intrapulpar no complexo dentino-

pulpar. Por outra parte, esta exposição de matéria orgânica (colágeno) diminui a energia livre superficial do substrato em função da perda de hidroxiapatita (cristais inorgânicos) (Rosales-Leal et al. [48] 2001), o que compromete a interação dos monômero hidrofóbicos com a dentina.

2.3.3. Adesivos convencionais de 3 passos.

Com o descrito anteriormente, entende-se melhor a razão pela qual os primeiros adesivos convencionais possuíam 3 passos. Constando de um ácido fosfórico para desmineralizar a superfície da dentina (passo 1), o sistema adesivo é comercializado em dois passos ou frascos subsequentes para serem usados após a desmineralização superficial. O primeiro frasco (passo 2) possuí uma mistura de substâncias que permitiam a interação com o colágeno desmineralizado. Assim, monómeros hidrofílicos num veículo (água, etanol, acetona) que facilitam a penetração destes monômeros no interior da dentina desmineralizada, são utilizados. Estes agentes presentes no primeiro frasco facilitam o interação dos monômeros hidrofóbicos presentes no segundo frasco do adesivo (passo 3) com a dentina, criando o que Nabakayashi [35] em 1982 denominou "*CH"*.

Entre os produtos comerciais mais destacados pertencentes a esta classificação temos os adesivos: Optibond Fl (Kerr, Orange, CA, USA) e o Scotchbond Multipropósito (3M Oral Care, Minneapolis, Minnesota, EUA).

2.3.4. Adesivos convencionais de 2 passos.

Com a finalidade de reduzir o tempo clínico de aplicação, as companhias produtoras de materiais odontológicos continuaram buscando a simplificação dos procedimentos e das técnicas. Para esta finalidade, os adesivos convencionais eventualmente surgiram no mercado com um número menor de passos. Com a aparição dos adesivos convencionais simplificados, o *primer* e o adesivo eram vendidos em um frasco único, reduzindo a técnica de três a dois passos.

Em termos de eficácia, os valores de RU destes adesivos ficaram bastante próximos aos valores dos seus antecessores (Tjan et al. [49] 1996; Wilder Jr et al. [50] 1998). Porém, a mistura com os componentes do *primer* aumentou a hidrofilidade destes sistemas, tendo implicações clínicas a longo prazo. Além disso, em termos de redução do tempo de aplicação, estes adesivos não tiveram muita vantagem sobre aqueles de 2 frascos devido à necessidade de aplicação de duas camadas daquela solução *primer/*adesivo.

Exemplos distribuídos comercialmente desta classificação de adesivos são: Adper Single Bond 2 (3M Oral Care, EUA), Optibond Solo (Kerr, Orange, CA, USA).

2.3.5. Classificação dos sistemas adesivos autocondicionantes (Self Etch)

A diferença principal dos adesivos convencionais e os adesivos autocondicionantes radica na falta de um passo separado para o condicionamento dos tecidos. Dentro da sua composição, os adesivos autocondicionantes possuem monômeros ácidos que fazem um condicionamento do substrato com infiltração simultânea durante a aplicação aos substratos dentários que se copolimerizam após a fotoativação. Portanto, esta técnica tem sido divulgada como uma técnica mais simples, pois elimina passos clínicos e reduz o tempo de cadeira, e ao mesmo tempo, se torna uma técnica menos suscetível de erros devido que não precisa de uma dentina “relativamente umedecida” (um jato de ar para uma secagem simples é suficiente para sua aplicação). Por tanto, esta técnica pode ser considerada como uma técnica com desempenho clínico confiável (Peumans et al. [51] 2005; Peumans et al. [52] 2010; Akimoto et al. [53] 2007; van Dijken et al. [54] 2007), embora isto seja altamente dependente do adesivo autocondicionante selecionado pelo clínico.

Outras vantagens clínicas que os adesivos autocondicionantes apresentam está relacionado a sensibilidade pós-operatória. Para entender melhor este ponto, é importante conhecer como funcionavam os adesivos convencionais. Uma vez que o ácido fosfórico desmineraliza a dentina (entre 3 e 8 μm) o adesivo penetrava através das porosidades criadas, no entanto, a hibridização do adesivo não conseguia preencher completamente esta espessura de dentina desmineralizada (Miyazaki et al. [55] 2003). Esta discrepância era um dos motivos para o desenvolvimento de sensibilidade pós-operatória neste tipo de adesivos. Como a técnica autocondicionante não requer condicionamento pelo ácido fosfórico, ela é menos agressiva quando comparada a técnica convencional de condicionamento total. Os adesivos autocondicionantes interagem mais superficialmente com a dentina, deixando os túbulos dentinários muitas vezes obstruídos com SL. No entanto, esta discrepância parece ocorrer também, em menor medida, nos adesivos autocondicionantes (Carvalho [56] et al. 2005; Wang e Spencer [57] 2005). Essas são as principais razões para presumir o motivo da menor prevalência de sensibilidade com o uso destes sistemas adesivos (Perdigão, Geraldeli e Hodges [58] 2003; Unemori et al. [59] 2004; Tay et al. [60] 2002). Um dado interessante provém de uma recente revisão sistemática que sugere que em dentes posteriores, principalmente naqueles com cavidades amplas, existem poucas diferenças na prevalência de sensibilidade entre os sistemas auto-condicionantes e convencionais (Reis et al. [61] 2015). Todas estas vantagens citadas resultaram no aumento da popularidade do uso destes adesivos entre os clínicos na primeira década de 2000 (Van Meerbeek et al. [62] 2011).

Os adesivos SE são comercializados em dois passos (primer autocondicionante + adesivo), em único passo contendo dois frascos (o primer autocindicionante deve ser misturado ao adesivo antes da aplicação) ou em passo único em apenas um frasco (não requerem mistura, o primer autocondicionante e o adesivo encontram-se em frasco único). Dentro desta classificação, aqueles que eram vendidos num único frasco, previamente misturados, foram os que apresentaram os piores resultados nos estudos laboratoriais (Van Meerbeek et [63] al 2003; Kenshima et al. [64] 2005).

Eventualmente, dados os pobres resultados destes adesivos, muitos destes produtos foram descontinuados.

Os monômeros ácidos presentes nos sistemas autocondicionantes são na maioria derivados do ácido carboxílico (4-MET) ou monômeros fosfonados (Fenil P; 10-MDP; PENTA). Os adesivos autocondicionantes de dois passos, de uma forma geral, apresentam o mesmo potencial retentivo e de selamento que os adesivos convencionais (Kenshima et al. [64] 2005).

Além da classificação de acordo com o número de passos, os adesivos autocondicionantes podem ser classificados de acordo com o grau de acidez do primer. Assim, aqueles com pH > 2 são denominados adesivos leves. Os *primers* moderados possuem pH entre 1,1 e 2 e os agressivos tem pH inferiores a 1. Este é um dado importante, considerando que nesta técnica a adesão é feita sobre dois substratos: SL e dentina. Nesse sentido, sabe-se que *primers* autocondicionantes mais ácidos são capazes de penetrar facilmente em toda a camada do SL até alcançar a dentina subjacente, fazendo com que sejam formadas camadas híbridas mais espessas (Pashley e Tay [65] 2001). Isto não significa que os valores de adesão nesta situação sejam superiores, pois não existe uma correlação entre a espessura da CH e os valores de RU (Reis et al. [66] 2005, Van Meerbeek [62] 2011. Pelo contrário, os adesivos mais ácidos parecem ser mais fracos mecanicamente mesmo possuindo camadas híbridas tão espessas como aquelas formadas por sistemas TE.

A água e seu papel nos sistemas autocondicionantes

Embora a técnica *per se* não requer um substrato úmido para um correto procedimento adesivo, a água cumpre uma função importante na estratégia autocondicionante. A função da água é ionizar os monômeros ácidos que, desta forma, tornam-se aptos para desmineralizar a SL e a dentina subjacente para formar uma CH verdadeira. Em sistemas autocondicionantes de passo único, a proporção de água e monômeros hidrofílicos é maior. Assim, a camada de adesivo se apresenta fina e sensível as consequências da inibição por oxigênio durante a polimerização. Outro fator desfavorável nestes tipo de

adesivos era a grande quantidade de solvente na composição, afetando as propriedades mecânicas da camada. Sendo assim, é sempre recomendável a aplicação de jato de ar por tempos maiores aos usados em outros sistemas, com o fim de volatilizar o solvente (Van Meerbeek et al. [62] 2011).

A molécula de MDP

A forma em que os monômeros ácidos interagem com a hidroxiapatita (HAP) foi descrita no que se conhece como "Conceito AD" ou "Conceito de Adesão-Descalcificação (Yoshida et al. [67] 2001; Yoshioka et al. [68] 2002; Fu et al. [69] 2005). Este modelo explica que, uma vez ionizados pelo efeito da água, todos os ácidos se ligam quimicamente (iônicamente) ao cálcio da HAP (Fase 1). Esta primeira etapa é acompanhada pela liberação de grupos fosfato (PO_4^3) e grupos hidroxila (OH^-) da HAP, deixando a superfície num estado eletro-neutro. Neste ponto, a molécula ácida pode: 1) permanecer ligada ou 2) desprender-se, dependendo da estabilidade da ligação formada com o Ca, ou em outras palavras, da estabilidade com o sal de cálcio com a que a molécula teve interação.

Falando mais especificamente, moléculas como o 10-metacriloiloxidecil di-hidrogênio (10-MDP), um monômero acídico funcional introduzido pela primeira vez ao mercado com o lançamento do adesivo autocondicionante de dois passos Clearfil SE Bond (Kuraray Noritake, Tokyo, Japão), possui a capacidade de se aderir quimicamente através da formação de sais de cálcio-fosfato e cálcio-carboxilato com apenas um pequeno efeito desmineralizante na superfície. Estes efeitos de adesão química com as estruturas de cálcio presentes no dente formam o que se denomina em inglês "*nanolayering*" que tem sido descritas como pequenas camadas de deposição do 10-MPD na superfície dos cristais de HAP (Yoshida et al. [70] 2012).

Outro aspecto importante destes adesivos é a sua ação sobre o esmalte. Nesse sentido, os monômeros ácidos incorporados não são suficientemente potentes para produzir um padrão de desmineralização adequado para obter uma retenção forte neste substrato. Por tal motivo, recomenda-se o

condicionamento prévio com ácido fosfórico para obter valores de RU semelhantes aos da técnica de condicionamento total (Perdigão et al. [71] 2000; Torii et al. [72] 2002), técnica que se conhece como “condicionamento seletivo do esmalte” (*selective enamel etching)*.

2.3.6. Adesivos universais

Provavelmente, os adesivos dentais sejam os produtos cujos nomes e apresentação comercial mudam com mais velocidade na área da saúde. A constante e rápida evolução dos AU gera dúvidas entre os clínicos sobre o tipo de adesivo que deveria usar e a forma de usá-lo diante das diversas situações clínicas. Tradicionalmente, como explicado anteriormente, o clínico possuía duas opções para a adesão à dentina: uma estratégia com o uso do ácido fosfórico em esmalte e dentina (TE), e uma segunda opção na qual o ácido fosfórico é apenas utilizado no esmalte (SE*/selective enamel etching*).

Recentemente, após a liberação da patente do 10-MDP introduzida pela Kuraray na década de 90 no Japão, apareceram no mercado adesivos novos que preconizam o uso multimodal ou “universal” deles. Em outras palavras, são sistemas adesivos que podem ser usados como um adesivo SE de passo único ou como um adesivo convencional de dois passos, sendo possível aplicar o ácido fosfórico na dentina ou não, sem comprometer o desempenho do produto (Da Rosa, Piva, da Silva [73] 2015). Além disso, estes adesivos podem ser usados em diferentes situações clínicas como a cimentação de pinos de fibra de vidro, facetas ou próteses fixas feitas em porcelana, todas essas possibilidades em um único frasco (Perdigão [74] 2015).

Quando usados em modo auto-condicionante, os AU se tornam basicamente um adesivo *self etch* de um passo. Como comentado anteriormente, os adesivos auto-condicionantes de passo único eram os que tradicionalmente apresentavam os piores valores de resistência de união, tanto em estudos *in vitro* (Peumans et al. [51] 2005; Breschi et al. [11] 2008) quanto em estudos clínicos (Heintze et al. [11] 2010).

Apesar de terem uma composição parecida a dos adesivos SE de um passo, os AU possuem dentro de sua composição outro tipo de monômeros funcionais que tem a capacidade de ligar-se de forma iônica à hidroxiapatita (Yoshida et al. [67] 2001; Yoshida et al. [70] 2012; Yoshihara et al. [75] 2013). Entre estes monômeros o 10-MDP é agora incluído na maioria dos AU. Entre os produtos lançados no mercado, o Single Bond Universal (3M Oral Care) e All bond Universal (BISCO Dental, Schaumburg, Illinois, EUA), ambos com conteúdo de 10-MDP, tem mostrado também a capacidade de formar ligações químicas com a hidroxiapatita na forma de *nanolayering* (Yoshida et al. [70] 2012). Concomitantemente, um dos copolímeros presentes na composição do Single Bond Universal (Tabela 1) parece apresentar um tipo de união química entre seu radical carboxila e o cálcio presente no dente.

Vários estudos laboratoriais têm demonstrado o bom desempenho dos AU desde o lançamento deles no mercado (Hanabusa et al. [76] 2012; Muñoz et al. [77] 2013; Muñoz et al. [78] 2015; Wagner et al. [79] 2014; Luque-Martinez et al. [80] 2014; Marchessi et al. [81] 2014; Zhang et al. [82] 2016; Sai et al. [83] 2016; Thanatvarakorn et al. [84] 2016; Fu et al. [85] 2017). Um dos achados mais interessantes dos resultados imediatos deste tipo de adesivos foi reportado numa metanálise de Da Rosa, Piva e da Silva [73] em 2015 que comparou estudos *in vitro* e demonstrou que o desempenho dos AU, em termos de resistência de união, é similar na dentina quando usados no modo TE ou SE. No passado, o uso do ácido fosfórico prévio à aplicação de adesivos SE em dentina era prejudicial e comprometia os valores de adesão da técnica quando aplicada em dentina (Ikeda et al. [86] 2009; Sabatini et al. [87] 2013), uma situação que não acontece nos AU e que confirma a versatilidade de opções no uso clínico destes tipos de adesivos.

Estudos clínicos também tem mostrado o comportamento favorável no uso de sistemas adesivos SE. Nesse sentido, estudos clínicos aleatorizados de 6 (Mena Serrano et al. [88] 2015), 18 (Perdigão et al. [89] 2014), 24 (Lawson et al. [90] 2015), 36 meses (Loguercio et al. [91] 2015) demonstraram que a taxa de

fracasso nestes períodos de tempo pode variar entre 0 e 3,8% quando usados em lesões cervicais.

Apesar dos grandes avanços tecnológicos ao longo de 70 anos de pesquisas na área de adesão dental, todos os sistemas adesivos ainda apresentam uma desvantagem. Como referido no início desta revisão, as condições favoráveis do esmalte permitem ter uma adesão previsível e duradoura. No entanto, a grande presença de umidade, a incompleta infiltração da dentina durante a hibridização e os mecanismos auto reguladores do organismo geram a degradação desta interface ao longo do tempo (Sano et al. [10] 2006; Breschi et al. [11] 2008; Frasseto et al. [12] 2016).

2.3.7. Adesão em dentina afetada por cárie

As alterações patológicas mais comuns na dentina estão relacionadas com a cárie dental. De acordo com os trabalhos de Fusayama e colaboradores, a dentina cariada consiste de uma primeira camada superficial e uma segunda camada mais profunda (Fusayama e Terachima [92] 1972; Ohgushi e Fusayama [93] 1975; Kuboki, Ohgushi e Fusayama [94] 1977). A camada mais externa se caracteriza pela alta desmineralização (e impossibilidade de remineralização), suscetível à coloração com fucsina, e com a presença de fribrilas colágenas desorganizadas com a desaparição virtual das ligações cruzadas indicando a desnaturação irreversível do colágeno. A camada interna é considerada medianamente descalcificada, fisiologicamente mineralizável, não suscetível a coloração com fucsina, com processos odontoblásticos prolongados, fibrilas colágenas hígidas e cristais de apatita ligados ao colágeno.

No entanto, após todos os avanços na bioquímica da lesão de cáries, ainda persistem as dúvidas sobre a verdadeira relação entre a tinção da dentina cariada e as características ultra-estruturais das regiões da dentina cariada (Pugach et al. [95] 2009). Um estudo mostrou que o nível de bactérias encontradas em dentina corada com fucsina foi similar aos níveis da dentina que não foi corada (Kidd et al. [96] 1993). A dentina corada nem sempre pode

estar infectada, porém a ausência de coloração nem sempre assegura a eliminação de bactérias nessa região. De fato, os corantes parecem não ser específicos para o colágeno alterado irreversivelmente encontrado na dentina cariada (Yip et al. [97] 1994) e inclusive, pode colorear dentina em dentes hígidos (Boston et al. [98] 2004). Estes achados geram algumas perguntas com relação aos estudos que avaliaram a adesão em dentina afetada por cárie quando a dentina infectada foi removida com ajuda de corantes (Perdigão et al. [19] 2010).

As mudanças que acontecem na estrutura da dentina como resposta ao processo de cáries podem ter lugar na dentina mesmo, ou podem ser decorrentes da resposta do tecido pulpar. A polpa reage ao processo de desenvolvimento de cáries através do bloqueio completo do lúmen dos túbulos dentinários ou diminuindo o diâmetro do túbulo para impedir a passagem de bactérias ou fluidos irritantes nas proximidades da polpa. Stanley e colaboradores [99] observaram que o complexo dentino-pulpar responde a agressões externas formando dentina esclerótica, áreas de dentina caracterizadas pela presença de processos odontoblásticos desnaturados (*dead tracts)*, ou formando dentina reparadora. A presença de dentina reativa não preveem a formação de dentina reparadora, pelo contrário, este processo parece ocorrer como resultado do mesmo tipo de estímulo. Estudos tem reportado que estes depósitos nos túbulos dentinários são β-fosfato tricálcico (também chamado de *whitlockite*) (Daculsi et al. [100] 1987; Duke e Lindemuth [101] 1991), um mineral menos solúvel que a hidroxiapatita.

A contínua deposição de minerais no lúmen dos túbulos dentinários por baixo da dentina cariada, levará finalmente à esclerose deste tecido. Esse tipo de material esclerótico difere da esclerose fisiológica principalmente pela sua formação como efeito de um processo de cáries, restaurador ou pela atrição, e nestes casos a sua formação esta restrita à área afetada (Smith et al. [102] 1995; Nabakayashi et al. [35] 1982; Van Meerbeek et al. [103] 1992; Fusayama e Terachima [92] 1972; Ohgushi e Fusayama [93] 1975; Kuboki, Ohgushi e Fusayama [94] 1977 ; Pugach et al. [95] 2009). Este tecido possui uma deposição maior de minerais quando comparado à dentina hígida (Mendis e Darling [104] 1979)

A dentina afetada por cárie é um substrato clinicamente relevante na prática diária. Muito do entendimento que possuímos hoje em dia em relação à adesão foi realizado principalmente em dentina hígida (dentina de “laboratório”) (Perdigão [19] 2010). No entanto, este não é um substrato com o qual lidamos frequentemente pois os dentistas rotineiramente realizam procedimentos adesivos à dentina afetada com o objetivo de substitui-la. A dentina afetada possui uma dureza inferior que a dentina hígida (Ogawa et al. [105] 1983; Marhsall et al. [106] 2001). Assim, uma correlação significativa foi encontrada entre as propriedades mecânicas e a RU, no entanto, as propriedades mecânicas da dentina não são os únicos fatores responsáveis pelos valores de RU mais baixos na dentina afetada (Wang e Spencer e Walker [107] 2006). A diminuição de minerais de fosfato e carbonato (Wang e Spencer e Walker [107] 2006) e as alterações na distribuição e quantidade de fibrilas colágena e proteoglicanos em dentina afetada (Suppa et al. [108] 2006) parecem ter também uma influência nas propriedades adesivas.

Os valores de RU em dentina afetada são menores que os valores obtidos em dentina hígida, independente da técnica adesiva utilizada (Ceballos et al. [109] 2003; Wei et al. [110] 2008; Yoshiyama et al. [111] 2002; Say et al. [112] 2005). Uma comparação entre três diferentes estratégias de adesão mostrou valores de RU menores, em cada uma das estratégias, quando comparada à dentina hígida (Wei et al. [110] 2008). Os menores resultados de RU obtidos na dentina afetada poderiam ser o resultado da dureza e resistência a tração menores deste substrato. Clinicamente, este poderia não ser um problema tão crítico devido a presença de dentina hígida e esmalte circundante a este tipo de lesões (Yoshiyama et al. [111] 2002; Imparato et al. [14] 2017). A CH neste tipo de substrato é normalmente mais espessa e porosa que a CH formada em dentes hígidos (Yoshiyama et al. [111] 2002; Say et al. [112] 2005). As camadas híbridas em dentina hígida podem variar entre 1 e 3 μm enquanto a camada híbrida em tecido cariado pode apresentar espessuras entre 6 e 8 μm (Yoshiyama et al. [113] 2003). Como resultado da deposição de minerais no lúmen dos túbulos dentinários, a infiltração de resina dentro no interior dos túbulos dentinários da dentina afetada pode ser comprometida.

Entre os fatores que podem influenciar a adesão temos: a porosidade da dentina afetada que é altamente permeável e pouco mineralizada (Spencer et al. [114] 2005), o que poderia gerar as condições favoráveis para diminuir o grau de conversão do adesivo polimerizado nestas áreas (Spencer et al. [114] 2005). Por outra parte, a composição do adesivo também pode influenciar a RU no substrato cariado, nesse sentido o ácido polialquenóico presente em alguns adesivos pode aumentar os valores de RU neste substrato (Nakajima et al. [115] 1999). O uso de diferentes concentrações de ácido fosfórico também poderia influenciar nestes valores, dependendo do tipo de adesivo e o veículo na composição (Nakajima et al. [116] 2000). Um estudo *in vitro* que comparou diferentes técnicas de remoção da dentina afetada (brocas de carbeto de tungstênio, laser ou lixa 600), também mostrou diferenças nos valores de RU entre as técnicas comparadas (Sattabanasuk et al. [117] 2006).

A dentina afetada por cárie continua sendo o foco de diversas pesquisas devido a dificuldade para criar uma adesão duradoura e previsível neste tipo de substrato. As técnicas atuais buscam, materiais e terapias que permitam alcançar este propósito, evitando a reaparição do processo carioso no tempo.

2.3.8. Mecanismos de degradação da camada de adesivo

De uma forma geral, poderia dizer-se que a maioria dos sistemas adesivos testados em provas de retenção e selado marginal apresentam resultados imediatos favoráveis (Inoue et al. [118] 2001). Apesar da eficácia imediata que um adesivo possa obter, existem outros fatores mais importantes a serem levados em conta. Considerando que o propósito de uma restauração é ficar em função na boca pelo maior período de tempo possível, poderíamos falar que a adesão foi "exitosa" quando temos restaurações altamente duradouras.

Apesar dos avanços significativos na área da adesão, a interface adesiva continua sendo o elo mais fraco das restaurações adesivas. Os estudos apontam que há pouca correlação entre resultados imediatos

favoráveis e degradação ao longo do tempo (Van Dijken [119] 2000; Tay et al. [120] 2005; De Munck et al. [9] 2005) dos sistemas adesivos. Nesse sentido, evidentes sinais de degradação podem ser observadas em períodos tão curtos como 6 meses (Carrilho et al. [121] 2005; Tay et al. [120] 2005). Clinicamente, isto pode traduzir-se em descoloração marginal, adaptação marginal pobre ou até perda subsequente da retenção da restauração (Mjör e Gordan [122] 2002).

A degradação dos sistemas adesivos é um fenômeno que tem sido estudado ao redor de 35 anos, desde que em 1982, Nabakayashi [35], descreveu a CH pela primeira vez. Na década de 90, os estudos de Sano e Pashley (Sano [10] 2006) conduziram a um novo conceito, derivado de achados microscópicos que sugeriam uma degradação do adesivo de dimensões nanométricas. O termo "nanoinfiltração" se popularizou nesse momento, e o padrão de degradação na resina foi denominado "*water trees"* pela semelhança do padrão de infiltração com as árvores. Essa sequência de descobertas acabariam desvendando o mecanismo de degradação dos sistemas adesivos (Hashimoto [123] 2004). A conclusão obtida aponta à degradação dos dois substratos que conformam a interface adesiva, a dentina e o adesivo através de mecanismos diferentes, embora simultâneos.

Degradação da camada resinosa

A deterioração da camada de adesivo é um processo crônico que envolve dois fenômenos, a hidrólise desta camada e o vazamento de fluidos dentro do adesivo resinoso que inicialmente infiltra a matriz de colágeno desmineralizada (Hashimoto [124] 2010; Wang e Spencer [125] 2003; Kermanshahi et al. [126] 2010). Este processo de infiltração é facilitado pela penetração de água nas regiões onde o adesivo impregnou parcial ou incompletamente às fibrilas colágenas, e nas regiões onde há presença de uma camada predominantemente hidrofílica. Estas áreas são consideradas mais fracas, devido ao baixo grau de conversão decorrente da separação de fase do adesivo (Spencer e Wang [126] 2002) e a pobre compatibilidade entre o foto-iniciador hidrofóbico e a fase hidrofílica (Ye et al. [127] 2010). A fase hidrofílica do adesivo é degradada rapidamente no ambiente aquoso. Nesta etapa a

extração dos componentes da fase hidrofílica continua e está acompanhada de uma aceleração do movimento de água no interior da camada que se acelera na medida que as vias de percurso da água aumentam o seu calibre (Breschi et al. [11] 2008). Resíduos de água presos dentro da camada de adesivo durante o processo de polimerização podem ser observados durante essa etapa, contribuindo à degradação. Essa matriz de colágeno previamente hibridizada começa a apresentar fibrilas colágenas desprotegidas e vulneráveis a ação de enzimas proteolíticas (Pashley et al. [128] 2004; Armstrong et al. [129] 2004). Os grupos uretano, éster, carboxila, hidroxila e grupos fosfato são os grupos mais suscetíveis à degradação hidrolítica nos adesivos a base de metacrilatos (VanLanduyt et al. [130] 2007), podendo ser hidrolizados de forma química e pela ação de enzimas próprias do ambiente bucal (Feracane [131] 2006, Reis et al. [132] 2015).

Em períodos prolongados de tempo, a degradação da interface adesiva, que inicialmente se encontrava na base, começa a infiltrar o adesivo até chegar na camada de resina composta (Ito et al. [133] 2005; Yoshida et al. [134] 2007). Os componentes resinosos sofrem um processo de plastificação das suas cadeias poliméricas, o que faz eles agirem como um lubrificante molecular. O desgaste mecânico pelas forças mastigatórias aumentam a degradação da interface adesiva, até o ponto de permitirem em algumas ocasiões o contado da interface com os fluidos salivares, o que permite que as esterases aumentem a degradação dos grupos éster dos metacrilatos. O processo de hidrólise da interface adesiva é considerado a principal causa de degradação, contribuindo na diminuição da RU no tempo.

Degradação das fibrilas colágenas.

A degradação é um fenômeno que também pode afetar a matriz de colágeno que forma a camada híbrida. Quando os monômeros são aplicados na dentina, a hibridização incompleta do adesivo nas irregularidades nanométricas das fibrilas colágenas é comum. É por este motivo que as fibrilas colágenas desprotegidas pelos monômeros hidrofóbicos são mais suscetíveis à

degradação. Nesse sentido, o efeito da água pode ser considerado como a principal causa de degradação das fibrilas colágenas.

Como mencionado anteriormente, dois padrões de degradação tem sido observados na camada híbrida, a perda de material resinoso nos espaços intrafibrilares e a desorganização / desnaturação das fibrilas colágenas (Hashimoto et al. [135] 2003). O recobrimento das fibrilas colágenas é variável e depende do tipo de adesivo usado (Breschi et al. [11] 2008), o que pode gerar áreas de recobrimento incompleto que contem fibrilas colágenas desprotegidas ao longo da camada híbrida (Wang e Spencer [136] 2002). Essas fibrilas colágenas desprotegidas podem ser reconhecidas com métodos imunohistoquímicos (Breschi et al. [137] 2004; Hall et al. [138] 1997). Assim, técnicas como a zimografia *in situ* são utilizadas para determinar a presença de enzimas próprias do organismo nas regiões de colágeno desprotegido subjacente à camada híbrida (Breschi et al. [139] 2002; Breschi et al. [137] 2004; Mazzoni et al. [140] 2012)

A dentina mineralizada apresenta uma atividade colagenolítica intrínseca que contribui na degradação do colágeno. Estudos recentes tem analisado o efeito das proteinases próprias do hospedeiro e a sua relação com a ruptura e clivagem da matriz de colágeno na patogêneses da cárie dental (Tjäderhane et al. [2] 1998; Sulkala et al. [141] 2002). Embora a importância destes achados, a dúvida sobre o mecanismo de degradação da dentina hígida desmineralizada pelo ácido fosfórico ainda era uma incógnita. Assim, a primeira evidência da atividade colagenolítica intrínseca das metaloproteinases próprias do hospedeiro (MMPs) em dentes hígidos mineralizados foi mostrada por Pashley e colaboradores [128] em 2004. Neste estudo foram evidenciados sinais de degradação do colágeno em ausência de bactérias imediatamente após a aplicação do ácido fosfórico. Estes autores especularam sobre a atividade proteolítica poderia ser decorrente do efeito de MMPs, cuja presença no complexo dentinho-pulpar já tinha sido previamente comprovada (Tjäderhane et al. [2] 1998; Sulkala et al. [141] 2002; Sulkala et al. [4] 2001).

MMPs e Cisteínas Catepcinas

As MMPs são um tipo de endopeptidases dependentes do zinco e do cálcio. Estas enzimas endógenas são componentes importantes em diversos processos biológicos e patológicos pela sua habilidade de degradar praticamente todo tipo de matrizes extracelulares. No meio bucal as pesquisas tem se focado principalmente no papel, detecção e distribuição das MMPs (Hannas et al. [142] 2007). Dentro do complexo dentino-pulpar, várias são as MMPs que tem sido identificadas. A matriz de dentina possui ao menos quatro tipos de MMPs até agora identificadas: stromelysin- 1 (MMP-3) (Boukpessi et al. [143] 2008; Mazzoni et al. [144] 2011), colagenase (MMP-8) (Sulkala et al. [145] 2007) e gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9 respectivamente)(Martín-De las Heras, Valenzuela e Overall [146] 2000; Mazzoni et al. [147] 2007).

Um estudo *in vitro* de Tjäderhane et al. [2] descreveu pela primeira vez a relação das MMPs no processo de degradação da matriz da dentina desmineralizada. Neste estudo, as MMPs 2, 8 e 9 foram identificadas em lesões de dentina desmineralizada. Além disso, este estudo analisou o papel das bactérias acidogênicas no processo de desmineralização da dentina, mostrando que os produtos do metabolismo das bactérias *per se* não estão envolvidos diretamente na degradação do colágeno, embora a desmineralização traga como consequência a ativação das MMPs endógenas. Portanto, foi concluído que após a desmineralização, as MMPs seriam as responsáveis da destruição da matriz de dentina durante a progressão da lesão cariosa (Tjäderhane et al. [2] 1998). Dadas as evidências dos estudos *in vitro* com relação a ativação das MMPs imediatamente após a desmineralização com ácido fosfórico (Mazzoni et al. [148] 2006), se pensou que um alternativa para evitar a ativação destas enzimas poderia ser possível através do uso de adesivos SE, no entanto esta hipótese foi posteriormente rejeitada pelas evidências apresentadas num estudo de Nishitami et al. [149] 2006, onde a ativação de MMPs foi observado em adesivos SE, principalmente em aqueles cujo pH é mais ácido.

Atualmente, se pensa que durante os procedimentos adesivos na dentina a exposição e subsequente ativação destas enzimas endógenas)

(Pashley et [128] al 2004; Mazzoni et al. [147] 2007; Mazzoni et al. 2015; Mazzoni et al. [148] 2006) é a responsável pelo desaparecimento quase completo da interface adesiva após o envelhecimento (De Munck et al. [150] 2003; Mazzoni et al. 2015).

Além do efeito das MMPs, a presença de um grupo novo de proteases endógenas foi descoberta na dentina desmineralizada, as denominadas cisteínas catepsinas (CPs). As catepsinas humanas são melhor conhecidas como as proteases que são amplamente expressadas nos lisosomas (**e.g.** catepsinas B, H, L e dipeptil-peptidase) (Dickinson [151] 2002). Dos quinze tipos de genes que expressam as CPs, dez são expressados no tecido pulpar e onze tem sido detectados nos odontoblastos.

Estudos *in vitro* investigaram a potencial correlação da ação das CPs e MMPs em dentina hígida (Tersariol et al. [6] 2010) e dentina cariada (Nascimento et al. [5] 2011). Os resultados destes estudos mostraram a atividade das CPs e MMPs em ambos substratos. Embora as CPs estejam presentes na dentina hígida, o nível de expressão destas proteases aumenta aproximadamente dez vezes na dentina cariada. Estes resultados mostraram que existe uma atividade colagenolítica-gelatinolítica sinérgica entre as MMPs e as CPs durante o processo de degradação do colágeno dentinário.

2.3.9. Estratégias para reduzir a degradação da camada híbrida.

Como foi mencionado no item relacionado a degradação da CH, os mecanismos envolvidos podem estar direcionados à resina composta ou à dentina hibridizada e subjacente. Da mesma forma, existem estratégias que tem como objetivo melhorar a penetração e as propriedades do componente resinoso. Entre estas estratégias podemos citar a aplicação ativa do adesivo, o aumento do tempo de aplicação do adesivo, o uso de ar quente, a aplicação de uma camada hidrofóbica após a aplicação do adesivo ou a aplicação de múltiplas camadas de adesivo, o aumento do tempo de polimerização (Reis et

al. [152] 2013). Neste item serão abordadas com maior detalhe as estratégias mais utilizadas na preservação do colágeno.

Com o intuito de prolongar a durabilidade da interface resina-dentina, a inibição das proteases (MMPs e CPs) tem sido recomendada. Assim, atualmente dispomos basicamente de 5 estratégias para este fim: 1) a inibição das MMPs através do uso de diferentes inibidores sintéticos tais como a clorexidina (Breschi et al. [153] 2010; Liu et al. [154] 2011; Almahdy et al. [155] 2012), metacrilatos de amônio quaternário, ou o cloreto de benzalcônio (Tezvergil-Mutluay et al. [156] 2011; Tezvergil-Mutluay [157] 2011) b) O fortalecimento da dentina subjacente e inativação das proteases pelo uso de agentes de ligação cruzada (*cross linkers)* (Bedran Russo et al. [20] 2010; Bedran Russo et al. [21] 2007; Bedran Russo et al. [22] 2008; Bedran Russo [23] et al. 2011; Leme-Kraus et al. [24] 2017; Bedran Russo et al. [158] 2010), c) a remineralização biomimética guiada da dentina (Sauro et al. [159] 2012), d) o uso de competidores dos iniciadores das proteases (cobre ou zinco) (Gutierrez et al. [160] 2017; Toledano et al. [161] 2015) e e) o uso de etanol para modificar a umidade e a superfície da dentina na técnica de "*ethanol wet bonding"* (Sadek et al. [162] 2010).

a) Inibidores das proteases

Clorexidina

A maioria dos experimentos destinados à busca da inibição das proteases com o objetivo de prolongar a longevidade da interface adesiva tem sido realizados através do uso da clorexidina (CHX), um potente agente antimicrobiano (Reis et al. [152] 2013). A CHX é um inibidor eficaz das MMP-2, -8, -9 (Gendron et al. [163] 1999) e das CPs. (Scaffa et al. [164] 2012), inclusive em concentrações muito baixas (Gendron et al. [163] 1999) e em tempos de aplicação curtos (15 a 30 s) (Loguercio et al. [165] 2009; Breschi et al. [166] 2010). O primeiro reporte da eficácia da CHX em inibir a ação das MMPs foi publicado por Pashley et al. [128] em 2004 onde mostraram a capacidade desta substância em manter a integridade do colágeno da camada híbrida. A partir deste momento, vários estudos confirmaram o potencial inibitório da CHX assim como também a capacidade de diminuir a taxa de queda nos valores de RU ao

longo do tempo, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Hebling et al. 2005; Carrilho et al. [167] 2007; Breschi et al. [166] 2010; Brackett et al. [168] 2009; Breschi et al. [169] 2009; Loguercio et al. [165] 2009; Stanislawczuk, Loguercio e Reis [170] 2009; Breschi [171] 2013).

O mecanismo de ação da CHX poderia estar relacionado a sua capacidade quelante (Zhou et al. [172] 2011) e a substantividade (capacidade de se liberar gradativamente) que possui (Carrilho et al. [173] 2010). Assim, a CHX tem comprovado ser um pré-tratamento dentinário eficiente quando utilizado nas diferentes estratégias adesivas (TE e SE) (Breschi et al. [11] 2008; Reis et al. [152] 2013). No entanto, o aumento de número de passos na sequência do protocolo de aplicação dos adesivos é contraria à tendência de simplificação da técnica buscada pelos clínicos. É por este motivo que o uso da CHX tem sido estudado na incorporação dela ao ácido fosfórico (Stanislawczuk et al. [174] 2009; Stanislawczuk, Loguercio e Reis [170] 2009), mostrando ser efetiva na inibição das enzimas proteolíticas. Mais recentemente, sua efetividade foi testada quando incorporada à composição de um sistema adesivo (Pallan et al. [175] 2012). Embora os achados destes estudos mostraram que a incorporação de CHX no adesivo pode interferir no grau de conversão (GC) do sistema adesivo, não foram observados sinais de aumento da sorção de água. Inclusive, os valores de resistência flexural e módulo de elasticidade (Ei) apresentaram valores maiores quando comparados ao controle (Pallan et al. [175] 2012).

Estudos mais recentes apontam que o colágeno poderia competir pelos sítios de ligação da CHX com as MMPs (Kim et al. [176] 2010; Carrilho et al. [173] 2010), motivo pelo qual a eficácia da incorporação de CHX no sistema adesivo poderia ser dependente à porcentagem incorporada. No entanto, a taxa de liberação da substancia no adesivo parece ser lenta e gradativa (Pallan et al. [175] 2012). Considerando que o objetivo da incorporação de inibidores nos sistemas adesivos é manter sua ação no tempo, estes resultados são alentadores.

Galardin

Outro inibidor que tem sido estudado é o Galardin. Esta é uma molécula inibitória sintética que apresenta atividade específica frente a ação da MMP-1, -2, -8, -9. A estrutura do galardin é similar a do colágeno e possui a capacidade de ligar-se às MMPs. O efeito do galardin na dentina tem sido comprovado através de testes de zimografia e nanoinfiltração após 1 ano (Breschi et al. [153] 2010). Além disso, a incorporação de galardin em um *primer* resultou na inibição das MMPs, mostrando um aumento da RU imediatamente e estabilidade destes valores após 3 meses de armazenamento (Almahdy et al. [155] 2012). Outra das vantagens desta molécula é a efetividade na inibição de MMPs em baixas concentrações. O uso de galardin em doses entre 10 e 100 vezes menor ao da CHX mostrou ser efetivo quando usado em dentina (Breschi et al. [153] 2010).

Tetraciclinas

As tetraciclinas e seus derivados, doxiciclina e minociclina, pertencem à família de antibióticos de amplo espectro que possuem propriedades catiônicas quelantes. Estes fármacos tem sido descritos como inibidores efetivos das MMPs (Sulkala et al. [4] 2001; Lauhio et al. [177] 1995; Sorsa et al. [178] 1996). Dentro desta classificação, a doxiciclina é a única tetraciclina clinicamente disponível com propriedades inibitórias das MMPs e que apresentam um alto potencial de diminuição da degradação da matriz de dentina. Um estudo de Stanislawczuk e colaboradores [179] avaliou a efetividade destes compostos nas propriedades adesivas de um adesivo convencional sobre a dentina, mostrando a interessante ação destas moléculas quando aplicadas à dentina.

Outros compostos similares com alta capacidade de inibição de MMPs são as tetraciclinas quimicamente modificadas. Este tipo de inibidores possuem baixa capacidade antimicrobiana, no entanto elas mantém alta capacidade inibitória. Dentro deste grupo, a CMT-3 (Metastat) é um fármaco particularmente efetivo na inibição de MMPs em lesões de cárie (Sulkala et al. [4]

2001; Chaussain-Miller et al. [180] 2006). O seu mecanismo de ação é basicamente direcionado a inibição da atividade e secreção das enzimas proteolíticas, e além disso, possui a capacidade quelante com o cálcio da dentina. Através da ligação da molécula de CMT-3 no sítio ativo do zinco na molécula de MMPs, este agente tem a capacidade de mudar a conformação molecular da proenzima ativador, e desta forma bloquear a atividade catalítica na matriz extracelular (Corbitt e Lindsey [180] 2007).

De uma forma geral, este tipo de fármaco e os seus derivados apresentam um potencial inibitório de relevância na área odontológica, razão pela qual estudos futuros deveriam ser conduzidos para elucidar o potencial destas moléculas. No entanto, uma das desvantagens que possuem e poderia limitar a sua aplicabilidade clínica, é a coloração decorrente da foto-oxidação das suas partículas.

Compostos derivados do amônio quaternário.

Os derivados do amônio quaternário (AQS) são outro grupo de moléculas de natureza catiônica que tem o potencial de inibir as MMPs, e consequentemente poderiam estabilizar a interface adesiva no tempo. Os AQS encontram-se positivamente carregadas e possuem um efeito antibacteriano. Similar à CHX, estes compostos são catiônicos e hidrossolúveis, no entanto a diferença da CHX, as AQS não são suscetíveis de lixiviação fora das interfaces adesivas. Os AQS são tão ou mais efetivas que o galardin em inibir as MMPs-9, e tem a capacidade de inibir quase completamente a degradação do colágeno da dentina desmineralizada (Tezvergil-Mutluay et al. [156] 2011). Entre os compostos mais destacados deste grupo de inibidores temos os metacrilatos de AQS polimerizáveis e o cloreto de benzalcônio (BAC) (Frassetto et al. [12] 2016).

Entre os metacrilatos de AQS polimerizáveis temos o brometo 12-metacriloiloxidecilpiridinio (MDPB), uma molécula que foi incorporada na composição do primer do adesivo Clearfill Protect Bond (Kuraray, Japão) pelas propriedades antimicrobianas e a capacidade de copolimerizar com os

monômeros do adesivo (Imazato et al. [181] 2003; Imazato et al. [182] 2007). Esta molécula parece ter um efeito inibitório das enzimas colagenolíticas da interface adesiva (Pashley, Tay e Imazato [183] 2011; Tezvergil-Mutluay et al. [184] 2015). Apesar dos resultados encontrados com relação a capacidade inibitória do MDPB, alguns estudos tem mostrado que houve redução dos valores de RU comparável aos níveis de outros adesivos (De Munck et al. [185] 2010; De Munck et al. [186] 2011)

O BAC é uma mistura de cloretos de alquilobenzilo-dimetiloamonio que possuem várias cadeias alquilo, é um surfactante catiônico com um grupo de amônio quaternário antimicrobiano (Tezvergil-Mutluay et al. [157] 2011). Estes compostos são incorporados na composição do ácido fosfórico sem afetar as propriedades adesivas imediatas tanto da dentina quanto do esmalte (Kanca [187] 1997). O ácido fosfórico da Bisco (Bisco Dental, EUA) é um dos produtos comercializados que possuem BAC na sua composição. Um estudo de Tezvergil-Mutluay et al. [157] demonstrou que o uso de BAC ao 0,5 % inibiu completamente as MMP-2, -9 e -8 e produziu uma diminuição significativa da degradação do colágeno. Outras das vantagens que a molécula de BAC possui é a capacidade de ligar fortemente à dentina desmineralizada, o que permite que ela mantenha as propriedades inclusive após a lavagem com água.

Os estudos com o uso de BAC tem ganhado força nos últimos anos, as variações de porcentagens e aplicações para a técnica TE tem mostrado resultados encorajadores (Sabatini et al. [188] 2013; Sabatini et al. [189] 2015) que poderiam abrir novas linhas de pesquisa usando materiais mais atuais.

b) Agentes de ligação cruzada do colágeno.

Apesar do potencial inibitório da CHX em inibir as MMPs (Gendron et al. [163] 1999) e as CPs (Scaffa et al. [164] 2013), a desvantagem desta molécula é a sua lixiviação fora da camada híbrida após períodos de longevidade entre 18 e 24 meses (Hashimoto et al. [8] 2000; De Munck et al. [185] 2010; Donmez et al. [190] 2005; Sadek et al. [162] 2010; Komori [191] et al. 2009; Griffiths et al. [192] 1999; Koshiro et al. [193] 2004; Ricci et al. [194] 2010). Os agentes de ligação cruzada

(ALC) são considerados uma opção interessante para melhorar a estabilidade e resistência à degradação do colágeno na matriz desmineralizada de dentina (Bedran-Russo et al. [195] 2008; Xu e Wang [196] 2011). Os ALC covalentes produzidos com *cross linkers* externos são bastante estáveis, e podem inativar os sítios ativos das proteases dentinárias a través da redução da mobilidade molecular dos sítios ativos ou pela mudança de polaridade dos sítios ativos das terminações carbóxila (COO^-) com carga negativa em grupos amida com carga positiva. Assim, um aumento das ligações cruzadas nas fibrilas colágeno, antes da aplicação do adesivo poder resultar em um aumento da longevidade da RU (Frassetto et al [12] 2016)

O uso de ALC tem ganho popularidade recentemente devido a capacidade das moléculas de diminuir a bio-degradação e aumentar as propriedades mecânicas da dentina, ambas qualidades buscadas para preservação do colágeno (Tjäderhane et al. [7] 2013; Liu et al. [154] 2011). Diferentes moléculas que possuem estas características tem sido estudadas, dentre elas destacam-se o glutaraldeido, as proantocianidinas e a genipina (Bedran Russo et al. [197] 2007), a riboflavina (Cova et al. [197] 2011), o ácido tânico (Bedran Russo [198] et al. 2009) e a carbodiimida (Bedran Russo [158] 2010). Todas elas mostraram potencial para reforçar a estabilidade mecânica e estrutural do colágeno, o que poderia especular-se aumentaria a longevidade da interface adesiva. Outro benefício importante dos ALC é a capacidade de melhorar a resistência à degradação das colagenases do metabolismo bacteriano na dentina leve ou parcialmente tratada com ALC.

Apesar dos efeitos químicos e físicos dos ALC, ainda persistem alguns problemas a serem resolvidos antes de conseguirem ser disponibilizados para sua aplicação clínica. O glutaraldeído é um exemplo desta situação. Embora a sua alta capacidade de tratar e melhorar as propriedades do colágeno em tempo clínico aceitável (1 min), evitando a degradação de colágeno (Bedran Russo et al. [195] 2008) o glutaraldeído é uma substância altamente tóxica.

O tratamento tópico da dentina com 3,75 % (massa) de proantocianidina (PRO) é outra alternativa derivada de produtos naturais (e.g. extrato de

semente de uva e outras frutas silvestres) que tem mostrado resultados favoráveis. Um estudo *in vitro* demonstrou que a aplicação de PRO por 5, 15 ou 30 s foi capaz de proteger o colágeno quando imerso numa solução de colagenase bacteriana, entretanto, os grupos controle perderam toda a dentina desmineralizada após uma hora de incubação em colagenase (Liu, Dusevich e Wang [199] 2013).

O uso de PRO na forma de extrato de semente de uva (GSE) também tem demonstrado ser eficaz (Bedran Russo et al. [195] 2008) e gera um aumento dos valores de RU em tempos de aplicação curtos (Fang et al. [200] 2012). No entanto, um dos problemas para a sua aplicação clínica é o manchamento que produz no substrato (cor marrom). A efetividade destes produtos em períodos longos de tempo ainda não tem sido suficientemente estudada e deve ser examinada em estudos futuros.

Dentro deste grupo de substâncias que possuem potencial para proteger o colágeno temos também os Flavonoides. Os flavonoides são compostos fenólicos de origem natural que tem sido usados como fitoativos com aplicabilidades sistêmicas por vários anos (Bravo [201] 1998) . Plantas medicinais e condimentares que contêm flavonóides são utilizadas há milhares de anos na medicina oriental. No entanto, a despeito da literatura avaliada, ainda são pouco usados terapeuticamente na medicina popular do ocidente, embora possuam atividade antioxidante na função protetora e no tratamento de doenças degenerativas mediadas por estresse oxidativo. Umas das vantagens destes produtos é a facilidade de obtenção e o baixo custo, pois a maioria das moléculas são derivados de cítricos (Middleton et al. [202] 2000).

Mais de 8.000 flavonóides já foram identificados e sua estrutura básica consiste em um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos e um pirano acoplado ao anel central (Di Carlo et al. [203] 1999). Os flavonóides são subdivididos nas principais classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonóides (Bravo [201] 1998). Flavonas e flavonóis são de

origem biossintética muito próxima. Os flavonóis são, na verdade, flavonas substituídas na posição C3 por uma hidroxila. Suas análises, sínteses e reações possuem, por isso, base teórica comum.

Estes compostos também possuem efeitos benéficos sobre a dentina. Um estudo em dentes bovinos de Islam et al. [25] em 2012 demonstrou a capacidade protetora da HES, uma flavona glicosada, tradicionalmente utilizada no tratamento de alterações circulatórias a nível sistémico e com alto potencial antioxidante, em proteger a dentina quando submetida a desafio ácido. Posteriormente, Castellan et al. [26] em 2013 testaram a aplicação da HES em dentes humanos e os resultados foram igualmente interessantes. Dados os resultados promissores obtidos com esta substância, este mesmo grupo de pesquisa (Islam et al. [27] 2014) incorporou HES em várias concentrações na composição do *primer* de um adesivo comercial de 2 passos (Clearfill SE Bond, Kuraray, Japão), demonstrando alta capacidade protetora da matriz de dentina após 1 ano de armazenamento. Da mesma forma, os valores de RU imediatos e ao longo do tempo se mantiveram estáveis.

Um estudo posterior (Epasinghe et al. [204] 2014) avaliou o efeito da PRO e outros flavonoides como a naringina (NAR) e a quercetina (QER) analisou o efeito de ditas substâncias aplicadas em uma solução salina (PBS) nas propriedades mecânicas (*Ultimate Tensile Strength)* da dentina. Embora os flavonoides apresentaram valores mais altos de resistência à tração, a PRO foi mais efetiva que os flavonoides (Epasinghe et al. [204] 2014).

c) *Outras alternativas: "ethanol wet bonding" e a Remineralização Biomimética.*

Com o intuito de prevenir a degradação da interface adesiva outra alternativa tem sido proposta. O *ethanol wet bonding* preconiza o uso de diferentes concentrações de etanol (50% em porcentagens crescentes até chegar ao 100 %) com a finalidade de modificar a umidade da dentina e permitir a aplicação de um adesivo hidrofóbico (Pashley et al. [205] 2007). Este

tratamento superficial permite a remoção da água da dentina evitando a separação de fase dos monômeros hidrofóbicos (e.g. Bis-GMA), facilitando o uso de adesivos hidrófobos na dentina. Alguns estudos tem sugerido que a técnica de molhamento com etanol permite melhor espalhamento do adesivo na dentina pré-condicionada e poderiam ser benéficos para evitar a degradação da interface adesiva (Sauro et al. [206] 2009; Shin et al. [207] 2009).

A última das estratégias que será descrita neste item é a remineralização biomimética. Esta técnica consiste basicamente no uso de nanotecnologia para mimetizar princípios naturais da biomineralização (Tay e Pashley [208] 2008; Sauro et al. [159] 2012). Nesta estratégia, a água é substituída por nanopartículas de cristais de apatita com tamanhos o suficientemente pequenos para ocupar os espaços intrafibrilares da matriz de colágeno e permitir a remineralização da interface adesiva (Niu et al. [209] 2014). Estes estudos que testaram esta técnica encontram-se na etapa laboratorial ainda e a aplicabilidade clínica deste conceito esta sendo desenvolvida.

3. PROPOSIÇÃO

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* o efeito de *primers* experimentais de diversos flavonoides nas propriedades adesivas e mecânicas da dentina hígida e da dentina com lesões cariosas artificiais quando utilizados como tratamento prévio ao uso de um adesivo universal em modo convencional.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da aplicação de soluções de flavonoides na nanodureza e módulo de elasticidade das camadas de adesivo, camada híbrida formada em dentina sadia e dentina afetada por cárie, após 24 horas e após envelhecimento com ciclagem térmica simulando dois anos e meio de envelhecimento.

2. Avaliar o efeito da aplicação de soluções de flavonoides nos valores de resistência de união de um sistema adesivo universal aplicado no modo *etch-and-rinse* em dentina sadia e dentina afetada por cárie, após 24 horas e após envelhecimento com ciclagem térmica simulando dois anos e meio de envelhecimento.

3. Avaliar qualitativamente a micromorfologia e características da micro-infiltração da interface de união formada na dentina hígida e na dentina afetada por cárie por meio de microscopia confocal laser, 24 horas após a aplicação de *primers* experimentais de flavonoides e após envelhecimento com ciclagem térmica simulando dois anos e meio de envelhecimento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi dividido em dois experimentos, com o objetivo de analisar o efeito dos flavonoides tanto na dentina hígida quanto na dentina afetada. O protocolo do projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa e aprovado sob o Protocolo N· 1032/2017, Parecer PN· 41 2017.

Um total de 182 molares humanos hígidos e intactos (Microtração (n = 98), Nanodureza (n = 42), Confocal (n = 42)) foram solicitados ao Banco de Dentes Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa para a realização dos diferentes testes.

4.1. Avaliação das propriedades adesivas e mecânicas em dentina hígida e afetada por cárie.

Para a avaliação em dentina hígida, foram utilizados um total de 91 molares humanos hígidos e intactos extraídos por indicação cirúrgica e armazenados em água deionizada (pH 7,1) à 4 ºC, por um tempo inferior a um mês. O total dos dentes foi aleatoriamente alocado em um dos grupos experimentais para avaliação nos diferentes testes: Controle Hígido (CONH), Placebo (PLA), Proantocianidina (PRO), Quercetina (QER), Rutina (RUT), Naringina (NAR), e Hesperidina (HES), sendo conformados da seguinte maneira: Microtração (n = 7), Nanodureza (n = 3) e Confocal (n = 3) para cada grupo experimental. As raízes dos molares foram cortadas 1 mm apical à junção amelo-cementária usando uma máquina de corte (Isomet 11/1180, Buehler, Coventry, Reino Unido) equipada com um disco de corte (XL 12205, Buehler, Londres, Reino Unido). O esmalte oclusal foi removido na mesma máquina de corte até expor a dentina, obtendo uma superfície plana de profundidade média, perpendicular ao longo eixo do dente.

Depois disso, a ausência de lacunas de esmalte foi conferida pelo uso de um microscópio ótico num aumento de 10x e o esmalte circundante nas

faces do dente foi cuidadosamente removido com alta rotação, utilizando uma ponta diamantada de formato tronco-cônico (Piranha Diamond, 847KR-016C,SS White, EUA). A superfície da dentina foi polida com uma lixa de granulação 600 por 1 min para padronização da SL.

Para o experimento em dentina afetada por cárie, foram utilizados um total de 91 molares humanos hígidos e intactos, extraídos por indicação cirúrgica e armazenados em água deionizada (pH 7.1) à 4 ºC, por um tempo inferior a um mês. O total dos dentes foi aleatoriamente alocado em um dos grupos experimentais para avaliação nos diferentes testes: Controle afetado por cárie (CONC), Placebo (PLA), Proantocianidina (PRO), Quercetina (QER), Rutina (RUT), Naringina (NAR), e Hesperidina (HES) (Microtração (n = 7), Nanodureza (n = 3), Confocal (n = 3)) da mesma forma que no experimento em dentes hígidos. O esmalte oclusal foi removido para expor a dentina conforme descrito anteriormente, obtendo uma superfície plana de profundidade média, perpendicular ao longo eixo do dente. Depois disso, a ausência de lacunas de esmalte foi conferida pelo uso de um microscópio ótico.

Lesões artificiais foram induzidas na superfície oclusal dos 91 dentes, usando o método microbiológico descrito por Marquezan [210] et al. Depois, os dentes foram alocados aleatoriamente em um dos grupos experimentais e distribuídos para cada teste de acordo com o Figura 1.

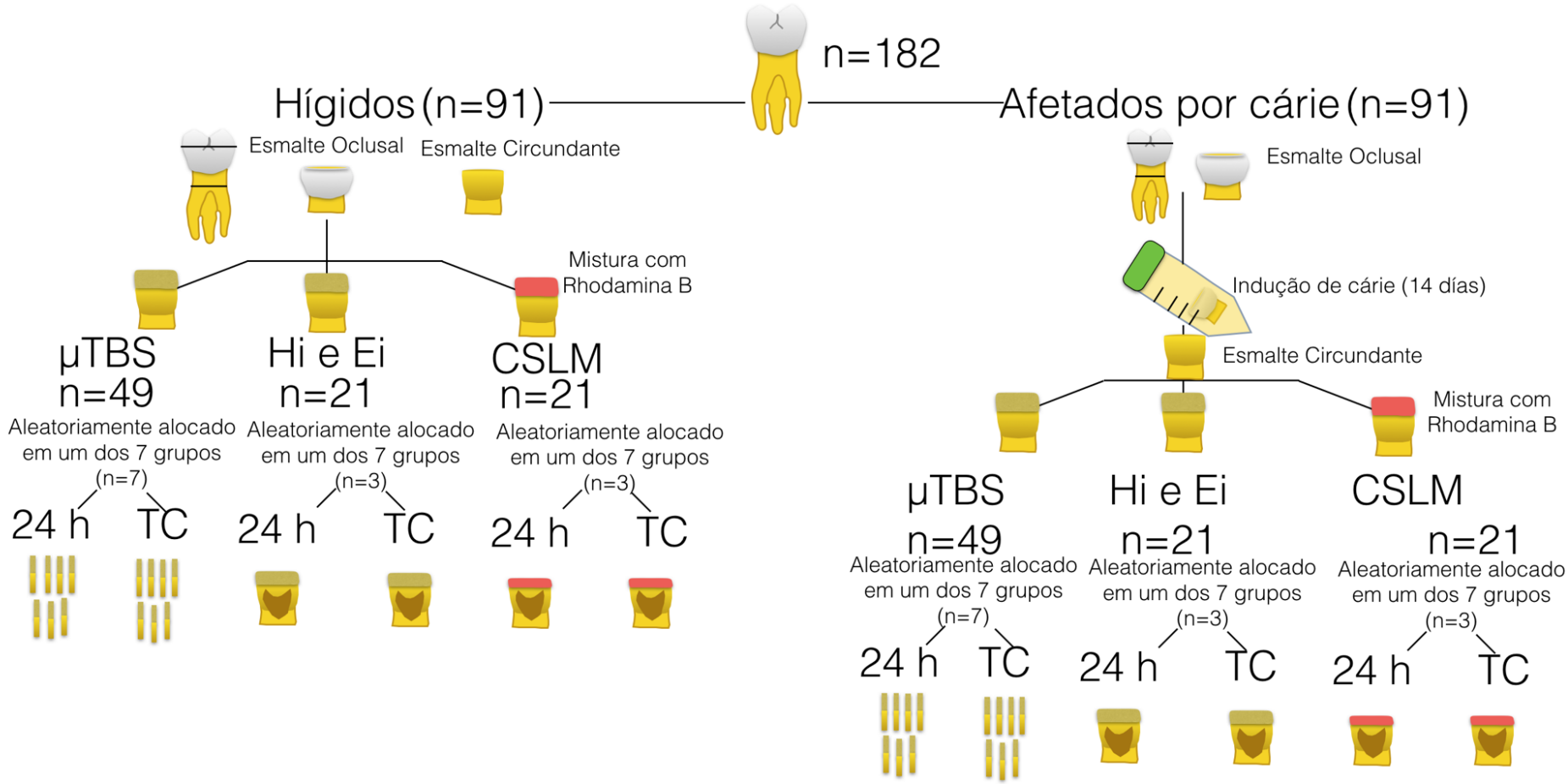


Figura 1. Representação ilustrativa da distribuição dos espécimes em cada um dos experimentos realizados neste estudo.

Em todas as superfícies do dente, com exceção da superfície oclusal, o esmalte circundante foi mantido para evitar a formação de lesões de cáries nestas regiões. Os espécimes foram esterilizados e depois transferidos assepticamente a um tubo falcon estéril com a solução de cáries artificial. A solução foi feita de: 3.7 g de hagar de infusão de cérebro-coração (BHI) (Sigma Aldrich, St Luis, Misuri, Estados Unidos), 0,5 g de extrato de levadura (Sigma Aldrich, EUA), 2.0 g de sacarose, 1.0 g de glicose por cada 100 mL de água destilada e 100 µl de cultivo jovem de *Streptococcus mutans* INCQS 00446, com um pH ao redor de 4.0. Cada dente foi imerso individualmente em 25 mL da em uma jarra anaeróbica (BBL, GasPak system, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, EUA). A cada 48 horas os espécimes foram transferidos a um novo tubo falcon contendo uma solução de cáries artificial nova. Depois de 14 dias, os espécimes foram lavados com água destilada (Marquezan [210] et al 2009).

Uma vez limpos, o esmalte circundante dos dentes foi cuidadosamente eliminado com auxílio de ponta diamantada (Piranha Diamond, 847KR-016C, SS White, EUA) em turbina de alta rotação sob irrigação constante com jato de ar e água. A eliminação da dentina infetada na superfície oclusal dos dentes foi simulada e padronizada, usando uma lixa de água nova de granulação 600 (3M, EUA) por 20 s. Este tempo foi determinado após a realização de estudos piloto prévios de microdureza e microtração (Dados não apresentados neste trabalho).

4.1.1. Formulação dos primers experimentais.

Uma vez determinado o índice de solubilidade e a natureza principalmente hidrófoba de cada flavonoide, foi estabelecida uma fórmula única, aplicável para todas as soluções que permitisse: a) obter os flavonoides em estado líquido sem alterar as suas propriedades e maximizando a sua disponibilidade em meio líquido para sua aplicação em dentina e b) utilizar a concentração mínima possível de solvente e veículo, evitando modificar as suas propriedades sobre o substrato (Quadro 1). Uma mistura de etanol e água foi escolhida para a formulação dos *primers* experimentais como recomendado

por Fang et al. [200]. Considerando os diferentes índices de solubilidade e a concentração miscelar crítica dos compostos, incorporou-se um tensoativo na formulação para homogeneização da solução. O tensoativo selecionado foi de natureza não iónica, dada a biocompatibilidade com os tecidos.

Flavonoide: 6,5% em massa.
Etanol puro: 30% (3 mL)
Tensoativo: Polissorbato 20 (SPAN 20): 1% (0,1 g)
Água destilada: QSP 10 mL.

Quadro 1. Fórmula química para obtenção de uma solução hidro-alcóolica de flavonoide ao 6,5%.

Devido a incorporação de substâncias que pudessem alterar a superfície e umidade da dentina, como o etanol e o SPAN 20, foi determinada a necessidade do uso de uma substância “placebo” com fins comparativos para quantificar e comparar o potencial real dos flavonoides, cuja fórmula foi igual das substancias a serem testadas, porém, sem o uso de princípio ativo algum.

Uma vez estabelecida a formulação final, cada flavonoide em forma de pó foi pesado numa balança analítica de precisão (Shimadzu, ATX324, Kioto, Japão), sendo reajustado o peso de acordo com a porcentagem de pureza do produto para basear-se numa concentração do 100%. O flavonoide em pó de HES, QER, NAR, RUT (Sigma Aldrich, St Luis, Misuri, Estados Unidos) e PRO (Grape Seed Extract, 95% de proantocianidina, Active Pharmaceutica, Palhoça, Santa Catarina, Brasil) foi misturado e agitado manualmente com cada um dos componentes da solução final até obter uma solução final homogênea. Após este passo, as soluções foram armazenadas sob refrigeração em frascos âmbar para manter as suas propriedades até o momento do uso.

4.1.2. Procedimentos Adesivos

As superfícies de dentina dos dentes foram condicionadas utilizando um gel de ácido ortofosfórico à 35% por 15 seg, seguido de lavagem abundante com água por 30 s. Os excessos de água foram secos com jato de ar e papel filtro, homogeneizando a umidade do substrato e evitando dessecar a superfície da dentina. Uma vez feita a lavagem, os *primers* experimentais de HES, QER, RUT, NAR, PRO e PLA foram aplicados ativamente sobre as superfícies condicionadas com ácido por 1 min e a umidade controlada com jato de ar e papel filtro, evitando superfícies muito úmidas ou ressecadas. No grupo CONH, nenhum destes produtos foi aplicado após a lavagem com água. O sistema adesivo Single Bond Universal (3M Oral Care, Minneapolis, Minnesota, EUA) foi aplicado de acordo com as indicações do fabricante (Quadro 2).

Substância	***Composição***	***Forma de aplicação***
3M Single Bond Universal	Ingredientes: MDP, Resinas de dimetacrilato, HEMA, Copolímero Vitrebond™, partículas de carga, etanol, agua, iniciadores, Silano.	Técnica adesiva de condicionamento total: – Aplicar 1 gota de Single Bond Universal nas superfícies de dentina condicionada, aplicar por 20 segundos, secar por 5 segundos e foto-polimerizar por 10 segundos.
Primer de Hesperidina	Solução hidroalcóolica de Hesperidina 6,5%	Aplicar ativamente na dentina por 1 min.
Primer de Quercetina	Solução hidroalcóolica de Quercetina 6,5%	Aplicar ativamente na dentina por 1 min.
Primer de Rutina	Solução hidroalcóolica de Rutina 6,5%	Aplicar ativamente na dentina por 1 min.
Primer de Naringina	Solução hidroalcóolica de Naringina 6,5%	Aplicar ativamente na dentina por 1 min.
Primer de Proantocianidina	Solução hidroalcóolica de ESU 6,5% (95% de PRO)	Aplicar ativamente na dentina por 1 min.
Primer Placebo	Solução hidroalcóolica sem conteúdo de flavonoides.	Aplicar ativamente na dentina por 1 min.

Quadro 2. Adesivo e *primers* experimentais usados neste estudo

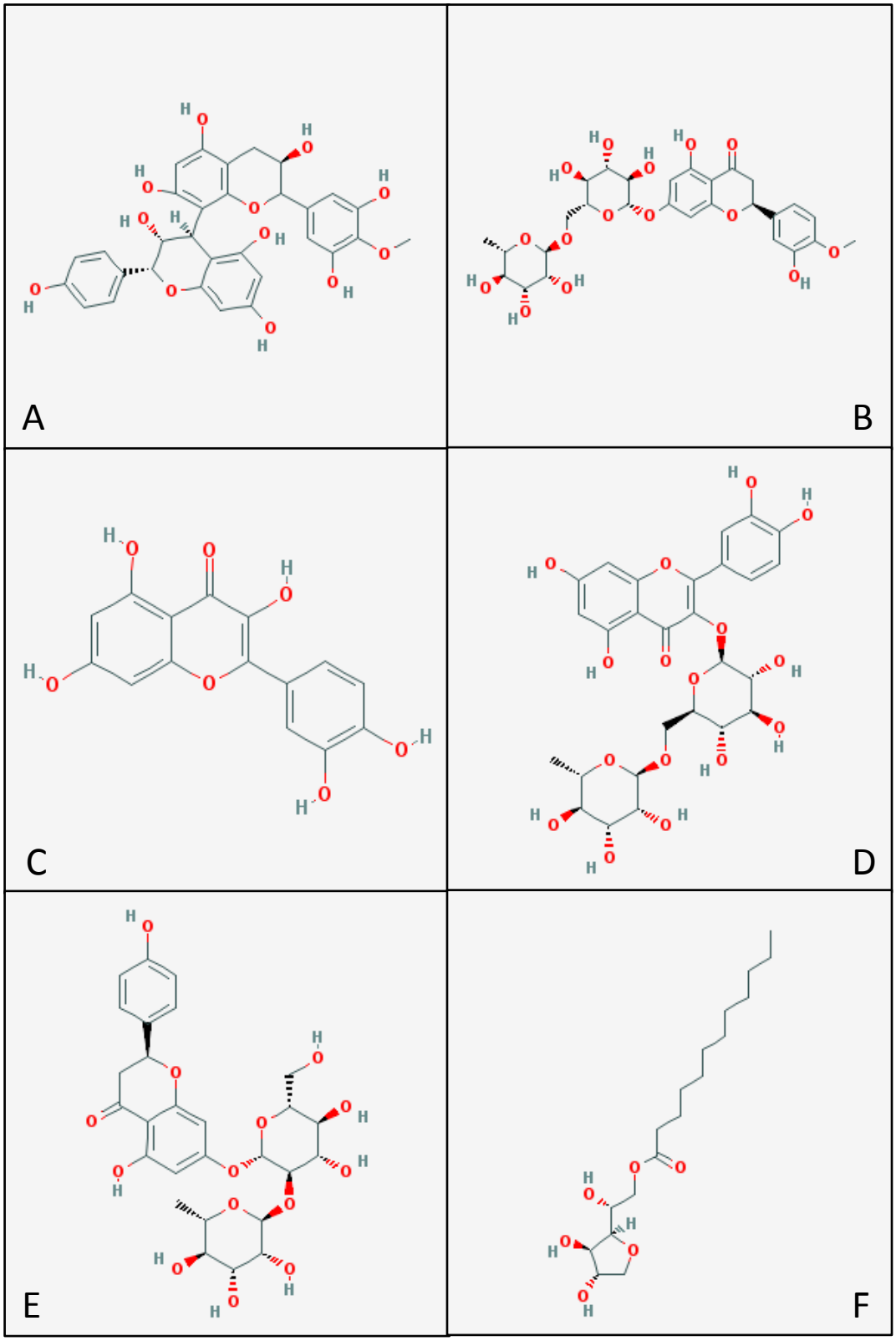


Figura 2. Moléculas utilizadas neste estudo. Proantocianidina (A), Hesperidina (B), Quercetina (C), Rutina (D), Naringina (E); SPAN 20 (F)

O procedimento de foto-ativação foi realizado com uma fonte de luz LED (Valo, Ultradent Products Inc, Sandy, Utah, EUA) por 10 s a 1000 mW/cm^2.

Uma resina Micro-híbrida LIS, cor EA2 (FGM, Joinville, Santa Catarina, Brasil) foi colocada de forma incremental em camadas de até 2 mm e polimerizada por 20 s cada uma, a 1000 mW/cm^{2,} resultando em um bloco de resina composta com 4 mm de altura.

4.1.3. Resistência de união. Teste de Microtração (μTBS)

Vinte e quatro horas após, os dentes restaurados foram seccionados no seu longo eixo nos sentidos mésio-distal e vestíbulo-lingual para obter palitos de dentina com área de secção transversal de aproximadamente 0.9 mm^2. Quatorze palitos de cada dente foram selecionados aleatoriamente para serem testados depois de 24 h (n = 7) ou após ciclagem térmica (n = 7) simulando um período equivalente a 2 anos e meio de envelhecimento. A área dos palitos foi medida com um paquímetro digital (Absolut Digimatic 131, Mitutoyo, Tokyo, Japão) com a máxima precisão (0,01 mm) para o cálculo dos valores de RU. Os espécimes selecionados para envelhecimento foram submetidos a vinte e cinco mil ciclos térmicos (Zhang et al. [211] 2014) em um aparelho de temociclagem (ODEME, São Francisco, Luzerna, Santa Catarina, Brasil), variando entre 5 ºC e 55 ºC, sendo mantidos durante 15 seg em cada temperatura para acelerar a degradação da interface de união. Após a mensuração da área, cada palito foi colado em um dispositivo para teste de microtração com uma cola à base de resina de cianoacrilato (Super Bonder Gel, Loctite, São Paulo, Brasil) e testados numa máquina de ensaios universais (Kratos, Cotia, São Paulo, Brasil) com velocidade de 0,5 mm/min até fraturar o palito.

4.1.4. Tipo de Fratura

O tipo de fratura foi avaliada com um microscópio óptico com magnificação de 40x e as fraturas classificadas em coesivas (falha exclusivamente entre a dentina ou a resina composta, C), adesiva (falha na interface resina-dentina, A) ou adesiva mista (falha na interface resina dentina que incluiu falha coesiva nas áreas circundantes, A/M).

4.1.5. Teste de Nanodureza

Os procedimentos para a eliminação do esmalte oclusal, forma de aplicação do *primer* e do adesivo, e a restauração dos espécimes foi realizada como descrito para o teste de microtração no item 4.1.

Três espécimes foram alocados em cada um dos grupos experimentais e cortados longitudinalmente até obter duas fatias (espessura 1,2 mm) para serem analisadas nos momentos 24 h e após ciclagem térmica respectivamente. As fatias para o teste 24 h foram polidas usando lixas de água de carbeto de silício em forma decrescente desde a granulação mais grossa de 800 até a mais fina de 4000. Um polimento final foi feito utilizando pastas diamantadas (Buehler-MetaDI, Buehler Ltd, Lake Bluff, Ilinois, EUA) sendo utilizadas na sequência de 1 μm até 0,25 μm. Entre cada passo do polimento, os dentes foram limpos em cuba ultrassônica com água destilada (pH 7.4) por 5 min para eliminar resíduos do polimento. Para as fatias submetidas a envelhecimento com ciclagem térmica, os procedimentos de polimentos foram realizados como descrito previamente, uma vez finalizados os 25.000 ciclos de ciclagem térmica. As amostras foram colocadas na termocicladora juntamente com as amostras utilizadas no teste de microtração.

As amostras polidas foram coladas com cera pegajosa em um *stub* metálico e colocadas em um porta amostras específico para serem testadas no aparelho nanoindentador (Asmec, Advanced Surface Mechanics, UNAT 3, Dresden, Alemanha), e uma ponta indentadora Berkovich (raio de 20 nm) foi empregada para o processo de indentação. Três malhas de 16 pontos de indentações foram realizados (4 no eixo X e 4 no eixo Y) com uma carga de 5000 nN e tempo de função de 10 s em 3 regiões do espécime (Mesial, Média e Distal), começando desde a camada adesiva e descendo em sentido à dentina intertubular, sendo analisadas quatro regiões : Adesivo (A), Camada Híbrida (CH), Dentina a 10 μm em direção apical (D10) da CH e Dentina a 20 μm em direção apical da CH (D20) nos diferentes períodos de armazenamento (24 h e após ciclagem térmica). A distância entre cada indentação foi mantida

ajustando o intervalo da distância em 10 μm (± 1 μm) por intervalo no eixo Y e 100 μm (± 10 μm) por intervalo no eixo X. Os valores obtidos após a indentação no nanodurômetro foram analisados num software próprio do aparelho para a obtenção do módulo de elasticidade (Ei) e nanodureza (Hi). Dada a irregularidade do substrato, no teste de Nanodureza realizado em dentina afetada por cárie, as regiões analisadas foram: : Adesivo (A), Camada Híbrida (CH), Dentina a 20 μm apical a (D20) CH e Dentina Hígida (DH). A DH foi visualizada no microscópio e a região imediatamente subjacente a lesão de cárie foi selecionada para a realização da indentação.

4.1.6. Análise da interface de união e micoinfiltração por meio *de Microscopia Eletrônica Confocal Laser*

Para este teste, previamente à restauração dos dentes, a resina e o adesivo foram misturados com 0.2 % (massa) de Rhodamina B (Sigma Aldrich, EUA) com o intuito de serem detectados na análise em CSLM. Uma vez obtida uma mistura homogênea destes materiais, os procedimentos restauradores compreendendo a utilização dos *primers* foram realizados como descrito para o teste de microtração.

Três dentes foram aleatoriamente alocados em cada um dos grupos experimentais. Após 24 h da restauração dos dentes, todos os espécimes foram cortados longitudinalmente até obter 2 fatias de 1,2 mm de espessura. Uma das fatias foi imersa numa solução de fluoresceína (Sigma Aldrich, EUA) ao 0,1 % (massa) por 4 h. Após este tempo, todos os espécimes foram limpos em cuba ultrassônica com água destilada por 8 min e finalmente polidos usando lixas de água de grano 1200 por 1 min. (Sauro et al. [159] 2012; Toledano et al. [212] 2014). A segunda fatia foi submetida a 25.000 ciclos de ciclagem térmica para análise de longevidade simulada. Após a ciclagem, o procedimento de imersão das fatias em fluoresceína e o polimento foi realizado como descrito previamente.

Um microscópio confocal à Laser (Leica TCLS, Leica, Heidelberg, Alemanha) equipado com uma lente de imersão em óleo de 63x/.4 NA, um

laser de Ar/Kr em modo de excitação de 488-nm (excitação da Fluoresceina), e um laser de He/Ne em modo de excitação de 568-nm (excitação da Rhodamina B) foi empregado para análise das interfaces adesivas. A emissão fluorescente foi coletada a 512-538 e 585-650 nm, respectivamente (Gráfico 2). Duas regiões diferentes de cada fatia foram selecionadas após feita uma análise geral da amostra com visão de 0,75 x de zoom ao longo do espécime. Imagens ópticas da reflexão da fluorescência e da rhodamina B foram capturadas a partir da sub-superfície do espécime, com 5 μm e 10 μm de profundidade (intervalos Z de 5 μm) abaixo da superfície externa da amostra e convertidas em imagens únicas usando o programa de processamento de imagem Leica LAS X for CLSM (Leica, Heidelberg, Alemanha) (Sauro et al. [213] 2012). A configuração do sistema foi padronizada e utilizada ao mesmo nível durante todo o estudo. Em seguida, as imagens foram avaliadas qualitativamente por dois avaliadores, comparando-as entre os diversos grupos experimentais e entre os momentos (24 h e 25.000 ciclos).

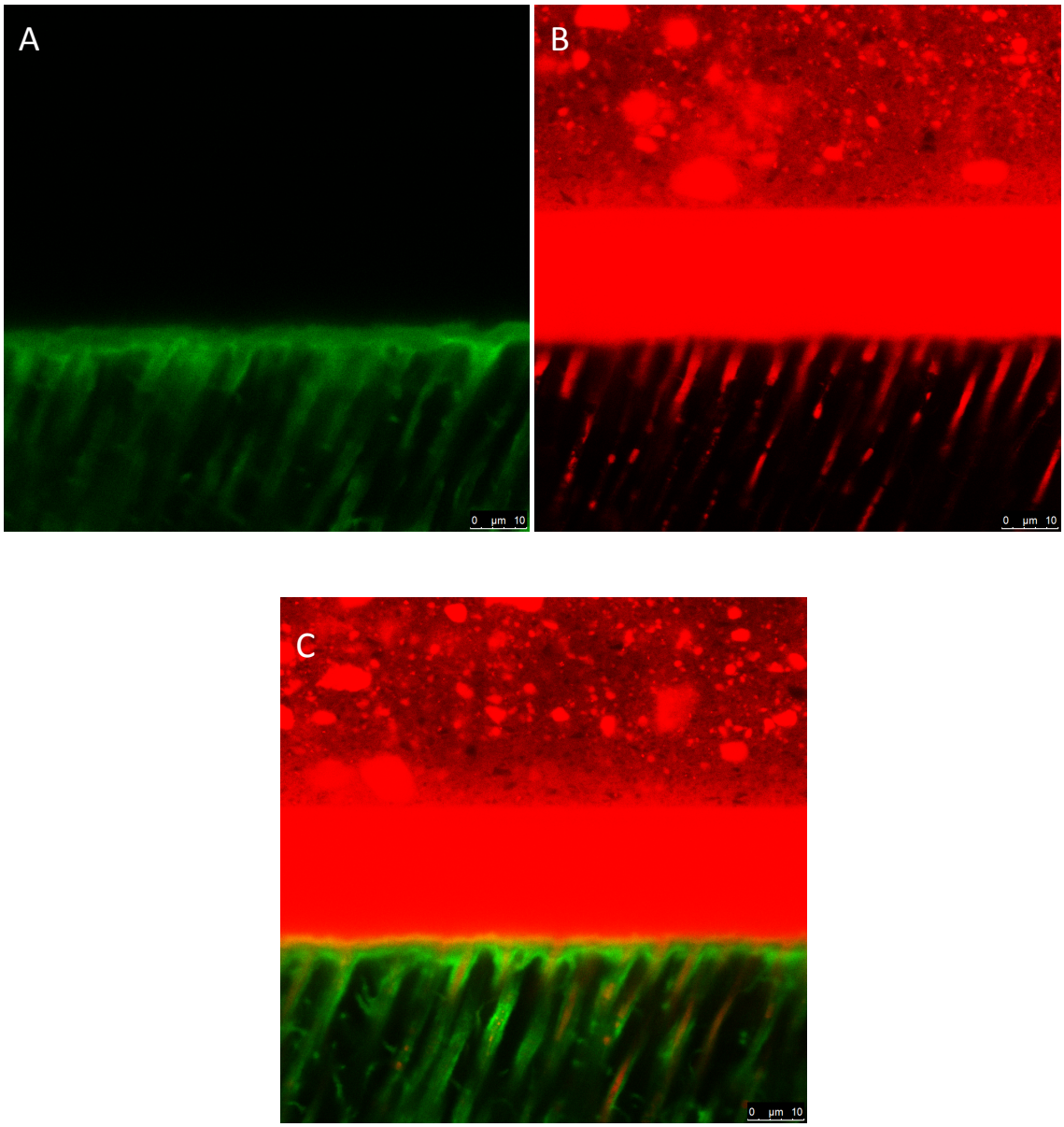


Figura 3. Imagem representativa da captura de imagem nos canais dos lasers do CSLM. A. Excitação do Laser 488 (Fluoresceína), B. Excitaçao do laser 552 (Rhodamina), C. Superposição de Imagens A+B.

4.1.7. Análise Estatística

A média dos valores do teste de RU dos estudos em dentina hígida e afetada foram submetidos ao teste ANOVA de dois fatores com medidas repetidas (Tratamento de superfície e Tempo) e teste de Bonferroni de comparações múltiplas. A análise estatística foi pré-estabelecida com nível de significância $\alpha = 0,05$, utilizando um pacote de *software* estatístico (SPSS19, SPSS Inc, IBM Comp., Armonk, Nova York, EUA).

Os dados de Ei e Hi foram submetidos a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas (tratamento de superfície e tempo de armazenamento, para os resultados de cada região ao longo da interface (camada de adesivo, camada híbrida, e profundidades dentinárias). O teste de Bonferroni foi utilizado para comparações múltiplas. A análise estatística foi pré-determinada com nível de significância $\alpha = 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Dentina hígida

5.1.1 Teste de Microtração

A análise estatística detectou significância para o fator tipo de tratamento de superfície. Entre as etapas 24 h e 25.000 ciclos houve diferença significativa nas médias gerais de todos grupos ($p < 0,05$). Nos tempos 24 h e 25.000 ciclos não foi detectada significância, assim a comparação das médias totais (24 h e 25.000 ciclos) foi utilizada para as comparações. Houve uma diferença significativa entre a média total (24 h e 25.000 ciclos) dos grupos experimentais PLA, RUT, QER, HES, PRO com o grupo CONH ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre o grupo NAR e o grupo CONH ($p > 0,05$). O grupo PLA alcançou os valores mais altos de RU, seguido da RUT, QER e HES. Não houve diferença significativa entre estes grupos ($p > 0,05$). O grupo PRO mostrou diferenças significativas com os grupos PLA, RUT e QER. Não houve diferença significativa entre o grupo PRO e os grupos HES e NAR. (Gráfico 2).

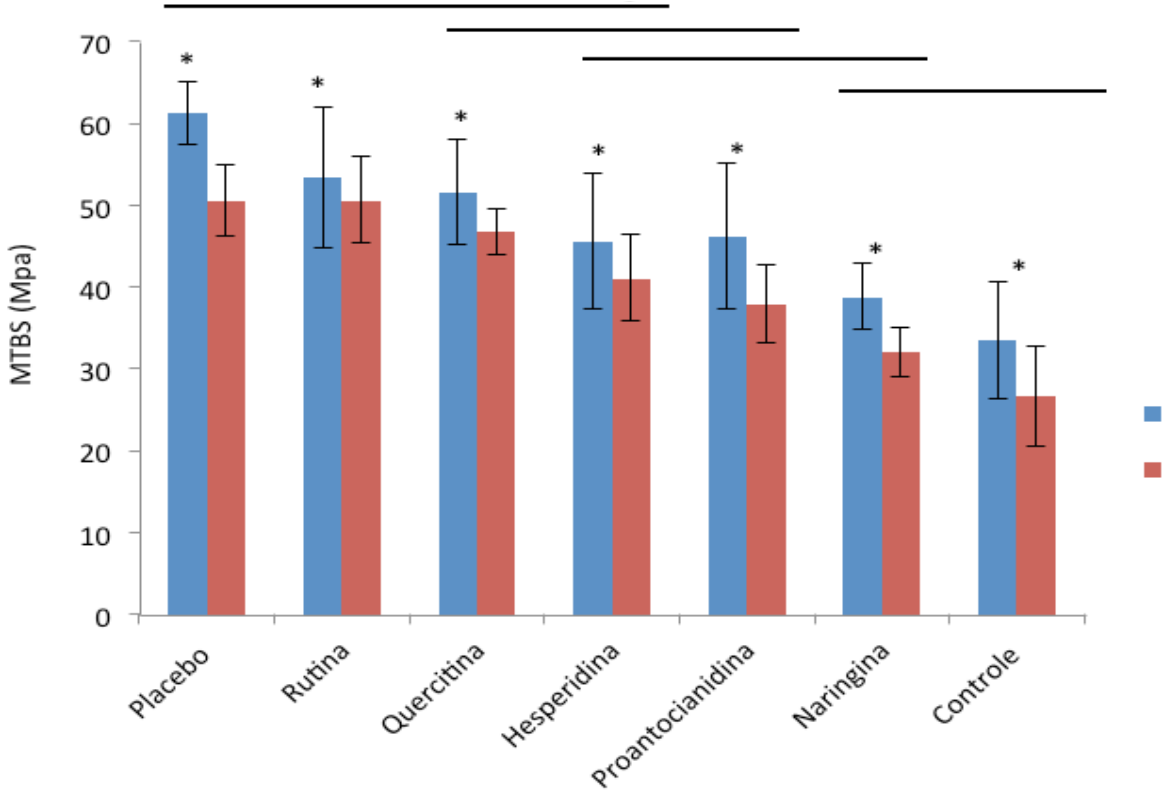


Gráfico 1. Média e desvio padrão dos valores de RU dos grupos experimentais (Mpa) do Experimento 1. Dentes Hígidos. Azul: imediato 24 h, Vermelho: após 25.000 ciclos. Linhas superiores indicam igualdade estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre os momentos ($p < 0,05$).

5.1.1. Tipo de Fratura

O tipo de fratura entre os grupos foi predominantemente adesiva (A). O grupo RUT apresentou a maior porcentagem de fraturas coesivas em dentina (CD) e coesivas em resina (CR) (Gráfico 3).

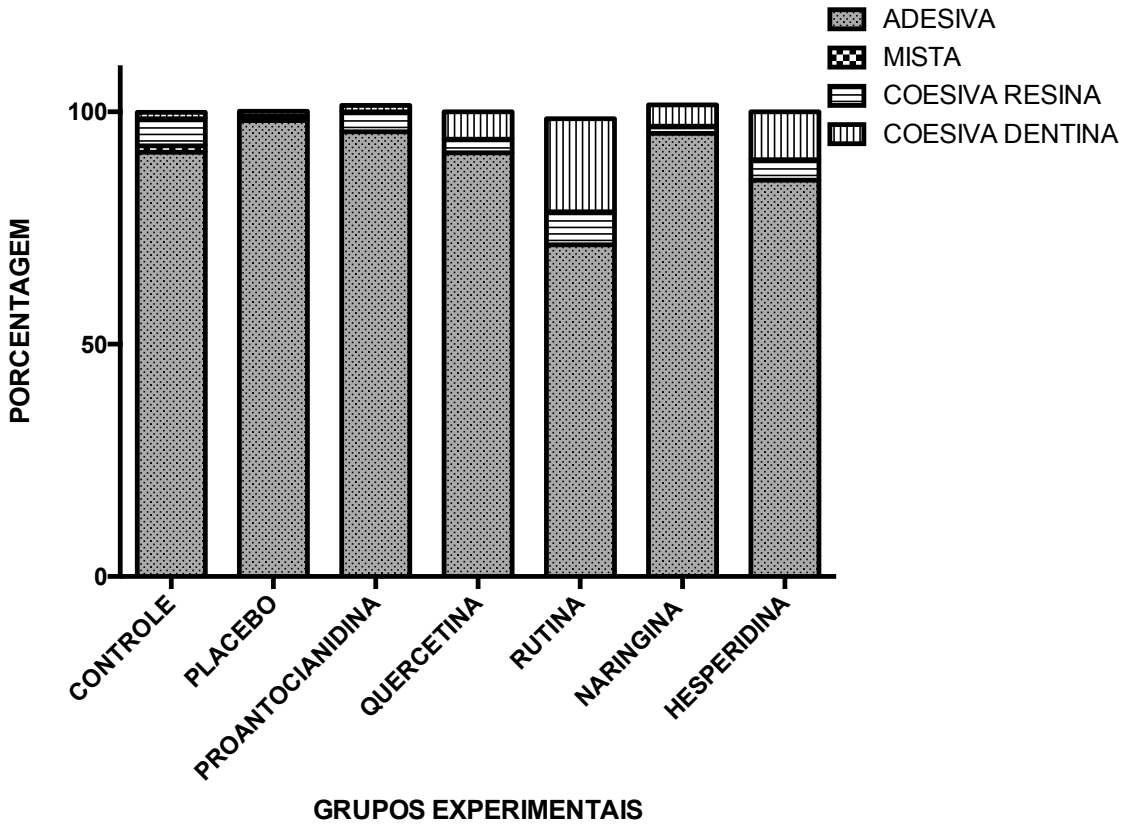


Gráfico 2. Porcentagem do tipo de fraturas entre os grupos experimentais aplicados em dentina hígida.

5.1.2. Teste de Nanodureza

Os resultados das propriedades mecânicas foram comparados entre os grupos dependendo da região analisada ao longo da interface adesiva (A, CH, D10, D20). Na camada de adesivo, a análise estatística mostrou diferenças na etapa 24 h entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Os grupos HES, RUT, e PRO mostraram os valores mais altos de Hi e Ei nesta etapa ($p < 0,05$). Não

houve diferenças significativas entre o grupo CONH e os grupos PLA, QUER e RUT ($p > 0,05$). Após ciclagem térmica, apenas a HES e a NAR apresentaram diferenças significativas entre períodos. Os valores de Hi e Ei após ciclagem térmica não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 1. Média e desvio padrão da nanodureza (Hi) e módulo de elasticidade (Ei) dos grupos experimentais hígidos na camada de adesivo.

	Camada de Adesivo			
	Hi-24 h	Hi-25.000 ciclos	Ei-24 h	Ei- 25.000 ciclos
CONH	0,275 (0,07) Ac	0,286 (0,04) Aa	7,48 (1,96) Ac	7,66 (0,86) Aa
PLA	0,265 (0,051) Ac	0,256 (0,018) Aa	6,55 (0,86) Ac	5,63 (0,89) Aa
PRO	0,290 (0,051) Aabc	0,244 (0,024) Aa	7,81 (1,59) Abc	7,20 (0,86) Aa
QUER	0,274 (0,022) Ac	0,250 (0,011) Aa	7,14 (1,44)Ac	6,16 (0,31) Aa
RUT	0,282 (0,002) Abc	0,249 (0,017) Aa	7,10 (0,88) Ac	6,29 (0,56) Aa
NAR	0,440 (0,061)Aab	0,306 (0,018) Ba	13,60 (1,82) Aa	8,89 (3,27) Ba
HES	0,444 (0,076) Aa	0,285 (0,039) Ba	12,90 (2,77) Aab	7,40 (0,76) Ba

Média e (DP) das nanopropriedades (Gpa) dos grupos experimentais ($p > 0.05$) .Letras Maiúsculas:comparação entre períodos. Minúscula: comparação entre grupos

Na CH os flavonoides apresentaram diferenças significativas com o grupo CONH e PLA no período imediato. Os valores mais altos de Hi e Ei neste período foram dos grupos HES, QUER e NAR respectivamente ($p < 0,05$). Os grupos RUT e PRO não apresentaram diferenças significativas entre eles neste período ($p > 0,05$). Os valores mais baixos de Hi e Ei após 24 h foram obtidos pelos grupos CONH e PLA ($p < 0,05$). No período posterior a ciclagem térmica, os grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas entre eles ($p > 0,05$). Diferenças significativas entre os períodos imediato e após ciclagem térmica foram detectados nos grupos em que foram aplicados *primers* experimentais de flavonoides (Tabela 3).

Tabela 2. Média e desvio padrão da Nanodureza (Hi) e módulo de elasticidade (Ei) dos grupos experimentais hígidos na camada híbrida.

	Camada Híbrida			
	Hi-24 h	Hi-25.000 ciclos	Ei-24 h	Ei- 25.000 ciclos
CONH	0,367 (0,08) Acd	0,384 (0,03) Aa	12,44 (0,61) Acd	11,43 (0,98) Aa
PLA	0,330 (0,04) Ad	0,350 (0,06) Aa	10,79 (0,88) Ad	10,86 (1,19) Aa
PRO	0,520 (0,03) Abc	0,380 (0,04) Ba	14,90 (0,85) Abc	12,36 (3,31) Aa
QUER	0,640 (0,11) Aab	0,320 (0,01) Ba	18,14 (3,28) Aab	9,31 (0,42) Ba
RUT	0,460 (0,04) Abcd	0,310 (0,01) Ba	13,64 (0,29) Acd	9,58 (0,56) Ba
NAR	0,580 (0,07) Aab	0,320 (0,09) Ba	18,97 (0,77) Aa	9,05 (2,57) Ba
HES	0,740 (0,01) Aa	0,340 (0,01) Ba	22,51 (0,18) Aa	8,30 (2,10) Ba

Média e (DP) das nanopropriedades (Gpa) dos grupos experimentais ($p > 0.05$) .Letras Maiúsculas:comparação entre períodos. Minúscula: comparação entre grupos

A análise estatística detectou significância para o fator tipo de tratamento de superfície na análise das profundidades de dentina D10 e D20 ($p < 0,05$). Entre as etapas 24 h e 25.000 ciclos houve diferença significativa nas médias gerais de todos os grupos ($p > 0,05$). Nos tempos 24 h e 25.000 ciclos não foi detectada significância, assim a comparação das médias totais (24 h e 25.000 ciclos) foi utilizada para as comparações entre os grupos experimentais. Os grupos HES e RUT obtiveram a média dos valores mais altos de Ei e Hi. Os valores mais baixos de Hi e Ei na D10 foram obtidos pelo grupo NAR (Tabela 4). Na profundidade D20, os valores mais baixos foram dos grupos PLA e NAR respectivamente (Tabela 5). Entre os grupos restantes não houve diferenças significativas nas profundidades D10 e D20 (Tabelas 4 e 5).

Tabela 3. Média e desvio padrão da Nanodureza (Hi) e módulo de elasticidade (Ei) dos grupos experimentais hígidos na dentina a 10 µm.

Dentina 10 µm									
		Control	Placebo	Proanto	Quercitina	Rutina	Naringina	Hesperidina	Average
Hi	24 h	0,677 (0,141)	0,649 (0,096)	0,698 (0,042)	0,757 (0,024)	0,767 (0,055)	0,637(0,078)	0,788 (0,053)	0,711 A
	25.000 c	0,663 (0,042)	0,574(0,055)	0,609 (0,067)	0,560 (0,047)	0,633 (0,105)	0,464 (0,028)	0,690 (0,072)	0,599 B
	Average	0,670 ab	0,612 ab	0,654 ab	0,659 ab	0,700 a	0,550 b	0,739 a	
Ei	24 h	21,94 (0,99)	20,27 (1,22)	21,20 (0,87)	22,86 (1,12)	23,20 (0,32)	20,93 (1,02)	24,52 (0,70)	22,13 A
	25.000 c	20,52(0,67)	16,44 (4,35)	19,06 (1,50)	17,47 (1,21)	18,16 (1,52)	13,24 (4,31)	20,25 (3,30)	17,88 B
	Average	21,23 ab	18,35 ab	20,13 ab	20,16 ab	20,67 ab	17,08 b	22,38 a	

Média e (DP) das nanopropriedades (Gpa) dos grupos experimentais ($p > 0.05$) .Letras Maiúsculas:comparação entre períodos. Minúscula: comparação entre grupos

Tabela 4. Média e desvio padrão da Nanodureza (Hi) e módulo de elasticidade (Ei) dos grupos experimentais hígidos na dentina a 20 µm.

Dentina 20 µm									
		Control	Placebo	Proanto	Quercitina	Rutina	Naringina	Hesperidina	Average
Hi	24 h	0,738 (0,069)	0,660 (0,074)	0,720 (0,054)	0,745 (0,028)	0,819 (0,079)	0,633 (0,10)	0,786 (0,053)	0,730 A
	25.000 c	0,685 (0,127)	0,578 (0,073)	0,712 (0,083)	0,680 (0,079)	0,762 (0,048)	0,547 (0,094)	0,743 (0,032)	0,670 B
	Average	0,712 ab	0,619 b	0,716 ab	0,713 ab	0,791 a	0,590 b	0,764 a	
Ei	24 h	23,16 (0,19)	21,13 (1,55)	21,96 (0,16)	23,12 (1,15)	25,09 (0,86)	20,98 (0,68)	24,15 (0,40)	22,80 A
	25.000 c	21,17 (1,66)	19,61 (0,51)	21,75 (1,87)	21,9 (1,15)	21,832 (0,86)	18,74 (0,44)	22,85 (0,54)	21,13 B
	Average	22,16 abc	20,37 c	21,86 abc	22,53 ab	23,46 ab	19,86 c	23,50 a	

Média e (DP) das nanopropriedades (Gpa) dos grupos experimentais ($p > 0.05$) .Letras Maiúsculas:comparação entre períodos. Minúscula: comparação entre grupos

5.1.3. Teste de Microinfiltração assistida por corantes

As imagens de CSLM mostraram áreas de infiltração na base da CH dos grupos CONH, QER e HES (Figura 4). Nos grupos PLA, PRO, RUT e NAR, foram observadas regiões onde não pode ser evidenciada a infiltração da CH. Nessas mesmas imagens os *tags* de adesivo não apresentavam penetração de fluoresceína ao redor da região mais superficial da penetração no interior dos túbulos. A presença de fluoresceína foi observada apenas a partir da profundidade de penetração de *tags* de aproximadamente 20 µm, (Figura 5). Este padrão de microinfiltração foi apenas observado nestes grupos. Após a ciclagem térmica, o grupo CONH apresentou um padrão bastante similar de infiltração ao inicial. No entanto, intensa infiltração de fluioresceina foi observada no interior da CH, caracterizada pela coloração alaranjada decorrente da mistura entre fluoresceína e rhodamina do adesivo no interior da CH (Figura 6). Os grupos HES e QUER mantiveram padrões similares quando comparados ao *baseline* (Figura 7). Poucos indícios de infiltração foram observados no grupo da RUT após ciclagem térmica. Entre os grupos analisados, o grupo da RUT aparentemente apresentou o padrão com o menor grau de infiltração. Os grupos PRO, PLA e NAR também apresentaram um padrão aparentemente estável de microinfiltração após a ciclagem térmica, com poucas regiões de microinfiltração similares as encontradas no *baseline* (Figura 8*).*

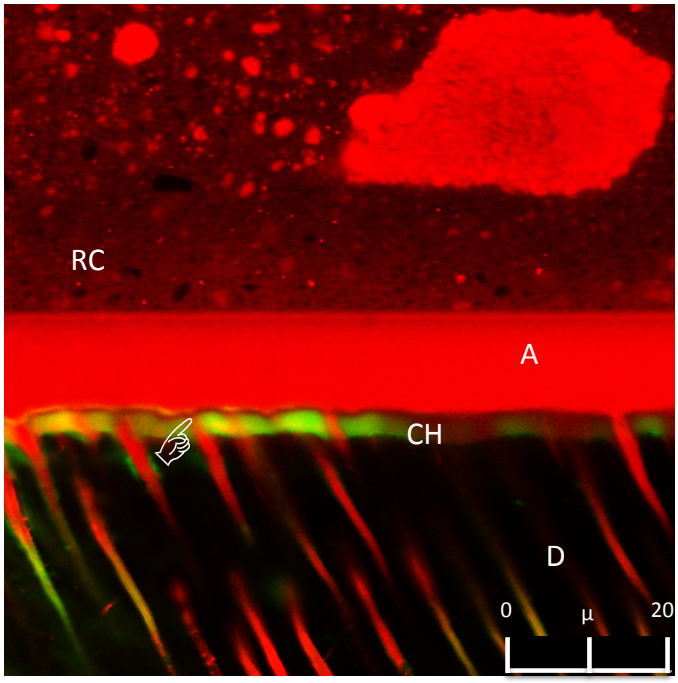


Figura 4. Imagem representativa da microinfiltração na base da camada híbrida após 24 h nos grupos CONH, QER e HES. Indicador: Infiltração de fluoresceína na base da camada híbrida. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D).

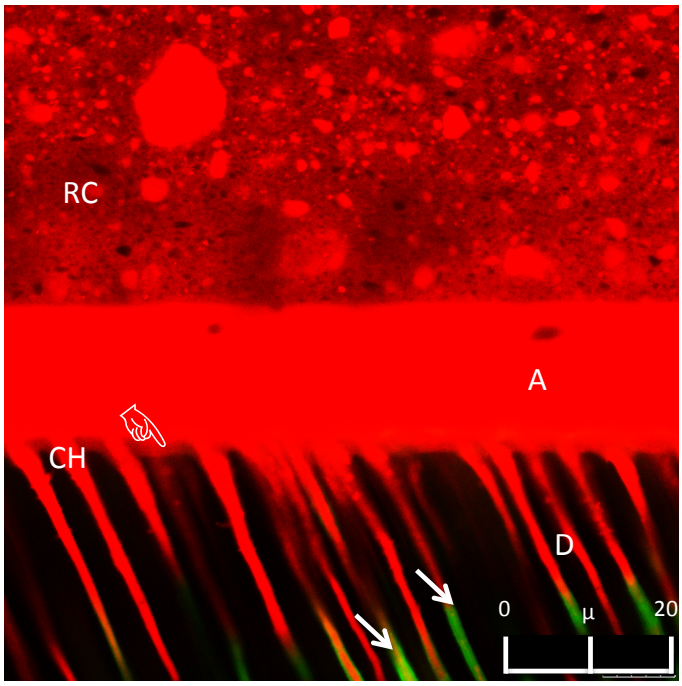


Figura 5. Imagem representativa da microinfiltração observada nos grupos RUT, PLA, PRO e NAR. Indicador: camada híbrida sem sinal de infiltração. Flechas: infiltração da fluoresceína apenas até a base dos tags. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D).

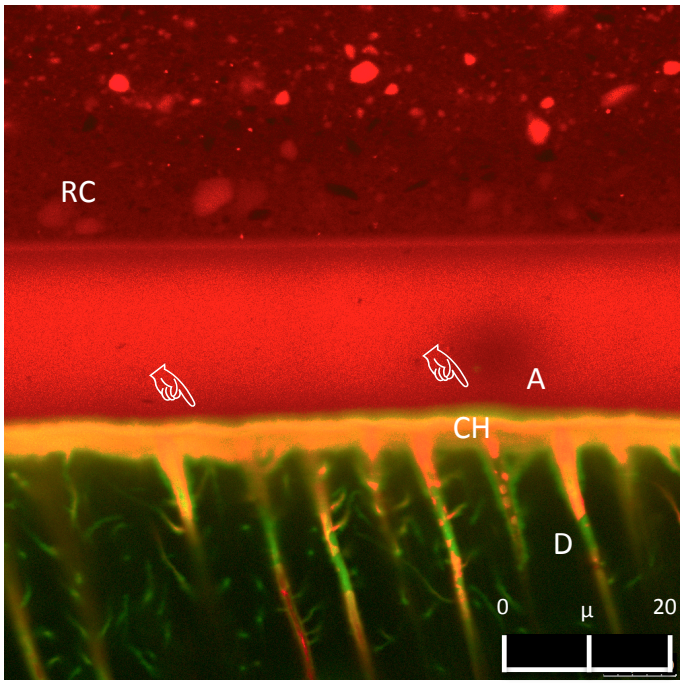


Figura 6. Imagem representativa de CSLM da microinfiltração observada no grupo CONH (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 µm), após ciclagem térmica de 25.000 ciclos. Indicador: Infiltração na CH e na base da camada de A. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D).

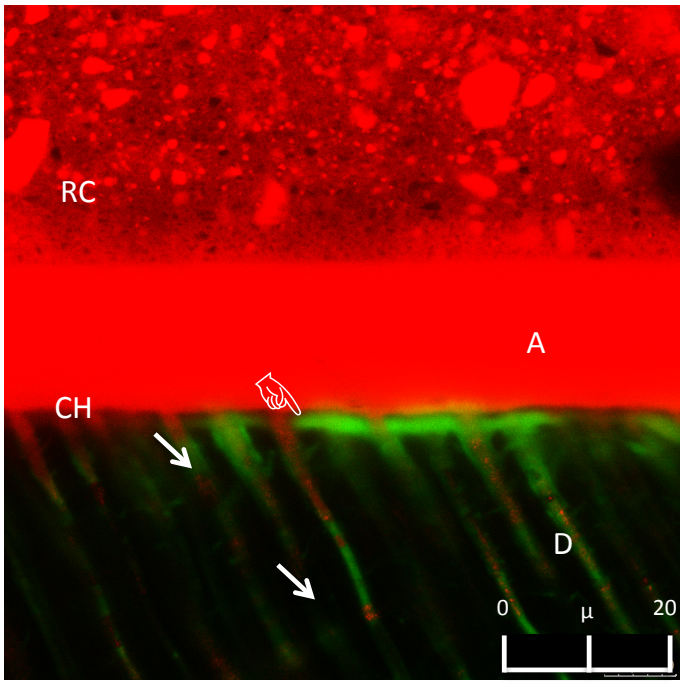


Figura 7. Imagem representativa de CSLM (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 µm). da microinfiltração observada nos grupos QER e HES após ciclagem térmica de 25.000 ciclos. Indicador: infiltração de adesivo na base da CH. Setas: infiltração até os tags de adesivo. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D).

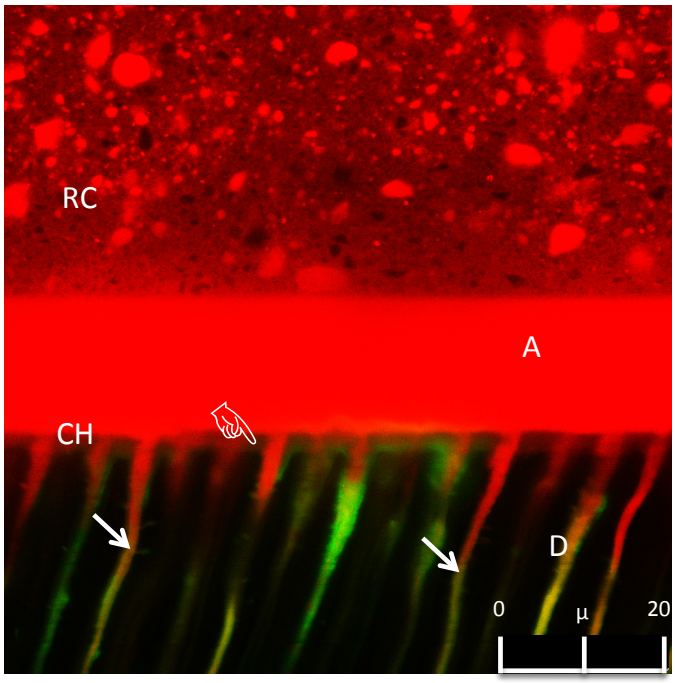


Figura 8. Imagem representativa de CSLM da microinfiltração observada nos grupos RUT, PRO, PLA após ciclagem térmica de 25.000 ciclos (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 µm). Indicador: infiltração de adesivo na base da CH. Setas: infiltração até os tags de adesivo Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D).

5.2. Dentina afetada por cárie.

5.2.1. Teste de Microtração

Na comparação das propriedades adesivas após 24 h, os grupos RUT, NAR e QER apresentaram os maiores valores, respectivamente. Estes valores foram significativamente superiores aos do grupo CONC ($p > 0,05$). Os grupos PRO, PLA, HESP não apresentaram diferença significativa entre eles nem com os grupos RUT, NAR e QER ($p > 0,05$). Da mesma forma, não houve diferenças significativas entre os grupos PRO, PLA, HES e o grupo CONC (Tabela 6, $p > 0,05$).

A RUT apresentou os valores mais altos de RU na avaliação após a ciclagem térmica, porém, houve diferenças significativas entre os valores iniciais e após ciclagem térmica ($p > 0,05$). Os grupos NAR, PRO, PLA e HES não apresentaram diferenças significativas entre o momento imediato (24 h) e

após a ciclagem térmica ($p > 0,05$). Entre os grupos experimentais, a QER teve os valores mais baixos de RU após a ciclagem térmica, apresentando uma queda de aproximadamente 50%, cujo valor final não teve diferenças significativas com os valores do grupo controle após ciclagem térmica. Entre os grupos QER, PRO, PLA, HES e CONC não houve diferenças significativas neste intervalo ($p > 0,05$). O grupo CONC teve os valores gerais mais baixos. Diferenças significativas entre a avaliação imediata e após ciclagem térmica foram detectadas também neste grupo (Tabela2).

Tabela 5. Média e desvio padrão dos valores de RU dos grupos experimentais afetados por cárie.

-

	Rutina	Naringina	Quercitina	Proantocianidina	Placebo	Hesperidina	Controle
Imediato	26.00 (5.51) Aa	24.64 (3.70) Aa	24.58 (4.90) Aa	20.66 (3.92) Aab	20.54 (4.88) Aab	18.41 (5.30)Aab	14.42 (4.43) Ab
Ciclagem	21.08 (4.75) Ba	22.12 (2.92) Aa	12.02 (5.21) Bb	17.20 (2.72) Aab	17.11 (5.27) Aab	15.73 (6.07) Aab	9.43 (4.29) Bb

Média e (DP) da RU dos grupos experimentais cariados em MPa ($p > 0.05$) .Letras Maiúsculas: comparação entre períodos. Minúscula: comparação entre flavonoides.

5.2.2. Tipo de Fratura

O tipo de fratura entre os grupos foi predominantemente A. O grupo RUT apresentou a maior porcentagem de fraturas CD e CR. (Gráfico 3, Porcentagem de Fratura em Dentes Cariados).

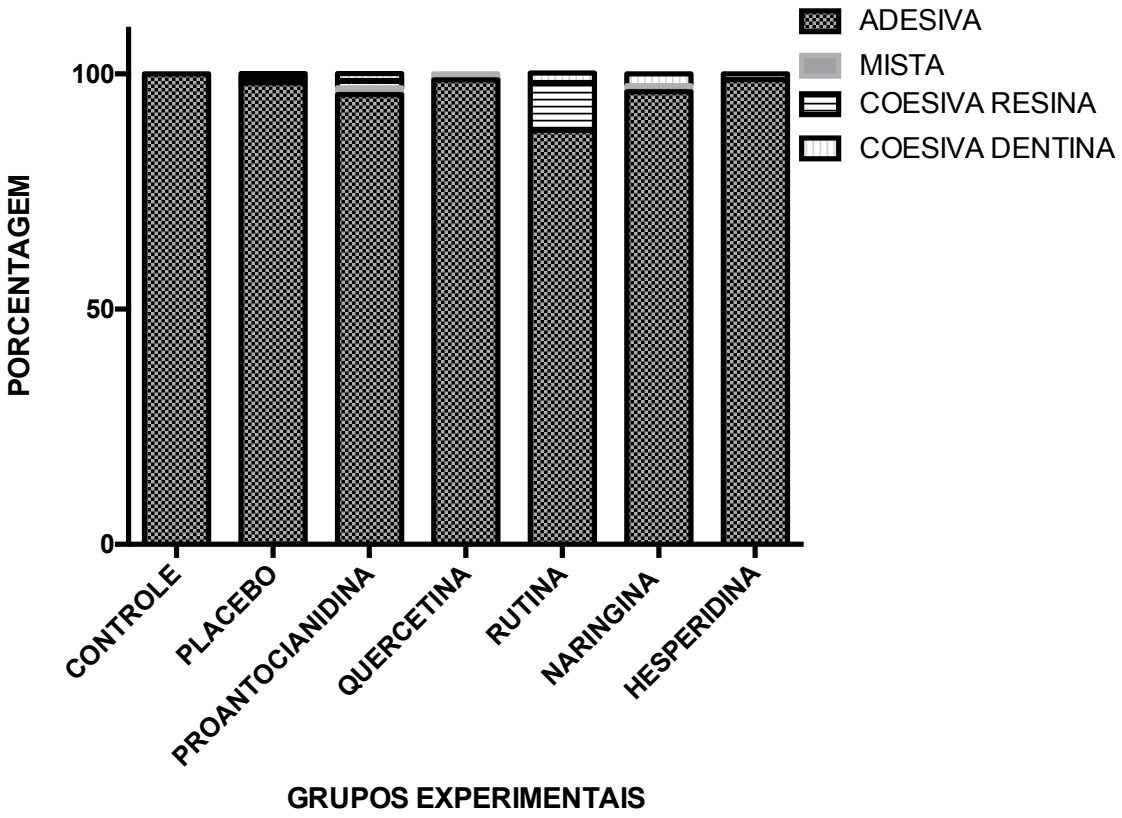


Gráfico 3. Porcentagem do tipo de fraturas entre os grupos experimentais aplicados em dentina afetada por cárie.

5.2.3. Teste de Nanodureza

Na camada de A e CH dos dentes afetados por cárie, a análise estatística detectou significância para o fator tipo de tratamento ($p < 0,048$). Não foi detectada diferença nos valores de nanodureza entre os tempos 24 h e após 25.000 ciclos (Tabelas 6 e 7).

Na camada de A, não houve diferença significativa nas médias entre as etapas 24 h e após 25.000 ciclos (Tabela 6). Entretanto, diferenças significativas nas médias gerais de todos os grupos foram observadas na CH entre os momentos experimentais (Tabela 7). Na camada de A, todos os grupos apresentaram valores mais altos de Hi e Ei quando comparados com o grupo CONC ($p < 0,048$) Entre os grupos experimentais, a QER, NAR e HES obtiveram a média dos valores mais altos de Ei e Hi. ($p < 0,048$) (Tabela 6). Este comportamento foi observado também na CH onde a NAR obteve os valores mais altos, seguida da HES e a QER ($p < 0,034$) (Tabela 7). Os valores mais baixos entre os grupos experimentais com conteúdo de flavonoide nas camadas A ($p < 0,048$). e CH ($p < 0,034$) foram observados na RUT.

Tabela 6. Média e desvio padrão das nanopropriedades dos grupos experimentais afetados por cárie na camada de adesivo.

Camada de Adesivo - Afetados por cárie

		Control	Placebo	Proanto	Quercitina	Rutina	Naringina	Hesperidina	Average
Hi	24 h	0,225 (0,041)	0,313 (0,087)	0,339 (0,056)	0,455 (0,127)	0,244 (0,023)	0,387 (0,092)	0,328 (0,074)	0,327 A
	25.000 c	0,191 (0,039)	0,305 (0,013)	0,282 (0,062)	0,338 (0,099)	0,297 (0,059)	0,256 (0,025)	0,306 (0,115)	0,282 A
	Average	0,208 b	0,309 ab	0,311 ab	0,396 a	0,270 ab	0,321ab	0,317 ab	
Ei	24 h	5,47 (1,16)	6,02 (1,45)	7,65 (0,49)	7,68 (1,94)	5,86 (0,74)	7,42 (1,22)	6,56 (0,57)	6,67 A
	25.000 c	4,19 (0,80)	5,86 (0,45)	7,61 (1,60)	7,09 (2,39)	5,76 (0,92)	5,35 (0,24)	6,40 (1,40)	6,04 A
	Average	4,83 b	5,94 ab	7,63 a	7,38 ab	5,81 ab	6,39 ab	6,48 ab	

Média e (DP) das nanopropriedades (Gpa) dos grupos experimentais ($p > 0,058$) .Letras Maiúsculas:comparação entre períodos. Minúscula: comparação entre grupos

Tabela 7. Média e desvio padrão das nanopropriedades dos grupos experimentais afetados por cárie na camada híbrida.

Camada Híbrida - Afetados por cárie

		Control	Placebo	Proanto	Quercitina	Rutina	Naringina	Hesperidina	Average
Hi	24 h	0,257 (0,156)	0,208 (0,058)	0,167 (0,076)	0,337 (0,144)	0,224 (0,018)	0,489 (0,029)	0,509 (0,146)	0,313 A
	25.000 c	0,192 (0,069)	0,222 (0,045)	0,185 (0,093)	0,292 (0,110)	0,154 (0,061)	0,306 (0,046)	0,272 (0,140)	0,232 B
	Average	0,225 ab	0,215 ab	0,176 b	0,314 ab	0,189 b	0,397 a	0,391 a	
Ei	24 h	5,27 (2,11)	4,11 (1,11)	4,31 (2,02)	6,64 (3,24)	4,22 (0,26)	14,23 (3,11)	9,86 (2,46)	6,95 A
	25.000 c	5,35 (2,27)	4,07 (0,56)	4,31 (2,05)	5,80 (1,99)	4,04 (0,26)	6,81 (1,67)	5,75 (2,48)	5,16 B
	Average	5,31 b	4,09b	4,31 b	6,22 b	4,13 b	10,52 a	7,81 ab	

Média e (DP) das nanopropriedades (Gpa) dos grupos experimentais ($p > 0,034$) .Letras Maiúsculas:comparação entre períodos. Minúscula: comparação entre grupos

Na camada de dentina afetada por cárie 10 µm, não houve diferenças significativas entre as médias dos valores dos grupos experimentais ($p > 0,034$) (Tabelas 8 e 9). Embora as médias de 24 h dos grupos HES e NAR foram aparentemente mais altas entre os grupos, não foi detectada diferença significativas entre os grupos. No entanto, HES e NAR foram os únicos grupos apresentar redução significativa após ciclagem térmica. Para o módulo de elasticidade, apenas a NAR apresentou médias significativamente superiores àquelas observadas nos outros grupos após 24 h. NAR e HES foram os únicos grupos a exibir queda significativa após ciclagem térmica ($p=0.005$) (Tabela 9.)

Tabela 8. Média e desvio padrão da nanodureza dos grupos experimentais afetados por cárie na camada de dentina afetada a 10 µm.

Dentina afetada por cárie 10 µm								
		Control	Placebo	Proanto	Quercitina	Rutina	Naringina	Hesperidina
Hi	24 h	0,227 (0,146) a	0,220 (0,142) a	0,318 (0,185) a	0,274 (0,116) a	0,183 (0,053) a	0,530 ((0,117) a	0,623 (0,115) a
	25.000 c	0,345 (0,251) a	0,155 (0,024) a	0,324 (0,172) a	0,229 (0,041) a	0,174 (0,096) a	0,261 (0,052) b	0,287 (0,008) b
	Average	0,286 A	0,187 A	0,321 A	0,252 A	0,178 A	0,396 A	0,455 A

Média e (DP) da nanodureza (Gpa) dos grupos experimentais (p > 0,034) .Letras Minúsculas:comparação entre tempos. Maiúscula: comparação entre grupos

Tabela 9. Média e desvio padrão do módulo de elasticidade dos grupos experimentais afetados por cárie na camada de dentina afetada a 10µm.

Dentina Afetada 10 µm		
	Ei-24 h	Ei-25.000 ciclos
CONH	4,79 (2,38) Ba	5,58 (2,21) Aa
PLA	4,43 (2,46) Ba	3,54 (0,15) Aa
PRO	7,02 (3,66) Ba	8,19 (3,14) Aa
QUER	5,82 (3,04) Ba	5,04 (1,55) Aa
RUT	3,19 (0,44) Ba	5,77 (4,39) Aa
NAR	18,14 (1,75) Aa	7,39 (5,70) Ab
HES	9,02 (1,90) Ba	5,20 (2,67) Ab

Média e (DP) do módulo de elasticidade (Gpa) dos grupos experimentais (p > 0.05). Letras Maiúsculas:comparação entre grupos. Minúscula: comparação entre tempos.

Tabela 10. Média e desvio padrão das nanopropriedades dos grupos experimentais afetados por cárie na camada de dentina subjacente à afetada.

Camada de Dentina Subjacente à Afetada

		Control	Placebo	Proanto	Quercitina	Rutina	Naringina	Hesperidina	Average
Hi	24 h	0,482 (0,107)	0,444 (0,111)	0,454 (0,144)	0,566 (0,098)	0,571 (0,093)	0,759 (0,113)	0,608 (0,018)	0,555 a
	25.000 c	0,370 (0,084)	0,411 (0,162)	0,470 (0,087)	0,273 (0,072)	0,461 (0,129)	0,421 (0,173)	0,442 (0,063)	0,407 b
	Average	0,426 B	0,428 B	0,462 AB	0,420 B	0,516 AB	0,590 A	0,525 AB	
Ei	24 h	12,98 (6,02)	15,85 (4,08)	15,84 (3,60)	17,78 (2,12)	17,16 (2,40)	22,21 (1,00)	15,91 (4,75)	16,82 a
	25.000 c	12,94 (5,80)	12,05 (5,72)	15,08 (2,56)	10,06 (0,88)	17,24 (4,83)	10,90 (7,46)	17,55 (2,31)	13,69 b
	Average	12,96 A	13,95 A	15,46 A	13,92 A	17,20 A	16,56 A	16,73 A	

Média e (DP) das nanopropriedades (Gpa) dos grupos experimentais ($p > 0,05$) .Letras Minúsculas:comparação entre períodos. Maiúscula: comparação entre grupos

Para a camada de dentina subjacente à dentina afetada por cárie, a ANOVA 2 fatores com medidas repetidas detectou diferenças significativas para os fatores "tratamento de superfície" ($p < 0,05$) e "tempo" ($p < 0,05$) para os valores de Nanodureza (Tabela 10). Não foi detectada interação significativa entre as variáveis independentes ($p > 0,05$). Entre os grupos analisados, os valores mais altos de Nanodureza foram obtidos pelo grupo NAR, seguido da HES, RUT respectivamente ($p < 0,05$). Entre estes três últimos grupos não foi evidenciada diferença significativa ($p > 0.05$).
Com relação ao Ei, nenhuma diferença significativa foi notada entre os grupos, A ciclagem térmica reduziu os valores de Ei significativamente ($p = 0,035$).

5.2.4. Teste de Microinfiltração assistida por corantes

As avaliações das imagens obtidas após 24 h mostraram um padrão de infiltração bastante semelhante entre os grupos. Dois padrões de formação de CH foram observados: O primeiro padrão, e o mais comum, apresentou regiões com *"tags"* de adesivo bem definidos que foram facilmente identificados, porém a CH apresentou-se fina ou ausente (Figura 9). No segundo padrão de formação de CH, foram observadas regiões com uma CH mais espessa, porém, com menos penetração do adesivo nos túbulos da dentina (Figura 10). Poucas imagens sugestivas de formação de CH de grande espessura foram observadas de forma geral. O grupo CONC apresentou regiões com presença de bolhas em toda a extensão da camada de adesivo, além disso apresentou a maioria de imagens onde a CH foi facilmente evidenciada e reconhecida. Todos os grupos experimentais apresentaram uma quantidade menor de bolhas na camada de adesivo quando comparadas ao grupo CONC (Figura 11). Dentro dos grupos analisados, os grupos que menos apresentaram este padrão de alteração da camada de adesivo foram a RUT, PRO, NAR e PLA respectivamente (Figura 11). Entre os intervalos de análise, o principal achado foi a presença de áreas com uma fenda entre a superfície de dentina e o adesivo (Figura 12). No grupo CONC e PLA houve áreas onde os espaços criados pelas bolhas foram preenchidos pela fluoresceína (Figura 13).

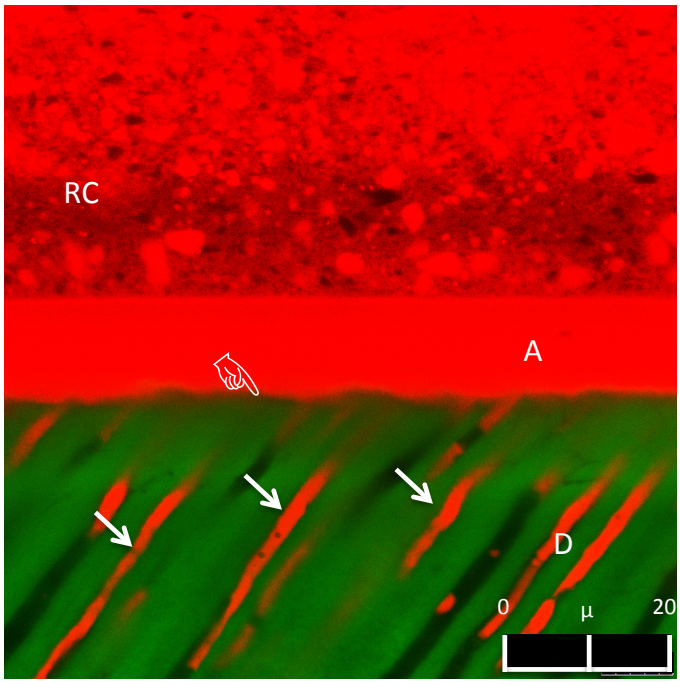


Figura 9. Imagem representativa de CSLM (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 5 µm) do padrão de formação de CH observada nos grupos experimentais cariados. Indicador: Ausência de interação do adesivo na interfase. Setas: presencia de tags de adesivo. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D).

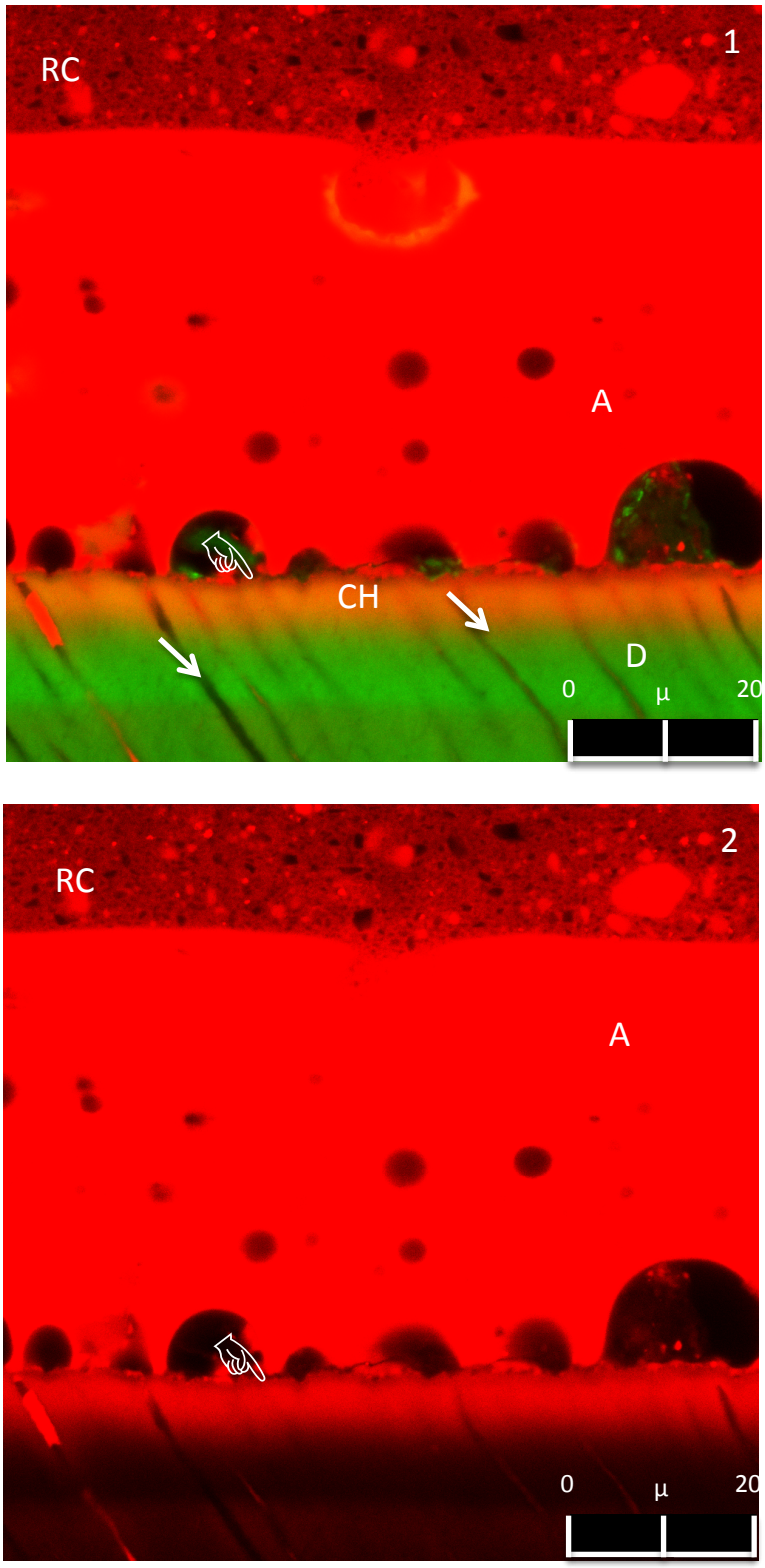


Figura 10. Imagens representativas de CSLM (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 µm). do padrão de formação de CH menos observado. Superior: Imagem com a superposição dos canais 488 e 552. Inferior: Imagem apenas do canal 552 para mostrar a infiltração do adesivo na dentina porosa formando uma CH mais espessa. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D).

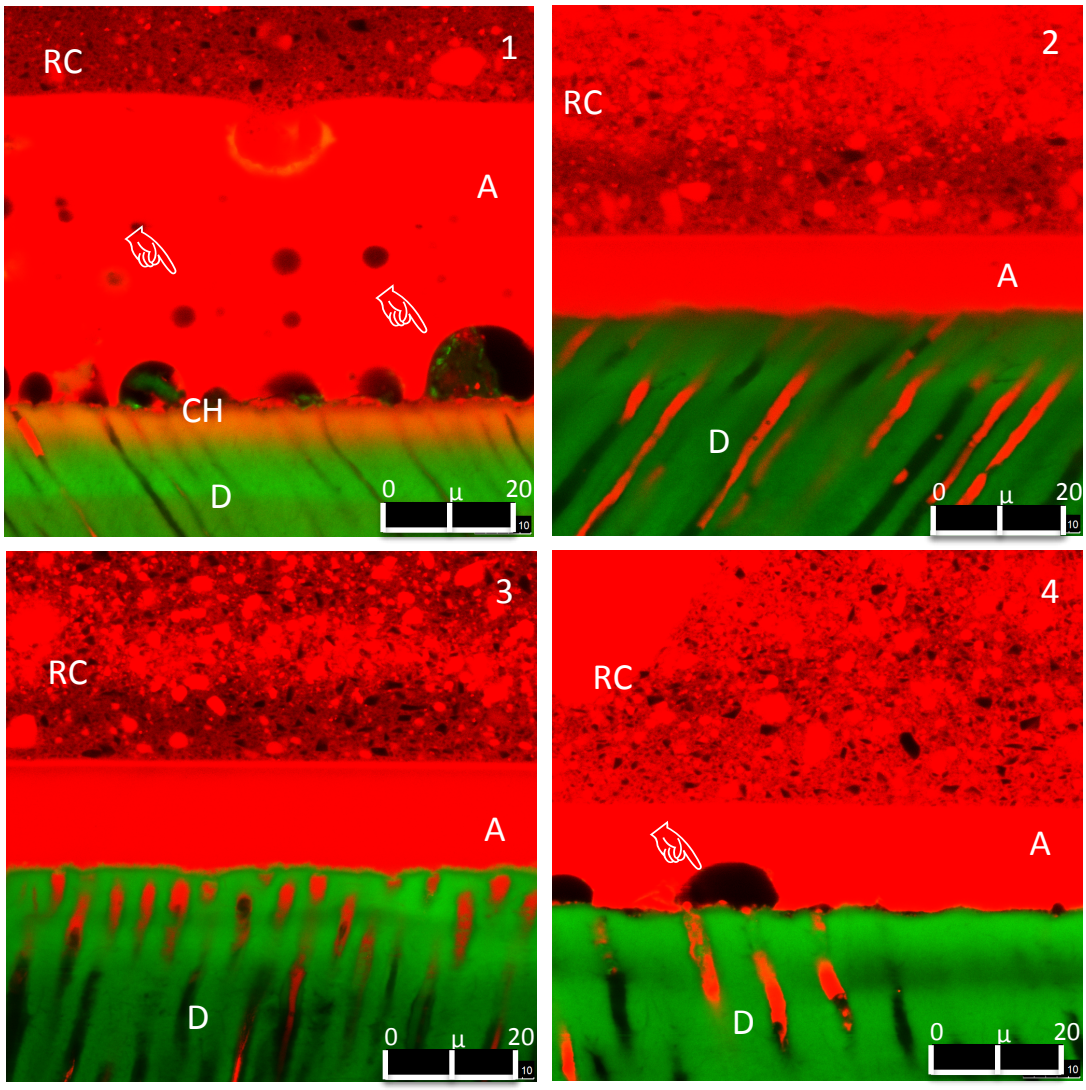


Figura 11. Imagens comparativas dos grupos experimentais (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 µm). 1 Grupo CONC, 2 Grupo RUT. 3 Grupo PRO. 4 grupo HES. Indicador: Formação de bolhas generalizada no grupo CONC. Menor quantidade de bolhas nos grupos experimentais 2 RUT, 3 PLA; 4 NAR. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D).

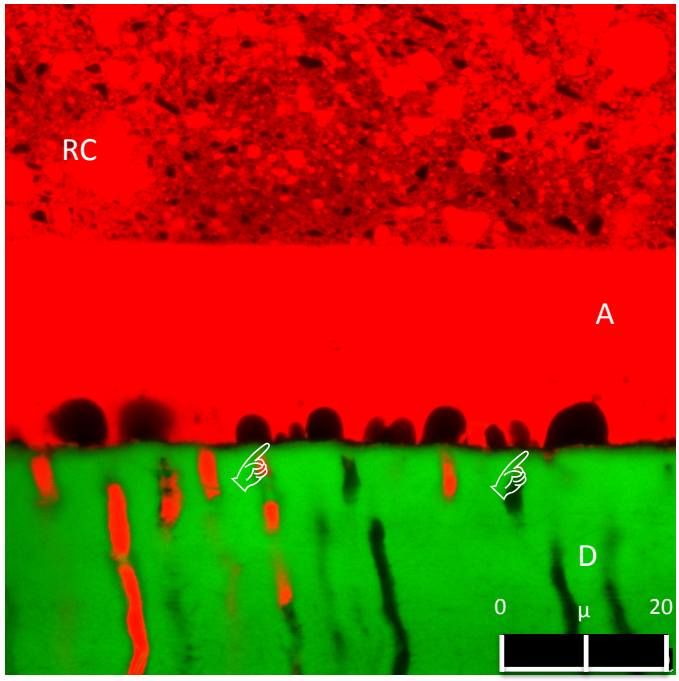


Figura 12. Imagem representativa de CSLM (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 µm). do grupo HES cariado após a ciclagem térmica. Indicador: áreas de separação da dentina do adesivo. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D).

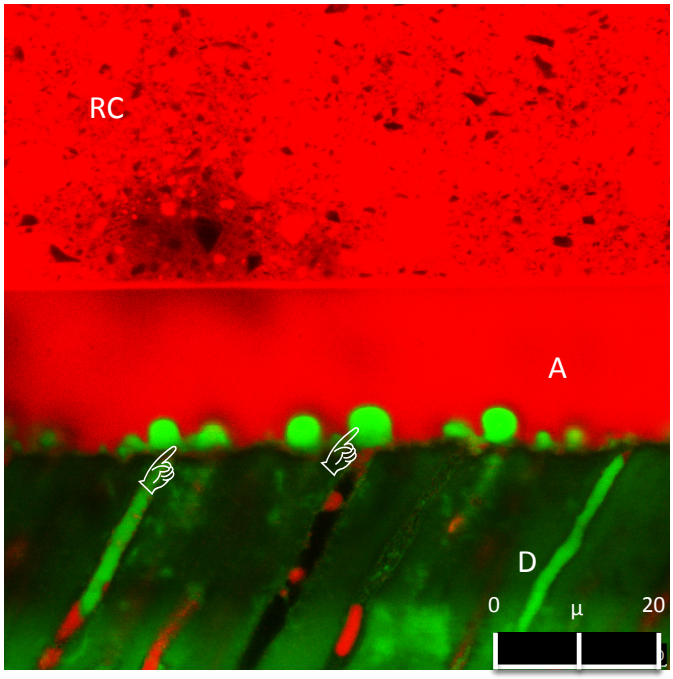


Figura 13. Imagens representativa de CSLM (Aumento 63X, Zoom 2X. Profundidade: 10 µm). dos grupos PLA e CONH observada após ciclagem térmica (25.000 ciclos). Indicador: Espaços de infiltração nas bolhas da base da camada híbrida. Resina Composta (RC), Adesivo (A), Camada híbrida (CH), Dentina (D).

6. DISCUSSÃO

Um tratamento ideal da dentina desmineralizada após a técnica de condicionamento ácido ou decorrente das lesões de cáries deveria proporcionar o restabelecimento das propriedades mecânicas do colágeno (Frassetto et al. [12] 2016) e a remineralização da dentina (Niu et al. [209] 2014), evitando ao mesmo tempo o desenvolvimento de cáries secundárias (Perdigão [19] 2010). Vários estudos tem demonstrado a eficácia dos agentes de ligação cruzada em reforçar ou restabelecer as propriedades mecânicas da dentina e o impacto positivo nas propriedades adesivas (Bedran Russo et al. [20] 2010; Bedran Russo et al. [21] 2007; Bedran Russo et al. [22] 2008; Bedran Russo [23] et al. 2011; Leme-Kraus [24] et al. 2017) .

No presente estudo, os resultados do teste de microtração mostraram um aumento nos valores de RU em relação aos grupos CONH e CONC apenas quando alguns dos *primers* experimentais foram utilizados, tanto no substrato hígido quanto no cariado . Deste modo, a primeira hipótese alternativa que estabelece que os ALCs aumentam os valores de RU foi parcialemente aceita. Estes resultados estão em concordância com resultados obtidos em estudos anteriores onde o uso de ALC demonstrou ter um efeito positivo sobre as propriedades adesivas nas técnicas TE e SE (Fang et al. [200] 2012; Islam et al. [27] 2014, Leme-Kraus et al. [24] 2017). Desta forma, o grau de efetividade dos flavonoides foi variável e aparentemente dependente das características moleculares do flavonoide e do tipo de substrato. De modo geral, o potencial de interação dos ALC com a dentina tem sido descrito como dependente da sua capacidade para formar ligações covalentes ou pontes de hidrogênio com o colágeno (He et al. [214] 2011). Isto pode estar relacionado com a quantidade de grupos reativos de hidroxila fenólica nas moléculas dos ALC que interagem com as cadeias laterais hidroxila, carboxila, amina ou amida dos espaços intrafibrilares do colágeno (Hagerman e Butler [215] 1981; Han, Jaurequi e Nimni [216] 2003). Ao posicionar-se entre as moléculas de colágeno, os polifenóis podem também formar ligações iônicas ou covalentes com o colágeno (Bors et al. [217] 1990).

No presente estudo, o grupo da RUT alcançou os maiores valores de RU dentre os grupos experimentais com conteúdo de flavonoide, em ambos os substratos avaliados. Apesar de não ser a molécula com o maior número de terminações hidroxila fenólica que pudessem potencialmente reagir com o colágeno, é possível que a eficácia do potencial de ligação cruzada das moléculas de ALC naturais na dentina esteja relacionada não apenas com esta única característica, e sim a quatro fatores simultâneos: 1) O tamanho da molécula para poder se difundir na dentina e nos espaços do colágeno, 2) O número de moléculas presentes no primer, 3) O índice de solubilidade da molécula (e a sua influência na miscibilidade do veículo selecionado para sua aplicação na dentina) e 4) o número e tipo de sítios reativos da molécula. Isto poderia explicar o efeito maior das molécula de RUT, QER e HES na RU em dentina hígida quando comparadas à PRO (Quadro 3). Estas moléculas de flavonoides possuem algumas vantagens como: tamanho molecular médio com quantidade de terminações hidrófilas também intermediário (Kumar e Pandey [218] 2013) que facilitariam a difusão do flavonoide entre os espaços interfibrilares para alcançar os sítios de ligação com o colágeno quando comparadas às

PRO.

Substância	*Massa Molecular*	*Número de Radicais Fenil Hidroxila*	*Número de radicais de Hidroxila alcoólica*	*Número de Mols (6,5% de massa)*	*Solubilidade na água*
Hesperidina	610,56 g/mol	2	6	1,06 mM	0,02 mg/mL
Naringina	580,53 g/mol	2	6	1,12 mM	1 mg/mL a 40·C
Proantocianidina	595,55 g/mol *	7*	2*	1,09 mM*	0,130 mg/mL*
Quercetina	302,24 g/mol	5	_	2,15 mM	0,06 mg/mL
Rutina	610,52 g/mol	4	6	1,06 mM	0,125 mg/mL

* Propriedades esperadas desta molécula baseadas no mero de catequinas. Pode variar de acordo com o número de meros na cadeia do polímero final.

Quadro 3. Propriedades Físicas e Químicas das moléculas utilizadas neste estudo.

As PRO tem sido consideradas o padrão ouro dentre os ALC exógenos derivados de compostos naturais. No entanto, a molécula de PRO, embora possua alta solubilidade na água e um número alto de grupos hidroxila fenólica, possui elevada massa molecular, o que poderia dificultar a difusão da molécula na dentina (Quadro 3). Em estado natural, o extrato de semente de uva apresenta uma grande variedade de moléculas na sua composição, indo desde pequenos monômeros de moléculas de catequinas e flavonas, oligômeros (até 5 moléculas iguais unidas) ou polímeros (mais de 5 moléculas iguais unidas) (Aguiar et al. [219] 2014; Vidal et al [220] 2014). A importância do tamanho da molécula de PRO foi comprovado em um estudo de Vidal e colaboradores [220], onde o efeito do peso molecular na distribuição hierárquica das moléculas fenólicas nos espaços intrafibrilares do colágeno foi analisado. Naquele estudo concluiu-se que o tamanho molecular menor e a presença de grupos reativos é importante no efeito dos ALCs. Estudos anteriores que incorporaram a molécula de PRO na composição do adesivo mostraram um efeito negativo nos valores de RU devido ao alto peso molecular das PRO, o que poderia dificultar a função do adesivo, demonstrando a importância do tamanho da molécula na sua efetividade em procedimentos adesivos (Islam et al. [27] 2014; Epasinghe et al. [221] 2012).

Até o presente momento não há na literatura uma comparação direta entre os principais tipos de flavonoides nas propriedades da interface adesiva. No entanto, existem estudos que compararam separadamente alguns dos flavonoides testados no presente estudo, como por exemplo a HES. Os resultados obtidos no presente estudo com este flavonoide em dentina hígida estão em concordância com os resultados do trabalho de Islam e colaboradores [27]. Naquele estudo, comparou-se a efetividade da molécula de HES na dentina, demostrando uma eficácia mais alta dela em comparação com a PRO, quando incorporada no primer de um sistema adesivo SE. Apesar de termos obtido resultados similares, a forma de aplicação do primer foi diferente entre o presente estudo e o de Islam e colaboradores [27]. No presente estudo a molécula de HES apresentou sutis diferenças nos valores de RU com a RUT.

Devido as semelhanças de ambas moléculas, elas poderiam apresentar as vantagens descritas anteriormente quando comparadas a PRO. Os resultados do padrão de fratura obtidos no presente estudo poderiam ajudar a confirmar estes achados, uma vez que os grupos de flavonoides como os valores mais altos de RU (RUT, QER e HES) apresentaram maior porcentagem de fraturas CR e CD. O efeito de ligação cruzada potente dos *primers* experimentais de flavonoides no substrato tratado poderia ter induzido estes resultados.

Um resultado interessante no presente estudo foi obtido quando utilizada a NAR, que apesar do seu tamanho molecular e características similares ao dos outros flavonoides testados, apresentou os menores valores de RU dentre os grupos com conteúdo de flavonoide em dentina hígida. A molécula de NAR possui duas desvantagens que poderiam ter comprometido seu desempenho: poucos sítios reativos de hidroxila fenólica e massa molecular similar ao das PRO. A hidrofilidade dos flavonoides aumenta de acordo com o número de grupos hidroxila fenólica (Quadro 3). No caso da NAR, uma flavona glicosada, a sua molécula apresenta apenas 2 grupos hidroxila fenólica livres. O seu anel heterocíclico (o anel da porção média) possui uma terminação hidroxila fenólica, enquanto o outro grupo disponível encontra-se em um dos seus extremos (Figura 1). Com o número limitado de grupos hidroxila livres, a NAR se comporta melhor em soluções lipídicas ou em soluções em altas temperaturas. Apesar disto, o comportamento em solventes como o etanol poderia aumentar a disponibilidade da NAR em meios líquidos da molécula (Zhang J et al. [215] 2015). No entanto, a formação de cadeias maiores em meios básicos, poderia comprometer seu desempenho na dentina hígida.

Curiosamente, quando aplicado em dentina hígida, o PLA apresentou os maiores valores de RU em comparação aos outros grupos. Isto poderia ser interpretado como o resultado do seu efeito sobre as características de superfície da dentina. A descrição das técnicas que preconizam o uso de etanol para modificar a umidade da dentina (Sadek et al. [162] 2010) envolve a utilização de sequências crescentes de concentrações de etanol em porcentagens acima do 50%, chegando até a concentração do 100%. No presente estudo, foi empregada a mínima concentração de solvente possível

(30%) numa solução aquosa para ser utilizada em conjunto com os flavonoides com a finalidade de evitar mudanças superficiais. No entanto, para conseguir este equilibro entre o soluto e o solvente e obter uma solução homogênea, o uso do tensoativo SPAN 20, uma molécula anfifílica que permite a homogeneização de substâncias em meios líquidos, foi aplicada (Juarez et al. [222] 2017). Esta molécula tem a capacidade de se ligar com substâncias hidrofóbicas em um dos seus extremos e com a água no outro extremo. Uma vez que no grupo PLA nenhum princípio ativo foi usado estas moléculas podem ter alterado a energia superficial da dentina, facilitando o molhamento do adesivo, o que na sua vez se traduziu em valores maiores de RU. Estudos similares tem sido realizados na área da endodontia (Gunesser et al. [223] 2017; Bukiet et al. 2013, Rossi-Fedele et al. [224] 2013), onde a incorporação de tensoativos nas soluções utilizadas para a limpeza de condutos ajudou no posterior selamento da dentina radicular ao facilitar a passagem dos seladores no interior da dentina (Gunesser et al. [223] 2017). Alguns inibidores das MMPs como o BAC possuem um efeito tensoativo simultâneo ao seu efeito inibitório principal. Esta propriedade poderia contribuir a sua eficácia na dentina (Sabatini et al. [225] 2015; Sabatini et al. [189] 2015). Estudos futuros são necessários para elucidar o mecanismo e a aplicabilidade de tensoativos na adesão aos tecidos dentais.

Contrário aos resultados obtidos em dentes hígidos, na dentina afetada por cárie o mecanismo de ação dos flavonoides parece ser diferente e depender das condições inerentes ao substrato. Em primeiro lugar, a dentina afetada por cárie possui um tramado de colágeno mais poroso (Duke et al. [101] 1991; Pugach et al. [95] 2009) e menos calcificado o que poderia permitir uma maior difusão das moléculas de flavonoide no interior da dentina. Em segundo lugar, é possível que exista dificuldade na recuperação do tamponamento para retornar ao pH neutro deste substrato após a aplicação de ácido fosfórico, cujas principais vias de tamponamento (Carbonato e Fosfato) estariam potencialmente reduzidas devido a descalcificação do meio decorrente da lesão de cárie, e isto manteria o pH dentinário mais ácido durante um período de tempo maior até conseguir a estabilização do meio, conforme observado por Camps e Pahsley [226] em 2000. Naquele estudo, os autores analisaram o efeito

tampão da dentina através de um modelo *in vitro* e concluíram que a capacidade da dentina em tamponar o efeito do ácido é bastante similar no substrato hígido e cariado. No entanto, a técnica utilizada para quantificar o pH foi realizada em dentes com lesões de cáries naturais, onde a resposta do hospedeiro cria uma dentina esclerosada com depósitos de cálcio e regiões altamente calcificadas como as de *whitlockite* (Daculsi et al. [100] 1987; Duke et al. [101] 1991). Além disso, a dentina peritubular cumpre uma função importante na estabilização do pH, pois uma vez que reage com o ácido fosfórico, precipitam-se os sais formados no interior do túbulo dentinário, obstruindo a passagem dos íons de hidrogênio no interior do dente (Camps e Pashley [226] 2000). Naquele estudo, também foi comprovado que a capacidade de tamponamento do colágeno e as estruturas orgânicas que conformam a dentina desmineralizada é mais pobre do que aquele observado em dentina hígida, conseguindo tamponar apenas 19 % do ácido fosfórico neste substrato. No ambiente *in vitro*, não existe uma resposta fisiológica do hospedeiro após a indução de cárie, pelo qual podemos presumir que a capacidade de tamponamento é diminuída. Além disso, levando em consideração que a capacidade de tamponamento é dependente do tempo, é provável que um tempo maior seja necessário para que este tecido criado artificialmente recupere o pH original. Estudos adicionais são necessários para elucidar estes mecanismos.

Em pHs mais baixos, a solubilidade dos compostos orgânicos aumenta (Henriksen et al. [227] 2005), facilitando a capacidade das moléculas de flavonoide migrarem e se difundirem na dentina, fenômeno que se conhece como lixiviação. Isto poderia explicar os resultados obtidos com os grupos experimentais no substrato cariado. Dentre os grupos avaliados, o efeito do uso do grupo PLA na dentina afetada por cárie não foi estatisticamente diferente ao do grupo CONC. O grupo PLA (sem flavonoide), mesmo que possibilite uma melhor difusão do adesivo no colágeno, não possui efeito químico algum sobre o colágeno. Diferente do ocorrido na dentina hígida, onde a modificação da energia superficial foi vantajosa, o efeito decorrente da modificação superficial da dentina afetada por cárie foi limitado.

Embora a RUT se manteve como a substância que apresentou os maiores valores de RU, a NAR, que obteve os piores valores dentre os flavonoides na dentina hígida, apresentou valores próximos aos da RUT na dentina afetada por cárie. Neste caso, a hipótese da influência do pH da dentina afetada por cárie poderia explicar este fenômeno no ambiente *in vitro*. As terminações hidroxila fenólica que apresentam carga positiva em meios básicos são as que potencialmente poderiam reagir com os grupos carbonila e carboxila dos espaços interfibrilares do colágeno. Essas polaridades permanecem estáveis em ambientes com pH neutros ou próximos ao neutro. Já em meios ácidos, a disposição tridimensional dos grupos hidroxila alcóolicos pode mudar a sua configuração na última órbita de elétrons e protonar-se (Henriksen et al. [227] 2005), tornando-os reativos com diferentes sítios da molécula de colágeno como a amina e amida que possuem carga negativa. Pelo contrário, em meios básicos, a disposição tridimensional dos grupos hidroxila fenólica pode mudar a sua configuração na última órbita de elétrons e ficar aniônica, permitindo a reação com grupos carboxila, carbonila, e outros grupos catiônicos. Levando em consideração o número de sítios reativos da molécula de NAR na sua metade glicosada, esta mudança na disposição dos sítios poderia amplificar o potencial para formar ligações com o colágeno e assim levar ao aumento nos valores de RU. O efeito do pH poderia não apenas explicar os resultados da NAR na dentina afetada por cárie como também justificar em parte os resultados observados com a RUT e da HES. A molécula de RUT e HES também possuem uma configuração molecular similar ao da NAR, própria das flavonas glicosadas (uma glicona + um heterósido). Devido a esta queda do pH mais prolongada e pelas quantidades de radicais de hidroxila fenólica , estes flavonoide poderiam manter suas características favoráveis em ambos substratos hígido e cariado.

Os efeitos dos flavonoides na RU puderam ser confirmados pelos resultados obtidos nos testes de Hi e Ei na dentina hígida, onde estes valores aumentaram na camada de A e CH dos grupos de flavonoides. Este efeito poderia ser o resultado da copolimerização das moléculas destes flavonoides com o adesivo, formando ligações tipo éster que poderiam contribuir nas propriedades da camada que envolvem componentes resinosos (Cho et al. [228]

2013; Zhang et al. [229] 2014). Alguns estudos tem avaliado compostos que contém moléculas do tipo catecol nas suas formulações como adesivos "biológicos" para superfícies úmidas (Lee et al. [230] 2007; Jenkins et al. [231] 2013; Zhang et al. [229] 2014; Maier [232] et al. 2015), podendo ser capazes de interagir quimicamente com os grupos acrilatos das resinas dentais (Cho et al. [228] 2013; Zhang et al. [229] 2014). Desta forma, os grupos catecol disponíveis nas PRO ligam-se quimicamente aos grupos de metracrilato. Devido a semelhança molecular e de ação dos outros flavonoides além da PRO, podemos especular que as moléculas de flavonoides utilizadas neste estudo apresentam esse potencial de união aos grupos metacrilato.

Um aumento na dureza da dentina em profundidades de 10 e 20 μm também foi observado, porém em apenas alguns dos grupos experimentais. Estudos anteriores tem confirmado a ação da PRO e HESP nas propriedades mecânicas da dentina. No presente estudo, a HES e RUT apresentaram um efeito maior ao da PRO. Além da capacidade da molécula em produzir ligações cruzadas com o colágeno, a sua capacidade de difusão no meio é importante para amplificar o seu efeito. Numa situação onde a difusão esta dificultada, pela mineralização do substrato, a molécula com o tamanho mais adequado poderia se difundir e penetrar mais facilmente pelos espaços da dentina e atingir o colágeno. Esta foi também a conclusão do estudo de Liu e colaboradores [233] que concluiu que a efetividade da ligação das PRO é dependente do tamanho da molécula. Outro estudo de Epasinghe e colaboradores [204] em 2014 comparou as propriedades mecânicas após a imersão em solução salina de PRO, QER e NAR no colágeno. Nesse estudo, a NAR teve o menor efeito sobre as propriedades mecânicas da dentina desmineralizada quando comparada a QER e PRO. Os resultados deste estudo mostraram que a PRO teve o maior efeito sobre a dentina desmineralizada, seguida da QER e a NAR. Como discutido anteriormente, a influência da solubilidade dos flavonoides em água poderia corroborar a hipótese proposta sobre a eficácia da ligação cruzada. Embora o presente estudo não analisou as propriedades específicas do colágeno desmineralizado, o teste de Hi e Ei podem ajudar a explicar a eficiência desses ALCs nas

propriedades mecânicas do colágeno. Nesse sentido, a NAR não apresentou um efeito sobre a dentina subjacente à interface adesiva, o que poderia explicar o fraco desempenho das propriedades adesivas, onde não foi observada diferença significativa nos valores de RU em relação ao grupo CONH.

Os resultados de nanodureza nos dentes afetados por cárie na camada de adesivo e híbrida apresentaram uma tendência similar àqueles observados nos dentes hígidos. Na CH, um resultado interessante foi notado no grupo da QER. Enquanto na dentina hígida esse composto não apresentou efeito nos componentes resinosos, o mesmo teve um efeito significativo na dentina afetada por cárie. O mesmo foi observado quanto utilizada a RUT, que teve um leve efeito na CH dos dentes hígidos, no substrato afetado por cárie apresentou os valores mais baixos. Estas mudanças poderiam ser decorrentes do pH do meio, que como explicado, modificaria a carga dos sítios reativos das moléculas de flavonoides, modificando os potenciais delas para reagir com outras moléculas e formar diversas disposições espaciais nas cadeias poliméricas, fazendo com que elas possam formar uma quantidade maior ou menor de polímeros da própria molécula. Apesar da alta heterogeneidade da dentina afetada por cárie e de não terem sido encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais, o grupo da NAR apresentou os valores mais altos de Nanodureza, corroborando o seu efeito sobre as propriedades adesivas onde apresentou resultados muitos próximos àqueles obtidos com RUT. As indentações realizadas na camada subjacente à híbrida foram realizadas com o intuito de comparar o potencial dos flavonoides em restabelecer as propriedades mecânicas da dentina. No entanto, a variabilidade do substrato decorrente da descalcificação “aleatória” que a dentina sofre após a formação artificial da cárie pode ter dificultado tal comparação. O potencial regenerativo dos flavonoides nesse sentido é limitado, pois as propriedades mecânicas estão não só relacionadas às propriedades mecânicas do colágeno como também à presença e quantidade de cristais de HAP (Salvatore et al [159] 2012) . Diferente do substrato dentinário hígido, o substrato afetado por cárie é caracterizado pela desmineralização parcial ou total da região mais superficial (Yoshiyama et al. 2000; Marquezan et

al 2009), e mais especificamente naquele formado in vitro, nenhuma região de remineralização é encontrada como é no substrato afetado in vivo. Deste modo, a única forma de restabelecer as propriedades mecânicas desse substrato efetivamente seria por meio de uma combinação de estratégias que permitam melhorar as propriedades do colágeno (pelos ALCs) e concomitantemente remineralizar o tecido afetado por cárie nos espaços do colágeno (remineralização biomimética), com o intuito de aproximar-se ainda mais às características da dentina hígida. Desta forma, a segunda hipótese foi parcialmente aceita.

As imagens de CSLM mostraram sinais de infiltração na base da camada de adesivo e alta fluorescência da Rhodamina B na base da camada do adesivo. Dada a natureza hidrofílica de alguns componentes do adesivo como o HEMA, a camada híbrida pode sofrer uma separação de fase e se comportar como uma camada altamente porosa (Spencer e Wang [234] 2002), o que neste caso, permitiu que a fluoresceína penetrasse na base do adesivo. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que tem avaliado o comportamento da camada de adesivo nas técnicas de condicionamento total, onde a dentina deve permanecer úmida (Tay e Pashley [235] 2003; Suppa et al. [236] 2005). Estudos anteriores que tem demonstrado o comportamento da camada híbrida na presença de água, Spencer e Wang [234] em 2002 fizeram uma análise sobre a separação de fase do adesivo em meio úmidos, o que afeta o desempenho do adesivo e o torna poroso, permeável e suscetível de degradação.

Um estudo recente demonstrou a capacidade dos flavonoides em modificar a umidade relativa quando aplicados em dentina hígida. Nesse estudo, se atribui tal efeito à alta densidade das ligações cruzadas pelas OPACs reduzindo a hidrofilicidade da superfície (He et al. [214] 2011) e a dinâmica intrínseca da água (Fathima et al. [237] 2010). As ligações cruzadas mediadas pela PRO, através do deslocamento da água durante o processo de ligação com o colágeno poderiam facilitar a penetração do adesivo e reduzir a

permeabilidade entre as fases do adesivo. Além deste mecanismo, os flavonoides e o veículo podem favorecer o deslocamento dos proteoglicanos que estão fortemente unidos as fibrilas colágenas e são os principais encarregados de manter a umidade no meio para evitar o colabamento destas fibrilas. Assim, este deslocamento dos proteoglicanos poderia consequentemente modificar a umidade do meio (Leme Kraus et al. [24] 2017, Bertassoni et al. [238] 2012, RIgozzi et al. [239] 2013) e aumentar a penetração do adesivo (Mazzoni et al. [240] 2008). Com a diminuição da umidade no meio, os sinais de infiltração na base da camada híbrida diminuíram. Estes resultados podem ser extrapolados aos resultados obtidos no presente estudo, onde os flavonoides contribuíram na estabilidade da camada de adesivo, inclusive após o envelhecimento simulado. Os veículos usados na formulação dos flavonoides podem ter contribuído também na obtenção de condições mais favoráveis para adesão graças à umidade da dentina. Deste modo, a terceira hipótese foi aceita.

Diferente da dentina hígida, as imagens de CSML mostraram uma superfície com alta presença de bolhas na camada de adesivo do grupo controle nos dentes cariados. Estas regiões não foram observadas ou observadas mais sutilmente nos grupos dos flavonoides. Como discutido anteriormente, os ALC tem a capacidade de modificar a umidade da dentina (He et al. [214] 2011; Fathima et al. [237] 2010; Bertassoni et al. [238] 2012, RIgozzi et al. [239] 2013), assim, ao serem aplicados na dentina afetada por cárie, poderiam modificar em maior ou menor grau a sua umidade para melhorar as fracas características adesivas. Outro achado importante foi a falta de áreas onde a camada híbrida pudesse ser evidenciada claramente em dentina afetada por cárie. Outros estudos que avaliaram a CH em dentes cariados descreveram regiões onde a camada híbrida apresentou espessuras maiores que as encontradas na dentina hígida (Yoshiyama et al. [113] 2003). No presente estudo, estas regiões foram encontradas na dentina afetada por cárie artificial, o que poderia corroborar a semelhança ultramorfológica deste substrato ao da dentina afetada formada *in vivo* descrita no estudo de Marquezan e colaboradores [210]. A maior permeabilidade desta dentina poderia permitir a

formação deste tipo de CH (Yoshiyama et al. [113] 2003; Yoshiyama et al. [111] 2002). No nosso estudo houve uma grande dificuldade em encontrar áreas de interação do adesivo com a dentina que apresentasse estas características. Isto pode ser explicado, em primeiro lugar, pela técnica de formação de cáries utilizada no ambiente *in vitro*, que não possui a recuperação fisiológica do dente através dos seus mecanismos de defesa como acontece em situações *in vivo*. Além disso, deve-se considerar a heterogeneidade do substrato cariado, que devido às diferenças morfológicas contém áreas com maior e menor desmineralização, podendo resultar na variação da interação do sistema adesivo com o substrato dentinário como foi observado nas imagens de CSLM. Além da variabilidade do substrato, outros fatores podem contribuir na diminuição da interação com o adesivo. A porosidade da dentina afetada que é altamente permeável e pouco mineralizada (Spencer et al. [114] 2005), e provavelmente ainda mais em dentinas afetadas por cárie induzidas artificialmente devido a falta dos fatores fisiológicos citados, poderia gerar as condições favoráveis para diminuir o grau de conversão do adesivo polimerizado nestas áreas (Spencer et al. [114] 2005). Por outra lado, se o tempo recuperação do pH aumentasse, o ambiente ácido poderia influenciar na polimerização do adesivo, diminuindo suas propriedades.

Na dentina afetada por cárie o uso de substâncias tensoativas como as encontradas no grupo PLA, que também apresentou efeitos benéficos sobre a interface adesiva, pode melhorar a umidade relativa do meio (Zanchi et al. [241] 2013). Através do seu efeito sobre a energia superficial do meio, o tensoativo poderia ser capaz de facilitar a penetração do adesivo na dentina afetada por cárie, deslocando a água ou evaporando-a mais rapidamente. Este efeito é conhecido como azeotropismo. Neste caso, quando duas substâncias com capacidades de volatilização diferentes são misturadas, o etanol e a água, a água pode modificar suas características físicas e desta forma evaporar-se mais facilmente. Este efeito poderia também ter ocorrido nos grupos experimentais cuja formulação também continha etanol, e potencializado o seu efeito.

Na dentina hígida, os valores de RU apresentaram uma queda após o

envelhecimento. É provável que a incorporação de um passo adicional na técnica adesiva possa ter comprometido os valores de RU dos grupos de flavonoides, pois como observado no Gráfico 2, apesar dos valores menores de RU do grupo CONH, a queda também foi proporcionalmente menor quando comparada aos dos grupos experimentais. Outra explicação para este achado poderia ser decorrente do processo de oxidação que as moléculas orgânicas como os flavonoides sofrem pelo aumento da temperatura (Rivero et al. [242] 2001), enfraquecendo as suas propriedades como ALCs no tempo. Os resultados obtidos no teste de RU poderia ter uma correlação com os resultados das propriedades mecânicas onde dentes hígidos mostraram o efeito no sistema adesivo. Embora a copolimerização poderia contribuir na melhora das propriedades mecânicas em um primeiro momento, essas ligações do tipo éster formados inicialmente poderiam ter menor estabilidade que as ligações próprios da formulação do sistema adesivo e desprender-se ao longo do tempo. Como consequência disso, a utilização de alguns dos flavonoides resultou em uma queda dos altos valores inicialmente observados, enquanto que os grupos CONH e PLA não apresentaram variação nos valores de Hi e Ei antes e depois da ciclagem térmica.

O comportamento dos grupos de flavonoides parece ter sido bastante similar segundo o observado nas imagens de CSLM dos momentos inicial e após a ciclagem térmica. Apesar da pouca interação da dentina e o adesivo, a ciclagem térmica parece não ter afetado a interface adesiva na dentina hígida. O estudo de Leme-Kraus et al. [24] mostrou resultados similares em dentina hígida, onde a camada híbrida apresentou estabilidade nas propriedades adesivas e poucas ou nenhuma sinal de infiltração após envelhecimento de 6 meses e um ano. Além disso, no presente estudo foi observada a estabilidade das propriedades mecânicas na dentina após o envelhecimento. Isso poderia demonstrar que o efeito da formação de ligações cruzadas é estável ao longo do tempo, mantendo condições favoráveis para uma adesão duradoura.

No tecido cariado, os valores de RU apresentaram diferenças entre os momentos 24 h e após envelhecimento para alguns flavonoides, enquanto

outros proporcioram aparente estabilidade da interface de união no intervalo avaliado. Desta forma, a quarta hipótese foi parcialmente aceita. A eficácia dos flavonoides como a PRO e a HES em prevenir a degradação tem sido provada anteriormente (Green et al. [243] 2010, Islam et al [27] 2014), a estabilidade das ligações formados com o colágeno poderia ser crucial para manter as suas propriedades (Leme-Kraus et al. [24] 2017). A molécula de NAR, cuja semelhança estrutural com a HES, apresentou a mesma capacidade de manter a estabilidade da interface adesiva na dentina cariada, o que poderia entender-se como o resultado do efeito semelhante de ambas moléculas. Nos outros grupos, as condições desfavoráveis deste tecido poderiam ter influenciado a aceleração da degradação da interfase adesiva. Um exemplo claro desta situação foi observado no grupo QER que apresentou os mais baixos valores de RU após ciclagem térmica, e onde sinais de separação do adesivo da superfície de dentina foram encontrados, o que poderia corroborar estes achados. Outro resultado interessante observado nos dentes cariados após a ciclagem térmica foram os apresentados pelos grupos PLA e CONC apresentaram infiltração da fluoresceína nas áreas de formação de bolhas da base da camada de adesivo. A explicação para este resultado poderia ser o efeito transitório do tensoativo, uma vez que este foi submetido a ciclagem térmica, a falta de interação química do etanol e o SPAN 20 com o colágeno poderiam ter feito com que estes compostos se dissolvessem no meio aquoso, permitindo assim a passagem de fluidos até a base da CH após o envelhecimento. Apesar disto, a interação inicial do PLA com a dentina afetada por cárie permitiu manter a estabilidade dos valores de RU no tempo. Resultados similares tem sido observados nas técnicas de *etanol wet bonding* onde a modificação inicial da dentina permitiu prolongar a estabilidade da CH (Sadek et al [162] 2010).

Um resultado interessante foi o observado pelo grupo QER na dentina afetada por cárie após a ciclagem térmica. A QER, cuja molécula possui apenas a metade glicona, apresentou os valores mais baixos dentre os flavonoides testados em dentina afetada por cárie após a ciclagem térmica. Esta molécula é bastante similar a molécula de RUT, no entanto ela não possui um heterósido em um dos extremos que tivesse o potencial de protonar os

seus extremos para reagir com o colágeno. Esta falta da metade glicosada poderia ter influenciado no potencial desta molécula em formar ligações cruzadas com o colágeno, o que facilitaria a perda das suas funções a longo prazo na dentina afetada por cárie.

Diferente dos resultados obtidos na dentina hígida, a camada de A não apresentou uma queda nos valores das nanopropriedades após o envelhecimento na dentina afetada por cárie. Nesse sentido, podemos especular que os flavonoides foram capazes de modificar as propriedades hídrodinâmicas do substrato (He et al. [214] 2011; Fathima et al. [237] 2010), reduzindo a quantidade de água na dentina e desta forma contribuindo para a adequada polimerização da camada de adesivo. Isto se deveria ao aumento da penetração das moléculas de flavonoide na dentina afetada por cárie em comparação à penetração em dentina hígida devido à maior porosidade do substrato afetado. Como consequência dessa maior penetração do flavonoide, a movimentação de fluidos seria reduzida. Por outro lado, esta maior difusão no interior do tecido afetado por cárie poderia ter influenciado na capacidade de copolimerização entre as moléculas de flavonoides e os grupos acrilato do adesivo, pois haveria uma quantidade de moléculas de flavonoide inferior na superfície do tecido para reagir com o adesivo. Isto pode ser comprovado pelos resultados das nanopropriedades obtidos na CH, onde não foram observadas diferenças significantes entre os grupos. Além disso, a interação do pH no arranjo das cadeias poliméricas e dos sítios ativos das moléculas de flavonoide poderia mudar o comportamento do flavonoide para formar enlaces com os grupos acrilato do adesivo neste substrato.

Após envelhecimento, a dentina afetada por cárie e a subjacente apresentaram uma queda quando comparada ao momento inicial. Nesse sentido as características morfológicas da dentina afetada por cárie podem ter aumentado a difusão da água na interface adesiva, fazendo-a mais suscetível às mudanças de temperatura e portanto aumentando a oxidação das moléculas de flavonoides e diminuindo o efeito de ligação cruzada no colágeno durante o processo de envelhecimento.

Estudos anteriores tem demonstrado uma diminuição nos valores de RU quando os procedimentos adesivos são realizados em dentina afetada por cárie (Ceballos et al. [109] 2003; Wei et al. [110] 2008; Say et al. [112] 2005), independente da técnica adesiva utilizada (Yoshiyama et al. [111] 2002), inclusive com os mais recentes sistemas universais (Lenzi et al. [17] 2015; Nicoloso et al. [18] 2016). Os resultados apresentados neste estudo estão em concordância com estes achados, onde valores de RU dos grupos experimentais cariados foram aparentemente mais baixos que os resultados dos grupos hígidos. Os baixos valores de RU nos grupos cariados podem ser comprovados pela predominância em quase 100% de falhas adesivas para todos os grupos.

No presente estudo, utilizou-se a técnica microbiológica de formação de cárie preconizada por Marquezan et al. [210]. Entre as técnicas de formação utilizada atualmente, a técnica microbiológica parece criar um ambiente mais próximo de uma situação real, o que resulta em características ultramorfológicas da lesão cariosa mais próximas daquelas observadas em lesões de cárie *in vivo*, quando comparada as técnicas que utilizam ciclagem de pH para simular lesões (Marquezan et al. [210] 2009). Neste último exemplo, as lesões obtidas parecem ser mais próximas das lesões ocasionadas por processos erosivos do que pelo efeito do metabolismo das bactérias, como acontece na dentina afetada por cárie. Outra vantagem dessa técnica é a sua simplicidade e rapidez quando comparada a outras técnicas que também utilizam microrganismos (Zhang et al. [244] 2012). Embora tenham mostrado resultados interessantes, estas técnicas requerem uma seleção prévia de voluntários e coleta de saliva dos mesmos, o que dificulta o processo e as torna mais sensíveis a erros. As imagens de microscopia confocal na dentina afetada por cárie obtidas neste estudo mostraram a dentina afetada como um substrato altamente poroso e irregular o que corrobora a formação de lesões na superfície dentinária.

A eliminação seletiva da dentina infectada por cárie ainda continua sendo um processo controverso (Perdigão [19] 2010; Pugach et al. [95] 2009). As técnicas de eliminação de cárie pelo uso de corantes parecem não ser

específicas apenas para o substrato cariado, o que diminui a confiabilidade do uso dessa técnica (Pugach et al. [95] 2009). No presente estudo, o tempo e técnica de eliminação de dentina infectada por cárie foram previamente determinados em estudo piloto envolvendo testes de dureza e microtração após o uso da lixa 600. Um estudo que avaliou as diferentes técnicas de eliminação de dentina infectada por cárie demonstrou que embora a lixa 600 seja a mais utilizada para tratar a dentina em estudos *in vitro e* não apresentar aplicabilidade clínica, ela permite obter uma *smear layer* uniforme, o que para fins de padronização é vantajoso neste tipo de estudo (Sattanbanasuk et al. [117] 2006).

Os resultados do presente estudo sugerem a importância do veículo a ser utilizado em estudos que avaliem o efeito dos ALCs. Estudos anteriores realizaram comparações de flavonoides em meios aquosos (Epasinghe et al. [204] 2014, Castellan et al. 2011, Liu et al. [245] 2013). Uma vez que estas moléculas orgânicas oscilam entre a insolubilidade na água e a baixa solubilidade, a molécula que apresentasse maior afinidade com a água teoricamente poderia proporcionar maior efeito sobre o colágeno devido a sua disponibilidade no meio. Um estudo de Fang e colaboradores [200] que avaliou a influencia do solvente nos resultados de RU de primer à base de flavonoides, mostrou que o uso de PRO em um solvente a base de etanol e água apresentou melhores resultados quando comparado ao solvente apenas de água. Naquele estudo, foi utilizado um veículo a base de etanol, e se recomendou o uso deste veículo para ser usado em *primers* com ALC. Assim, podemos supor que as diferenças sutis dos resultados apresentados entre os flavonoides utilizados no presente estudo, poderiam ser decorrentes de um fator além dos mencionados anteriormente, a Concentração Miscelar Crítica (Smith et al. [246] 2013). Este índice químico mede a quantidade de veículo "sobrante" após a mistura com o soluto. O veículo, como foi explicado possui um efeito sobre a dentina, e desta forma, esse remanescente poderia contribuir em maior ou menor grau dependendo da quantidade "livre" deste. Este parâmetro explicaria também os resultados obtidos por Fang et al. [200] no seu estudo.

A formulação planejada neste estudo levou em consideração a miscibilidade diferente em função da solubilidade de cada composto, com o intuito de encontrar um veículo que permitisse disponibilizar em um meio liquido a maior quantidade de moléculas de flavonoide para reagirem com o colágeno. No entanto, cada molécula de flavonoide possui diferentes índices de solubilidade, o que as torna mais dispersas ou mais dissolvidas no meio liquido, e isto tem um papel determinante na eficácia terapêutica dos flavonoides (Kumar e Pandey [218] 2013). Neste sentido, o uso do grupo placebo no presente estudo permitiu diferenciar este efeito tensoativo do efeito do flavonoide *per se,* e por esta razão o grupo PLA foi incorporado entre os controles.

Apesar das condições desfavoráveis do substrato afetado por cárie, e com as limitações do presente estudo, como a impossibilidade de reproduzir todas as condições dos substratos dentinários próprios de uma situação *in vivo,* os flavonoides foram eficazes em produzir um efeito sobre a dentina, mesmo nestas condições, o que gera expectativa sobre o potencial terapêutico destas substâncias. Estudos futuros onde estas moléculas possam ser incorporadas na composição do sistema adesivo para evitar passos adicionais na técnica e estudos *in vivo* são necessários para entender melhor a dinâmica e o potencial terapêutico destas substâncias.

7. CONCLUSÃO

Com as limitações deste estudo, podemos concluir que:

1) O uso de flavonoides pode ser benéfico e efetivo em melhorar a adesão tanto em dentina hígida como em substratos desafiadores como a dentina afetada por cárie.
2) O uso de *primers* de flavonoides poderia prolongar as propriedades adesivas, mecânicas, micromorfológicas e de microinifiltração da interface adesiva dependendo do flavonoide utilizado.
3) A efetividade do flavonoide varia de acordo com o tipo de flavonoide e do tipo de substrato onde é aplicado.
4) Os flavonoides testados neste estudo apresentaram propriedades superiores às da PRO em ambos substratos.

REFERÊNCIAS:

1. Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. Am J Dent. 2009;22(1):3-8.

2. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. J Dent Res. 1998;77(8):1622-9.

3. Tjaderhane L, Sulkala M, Sorsa T, Teronen O, Larmas M, Salo T. The effect of MMP inhibitor metastat on fissure caries progression in rats. Annals of the New York Academy of Sciences. 1999;878:686-8.

4. 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. J Dent Res. 2001;80(6):1545-9.

5. Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. J Dent Res. 2011;90(4):506-11.

6. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Paakkonen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. J Endod. 2010;36(3):475-81.

7. Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. Dent Mater. 2013;29(1):116-35.

8. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. J Dent Res. 2000;79(6):1385-91.

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

10. Sano H. Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. J Dent Res. 2006;85(1):11-4.

11. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. Dent Mater. 2008;24(1):90-101.

12. Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability--A literature review. Dent Mater. 2016;32(2):e41-53.

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

14. Imparato JCP, Moreira KMS, Olegario IC, da Silva S, Raggio DP. Partial caries removal increases the survival of permanent tooth: a 14-year case report. Eur Arch Paediatr Dent. 2017;18 (6):423-426.

15. Zanchi CH, Lund RG, Perrone LR, Ribeiro GA, del Pino FA, Pinto MB, et al. Microtensile bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems on sound and artificial caries-affected dentin. Am J Dent. 2010;23(3):152-6.

16. Alves FB, Lenzi TL, Reis A, Loguercio AD, Carvalho TS, Raggio DP. Bonding of simplified adhesive systems to caries-affected dentin of primary teeth. J Adhes Dent. 2013;15(5):439-45.

17. Lenzi TL, Raggio DP, Soares FZ, Rocha Rde O. Bonding Performance of a Multimode Adhesive to Artificially-induced Caries-affected Primary Dentin. J Adhes Dent. 2015;17(2):125-31.

18. Nicoloso GF, Antoniazzi BF, Lenzi TL, Soares FZ, Rocha RO. Is There a Best Protocol to Optimize Bond Strength of a Universal Adhesive to Artificially Induced Caries-affected Primary or Permanent Dentin? J Adhes Dent. 2016;18(5):441-46.

19. Perdigao J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. Dent Mater. 2010;26(2):e24-37.

20. Bedran-Russo AKB, Vidal CMP, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. J Biomed Mater Res B. 2010;94B(1):250-55.

21. Bedran-Russo AKB, Pereira PNR, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. J Biomed Mater Res B. 2007;80B(1):268-72.

22. Bedran-Russo AKB, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. J Biomed Mater Res B. 2008;86B(2):330-34.

23. Bedran-Russo AKB, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. Acta Biomater. 2011;7(4):1735-41.

24. Leme-Kraus AA, Aydin B, Vidal CM, Phansalkar RM, Nam JW, McAlpine J, et al. Biostability of the Proanthocyanidins-Dentin Complex and Adhesion Studies. J Dent Res. 2017;96(4):406-12.

25. Islam S, Hiraishi N, Nassar M, Yiu C, Otsuki M, Tagami J. Effect of natural cross-linkers incorporation in a self-etching primer on dentine bond strength. J Dent. 2012;40(12):1052-9.

26. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Antunes A, Pereira PN. Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: one-year bond strength study. International journal of dentistry. 2013;2013:918010.

27. Islam MS, Hiraishi N, Nassar M, Yiu C, Otsuki M, Tagami J. Effect of hesperidin incorporation into a self-etching primer on durability of dentin bond. Dent Mater. 2014;30(11):1205-12.

28. Basile A, Sorbo S, Giordano S, Ricciardi L, Ferrara S, Montesano D, et al. Antibacterial and allelopathic activity of extract from Castanea sativa leaves. Fitoterapia. 2000;71 Suppl 1:S110-6.

29. Bakar NS, Zin NM, Basri DF. Synergy of flavone with vancomycin and oxacillin against vancomycin-intermediate Staphyloccus aureus. Pakistan J Pharm Sci. 2012;25(3):633-8.

30. Abuelsaad AS, Mohamed I, Allam G, Al-Solumani AA. Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against diarrheic Aeromonas hydrophila in a murine model. Life Sci. 2013;93(20):714-22.

31. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. Dent Mater. 2011;27(1):1-16.

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

33. Gwinnett AJ, Matsui A. A study of enamel adhesives. The physical relationship between enamel and adhesive. Arch Oral Biol. 1967;12(12):1615-20.

34. Paffenbarger GC, Bowen RL. Scientific development and methods in practice. J Am Dent Assoc. 1958;56(6):785-9.

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

36. Bartlett JD. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. ISRN Dent. 2013;2013:684607.

37. Demarco FF, Collares K, Coelho-de-Souza FH, Correa MB, Cenci MS, Moraes RR, et al. Anterior composite restorations: A systematic review on long-term survival and reasons for failure. Dent Mater. 2015;31(10):1214-24.

38. Guba CJ, Cochran MA, Swartz ML. The effects of varied etching time and etching solution viscosity on bond strength and enamel morphology. Oper Dent. 1994;19(4):146-53.

39. Chow LC, Brown WE. Phosphoric acid conditioning of teeth for pit and fissure sealants. J Dent Res. 1973;52(5):1158.

40. Yoshiyama M, Carvalho RM, Sano H, Horner JA, Brewer PD, Pashley DH. Regional bond strengths of resins to human root dentine. J Dent. 1996;24(6):435-42.

41. Shono Y, Ogawa T, Terashita M, Carvalho RM, Pashley EL, Pashley DH. Regional measurement of resin-dentin bonding as an array. J Dent Res. 1999;78(2):699-705.

42. Pashley DH, Tao L, Boyd L, King GE, Horner JA. Scanning electron microscopy of the substructure of smear layers in human dentine. Arch Oral Biol. 1988;33(4):265-70.

43. Inokoshi S, Iwaku M, Fusayama T. Pulpal response to a new adhesive restorative resin. J Dent Res. 1982;61(8):1014-9.

44. Pashley DH. The effects of acid etching on the pulpodentin complex. Oper Dent. 1992;17(6):229-42.

45. Tagami J, Hosoda H, Burrow MF, Nakajima M. Effect of aging and caries on dentin permeability. Proc Fin Dent Soc. 1992;88 Suppl 1:149-54.

46. Asmussen E, Munksgaard EC. Bonding of restorative resins to dentine promoted by aqueous mixtures of aldehydes and active monomers. Int Dent J. 1985;35(2):160-5.

47. Kanca J, 3rd. Improving bond strength through acid etching of dentin and bonding to wet dentin surfaces. J Am Dent Assoc. 1992;123(9):35-43.

48. Rosales-Leal JI, Osorio R, Holgado-Terriza JA, Cabrerizo-Vilchez MA, Toledano M. Dentin wetting by four adhesive systems. Dent Mater. 2001;17(6):526-32.

49. Tjan AH, Castelnuovo J, Liu P. Bond strength of multi-step and simplified-step systems. Am J Dent. 1996;9(6):269-72.

50. Wilder AD, Jr., Swift EJ, Jr., May KN, Jr., Waddell SL. Bond strengths of conventional and simplified bonding systems. Am J Dent. 1998;11(3):114-7.

51. 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. Dent Mater. 2005;21(9):864-81.

52. Peumans M, De Munck J, Van Landuyt KL, Poitevin A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Eight-year clinical evaluation of a 2-step self-etch adhesive with and without selective enamel etching. Dent Mater. 2010;26(12):1176-84.

53. Akimoto N, Takamizu M, Momoi Y. 10-year clinical evaluation of a self-etching adhesive system. Oper Dent. 2007;32(1):3-10.

54. van Dijken JW, Sunnegardh-Gronberg K, Lindberg A. Clinical long-term retention of etch-and-rinse and self-etch adhesive systems in non-carious cervical lesions. A 13 years evaluation. Dent Mater. 2007;23(9):1101-7.

55. Miyazaki M, Onose H, Iida N, Kazama H. Determination of residual double bonds in resin-dentin interface by Raman spectroscopy. Dent Mater. 2003;19(3):245-51.

56. Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. Biomaterials. 2005;26(9):1035-42.

57. Wang Y, Spencer P. Continuing etching of an all-in-one adhesive in wet dentin tubules. J Dent Res. 2005;84(4):350-4.

58. Perdigao J, Geraldeli S, Hodges JS. Total-etch versus self-etch adhesive: effect on postoperative sensitivity. J Am Dent Assoc. 2003;134(12):1621-9.

59. Unemori M, Matsuya Y, Akashi A, Goto Y, Akamine A. Self-etching adhesives and postoperative sensitivity. Am J Dent. 2004;17(3):191-5.

60. Tay FR, King NM, Chan KM, Pashley DH. How can nanoleakage occur in self-etching adhesive systems that demineralize and infiltrate simultaneously? J Adhes Dent. 2002;4(4):255-69.

61. Reis A, Dourado Loguercio A, Schroeder M, Luque-Martinez I, Masterson D, Cople Maia L. Does the adhesive strategy influence the post-operative sensitivity in adult patients with posterior resin composite restorations?: A systematic review and meta-analysis. Dent Mater. 2015;31(9):1052-67.

62. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. Dent Mater. 2011;27(1):17-28.

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

64. Kenshima S, Reis A, Uceda-Gomez N, Tancredo Lde L, Filho LE, Nogueira FN, et al. Effect of smear layer thickness and pH of self-etching adhesive systems on the bond strength and gap formation to dentin. J Adhes Dent. 2005;7(2):117-26.

65. Pashley DH, Tay FR. Aggressiveness of contemporary self-etching adhesives. Part II: etching effects on unground enamel. Dent Mater. 2001;17(5):430-44.

66. Reis A, Grandi V, Carlotto L, Bortoli G, Patzlaff R, Rodrigues Accorinte Mde L, et al. Effect of smear layer thickness and acidity of self-etching solutions on early and long-term bond strength to dentin. J Dent. 2005;33(7):549-59.

67. Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, Yoshioka M, Snauwaert J, Abe Y, et al. Adhesion to and decalcification of hydroxyapatite by carboxylic acids. J Dent Res. 2001;80(6):1565-9.

68. Yoshioka M, Yoshida Y, Inoue S, Lambrechts P, Vanherle G, Nomura Y, et al. Adhesion/decalcification mechanisms of acid interactions with human hard tissues. J Biomed Mater Res. 2002;59(1):56-62.

69. Fu B, Sun X, Qian W, Shen Y, Chen R, Hannig M. Evidence of chemical bonding to hydroxyapatite by phosphoric acid esters. Biomaterials. 2005;26(25):5104-10.

70. Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, et al. Self-assembled Nano-layering at the Adhesive interface. J Dent Res. 2012;91(4):376-81.

71. Perdigao J, May KN, Jr., Wilder AD, Jr., Lopes M. The effect of depth of dentin demineralization on bond strengths and morphology of the hybrid layer. Oper Dent. 2000;25(3):186-94.

72. Torii Y, Itou K, Nishitani Y, Ishikawa K, Suzuki K. Effect of phosphoric acid etching prior to self-etching primer application on adhesion of resin composite to enamel and dentin. Am J Dent. 2002;15(5):305-8.

73. Rosa WL, Piva E, Silva AF. Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. J Dent. 2015;43(7):765-76.

74. Perdigao J, Swift EJ, Jr. Universal Adhesives. J Esthet Restor Dent. 2015;27(6):331-4.

75. Yoshihara K, Yoshida Y, Nagaoka N, Hayakawa S, Okihara T, De Munck J, et al. Adhesive interfacial interaction affected by different carbon-chain monomers. Dent Mater. 2013;29(8):888-97.

76. Hanabusa M, Mine A, Kuboki T, Momoi Y, Van Ende A, Van Meerbeek B, et al. Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. J Dent. 2012;40(6):475-84.

77. Munoz MA, Luque I, Hass V, Reis A, Loguercio AD, Bombarda NH. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. J Dent. 2013;41(5):404-11.

78. Munoz MA, Sezinando A, Luque-Martinez I, Szesz AL, Reis A, Loguercio AD, et al. Influence of a hydrophobic resin coating on the bonding efficacy of three universal adhesives. J Dent. 2014;42(5):595-602.

79. Wagner A, Wendler M, Petschelt A, Belli R, Lohbauer U. Bonding performance of universal adhesives in different etching modes. J Dent. 2014;42(7):800-7.

80. Luque-Martinez IV, Perdigao J, Munoz MA, Sezinando A, Reis A, Loguercio AD. Effects of solvent evaporation time on immediate adhesive properties of universal adhesives to dentin. Dent Mater. 2014;30(10):1126-35.

81. Marchesi G, Frassetto A, Mazzoni A, Apolonio F, Diolosa M, Cadenaro M, et al. Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-year in vitro study. J Dent. 2014;42(5):603-12.

82. Zhang ZY, Tian FC, Niu LN, Ochala K, Chen C, Fu BP, et al. Defying ageing: An expectation for dentine bonding with universal adhesives? J Dent. 2016;45:43-52.

83. Sai K, Shimamura Y, Takamizawa T, Tsujimoto A, Imai A, Endo H, et al. Influence of degradation conditions on dentin bonding durability of three universal adhesives. J Dent. 2016;54:56-61.

84. Thanatvarakorn O, Prasansuttiporn T, Takahashi M, Thittaweerat S, Foxton RM, Ichinose S, et al. Effect of Scrubbing Technique with Mild Self-etching Adhesives on Dentin Bond Strengths and Nanoleakage Expression. J Adhes Dent. 2016;18(3):197-204.

85. Fu J, Saikaew P, Kawano S, Carvalho RM, Hannig M, Sano H, et al. Effect of air-blowing duration on the bond strength of current one-step adhesives to dentin. Dent Mater. 2017;33(8):895-903.

86. Ikeda M, Kurokawa H, Sunada N, Tamura Y, Takimoto M, Murayama R, et al. Influence of previous acid etching on dentin bond strength of self-etch adhesives. J Oral Sci. 2009;51(4):527-34.

87. Sabatini C. Effect of phosphoric acid etching on the shear bond strength of two self-etch adhesives. J Appl Oral Sci. 2013;21(1):56-62.

88. Mena-Serrano A, Kose C, De Paula EA, Tay LY, Reis A, Loguercio AD, et al. A new universal simplified adhesive: 6-month clinical evaluation. J Esthet Restor Dent. 2013;25(1):55-69.

89. Perdigao J, Kose C, Mena-Serrano AP, De Paula EA, Tay LY, Reis A, et al. A new universal simplified adhesive: 18-month clinical evaluation. Oper Dent. 2014;39(2):113-27.

90. Lawson NC, Robles A, Fu CC, Lin CP, Sawlani K, Burgess JO. Two-year clinical trial of a universal adhesive in total-etch and self-etch mode in non-carious cervical lesions. J Dent. 2015;43(10):1229-34.

91. Loguercio AD, de Paula EA, Hass V, Luque-Martinez I, Reis A, Perdigao J. A new universal simplified adhesive: 36-Month randomized double-blind clinical trial. J Dent. 2015;43(9):1083-92.

92. Fusayama T, Terashima S. Differentiation of two layers of carious dentin by staining. Bull Tokyo Med Dental Univ. 1972;19(1):83-92.

93. Ogushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. J Dent Res. 1975;54(5):1019-26.

94. Kuboki Y, Ohgushi K, Fusayama T. Collagen biochemistry of the two layers of carious dentin. J Dent Res. 1977;56(10):1233-7.

95. Pugach MK, Strother J, Darling CL, Fried D, Gansky SA, Marshall SJ, et al. Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. J Dent Res. 2009;88(1):71-6.

96. Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. The use of a caries detector dye during cavity preparation: a microbiological assessment. Br Dent J. 1993;174(7):245-8.

97. Yip HK, Stevenson AG, Beeley JA. The specificity of caries detector dyes in cavity preparation. Br Dent J. 1994;176(11):417-21.

98. Boston DW, Liao J. Staining of non-carious human coronal dentin by caries dyes. Oper Dent. 2004;29(3):280-6.

99. Stanley HR, Pereira JC, Spiegel E, Broom C, Schultz M. The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. J Oral Pathol. 1983;12(4):257-89.

100. Daculsi G, LeGeros RZ, Jean A, Kerebel B. Possible physico-chemical processes in human dentin caries. J Dent Res. 1987;66(8):1356-9.

101. Duke ES, Lindemuth J. Variability of clinical dentin substrates. Am J Dent. 1991;4(5):241-6.

102. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. Int J Dev Bio. 1995;39(1):273-80.

103. Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. J Dent Res. 1992;71(8):1530-40.

104. Mendis BR, Darling AI. A scanning electron microscope and microradiographic study of closure of human coronal dentinal tubules related to occlusal attrition and caries. Arch Oral Biol. 1979;24(10-11):725-33.

105. Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. J Dent Res. 1983;62(1):7-10.

106. Marshall GW, Habelitz S, Gallagher R, Balooch M, Balooch G, Marshall SJ. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentin. J Dent Res. 2001;80(8):1768-71.

107. Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. J Biomed Mater Res Part A. 2007;81(2):279-86.

108. Suppa P, Ruggeri A, Jr., Tay FR, Prati C, Biasotto M, Falconi M, et al. Reduced antigenicity of type I collagen and proteoglycans in sclerotic dentin. J Dent Res. 2006;85(2):133-7.

109. Ceballos L, Camejo DG, Victoria Fuentes M, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM, et al. Microtensile bond strength of total-etch and self-etching adhesives to caries-affected dentine. J Dent. 2003;31(7):469-77.

110. Wei S, Sadr A, Shimada Y, Tagami J. Effect of caries-affected dentin hardness on the shear bond strength of current adhesives. J Adhes Dent. 2008;10(6):431-40.

111. Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Itou K, et al. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. J Dent Res. 2002;81(8):556-60.

112. Say EC, Nakajima M, Senawongse P, Soyman M, Ozer F, Tagami J. Bonding to sound vs caries-affected dentin using photo- and dual-cure adhesives. Oper Dent. 2005;30(1):90-8.

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

114. Spencer P, Wang Y, Katz JL, Misra A. Physicochemical interactions at the dentin/adhesive interface using FTIR chemical imaging. J Biomed Opt. 2005;10(3):031104.

115. Nakajima M, Sano H, Zheng L, Tagami J, Pashley DH. Effect of moist vs. dry bonding to normal vs. caries-affected dentin with Scotchbond Multi-Purpose Plus. J Dent Res. 1999;78(7):1298-303.

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

117. Sattabanasuk V, Burrow MF, Shimada Y, Tagami J. Resin adhesion to caries-affected dentine after different removal methods. Aus Dent J. 2006;51(2):162-9.

118. Inoue S, Vargas MA, Abe Y, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, et al. Microtensile bond strength of eleven contemporary adhesives to dentin. J Adhes Dent. 2001;3(3):237-45.

119. van Dijken JW. Clinical evaluation of three adhesive systems in class V non-carious lesions. Dent Mater. 2000;16(4):285-91.

120. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Hiraishi N, Yiu CK. Water treeing in simplified dentin adhesives--deja vu? Oper Dent. 2005;30(5):561-79.

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

122. Mjor IA, Gordan VV. Failure, repair, refurbishing and longevity of restorations. Oper Dent. 2002;27(5):528-34.

123. Hashimoto M, De Munck J, Ito S, Sano H, Kaga M, Oguchi H, et al. In vitro effect of nanoleakage expression on resin-dentin bond strengths analyzed by microtensile bond test, SEM/EDX and TEM. Biomaterials. 2004;25(25):5565-74.

124. Hashimoto M. A review--micromorphological evidence of degradation in resin-dentin bonds and potential preventional solutions. J Biomed Mater Res Part B, Applied biomaterials. 2010;92(1):268-80.

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

126. Kermanshahi S, Santerre JP, Cvitkovitch DG, Finer Y. Biodegradation of resin-dentin interfaces increases bacterial microleakage. J Dent Res. 2010;89(9):996-1001.

127. Ye Q, Park J, Topp E, Spencer P. Effect of photoinitiators on the in vitro performance of a dentin adhesive exposed to simulated oral environment. Dent Mater. 2009;25(4):452-8.

128. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. J Dent Res. 2004;83(3):216-21.

129. Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffoon JE, et al. Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. Oper Dent. 2004;29(6):705-12.

130. 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;28(26):3757-85.

131. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. Dent Mater. 2006;22(3):211-22.

132. Reis A, Martins GC, de Paula EA, Sanchez AD, Loguercio AD. Alternative Aging Solutions to Accelerate Resin-Dentin Bond Degradation. J Adhes Dent. 2015;17(4):321-8.

133. 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;26(33):6449-59.

134. Yoshida E, Uno S, Nodasaka Y, Kaga M, Hirano S. Relationship between water status in dentin and interfacial morphology in all-in-one adhesives. Dent Mater. 2007;23(5):556-60.

135. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. Biomaterials. 2003;24(21):3795-803.

136. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. J Biomed Mater Res. 2002;59(1):46-55.

137. Breschi L, Prati C, Gobbi P, Pashley D, Mazzotti G, Teti G, et al. Immunohistochemical analysis of collagen fibrils within the hybrid layer: a FEISEM study. Oper Dent. 2004;29(5):538-46.

138. Hall RC, Embery G. The use of immunohistochemistry in understanding the structure and function of the extracellular matrix of dental tissues. Adv Dent Res. 1997;11(4):478-86.

139. Breschi L, Lopes M, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Perdigao J. Dentin proteoglycans: an immunocytochemical FEISEM study. J Biomed Mater Res. 2002;61(1):40-6.

140. Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjaderhane L, et al. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. J Dent Res. 2012;91(5):467-72.

141. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. J Dent Res. 2002;81(9):603-7.

142. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. Acta Odontol Scand. 2007;65(1):1-13.

143. Boukpessi T, Menashi S, Camoin L, Tencate JM, Goldberg M, Chaussain-Miller C. The effect of stromelysin-1 (MMP-3) on non-collagenous extracellular matrix proteins of demineralized dentin and the adhesive properties of restorative resins. Biomaterials. 2008;29(33):4367-73.

144. Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, Ruggeri A, Jr., et al. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. J Dent. 2011;39(3):231-7.

145. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. Arch Oral Biol. 2007;52(2):121-7.

146. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. Arch Oral Biol. 2000;45(9):757-65.

147. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. J Dent Res. 2007;86(5):436-40.

148. 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;27(25):4470-6.

149. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. Eur J Oral Sci. 2006;114(2):160-6.

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

151. Dickinson DP. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(3):238-75.

152. Reis A, Carrilho M, Breschi L, Loguercio AD. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. Oper Dent. 2013;38(4):E1-E25.

153. 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. Dent Mater. 2010;26(6):571-8.

154. 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. J Dent Res. 2011;90(8):953-68.

155. Almahdy A, Koller G, Sauro S, Bartsch JW, Sherriff M, Watson TF, et al. Effects of MMP inhibitors incorporated within dental adhesives. J Dent Res. 2012;91(6):605-11.

156. 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. J Dent Res. 2011;90(4):535-40.

157. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Gu LS, Zhang K, Agee KA, Carvalho RM, et al. The anti-MMP activity of benzalkonium chloride. J Dent. 2011;39(1):57-64.

158. Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. J Biomed Mater Res Part B, Applied biomaterials. 2010;94(1):250-5.

159. Sauro S, Osorio R, Watson TF, Toledano M. Therapeutic effects of novel resin bonding systems containing bioactive glasses on mineral-depleted areas within the bonded-dentine interface. J Mat Sci Mat Med. 2012;23(6):1521-32.

160. Gutierrez MF, Malaquias P, Hass V, Matos TP, Lourenco L, Reis A, et al. The role of copper nanoparticles in an etch-and-rinse adhesive on antimicrobial activity, mechanical properties and the durability of resin-dentine interfaces. J Dent. 2017;61:12-20.

161. Toledano M, Aguilera FS, Osorio E, Cabello I, Toledano-Osorio M, Osorio R. Functional and molecular structural analysis of dentine interfaces promoted by a Zn-doped self-etching adhesive and an in vitro load cycling model. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. 2015;50:131-49.

162. Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol wet-bonding challenges current anti-degradation strategy. J Dent Res. 2010;89(12):1499-504.

163. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 1999;6(3):437-9.

164. Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. J Dent Res. 2012;91(4):420-5.

165. Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. Eur J Oral Sci. 2009;117(5):587-96.

166. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjaderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. Dent Mater. 2010;26(4):320-5.

167. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. J Dent Res. 2007;86(6):529-33.

168. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, et al. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. Oper Dent. 2009;34(4):379-83.

169. Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. J Adhes Dent. 2009;11(3):191-8.

170. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. J Dent. 2011;39(1):40-7.

171. Breschi L. Chlorhexidine application to stabilize the adhesive interface: why and how? J Adhes Dent. 2013;15(5):492.

172. Zhou J, Tan J, Yang X, Xu X, Li D, Chen L. MMP-inhibitory effect of chlorhexidine applied in a self-etching adhesive. J Adhes Dent. 2011;13(2):111-5.

173. Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. Dent Mater. 2010;26(8):779-85.

174. Stanislawczuk R, Amaral RC, Zander-Grande C, Gagler D, Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin bonds. Oper Dent. 2009;34(4):481-90.

175. Pallan S, Furtado Araujo MV, Cilli R, Prakki A. Mechanical properties and characteristics of developmental copolymers incorporating catechin or chlorhexidine. Dent Mater. 2012;28(6):687-94.

176. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, et al. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. Dent Mater. 2010;26(8):771-8.

177. Lauhio A, Salo T, Tjaderhane L, Lahdevirta J, Golub LM, Sorsa T. Tetracyclines in treatment of rheumatoid arthritis. Lancet. 1995;346(8975):645-6.

178. Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. Ann Med. 2006;38(5):306-21.

179. Stanislawczuk R, Costa JA, Polli LG, Reis A, Loguercio AD. Effect of tetracycline on the bond performance of etch-and-rinse adhesives to dentin. Braz Or Res. 2011;25(5):459-65.

180. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. J Dent Res. 2006;85(1):22-32.

181. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay FR. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. Dent Mater. 2003;19(4):313-9.

182. Imazato S, Tay FR, Kaneshiro AV, Takahashi Y, Ebisu S. An in vivo evaluation of bonding ability of comprehensive antibacterial adhesive system incorporating MDPB. Dent Mater. 2007;23(2):170-6.

183. Pashley DH, Tay FR, Imazato S. How to increase the durability of resin-dentin bonds. Compend Contin Educ Dent. 2011;32(7):60-4, 66.

184. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Mazzoni A, Carvalho RM, Carrilho M, Tersariol IL, et al. Can quaternary ammonium methacrylates inhibit matrix MMPs and cathepsins? Dent Mater. 2015;31(2):e25-32.

185. De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. Eur J Oral Sci. 2010;118(5):494-501.

186. De Munck J, Mine A, Vivan Cardoso M, De Almeida Neves A, Van Landuyt KL, Poitevin A, et al. Effect of dentin location and long-term water storage on bonding effectiveness of dentin adhesives. Dent Mater J. 2011;30(1):7-13.

187. Kanca J, 3rd. One step bond strength to enamel and dentin. Am J Dent. 1997;10(1):5-8.

188. Sabatini C, Patel SK. Matrix metalloproteinase inhibitory properties of benzalkonium chloride stabilizes adhesive interfaces. Eur J Oral Sci. 2013;121(6):610-6.

189. Sabatini C, Ortiz PA, Pashley DH. Preservation of resin-dentin interfaces treated with benzalkonium chloride adhesive blends. Eur J Oral Sci. 2015;123(2):108-15.

190. Donmez N, Belli S, Pashley DH, Tay FR. Ultrastructural correlates of in vivo/in vitro bond degradation in self-etch adhesives. J Dent Res. 2005;84(4):355-9.

191. Komori PC, Pashley DH, Tjaderhane L, Breschi L, Mazzoni A, de Goes MF, et al. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. Oper Dent. 2009;34(2):157-65.

192. Griffiths BM, Watson TF, Sherriff M. The influence of dentine bonding systems and their handling characteristics on the morphology and micropermeability of the dentine adhesive interface. J Dent. 1999;27(1):63-71.

193. Koshiro K, Inoue S, Tanaka T, Koase K, Fujita M, Hashimoto M, et al. In vivo degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch vs. a total-etch adhesive system. Eur J Oral Sci. 2004;112(4):368-75.

194. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. Eur J Oral Sci. 2010;118(4):411-6.

195. Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. J Biomed Mater Res Part B, Applied biomaterials. 2008;86(2):330-4.

196. Xu C, Wang Y. Cross-linked demineralized dentin maintains its mechanical stability when challenged by bacterial collagenase. J Biomed Mater Res Part B, Applied biomaterials. 2011;96(2):242-8.

197. Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. J Biomed Mater Res Part B, Applied biomaterials. 2007;80(1):268-72.

198. Bedran-Russo AK, Yoo KJ, Ema KC, Pashley DH. Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. J Dent Res. 2009;88(9):807-11.

199. Liu Y, Dusevich V, Wang Y. Proanthocyanidins rapidly stabilize the demineralized dentin layer. J Dent Res. 2013;92(8):746-52.

200. Fang M, Liu R, Xiao Y, Li F, Wang D, Hou R, et al. Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin-dentin bonds. J Dent. 2012;40(6):458-66.

201. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nut Rev. 1998;56(11):317-33.

202. Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharm Rev. 2000;52(4):673-751.

203. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci. 1999;65(4):337-53.

204. Epasinghe DJ, Yiu CK, Burrow MF, Tsoi JK, Tay FR. Effect of flavonoids on the mechanical properties of demineralised dentine. J Dent. 2014;42(9):1178-84.

205. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. Am J Dent. 2007;20(1):7-20.

206. Sauro S, Watson TF, Mannocci F, Miyake K, Huffman BP, Tay FR, et al. Two-photon laser confocal microscopy of micropermeability of resin-dentin bonds made with water or ethanol wet bonding. J Biomed Mater Res Part B, Applied biomaterials. 2009;90(1):327-37.

207. Shin TP, Yao X, Huenergardt R, Walker MP, Wang Y. Morphological and chemical characterization of bonding hydrophobic adhesive to dentin using ethanol wet bonding technique. Dent Mater. 2009;25(8):1050-7.

208. Tay FR, Pashley DH. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. Biomaterials. 2008;29(8):1127-37.

209. Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, et al. Biomimetic remineralization of dentin. Dent Mater. 2014;30(1):77-96.

210. Marquezan M, Correa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. Arch Oral Biol. 2009;54(12):1111-7.

211. Zhang L, Wang DY, Fan J, Li F, Chen YJ, Chen JH. Stability of bonds made to superficial vs. deep dentin, before and after thermocycling. Dent Mater. 2014;30(11):1245-51.

212. Toledano M, Aguilera FS, Sauro S, Cabello I, Osorio E, Osorio R. Load cycling enhances bioactivity at the resin-dentin interface. Dent Mater. 2014;30(7):e169-88.

213. Sauro S, Watson TF, Thompson I, Toledano M, Nucci C, Banerjee A. Influence of air-abrasion executed with polyacrylic acid-Bioglass 45S5 on the

bonding performance of a resin-modified glass ionomer cement. Eur J Oral Sci. 2012;120(2):168-77.

214. He L, Mu C, Shi J, Zhang Q, Shi B, Lin W. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. Int J Bio Mac. 2011;48(2):354-9.

215. Hagerman AE, Butler LG. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. J Biol Chem. 1981;256(9):4494-7.

216. Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. J Biomed Mater Res Part A. 2003;65(1):118-24.

217. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. Methods in enzymology. 1990;186:343-55.

218. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. Sci World J. 2013;2013:162750.

219. Aguiar TR, Vidal CM, Phansalkar RS, Todorova I, Napolitano JG, McAlpine JB, et al. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. J Dent Res. 2014;93(4):417-22.

220. Vidal CM, Leme AA, Aguiar TR, Phansalkar R, Nam JW, Bisson J, et al. Mimicking the hierarchical functions of dentin collagen cross-links with plant derived phenols and phenolic acids. Langmuir : ACS J Surf Col. 2014;30(49):14887-93.

221. Epasinghe DJ, Yiu CK, Burrow MF, Tay FR, King NM. Effect of proanthocyanidin incorporation into dental adhesive resin on resin-dentine bond strength. J Dent. 2012;40(3):173-80.

222. Juarez-Osornio C, Gracia-Fadrique J. Structures similar to lipid emulsions and liposomes. Dipalmitoylphosphatidylcholine, cholesterol, Tween 20-Span 20 or Tween 80-Span 80 in aqueous media. Journal Lip Res. 2017;27(2):139-50.

223. Guneser MB, Arslan D, Dincer AN, Er G. Effect of sodium hypochlorite irrigation with or without surfactants on the bond strength of an epoxy-based sealer to dentin. Clin Oral Invest. 2017;21(4):1259-65.

224. Rossi-Fedele G, Prichard JW, Steier L, de Figueiredo JA. The effect of surface tension reduction on the clinical performance of sodium hypochlorite in endodontics. Int Endod J. 2013;46(6):492-8.

225. Sabatini C, Pashley DH. Aging of adhesive interfaces treated with benzalkonium chloride and benzalkonium methacrylate. Eur J Oral Sci. 2015;123(2):102-7.

226. Camps J, Pashley DH. Buffering action of human dentin in vitro. J Adhes Dent. 2000;2(1):39-50.

227. Henriksen T, Juhler RK, Svensmark B, Cech NB. The relative influences of acidity and polarity on responsiveness of small organic molecules to analysis with negative ion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). J Am Soc Mas Spec. 2005;16(4):446-55.

228. Cho JH, Shanmuganathan K, Ellison CJ. Bioinspired catecholic copolymers for antifouling surface coatings. ACS applied materials & interfaces. 2013;5(9):3794-802.

229. Zhang H, Bre LP, Zhao T, Zheng Y, Newland B, Wang W. Mussel-inspired hyperbranched poly(amino ester) polymer as strong wet tissue adhesive. Biomaterials. 2014;35(2):711-9.

230. Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. Science. 2007;318(5849):426-30.

231. Jenkins CL, Meredith HJ, Wilker JJ. Molecular weight effects upon the adhesive bonding of a mussel mimetic polymer. ACS applied materials & interfaces. 2013;5(11):5091-6.

232. Maier GP, Rapp MV, Waite JH, Israelachvili JN, Butler A. BIOLOGICAL ADHESIVES. Adaptive synergy between catechol and lysine promotes wet adhesion by surface salt displacement. Science. 2015;349(6248):628-32.

233. Liu Y, Bai X, Li S, Liu Y, Keightley A, Wang Y. Molecular weight and galloylation affect grape seed extract constituents' ability to cross-link dentin collagen in clinically relevant time. Dent Mater. 2015;31(7):814-21.

234. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. J Biomed Mater Res. 2002;62(3):447-56.

235. Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? Journal. 2003;69(11):726-31.

236. Suppa P, Breschi L, Ruggeri A, Mazzotti G, Prati C, Chersoni S, et al. Nanoleakage within the hybrid layer: a correlative FEISEM/TEM investigation. J Biomed Mater Res Part B, Applied biomaterials. 2005;73(1):7-14.

237. Fathima NN, Baias M, Blumich B, Ramasami T. Structure and dynamics of water in native and tanned collagen fibers: Effect of crosslinking. Int J Biol Mac. 2010;47(5):590-6.

238. Bertassoni LE, Orgel JP, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix - limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. Acta Biomater. 2012;8(7):2419-33.

239. Rigozzi S, Muller R, Stemmer A, Snedeker JG. Tendon glycosaminoglycan proteoglycan sidechains promote collagen fibril sliding-AFM observations at the nanoscale. J Biomech. 2013;46(4):813-8.

240. Mazzoni A, Pashley DH, Ruggeri A, Jr., Vita F, Falconi M, Di Lenarda R, et al. Adhesion to chondroitinase ABC treated dentin. J Biomed Mater Res Part B, Applied biomaterials. 2008;86(1):228-36.

241. Zanchi CH, Munchow EA, Ogliari FA, de Carvalho RV, Chersoni S, Prati C, et al. Effects of long-term water storage on the microtensile bond strength of five experimental self-etching adhesives based on surfactants rather than HEMA. Clin Oral Invest. 2013;17(3):833-9.

242. Rivero RM, Ruiz JM, Garcia PC, Lopez-Lefebre LR, Sanchez E, Romero L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. Plant Sci. 2001;160(2):315-21.

243. Green B, Yao X, Ganguly A, Xu C, Dusevich V, Walker MP, et al. Grape seed proanthocyanidins increase collagen biodegradation resistance in the dentin/adhesive interface when included in an adhesive. J Dent. 2010;38(11):908-15.

244. 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. Dent Mater. 2012;28(8):842-52.

245. Liu Y, Chen M, Yao X, Xu C, Zhang Y, Wang Y. Enhancement in dentin collagen's biological stability after proanthocyanidins treatment in clinically relevant time periods. Dent Mater. 2013;29(4):485-92.

246. Smith GN, Brown P, Rogers SE, Eastoe J. Evidence for a critical micelle concentration of surfactants in hydrocarbon solvents. Langmuir. 2013;29(10):3252-8.

8. ANEXO A

8.1. Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa. COEP - UEPG

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROPESP
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

COEP
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER PNº 41/2017

Protocolo: 1032/2017

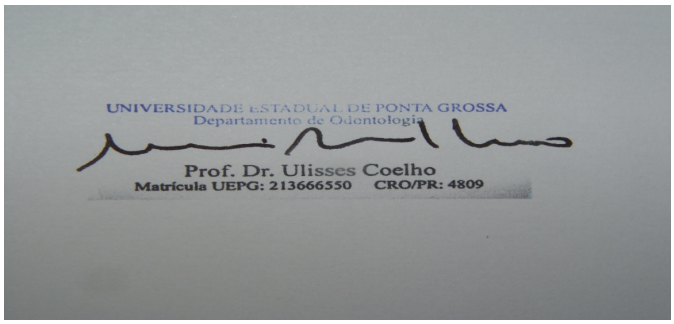
No dia 13 de JUNHO de 2017, a Comissão Interna de Ética em Pesquisa, **APROVOU** protocolo de pesquisa intitulado "**Efeito da aplicação de primers experimentais à base de flavonóides nas propriedades adesivas e mecânicas da dentina hígida e cariada.**" de responsabilidade do pesquisador Cesar Augusto Galvão Arrais.

Conforme Resolução CNS 466/2012, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (http://www.uepg.br/coep/).

Data para entrega do relatório parcial: 13 de JUNHO de 2018
Data para entrega do relatório final: 13 de JUNHO de 2019.

Ponta Grossa, 13 de JUNHO de 2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP



Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - CEP: 84030-900 – Ponta Grossa - PR – BRASIL
Bloco M Sala 100 - Campus Universitário em Uvaranas
Fone (42) 3220-3108 – Fax: (42) 3220-3102
e-mail: seccoep@uepg.br Home page: www.uepg.br