

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

CLAUDIA CAROLINA GONZALEZ VACA

EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO E COBRE
EM UM SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL NAS PROPRIEDADES ADESIVAS E
ANTIMICROBIANAS: ESTUDO *IN SITU*

PONTA GROSSA

2024

CLAUDIA CAROLINA GONZALEZ VACA

EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO E
COBRE EM UM SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL NAS PROPRIEDADES
ADESIVAS E ANTIMICROBIANAS: ESTUDO *IN SITU*

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título mestre em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Mestrado em Odontologia- Área de Concentração: Dentística Restauradora. Linha de Pesquisa: Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais Odontológicos.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio

Co-orientador: Prof. Dr. Andrés Dávila Sánchez

PONTA GROSSA

2024

Gonzalez Vaca, Claudia Carolina

G643

Efeito da adição de nanopartículas de óxido de zinco e cobre em um sistema adesivo universal nas propriedades adesivas e antimicrobianas: estudo *in situ* / Claudia Carolina Gonzalez Vaca. Ponta Grossa, 2024.

64 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio.

Coorientador: Prof. Dr. Andrés Dávila Sánchez.

1. Cobre. 2. Óxido de zinco. 3. Adesivos dentinarios. 4. Placa dentária. 5. Dentina. I. Loguercio, Alessandro Dourado. II. Dávila Sánchez, Andrés. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Dentística Restauradora. IV. T.

CDD: 617.6

CLAUDIA CAROLINA GONZÁLEZ VACA

EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO E COBRE
EM UM SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL NAS PROPRIEDADES ADESIVAS E
ANTIMICROBIANAS: ESTUDO *IN SITU*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Dentística Restauradora, linha de pesquisa de Adesão.

Ponta Grossa, ____08____ de março de 2024__.



Prof. Dr. Alessandro Loguercio- Orientador

Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Felipe Gutiérrez

Universidad de los Andes



Prof. Dra. Tamires Maske

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DADOS CURRICULARES

CLAUDIA CAROLINA GONZALEZ VACA

NASCIMENTO	25-10-1996 Quito – Pichincha- Equador
FILIAÇÃO	Mauricio Efraín González Oviedo Susana Norma Vaca Martínez
2015- 2020	Curso de Graduação em Odontologia da Universidade San Francisco de Quito (USFQ), Quito, Equador.
2022-2024	Curso de Pós-graduação em Odontologia. Área de concentração: Dentística Restauradora. Nível Mestrado em Odontologia Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), PR, Brasil.
2022-2024	Curso de Especialização em Prótese e Dentística, Universidade Tuiuti do Paraná (UTP), PR, Brasil.

Dedico para meus pais, Mauricio González e Susana Vaca. Obrigada por seu esforço e amor de todos os dias, sem vocês eu não estaria aqui. Pelo apoio nos momentos mais difíceis na minha vida, por olhar e saber qual que é o melhor caminho para mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre cuidar de mim, e estar sempre comigo sem importar o lugar. Mais do que tudo, ter um plano de vida maravilhoso para meu futuro que me lembra sempre. Obrigada por me escolher como sua filha e me mostrar seu amor.

Meus pais por me animar para sempre para seguir adiante nos desafios da vida e ajudar-me a chegar à onde estou neste dia.

Minha família, em especial minhas avós por sempre se preocupar e me ajudar na distância. Minha prima Camila e Tia Eugenia por me compreender o desafio que foi tomar a decisão de vir para o Brasil, e me escutar nos momentos mais difíceis.

O Jorge, meu namorado que conheci durante o tempo do mestrado. Obrigada por me amar, apoiar, entender e aconselhar. Por fazer desta aventura muito, mas incrível, e por compartilhar os mesmos sonhos do nosso futuro. Sem o Jorge não seria igual.

O Professor Andrés Dávila, o melhor professor que conheci no Equador. Sem o professor não teria esta oportunidade, obrigada por ser um excelente mentor e amigo durante o mestrado. Agradeço infinitamente.

Minha amiga, irmã que me deu a vida desde que a gente tinha 4 anos, Camila. Obrigada por todas as aventuras que vivemos desde crianças até o mestrado. Por nos apoiar em casa, na pós-graduação e na vida em geral nos momentos difíceis e os mais felizes. Somos uma dupla incrível.

Meu amigo compatriota, que a vida fez nos encontrar aqui, Byron. Obrigada por sua amizade e seu entusiasmo em tudo.

Minha tutora durante o mestrado, Romina, por me ensinar e ajudar durante a pesquisa. Pela paciência e o impulso para terminar tudo com sucesso.

Meus amigos e colegas brasileiros do mestrado, obrigada pela sua amizade, as experiências, risadas e por acolher dentro do seu ambiente.

A Professora Tamires e o Professor Alessandro, por me orientar e receber em seus programas de pesquisa. Obrigada por me ensinar o outro lado da odontologia que eu não conhecia e que agora sou parte.

O Brasil, por me acolher e abrir suas portas para poder estudar e aprender dos melhores professores que o país formou. Obrigada por ser minha segunda casa e me compartilhar parte de sua cultura que sempre vou levar no meu coração.

RESUMO

González CC. **Efeito da adição de nanopartículas de óxido de zinco e cobre em um sistema adesivo universal nas propriedades adesivas e antimicrobianas: estudo *in situ*.** [Dissertação]- Mestrado em Odontologia- Area de concentração Dentística Restauradora- Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2023.

Objetivo: O estudo determinou o efeito da incorporação de nanopartículas (Np) de óxido de zinco e cobre (Cu/ZnONp) em um sistema adesivo universal (Ambar Universal APS) nas propriedades antimicrobianas e adesivas à dentina quando submetidos ao desafio cariogênico (DC). **Material e métodos:** O sistema adesivo experimental (0,2/5% Cu/ZnONp) e o controle (0% Cu/ZnONp) foram aplicados em 56 terceiros molares na dentina e, distribuídos em quatro grupos (n=14) de acordo com a estratégia adesiva (condicionamento e lavagem [CON] ou autocondicionante [AUTO]). Os dentes foram restaurados com resina composta e seccionados longitudinalmente em espécimes no formato de “palitos”. Os espécimes de cada dente foram distribuídos aleatoriamente e avaliados no tempo imediato [IM] (n=7), e após o desafio cariogênico [DC] (n=7). Para o DC, os espécimes foram colocados em dispositivos palatais utilizados por 14 voluntários por duas fases de 21 dias cada, com um período *washout* de 7 dias, entre elas. Depois disso, os espécimes e o biofilme foram removidos. As propriedades antimicrobianas foram analisadas mediante a atividade antimicrobiana de unidades formadoras de colônias por miligrama (UFC log/mg), caracterização do biofilme por imagem do MEV, e a análise da microdureza Knoop (KHN) e a perda mineral (PM) dos espécimes de cada grupo experimental. Já para a avaliação das propriedades adesivas, foram testados na resistência de união a microtração (RU) e nanoinfiltração (NI), respetivamente, em cada tempo (IM e DC), mas para grau de conversão (GC) só foi no IM. Para a KHN, RU, NI os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de três fatores, e ANOVA de dois fatores para a PM, GC e (UFC log/mg). O teste *post hoc* de Tukey foi realizado para comparações múltiplas entre os grupos ($\alpha = 0,05$). **Resultados:** A adição de CuZnONps no adesivo teve uma redução significativa do número das UFC tanto para *estreptococos do grupo mutans* como para fungos totais ($p < 0,05$). As imagens do MEV mostraram um biofilme tridimensional complexo com morfologia bacteriana principalmente de cocos e estreptococos. A adição de CuZnONps diminuiu significativamente a PM nos 20 μm ($p=0,0002$), 50 μm ($p=0,0000002$), e 100 μm ($p= 0,000001$). Após o DC, todos os grupos na estratégia CON diminuíram significativamente os valores de RU em comparação com os valores IM ($p < 0,002$). Não foi observada diferença significativa nos valores de RU na estratégia AUTO CuZnONps no IM e após o DC ($p > 0,05$). Os valores de GC não apresentaram diferenças significativas em todos os grupos ($p=0,29$). Os valores de NI do controle aumentaram significativamente comparando com o CuZnO após DC, independente da estratégia adesiva. **Conclusão:** A adição de CuZnONps (0,2/5%) em um adesivo universal pode proporcionar uma atividade antimicrobiana local e reduzir a perda mineral, aumentando suas propriedades adesivas em um ambiente cariogênico.

Palavras-chave: Cobre, óxido de zinco, placa dentária, adesivos dentinarios, dentina

ABSTRACT

González, CC. **Preservation of the Adhesive Interface in a Cariogenic Oral Environment by Adding Zinc Oxide and Copper Nanoparticles to a Universal Adhesive System: An *in-situ* study** [Dissertation]- Master of Science in Dentistry- Concentration Area: Restorative Dentistry- State University of Ponta Grossa; 2023.

Objective: This study aimed to evaluate the effect of copper and zinc oxide nanoparticles (Cu/ZnONp) added into a universal adhesive system (Ambar Universal APS, FGM) on the antimicrobial and dentin bonding properties when submitted to a cariogenic challenge *in-situ*. **Methods and materials:** The experimental adhesive, (0.2/5% Cu/ZnONp), and the control (0% Cu/ZnONp) were applied to enamel-free fifty-six third molars distributed into four groups (n=14) based on the adhesive strategy (etch and rinse [ER] and self-etch [SE]). Teeth were restored with composite resin, and longitudinally sectioned into resin-dentin beam-like specimens which were randomly allocated to an immediate evaluation (IM, 24hrs) and to a cariogenic challenge (CC). For CC, specimens were placed in an intra-oral palatal device used by 14 volunteers for two phases of 21 days each with a washout period of 7 days, after the first 21 days and followed by biofilm harvest and specimen removal. Antimicrobial properties were assessed against several microorganisms with colony forming units per milligram (CFU,log/mg), biofilm characterization by SEM imaging, Knoop microhardness (KHN), and mineral loss (ML). Bonding properties were evaluated through microtensile bond strength (μ TBS) and nanoleakage (NL) for IM and after CC; degree of conversion (DC) was assessed only for IM. For KHN, μ TBS and NL it was used a three-way ANOVA and a two-way ANOVA for ML, DC, and (CFU,log/mg). Tukey's post-hoc test ($\alpha = 0.05$) for multiple comparison was applied. **Results:** The addition of CuZnONps in the adhesive led to a significant reduction in CFU count for both *mutans streptococci* and total fungus ($p < 0.05$). SEM imaging showed biofilm with complex three-dimensional morphology, primarily cocci and streptococci. The addition of CuZnO significantly decreased ML at 20 μ m ($p=0.0002$), 50 μ m ($p=0.0000002$), and 100 μ m ($p= 0.000001$). After CC, all groups in the ER strategy, significantly decreased the μ TBS values compared to (IM) values ($p < 0.002$). No significant difference in μ TBS values for the SE CuZnO at IM and after CC was observed ($p > 0.05$). DC values showed no significant differences on all groups ($p= 0.29$). NL values of control significantly increased compared CuZnO after CC, regardless of the adhesive strategy. **Conclusion:** The addition of CuZnONps (0.2/5 wt%) into a universal adhesive may provide a local antimicrobial activity and reduce mineral loss, increasing its bonding properties under a cariogenic environment.

Keywords: Copper, Zinc oxide, Biofilm, Dentin, Dental Adhesives

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Adesivo Universal APS utilizado	24
Figura 2. Desenho experimental da análise das propriedades adesivas	26
Figura 3. Preparo dos espécimes	27
Figura 4. Restaurações dos espécimes	28
Figura 5. Espécimes em formato de palitos por cada grupo experimental.....	29
Figura 6. Dispositivo palatal com a distribuição dos espécimes, para os grupos experimentais antes e após o <i>washout</i> de 7 dias.....	30
Figura 7. Distribuição dos palitos por teste das propriedades adesivas.....	34
Gráfico 1. Contagem microbiológico, com as medias e o desvio padrão para estratégia de condicionamento e lavagem.....	38
Gráfico 2. Contagem microbiológico, com as medias e o desvio padrão para estratégia autocondicionante	39
Figura 8. Imagens do MEV da morfologia bacteriana do desafio cariogênico, por cada estratégia adesiva.	40
Figura 9. Imagens SEM com retroespalhamento representativas da nanoinfiltração	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Materiais utilizados, número de lote, composição, e modo de aplicação.	25
Tabela 2. Médias e desvios padrão da microdureza Knoop no tempo (IM), após o desafio cariogênico (DC), e perda mineral (ML, %) após o DC em cada distância desde a camada híbrida por cada condição experimental (*).	42
Tabela 3. Número de espécimes (%) dos padrões de fratura e falhas prematuras dos diferentes grupos experimentais após o teste de resistência de união, no tempo imediato e após o desafio cariogênico.	43
Tabela 4. Média e desvio padrão dos valores de resistência de união (MPa) no tempo imediato e após o desafio cariogênico de todos os grupos experimentais (*).	44
Tabela 5. Média e desvio padrão do grau de conversão (%) para todos os grupos experimentais (*)	44
Tabela 6. Média e desvio-padrão da nanoinfiltração (%) no tempo imediato e após o desafio cariogênico para todas as condições experimentais (*).....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IM	Imediato
DC	Desafio cariogênico
A	Fratura adesiva
CR	Fratura coesiva de resina
CD	Fratura coesiva de dentina
Np	Nanopartículas
Cu	Cobre
ZnO	Oxido de zinco
RU	Resistência de união
CFU	Unidades formadoras de colônia
NI	Nanoinfiltração
GC	Grau de conversão
COEP	Comitê de ética em pesquisa
COM	Estratégia adesiva de condicionamento e lavagem
AUTO	Estratégia adesiva autocondicionante
BHI	Brain Heart Infusion
MSB	Mitis Salivarius Bacitracina
BHI Ácido	Brain Hear Infusion ácido
LACTO	Agar para lactobacilli bacteria
SAB	Sabouraud dextrose agar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

#	Número
%	Porcentagem
=	Igual
<	Menor que
>	Maior que
≥	Maior ou igual que
±	Mais ou menos
MPa	Mega Pascal
Log	Logaritmo de 10
mg	Miligramas
mm ²	Milímetro (s) quadrado (s)
mm/min	Milímetro (s) por minuto
mW/cm ²	MiliWatts por centímetro (s) quadrado
°C	Grau (s) Celsius
n	Número de corpos de prova
rpm	Rotações por minuto
α	Nível de significância
p	Valor de probabilidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	LONGEVIDADE DAS RESTAURAÇÕES.....	17
2.2	SISTEMAS ADESIVOS	18
2.3	DEGRADAÇÃO DA CAMADA HÍBRIDA	19
2.4	MATERIAIS ADESIVOS PARA PREVENIR A DEGRADAÇÃO DA INTERFACE ADESIVA.....	20
2.5	NANOPARTÍCULAS DE COBRE E ÓXIDO DE ZINCO	21
3	OBJETIVOS E HIPÓTESES	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3.3	HIPÓTESES NULAS.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL	24
4.1.1	Formulação do sistema adesivo.....	24
4.1.2	Cálculo amostral	25
4.1.3	Recrutamento de participantes	26
4.1.4	Preparação dos espécimes.....	27
4.1.5	Procedimento adesivo.....	27
4.1.6	Preparação dos espécimes.....	28
4.1.7	Preparação do dispositivo palatal	29
4.1.8	Fase intraoral	30
4.2	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS	31
4.2.1	Coleta do biofilme	31
4.2.2	Cultivo do biofilme e análise antimicrobiana	31
4.2.3	Análise da morfologia bacteriana (MEV).....	33

4.2.4 Análise da perda mineral (PM) com microdureza superficial de knoop (KHN)	33
4.3 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ADESIVAS	34
4.3.1 Distribuição dos palitos por cada teste	34
4.3.2 Análise da resistência de união à microtração (RU)	34
4.3.3 Análise do grau de conversão da camada híbrida por espectroscopia de micro-raman (GC após 24hrs)	35
4.3.4 Análise da nanoinfiltração (NI) por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
6 RESULTADOS	38
6.1 CULTIVO DO BIOFILME E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	38
6.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA BACTERIANA (MEV)	40
6.3 MICRODUREZA SUPERFICIAL DE KNOOP E PERDA MINERAL	41
6.4 RESISTÊNCIA DE UNIÃO	43
6.5 GRAU DE CONVERSÃO	44
6.6 ANÁLISE DA NANOINFILTRAÇÃO (NI) POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	44
7 DISCUSSÃO	47
8 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO A - APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA	59

1 INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo, a cárie dentária tem permanecido como um desafio predominante no campo da odontologia. De acordo com o *Global Burden of Disease Study*, a cárie não tratada foi classificada como a doença mais prevalente, com cerca de 2,3 bilhões de casos estimados de 1990 a 2017, afetando indivíduos de todas as idades em todo o mundo (Bernabe et al. ¹ 2020). A fase inicial da cárie dentária é caracterizada pelo distúrbio do equilíbrio da desmineralização e da remineralização da hidroxiapatita nos dentes, (Mazzoni et al. ² 2015; Pitts et al. ³ 2017) e o desenvolvimento posterior é influenciado por uma combinação multifatorial de exposição frequente aos carboidratos da dieta, higiene oral inadequada e acúmulo de biofilme cariogênico (Pitts et al. ³ 2017; Bowen ⁴ 2016). O produto final predominante do metabolismo do açúcar dentro do biofilme cariogênico é o ácido láctico, causando uma redução no pH do biofilme, abaixo de 5,5, levando a dissolução de cristais minerais, aumentando a porosidade do esmalte e facilitando a subsequente destruição da porção orgânica, resultando em cavitação dentária (Mazzoni et al. ² 2015; Pitts et al. ³ 2017).

A resina composta, associada a um sistema adesivo, é considerada o material de primeira eleição em restaurações direitas, devido a suas propriedades estéticas e bom desempenho clínico (Demarco et al. ⁵ 2017). No entanto, elas não conseguem neutralizar o ambiente ácido do biofilme resultante da atividade metabólica das bactérias e permitem o crescimento de bactérias cariogênicas, levando a um maior acúmulo de placa com mudanças na composição que favorecem as bactérias nocivas em prejuízo das benéficas, que podem se tornar suscetíveis a cáries secundárias (Nedeljkovic et al. ⁶ 2016). Nesse sentido, uma revisão sistemática recente (Heintze et al. ⁷ 2022) relatou uma taxa de falha anual ao redor de 2% para restaurações com resina composta em dentes posteriores, causado por cáries secundárias agora conhecidas como cáries adjacentes à margem da restauração (CAMR) (Machiulskiene et al. ⁸ 2020).

A cárie adjacente à margem da restauração compartilha fatores de risco semelhantes com lesões primárias, incluindo a presença de biofilme cariogênico (Askar et al. ⁹ 2020). Um dos principais microrganismos associados é o bem-conhecido *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (Jokstad ¹⁰ 2016), o qual tem um alto potencial cariogênico devido à capacidade de transportar e metabolizar

carboidratos em ácidos orgânicos (acidogenicidade) e de proliferar em condições de baixo pH (aciduricidade) (Lemos et al. ¹¹ 2019). No entanto, outros microrganismos encontrados no biofilme cariogênico podem influenciar a progressão da lesão cáries, ou a acúmulo do biofilme, como o *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Bifidobacterium* spp., *Prevotella* spp. e outros (Mo et al. ¹² 2010; Chenicheri et al. ¹³ 2017; Lamont et al. ¹⁴ 2018; Kreth et al. ¹⁵ 2020). Nesse contexto, as CAMRs também desempenham um papel importante na degradação do material, especialmente na interface dente- adesivo. A interface adesiva, é muito suscetível à biodegradação hidrolítica e enzimática pela ação de esterases bacterianas cariogênicas e assim como das metaloproteinases da matriz (MMPs), acelerando a degradação e a subsequente falha, (Frassetto et al. ¹⁶ 2016; Van Meerbeek et al. ¹⁷ 2020) sendo considerado o ponto mais fraco nas restaurações compostas (Spencer et al. ¹⁸ 2019).

Uma das alternativas para diminuir a degradação da interface adesiva pela ação bacteriana e também ter efeito de atuar nos fatores locais do desenvolvimento das lesões de cárie, é com o desenvolvimento de materiais restauradores com características antimicrobianas (Spencer et al. ¹⁸ 2019; Chen et al. ¹⁹ 2018), por meio da incorporação de nanopartículas (Np) metálicas (Chen et al. ¹⁹ 2018; Agnihotri et al. ²⁰ 2020). As CuNp tem se destacado por ser economicamente mais acessíveis que outras e apresentar propriedades antimicrobianas significativas, inibindo a formação do biofilme (Xu et al. ²¹ 2022). De acordo com estudos *in vitro*, a incorporação de CuNp pode fornecer propriedades antimicrobianas ao sistema adesivo e reduzir a degradação da interface, sem afetar as propriedades mecânicas do adesivo (Gutiérrez et al. ²² 2017; Gutiérrez et al. ²³ 2017). Além disso, a adição de CuNp pode melhorar as propriedades adesivas e mecânicas da interface, mesmo sob desafio cariogênico *in situ* (Vidal et al. ²⁴ 2022). Recentemente, um estudo clínico demonstrou que as CuNp não afetam o desempenho clínico de restaurações em lesões cervicais não cáries após 48 meses (Matos et al. ²⁵ 2023).

Por outro lado, a adição de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) nos sistemas adesivos também tem sido estudada, principalmente por favorecer a remineralização da dentina e reduzir a degradação da interface mediada pelas MMPs sem alterar as propriedades adesivas (Toledano et al. ²⁶ 2022). Nesse contexto, estudos *in vitro* tem demonstrado que a combinação de CuNp e ZnONp

e a incorporação delas no sistema adesivo em concentrações de 0,2/5% em peso é uma alternativa viável para fornecer propriedades antimicrobianas contra o *S. mutans* sem efeitos citotóxicos importantes e estabilizar a interface adesiva, tanto na dentina hígida quanto na dentina afetada por cárie (Gutierrez et al. ²⁷ 2019; Gutiérrez et al. ²⁸ 2019).

Não obstante a literatura mostra resultados promissores da atividade antimicrobiana e os efeitos positivos das CuNp e ZnONp na interface adesivo-dentina, esses baseados em estudos *in vitro*, os quais tem a desvantagem de gerar um ambiente cariogênico mais agressivo, quando comparado a um estudo *in situ* (Ferracane ²⁹ 2017). Por outro lado, a maioria de análises antimicrobianos são feitos com cultivos de uma ou duas espécies (*S. mutans* e *S. aureus*) de forma isolada. Certamente, para representar uma situação clínica mais específica, onde existe um biofilme com vários espécimes bacterianos interagindo, um estudo *in situ* é muito mais promissor (Nedeljkovic et al. ³⁰ 2017), permitindo a simulação do comportamento do material em condições reais, aumentando a relevância clínica da informação obtida (Ferracane ²⁹ 2017) (Hollanders et al. ³¹ 2018). Assim, o objetivo do estudo é determinar se a incorporação de CuZnONp em concentrações de 0,2/5% em um sistema adesivo universal melhora as propriedades antimicrobianas e adesivas à dentina quando submetido ao desafio cariogênico *in situ*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LONGEVIDADE DAS RESTAURAÇÕES

Diversos materiais restauradores resinosos têm sido desenvolvidos com o objetivo de devolver função e estética aos dentes que perderam parte de sua estrutura mostrando um bom comportamento clínico ao longo do tempo (Heintze et al. ⁷ 2022). Um desses materiais é a resina composta, que associada a um sistema adesivo, é considerada o material de primeira eleição em restaurações direitas. No entanto, a taxa de falha anual dessas restaurações é na média geral ao redor de 3%, sendo a cárie secundária, chamada também de cárie adjacente à margem da restauração, uma das principais causas de falha (Demarco et al. ³² 2023). A falha das restaurações por cárie secundária leva a trocar de mais da metade das restaurações, diminuindo a longevidade delas (Eltahlah et al. ³³ 2018) .

As lesões de cárie secundárias são definidas como lesões adjacentes à margem da restauração. Essas lesões de cárie, assim como na cárie primária, tem um processo multifatorial e complexo, envolvendo o material que foi utilizado para restaurar. Portanto, existem três situações em que as cáries secundárias podem ocorrer: 1) associada com uma restauração defeituosa, 2) associada com uma restauração intacta, e 3) não estar associada com uma restauração, mas com uma lesão cariosa ativa no dente adjacente (Askar et al. ⁹ 2020).

Nas três situações, os fatores de evolução são os mesmos da cárie dental: biofilme cariogênico, carboidratos fermentáveis, desbalanço da perda mineral, e perda de tecidos duros (Ferracane ²⁹ 2017), enquanto acontece a degradação enzimática dos materiais restauradores. Durante o processo de degradação da interface adesivo-dentina, as bactérias começam a ter uma participação prejudicial, devido a atividade enzimática das esterases bacterianas que aceleram o processo de degradação pela atividade enzimática das metaloproteinases da matriz (MMPs) ou pela hidrolises e lixiviação do adesivo (Spencer et al. ³⁴ 2019).

O *S. mutans*, além de ser conhecido como um dos principais microrganismos do biofilme associado às lesões de cárie adjacente à margem das restaurações, ser acidogênico e acidurico (Jokstad ¹⁰ 2016), é considerado também como um microrganismo com alta afinidade pela resina composta, seja devido aos monômeros que não foram polimerizados ou pela rugosidade superficial do material que ajuda na adesão bacteriana (Delaviz et al. ³⁵ 2014). O processo de colonização das bactérias cariogênicas começa com as espécies de bactérias

predominantes parte da microbiota oral, como a *Veillonella*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Neisseria* e outros microrganismo aeróbicos (Mosaddad et al. ³⁶ 2019). Esses microrganismos são importantes porque ajudam a manter a higiene oral evitando que agentes patogênicos se estabeleçam na superfície oral. Entretanto eles devem permanecer em um equilíbrio, que quando é interrompido por mudanças de estilo de vida, ou alterações da biologia da boca; as espécies patogênicas dominam sobre as comensais (Pitts et al. ³ 2017). Entre os principais patógenos associados com a cárie dental está conformado por algumas bactérias gram-positivas como as: *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Streptococcus mutans*, *Scardovia wiggsiae*, *Bifidobacterium longum*, *Selenomonas spp*, *Prevotella spp*, *Lactobacillus spp* (Pitts et al. ³ 2017; Mosaddad et al. ³⁶ 2019).

Além disso, o *S. mutans* pode interagir com outras espécies no biofilme oral podendo ser sinergistas, promovendo o crescimento de microrganismos; ou antagonistas, inibindo o crescimento de outras bactérias (Lemos et al. ¹¹ 2019). Alguns microrganismos que podem ser beneficiados pelo *S. mutans*, são os fungos, como a *Candida albicans*. quem consegue se aderir ao biofilme por uma enzima (GtfB) secretada pôr o *S. mutans*. Ao mesmo tempo pode secretar farnesol que ajuda na produção dos polissacáridos extracelulares do *S. mutans*, *aumentando a patogenicidade dele* (Lemos et al. ¹¹ 2019).

2.2 SISTEMAS ADESIVOS

Historicamente os sistemas adesivos foram evoluindo desde a proposição de Buonocore com a técnica de condicionamento ácido (Buonocore ³⁷ 1955), e a posterior formação da “camada híbrida”, uma estrutura composta pelos monômeros resinosos do adesivo infiltrados na rede de colágeno de dentina e a polimerização deles (Nakabayashi et al. ³⁸ 1982), até o desenvolvimento da oitava geração, a última geração representada pelos adesivos universais. Esses adesivos podem ser aplicados no modo de condicionamento e lavagem, modo autocondicionante, ou no modo de condicionamento seletivo (Van Meerbeek et al. ¹⁷ 2020; Perdigão et al. ³⁹ 2021). O principal monômero funcional utilizado na composição dos adesivos universais é o 10-MDP, o qual condiciona a dentina e promove uma adesão química ao substrato, formando ligações iônicas com a hidroxiapatita (HAp) resultado em nanocamadas de sal de 10-MDP-Ca (Yoshida et al. ⁴⁰ 2004).

Em toda situação clínica, a dentina e o esmalte são os principais substratos para a adesão. O esmalte é um substrato seco sem vitalidade contendo 92% de mineral HAp, sendo ideal para formar uma boa adesão com os materiais resinosos. As retenções micromecânicas dos adesivos com o esmalte resulta na difusão dos monômeros resinosos nas micro porosidades deixado pelo ácido. Enquanto, a dentina é um tecido complexo, composto pela HAp 45% (mineral) e por proteínas 33% e 22% água, sendo inevitavelmente úmida, pelo que a adesão neste substrato resulta mais complexa (Perdigão ⁴¹ 2020).

Indiferentemente da estratégia adesiva empregada, a eficácia do processo adesivo está intrinsecamente ligada à formação da camada híbrida, resultando em uma adesão contínua e estável entre o adesivo e a dentina. Dessa maneira, a camada híbrida desempenha um papel crucial, atuando como a primeira linha de defesa contra substâncias e patógenos que poderiam infiltrar e comprometer a integridade da restauração. Infelizmente, a camada híbrida é instável e susceptível a degradação ao longo do tempo, sendo considerada o ponto mais vulnerável na interface adesivo-dentina (Spencer et al. ³⁴ 2019).

2.3 DEGRADAÇÃO DA CAMADA HÍBRIDA

A degradação da interface adesiva é considerada como a desorganização e solubilização de fibras colágenas com a hidrólises do adesivo resinoso (Mokeem et al. ⁴² 2023). Existem dois mecanismos principais para a degradação adesiva: a degradação hidrolítica e a degradação enzimática.

A degradação hidrolítica acontece porque a dentina é um meio hidrofílico, as moléculas de água do ambiente começam se difundir por meio dos extremos livres hidrolíticos dos monômeros que ficaram dentro da matriz durante a fotopolimerização, resultando na separação de fases hidrolíticas no adesivo (Spencer et al. ⁴³ 2010; Frassetto et al. ⁴⁴ 2016). Além disso, as enzimas chamadas esterases, encontradas principalmente na saliva e produto das bactérias, hidrolisam as ligações éster dos materiais com metacrilato, acelerando a degradação adesiva e reduzindo a resistência de união (Frassetto et al. ⁴⁴ 2016). Por outro lado, a degradação das fibras colágenas na camada híbrida ocorre ao longo do tempo em um meio asséptico causado pelas proteinases da matriz dentinária. O processo começa porque as irregularidades na superfície colágena são difíceis que sejam infiltradas em sua totalidade pelos monômeros (Frassetto et al. ⁴⁴ 2016) As fibras que ficam expostas são mais vulneráveis a atividade das

MMPs, enzimas intrínsecas dependentes de zinco e cálcio que atuam sobre a dentina desmineralizada após o condicionamento ácido sem a presença de bactérias (Pashley et al. ⁴⁵ 2004). Adicionalmente estudos demonstraram que os ácidos bacterianos além de desmineralizar os tecidos dentários podem ativar posteriormente as MMPs. (Mazzoni et al. ² 2015).

2.4 MATERIAIS ADESIVOS PARA PREVENIR A DEGRADAÇÃO DA INTERFACE ADESIVA

Atualmente existem algumas propostas de possíveis materiais adesivos para prevenir a degradação da interface e ter um melhor desempenho clínico. Um deles é a adição de moléculas antibacterianas (Guo et al. ⁴⁶ 2022). As esterases bacterianas na cavidade oral são uma das causas da biodegradação, pelo que moléculas antibacterianas poderiam diminuir a presença de bactérias adjuntas nas restaurações. Uma das possíveis moléculas podem ser medicamentos químicos como a clorexidina, flúor, triclosan, amônio quaternário, biopolímeros de quitosan, e alguns antibióticos como a vancomicina e o metronidazol (Nedeljkovic et al. ⁴⁷ 2015). No entanto, a maioria dos compostos solúveis podem ter um efeito de explosão onde grandes quantidades são liberadas em pouco tempo e depois diminui sua concentração deixando possivelmente a estrutura do material porosa (Nedeljkovic et al. ⁴⁷ 2015).

Nesse sentido, uma proposta viável seria a incorporação de nanopartículas metálicas, tais como a prata, cobre, óxido de titânio, e o óxido de zinco. As nanopartículas (Np) de óxidos metálicos além de ter propriedades antimicrobianas-anticariogênicas diminuem a formação do biofilme e podem melhorar as propriedades mecânicas dos materiais dentais (Balhaddad et al. ⁴⁸ 2021). O processo do efeito antimicrobiano pode acontecer porque pode liberar íons que interacionam com os patógenos orais inibindo o crescimento e liberar íons para diminuir a desmineralização dentária. Uma vantagem dessa alternativa, é que as bactérias tem menor probabilidade de adquirir resistência, em comparação com outros antibióticos específicos (Allaker ⁴⁹ 2010). A forma das Np, também podem ser consideradas como uma vantagem, elas podem ser capazes de superar a diversidade do ambiente oral por seu balanço iônico no fluido bucal (Nizami et al. ⁵⁰ 2021).

2.5 NANOPARTÍCULAS DE COBRE E ÓXIDO DE ZINCO

Recentemente as Np de óxido de zinco, um composto inorgânico insolúvel, o foram estudadas. Na odontologia essas Np tanto do tamanho micro como do tamanho nano podem ser utilizadas como recheio inorgânico nos materiais dentários, como resinas compostas, adesivos, selantes e cimentos. Em específico as nanopartículas têm demonstrado atividade antimicrobiana superior que as partículas maiores contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Balhaddad et al. ⁴⁸ 2021). Pode ser por sua alta proporção da área de superfície ao volume, tendo uma alta percentagem de átomos na superfície do material aumentando a reatividade superficial (Balhaddad et al. ⁴⁸ 2021). Alguns estudos da incorporação de ZnO nos adesivos mostraram uma significativa redução bacteriana contra um biofilme oral, quando é incorporado 7,5% (Garcia et al. ⁵¹ 2021). Em especial podem inibir o crescimento do *S. mutans*, e podem ajudar na prevenção de cáries (Nizami et al. ⁵⁰ 2021). Além disso, uma análise zimográfico determinou que podem reduzir a expressão de algumas MMPs, reduzindo a degradação de colágeno da dentina. Uma razão pode ser porque o zinco tem um rol estrutural nas proteínas, fazendo uma mudança sutil na conformação do colágeno protegendo as zonas sensíveis e expostas para as MMPs (Elkassas e Arafa ⁵² 2017). Também pode ter uma influência nas vias de sinalização estimulando um efeito metabólico na mineralização dos tecidos duros. Pelo que a inibição da MMPs na interface adesivo-dentina poderia proteger a parte cristalina das fibras colágenas da degradação sendo mais propensas na remineralização (Elkassas e Arafa ⁵² 2017). A adição de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) nos sistemas adesivos também tem sido estudada, principalmente por favorecer a remineralização da dentina e reduzir a degradação da interface mediada pelas MMPs sem alterar as propriedades adesivas (Toledano et al. ²⁶ 2022).

Por outro lado, o cobre apresenta um amplo potencial antimicrobiano, contra bactérias Gram negativas e Gram positivas. Existem três possíveis mecanismos de ação antibacteriana: primeiro a acumulação de Np na membrana da bactéria alterando sua permeabilidade e removendo as proteínas da membrana, lipopolisacáridos e biomoléculas intracelulares dissipando a energia dos prótons no plasma da membrana. Segundo espécies que reagem ao oxigênio processam uma reação pós-oxidativa utilizando os ions e prejudicando as estruturas celulares. Terceiro, como as partículas de prata que são incorporadas nos polímeros, podem

liberar ions diminuindo a produção da adenosina trifosfato e a replicação do DNA para seu efeito bactericida (Xu et al. ²¹ 2022; Allaker ⁴⁹ 2010).

De acordo com estudos *in vitro*, a incorporação de CuNp pode fornecer propriedades antimicrobianas ao sistema adesivo e reduzir a degradação da interface, sem afetar as propriedades mecânicas do adesivo (Gutiérrez et al. ²² 2017; Gutiérrez et al. ²³ 2017). Além disso, a adição de CuNp pode melhorar as propriedades adesivas e mecânicas da interface, mesmo sob desafio cariogênico *in situ* (Vidal et al. ²⁴ 2022). Recentemente, um estudo clínico demonstrou que as CuNp não afetam o desempenho clínico de restaurações em lesões cervicais não cariosas após 48 meses (Matos et al. ²⁵ 2023).

Com o objetivo de combinar as vantagens das duas nanopartículas, recentes estudos mostraram que as CuZnONp em concentrações de 0,2/5% adicionadas num sistema adesivo fornecem propriedades antibacterianas significativas contra o *S. mutans*, sem gerar algum risco de citotoxicidade nem alterar as propriedades adesivas. Também se observou que as CuZnONp podem inibir os tipos de MMP-2, MMP-8, e MMP-9, mantendo a estabilidade da interface adesiva numa dentina hígida e afetada por cáries. (Gutierrez et al. ²⁷ 2019; Gutiérrez et al. ²⁸ 2019)

Não obstante a literatura mostra resultados promissores da atividade antimicrobiana e os efeitos positivos das CuNp e ZnONp na interface adesivo-dentina, esses baseados em estudos *in vitro*, os quais tem a desvantagem de gerar um ambiente cariogênico mais agressivo, quando comparado a um estudo *in situ* (Ferracane ²⁹ 2017). Assim, o objetivo do estudo é determinar se a incorporação de CuZnONps em concentrações de 0,2/5% em um sistema adesivo universal melhora as propriedades antimicrobianas e adesivas à dentina quando sometido ao desafio cariogênico *in situ*.

3 OBJETIVOS E HIPÓTESES

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito da incorporação de nanopartículas de óxido de zinco e cobre (CuZnONp) em um sistema adesivo universal na atividade antimicrobiana e na preservação das propriedades adesivas à dentina quando submetido ao desafio oral cariogênico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Examinar a eficácia da adição de CuZnONp em um sistema adesivo universal na atividade antimicrobiana quando submetido ao desafio oral cariogênico.
- Avaliar a eficácia da adição de CuZnONp em um sistema adesivo universal na diminuição da perda mineral em dentina quando submetido ao desafio oral cariogênico.
- Determinar a eficácia da adição de CuZnONp em um sistema adesivo universal na melhora da resistência de união quando submetido ao desafio oral cariogênico.
- Avaliar a eficácia da adição de CuZnONp em um sistema adesivo universal na diminuição da nanoinfiltração da interface adesivo-dentina num ambiente oral cariogênico.
- Avaliar a eficácia da adição CuZnONp em um sistema adesivo universal na melhora do grau de conversão do adesivo na interface adesivo-dentina.

3.3 HIPÓTESES NULAS

1. A incorporação de nanopartículas de óxido de zinco e cobre em um sistema adesivo universal não fornecerá atividade antimicrobiana em um ambiente oral cariogênico, quando comparado a um adesivo sem nanopartículas.
2. A incorporação de nanopartículas de óxido de zinco e cobre em um sistema adesivo universal não influenciará nas propriedades adesivas à dentina em um ambiente oral cariogênico, quando comparado a um adesivo sem nanopartículas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O respectivo estudo foi desenhado como *in situ*, crossover e duplo cego (voluntários e avaliador), aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, número de parecer 4.383.692 (Anexo A). Este estudo foi desenhado para facilitar a acumulação de biofilme de 14 voluntários, em duas fases de 21 dias, sob condições de um desafio cariogênico induzido pela exposição à sacarose.

4.1.1 Formulação do sistema adesivo

O sistema adesivo Ambar Universal APS, em base ao solvente de etanol, (FGM Prod. Odont. Ltda, Joinville, SC, Brasil) foi utilizado no presente estudo com o modo de condicionamento e lavagem e autocondicionante. O grupo controle foi o material comercial disponível sem nenhuma modificação. Para o grupo experimental foram pesadas 0,2/5% de CuZnONp (SkySpring Nanomaterials, Inc., Houston, TX, EUA). Depois a incorporação das nanopartículas à solução do adesivo foi feita por agitação em um misturador Speedmix (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) em um quarto escuro por 60s. A tabela 1 e a figura 1 mostra a composição e modo de aplicação dos materiais utilizados.

Figura 1. Adesivo Universal APS utilizado



Fonte: FGM Prod. Odont. Ltda, Joinville, SC, Brasil

Tabela 1. Materiais utilizados, número de lote, composição, e modo de aplicação.

Material [Número de lote]	Composição	Modo de aplicação	
Condac 37% (FGM Prod. Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) [260122]	Acido fosfórico a 37%,	Condicionamento e lavagem 1. Aplicar ácido fosfórico por 15 s na superfície da dentina. 2. Lavar por 15 s. 3. Secar com um jato de ar. 4. Aplicar vigorosamente duas camadas de adesivo por 20 s (10 s por cada camada). 5. Aplicar um suave jato de ar por 10 s para evaporar o solvente. 6. Fotopolimerizar por 10 s a 1200 mW/cm ² .	Autocondicionante 1. Aplicar vigorosamente duas camadas de adesivo por 20 s (10 s por cada camada). 2. Aplicar um suave jato de ar por 10 s para evaporar o solvente. 3. Fotopolimerizar por 10 s a 1200 mW/cm ² .
Ambar Universal APS (FGM Prod. Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) [080622]	10-MDP, monômeros metacrílicos, fotoiniciador (APS), nanopartículas de sílica, etanol, co-iniciadores e estabilizantes		

10-MDP = 10- metacriloiloxidecil dihidrogenofosfato. **Fonte:** O autor

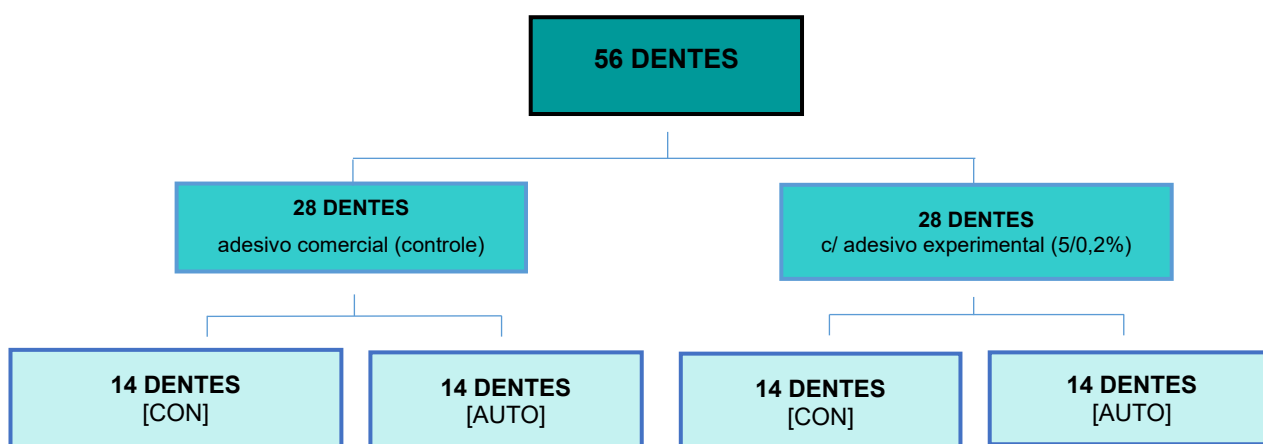
4.1.2 Cálculo amostral

O cálculo amostral geral para o estudo *in situ*, precisou de dois cálculos amostrais independentes. O primer cálculo amostral foi para o número de voluntários, baseado no teste de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Foi utilizado como referência um artigo *in situ* (Melo et al. ⁵³ 2013) que avaliou uma resina com propriedades antimicrobianas. Os dados do grupo controle e do grupo experimental foram colocados no website <https://www.sealedenvelope.com/>. Onde foi 9 para o grupo controle e 5 para o grupo experimental com um α de 5%, e um poder de 90%. O resultado foi de 12 voluntários, mas por uma de 20%, esse número subiu para 14 voluntários (n=14). O segundo cálculo amostral foi para o número de dentes, baseado no teste de Resistência de União (RU). Se utilizou outro artigo de um estudo *in situ* (Vidal et al. ²⁴ 2022), que utilizou um adesivo universal. Os dados do grupo controle 22,8 Mpa e do grupo experimental 28,7 Mpa, com um α de 5%, e poder de 80% foram colocados no mesmo website. O resultado foi de mínimo 6 dentes por grupo, mas foram aumentados para concordar com o número de

voluntários (n=14). Os números de espécimes estão de acordo com os delineamentos da *Academy of Dental Materials* (Armstrong et al.⁵⁴ 2017).

O estudo finalmente foi desenhado utilizando cinquenta e seis terceiros molares humanos hígidos, obtidos através do Banco de Dentes Humanos da Universidade Estadual e Ponta Grossa através de documentação específica para este fim. Em que tiveram as raízes foram seccionadas e desprezadas. Cada um deles foram alocados aleatoriamente nos quatro grupos experimentais: adesivo comercial e adesivo experimental CuZnO(0,2/5%); e estratégias adesivas (condicionamento e lavagem [CON] e autocondicionante [AUTO]). Figura 2.

Figura 2. Desenho experimental da análise das propriedades adesivas



CON= Condicionamento e lavagem; **AUTO=** Autocondicionante

Fonte: O autor

4.1.3 Recrutamento de participantes

Foram recrutados quatorze voluntários adultos (n=14), que vieram na Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os voluntários eram saudáveis com idade entre 18 e 30 anos, homens e mulheres, de acordo com os seguintes critérios de inclusão: boa saúde geral, fluxo salivar normal, sem a presença de lesões ativas de cárie dentária, não usar ou ter usado antibióticos nos últimos 2 meses antes do experimento, não ser usuário de prótese ou aparelho ortodôntico e disponibilidade de colaborar com o estudo. Todos os voluntários aceitaram participar do estudo assinando um termo de consentimento por escrito.

4.1.4 Preparação dos espécimes

Todos os dentes (n=56) tiveram o esmalte oclusal removido com uma politriz e usando lixa de carbeto de silício de granulação #180, sob irrigação constante, até exposição da dentina. As bordas periféricas de esmalte foram totalmente desgastadas com pontas diamantadas nº4137 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil) em alta rotação e irrigação constante deixando unicamente tecido dentinário exposto. Após disso, foi utilizado o lixamento com carbeto de silício de granulação #600 por 60s para a padronização da lama dentinaria (*smear layer*). Figura 3.

Figura 3. Preparo dos espécimes



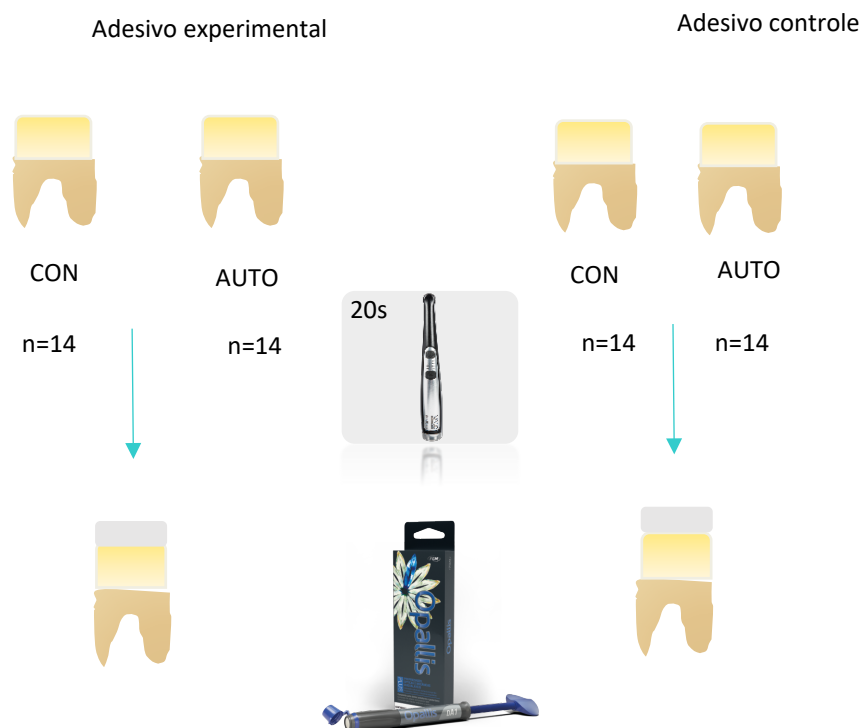
Fonte: O autor.

4.1.5 Procedimento adesivo

Após esse preparo, os adesivos com e sem adição de ZnO/CuNp numa concentração de 5/0,2% foram aplicados seguindo as indicações do fabricante nas seguintes estratégias adesivas: condicionamento e lavagem [CON] e autocondicionante [AUTO]. A fotoativação dos sistemas adesivos foi por 10 s usando um aparelho fotopolimerizador a base de LED com uma intensidade de 1000 mW/cm² (VALO, Ultradent Products, South Jordan, UT, EUA). Os dentes foram restaurados com 2 incrementos de aproximadamente 1,5 mm de espessura de resina composta (Opalis, FGM Dent. Prod., Joinville, SC, Brasil) e fotoativadas

por 20 s cada camada com o mesmo aparelho fotoativador. Um único operador realizou todos os procedimentos adesivos. Figura 4.

Figura 4. Restaurações dos espécimes

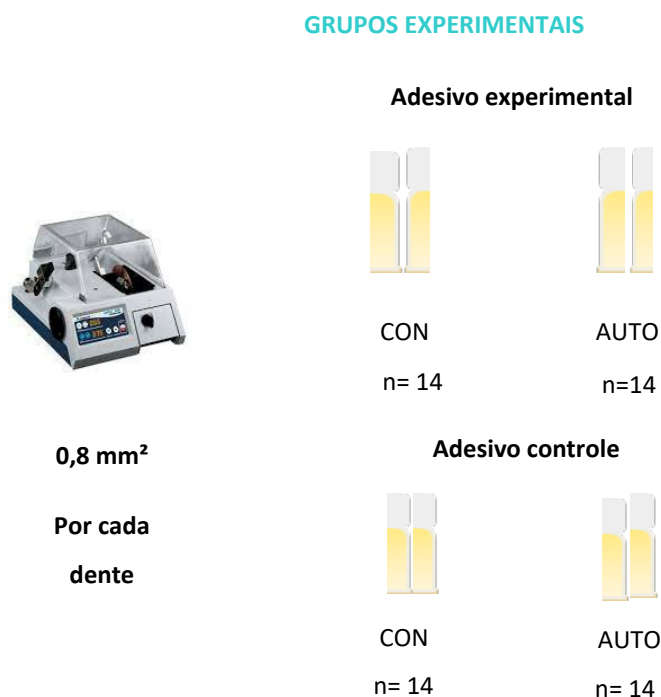


Fonte: O autor.

4.1.6 Preparação dos espécimes

Com as restaurações realizadas, todos os dentes foram armazenados em água destilada a 37°C por 24 horas, e levados a uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff Illinois, EUA) e seccionados com o disco diamantado (15HC-4in, Buehler Ltd., Lake Bluff, Illinois, EUA) sob irrigação a 300 rpm, nos eixos “x” “y” e “z”, para obter espécimes no formato de “palitos” de 0,80 mm² medidos com o paquímetro digital (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Kanagawa, Toquio, Japão). Cada palito (n=14) foi distribuído de acordo com os grupos experimentais, metade dos palitos (n=7) para teste imediato (após 24 h de armazenamento em água) e a outra (n=7) para ser fixada nos dispositivos palatais e fazer o teste após 21 dias de desafio cariogênico (*in situ*). Figura 5.

Figura 5. Espécimes em formato de palitos por cada grupo experimental.

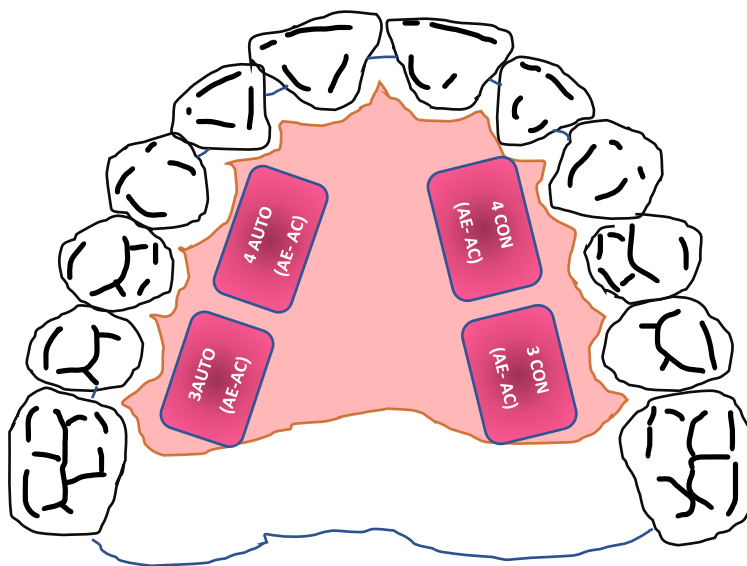


Fonte: O autor.

4.1.7 Preparação do dispositivo palatal

As moldagens foram feitas usando alginato (Hydrogum 5, Zhermack, Badia Polesine (RO), Italia) para obter modelos de gesso. Foram feitos quatorze dispositivos palatais de acrílico (desenho de Hawley) com quatro nichos laterais de 10 x 4 x 3 mm, onde os palitos restaurados de dentina foram posicionados aleatoriamente e fixados com cera. Pevia a colocação dos palitos, as amostras passaram por esterilização utilizando a autoclave a 121 °C. Sete palitos de um mesmo dente por grupo experimental foram divididos: nos dois primeiros nichos 4 e 3 palitos com adesivo experimental [CON] por cada um, e nos dois últimos nichos 4 e 3 palitos com adesivo experimental [AUTO] por cada um. Depois, uma malha de plástico foi fixada com resina acrílica, deixando espaço de 1,9 mm da superfície dos palitos, e assim permitir acumulação de biofilme dental e, ao mesmo tempo, mantendo retidos dentro da cavidade. Na primeira parte da avaliação, os nichos foram utilizados para o grupo experimental. Após o período *washout* de 7 dias, os palitos foram trocados pelos palitos do grupo controle. Onde os palitos foram fixados da mesma forma que os grupos experimentais. Figura 6.

Figura 6. Dispositivo palatal com a distribuição dos espécimes, para os grupos experimentais antes e após o *washout* de 7 dias.



Fonte: O Autor. (*) 4 e 3 palitos; AE Adesivo experimental com Np; AC Adesivo controle. O uso dos grupos foi randomizado, alguns voluntários utilizaram primeiro o controle e outros o experimental. Após os 21 dias eles mudaram para o seguinte grupo.

4.1.8 Fase intraoral

Antes de iniciar o uso dos dispositivos palatais, todos os voluntários receberam profilaxia, como deplacagem utilizando pasta profiláctica e escova de motor de baixa. Eles também foram indicados de utilizar pasta de dentes com flúor de 1000ppm antes, durante e depois dos desafios cariogênicos. Eles foram instruídos a remover o dispositivo e gotejar solução sacarose 20% sobre todos os blocos 4 vezes por dia (8:00, 11:00, 15:30 e 19:00 h), cinco minutos depois, o dispositivo foi novamente inserido na boca. Este tempo de espera é necessário para que a sacarose seja absorvida pelo biofilme dental e, assim, seja realizado um desafio cariogênico na interface adesiva. O dispositivo só poderia ser removido para refeições curtas e momentos de higiene bucal, sendo colocado imediatamente na caixa para aparelhos ortodônticos, sem colocar nada em cima dos nichos.

Os voluntários foram cegos e randomizados (<http://www.sealedenvelope.com>) previamente para utilizar os dispositivos palatais com os diferentes grupos experimentais. A metade deles utilizaram o dispositivo intra-oral o tempo todo por 21 dias consecutivos com os palitos do grupo experimental. Ao mesmo tempo a outra metade dos voluntários utilizaram os palitos

com os grupos controle. Depois, todos os voluntários tiveram um período *washout* por 7 dias, para evitar o efeito *carry-over* (Sung et al. ⁵⁵ 2014). Posteriormente, os espécimes nos mesmos dispositivos foram trocados com os grupos controle ou experimentais de acordo com a randomização, e os voluntários foram instruídos em utilizar por mais 21 dias consecutivos, seguindo as mesmas indicações; retirando o dispositivo apenas para realizar os procedimentos descritos acima. O total de tempo de uso dos dispositivos foi de 42 dias.

4.2 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

4.2.1 Coleta do biofilme

Após o término do desafio cariogênico (do grupo experimental e do grupo controle), o biofilme acumulado no dispositivo palatal dos 14 voluntários de cada grupo foi analisado. Todo procedimento foi feito na capela de fluxo laminar.

Utilizando um microbrush estéril 1-2 mg de biofilme (n= 28) da superfície das amostras (CON e AUTO por cada voluntário) foi coletado e armazenado em um tubo Eppendorf (2ml) (OA12, Odeme Biotechnology, Joaçaba, SC, Brasil) previamente esterilizado. Cada Eppendorf foi pesado em uma balança de precisão digital [peso inicial (gi)] e armazenado em gelo antes de ser utilizado. Após a coleta do biofilme o tubo Eppendorf foi seco com papel absorvente e pesado novamente [peso final (gf)]. Após a pesagem com o biofilme foi colocado em gelo, até adicionar 1 ml de solução estéril de *Reproduced Transport Fluid* (RTF) utilizando uma ponteira estéril com uma pipeta de 1000 µl e misturado no vortex. Todos os tubos Eppendorfs foram rotulados e estourados no freezer -4°C. As análises das propriedades antimicrobianas foram feitas em até 96hrs da colocação do RTF.

Posteriormente cada palito foi tirado dos nichos onde foram colocados em uma placa de 96 poços com solução salina. A placa com os palitos foi levada a uma cuba ultrassônica (Dabi Atlante -3L, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) durante 1 minuto, para a completa remoção das bactérias restantes aderidas aos palitos.

4.2.2 Cultivo do biofilme e análise antimicrobiana

Após a coleta do biofilme dos quatorze voluntários por cada estratégia adesiva (n=28), o biofilme foi colocado três vezes no sonificador por 10s (Vibra Cell, Sonic & Materials, Newtown, CT, EUA). Depois foi realizada uma diluição seriada, onde 20 µl de cada diluição do biofilme foi inoculado em duplicata em diferentes

médios de cultivo em placas Peri (Ágares) e incubados na estufa por 96hrs a 37° C. Cada um deles teve o alimento e as condições necessárias para o crescimento das bactérias mais frequentes das lesões de cárie dental. Os ágares utilizados foram:

- O ágar *mitis salivarios-bacitracin* (MSB ágar) com 20% de sacarose para a identificação dos estreptococos, principalmente dos estreptococos *do grupo mutans*.
- O *Rogosa Agar SL*, um meio seletivo para a contagem de bactérias da espécie *Lactobacillus*, o pH de 5.5 ácido favorece o cultivo das cepas ditas e inibe o crescimento de outros organismos.
- O ágar *Cerebro Coração* (BHI Ágar) com uma pH de 7,4 foi utilizado para a cultura de grandes variedades de microrganismos totais aeróbios assim como de leveduras e fungos (Ramalho ⁵⁶ 2010).
- O ágar *Cerebro Coração* (BHI Ágar ácido) com uma pH de pH4.8 (ácido), foi utilizado para microrganismos totais aeróbios acidúricos e acidogénicos assim como de leveduras e fungos.
- O ágar Sabouraud é um agar para o cultivo e crescimento qualitativo de fungos, tais como filamentosos, leveduras e espécies de *cândida*, onde dificulta o crescimento das bactérias.

Para o período de incubação todos os ágares foram colocados em uma jarra de anaerobiose, junto com o pó Anaerobac (Probac, São Paulo, Brasil), um gerador de atmosfera específica para microrganismos anaeróbios. Para os médios Sabouraud, foram incubados por 48h em aerobiose, enquanto os outros médios foram por 96hrs. Transcorrido o período de incubação, as placas Petri com ágar foram analisadas e contadas as unidades formadoras de colônia por miligrama UFC/mg de acordo com a morfologia para a identificação dos diferentes tipos de bactérias e fungos. A contagem das colônias foi realizada por um operador cego.

4.2.3 Análise da morfología bacteriana (MEV)

Para a análise da morfologia bacteriana, o biofilme de 4 voluntários aleatórios (n=4) foi selecionado, dois para cada adesivo. Dois palitos de cada voluntário dos grupos de [CON] e [AUTO] passaram por um processo de fixação, lavagem e dessecação para fixação em stubs metálicos que foram metalizados com ouro por meio de bombardeio iônico (SPI-Module, USA) e avaliados com microscópio eletrônico de varredura JSM 6380 LV (MEV) (JEOL, Japão).

4.2.4 Análise da perda mineral (PM) com microdureza superficial de knoop (KHN)

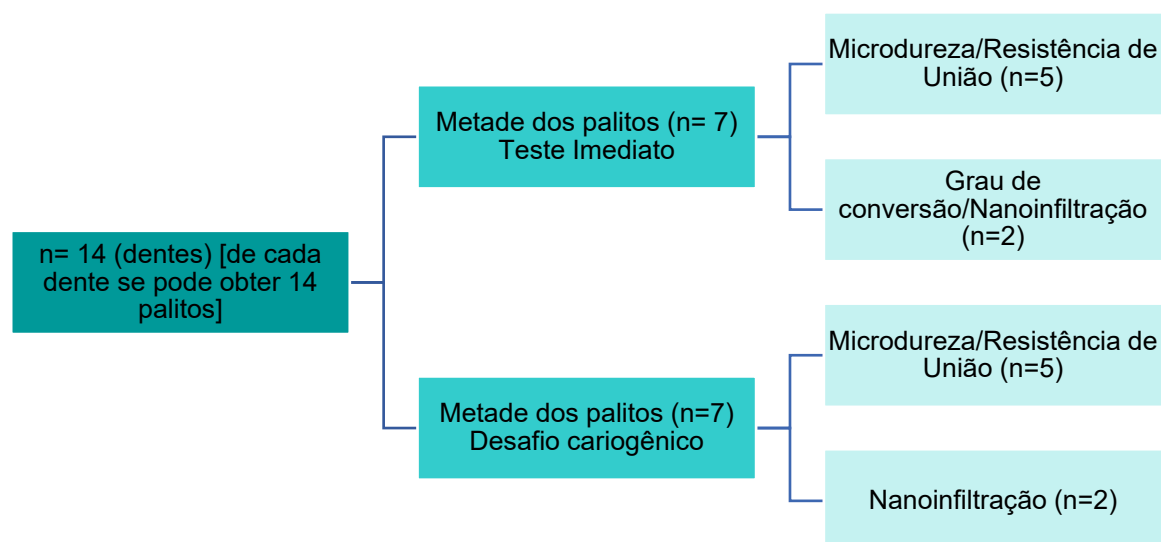
Os palitos selecionados para o teste de resistência de união de cada grupo (n=5) foram também utilizados para a microdureza, portanto foram analisados no tempo imediato e após o desafio cariogênico. Cada palito foi lixado com lixas de SiC de granulações (1000, 1200, 1500, 2000, 2500 e 4000) e lavados por 10min na cuba ultrassônica (Dabi Atlante -3L, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), para remover os dentritos. Em seguida cada um recebeu uma camada de verniz de unhas ácido resistente e de rápida secagem (Colorama Maybelline, São Paulo, Brasil), em três superfícies do palito que não foram ser avaliados, sem incluir a interface adesiva.

Os cinco palitos (n=5) de cada dente foram embutidos em cera base 7 sobre uma lâmina de microscópio e levados ao Microdurometro (HNV-2; Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) com o indentador Knoop Diamod (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). A KHN foi feita com 3 indentações, a primeira a 20 μm desde a camada híbrida, a seguinte a 50 μm de distância, e a última a 100 μm de distância em direção à dentina (kgf/mm^2). Todas as indentações foram feitos com uma carga de 10g por 10s. A KHN foi feita para obter os valores *IM* e após o desafio cariogênico utilizando os mesmos palitos (Moron et al. ⁵⁷ 2013). A análise foi realizada por um operador cego.

4.3 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ADESIVAS

4.3.1 Distribuição dos palitos por cada teste

Figura 7. Distribuição dos palitos por teste das propriedades adesivas



Fonte: O autor

4.3.2 Análise da resistência de união à microtração (RU)

Os cinco palitos (n=5) da análise da KHN de cada dente de cada grupo do teste imediato (após 24hrs) e *após o desafio cariogênico* foram colocados individualmente em garras de Geraldeli (Odeme Biotechnology, Lucerna, Santa Catarina, Brasil), aplicando em cada um dos extremos do palito cola de cianocrilato gel (Loctite Superbond Power Easy Gel, Henckel, São Paulo, São Paulo, Brasil). As garras com os palitos foram acopladas na máquina de ensaios universal de testes de microtração (Kratos Dinamometros, Cotia, São Paulo, Brasil) e tracionados com uma velocidade de 0,5 mm/min e 100 N de carga até ruptura. Os valores de força de tração foram medidos em MPa e os tipos de falhas foram classificadas em: adesiva (A), coesiva de resina (CR), coesiva de dentina (CD), mista (M) e falha prematura (FP). A análise foi realizada por um operador cego.

4.3.3 Análise do grau de conversão da camada híbrida por espectroscopia de micro-raman (GC após 24hrs)

Para o teste de grau de conversão, só dois palitos antes do teste da NI (n=2) de cada grupo experimental do tempo imediato foram selecionadas aleatoriamente e polidas com lixas de SiC de granulações #(1000, 1200, 1500 e 2000) (Buehler Ltd., Lake Bluff, Illinois, EUA) no sentido contrário a interface de união por 30 segundos. Seguido da lavagem dos palitos em cuba ultrassônica (Dabi Atlante -3L, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) por 10 minutos em água destilada.

Um espectrofotômetro de micro-Raman (Senterra equipment, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Wurttemberg, Alemanha) foi utilizado para a análise do GC na camada híbrida, sob os seguintes parâmetros: laser de Neônio de 20 mW com comprimento de onda de 532 nm; resolução espacial de $\approx 1 \text{ cm}^{-1}$; com 30 s de tempo de acumulação e 6 co-adições, em magnificação de 100X (Olympus UK, Londres, Reino Unido) para um laser de $\approx 1 \mu\text{m}$ de diâmetro. Os espectros foram obtidos de 3 locais aleatórios no meio da camada híbrida dentro da dentina Intertubular, e os valores foram calculados para fins estadísticos.

Cada adesivo foi dispensado e misturado em uma placa de vidro, a qual foi levada ao espectrofotômetro para a leitura. Os espectros dos adesivos não polimerizados (np) foram usados como referência. Para os adesivos polimerizados (p) a leitura foi realizada diretamente na camada híbrida. A proporção do conteúdo de ligações duplas, do monômero para polímero no adesivo foi calculada de acordo com a fórmula: $\text{GC (\%)} = (1 - R_{\text{polimerizado}} / R_{\text{nãopolimerizado}}) \times 100$, onde R é a proporção das áreas de pico alifático e aromático em 1639 cm^{-1} e em 1609 cm^{-1} em adesivos não curados. O pós-processamento dos espectros foi realizado usando o Spectragryph Software para espectroscopia óptica 1.2.16.1 (Dr. Friedrich Menges, Oberstdorf, Alemanha). A análise foi realizada por um operador cego.

4.3.4 Análise da nanoinfiltração (NI) por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Dois palitos (n=2) provenientes de cada grupo e tempo (imediato e após desafio cariogênico), foram reservados para análise de NI. Os palitos foram imersos em Eppendorfs [1,5 ml] com uma solução aquosa (pH = 7,0) de nitrato de prata amoniacal 50% em peso e armazenados por 24 h em ausência de luz. Após, os palitos foram lavados com água destilada e imersos em solução reveladora

(Rochester, Nova Iorque, EUA) por 8h sob luz fluorescente, para a redução dos íons de prata ao longo das nanoporosidades da interface de união.

Os palitos foram novamente lavados em água e fixados com cianocrilato em *stubs* de alumínio para facilitar o polimento das amostras, que foi com uma politriz de bancada (ALM 4, Arotec, Cotia, São Paulo, Brasil) sob escoamento contínuo da água com lixas de granulações 1000, 1200, 1500, 2000, 2500 e 4000, e pastas diamantadas com granulações decrescentes de 6, 3, 1 e 0,25 μm (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA). As amostras foram lavadas em cuba ultrassônica (Dabi Atlante -3L, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) por 8 minutos seguidos de escoamento de água sobre a superfície por 2 minutos, entre cada lixa e as pastas de polimento. As amostras foram deixadas então por 30 minutos em cuba ultrassônica. Para o processo de desidratação, as amostras foram deixadas em um dessecador contendo sílica coloidal por 24 h, e depois ser metalizadas em carbono/ouro (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein).

Em um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (VEJA SB; Tescan, Warrendale, PA, EUA), as amostras de interfaces resina-dentina foram analisadas por um técnico cego às condições experimentais. Foram realizadas três fotomicrografias com aumento 1000X da interface de cada palito. A porcentagem relativa de nitrato de prata nas áreas ocupadas pela camada híbrida e camada de adesivo foram consideradas na mensuração automatizada da NI por meio do Image J software para Mac OS (National Institutes of Health, EUA) operado por um avaliador que desconheceu o grupo experimental das imagens. Obtendo assim as médias dos valores percentuais de NI. A análise foi realizada por um operador cego.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar se os dados desses testes seguiam uma distribuição normal. O teste de Barlett foi realizado para determinar a validade da suposição de variâncias iguais. Após a confirmação da distribuição normal dos dados e a igualdade de variâncias, as médias de PM ($\Delta\%$) e GC foram submetidas a uma ANOVA de dois fatores (adesivo [presença de CuZnONp] vs. estratégia adesiva). Os dados de RU (MPa) e NI (%) foram submetidos a uma ANOVA de três fatores (adesivo vs. estratégia adesiva vs. tempo de avaliação). O teste post hoc de Tukey foi utilizado para comparações pareadas ($\alpha = 0.05$). Os modos de falha foram analisados pelo teste χ^2 ($\alpha = 0,05$). Os dados de atividade antimicrobiana também foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para analisar a normalidade dos dados e ao teste de Levene para homogeneidade. Apenas os dados de *Lactobacilos* foram transformados em rank e, em seguida, todos os dados foram submetidos a uma ANOVA de dois fatores (adesivo [presença de CuZnONp] vs. estratégia adesiva). Para todos os testes, foi aplicado um teste post hoc de Tukey com significância ($\alpha = 0.05$) (Jamovi, software estatístico, versão 2.3).

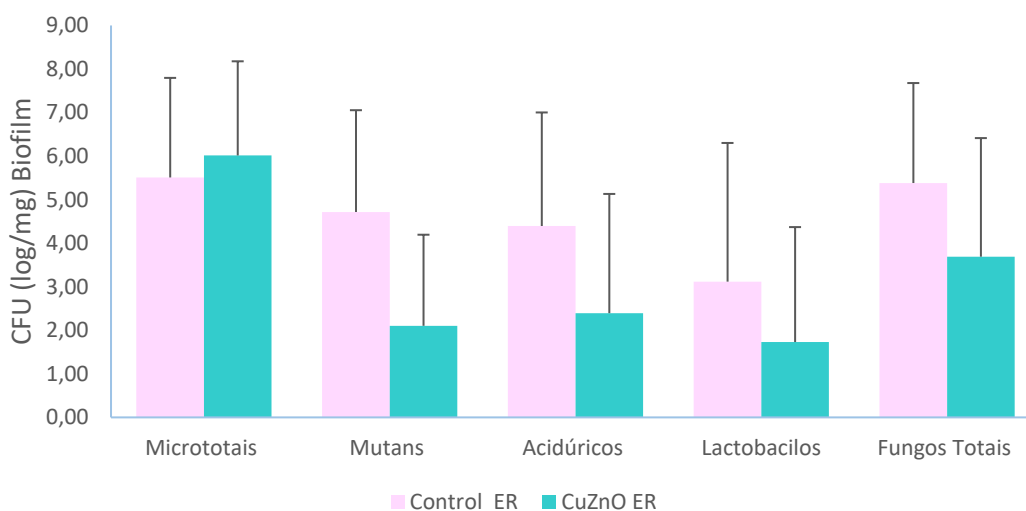
6 RESULTADOS

6.1 CULTIVO DO BIOFILME E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados para as unidades formadoras de colônias por miligrama (UFC log/mg) estão mostrados nos Gráficos 1 e 2 por cada estratégia adesiva, demonstrando uma tendência de redução das UFC quando o adesivo com CuZnONps foi utilizado. A adição de CuZnONps no adesivo resultou em uma redução significativa na contagem de UFC tanto para *estreptococos do grupo mutans* e fungos totais ($p < 0,053$), quando comparado ao controle. Não foram observadas diferenças significativas ao considerar o fator de estratégia adesiva de CON ou AUTO, preservando o crescimento dos microrganismos testados. Além disso, não houve interação significativa entre os fatores de estratégia e partículas.

Gráfico 1. Contagem microbiológica, com as medias e o desvio padrão para estratégia de condicionamento e lavagem

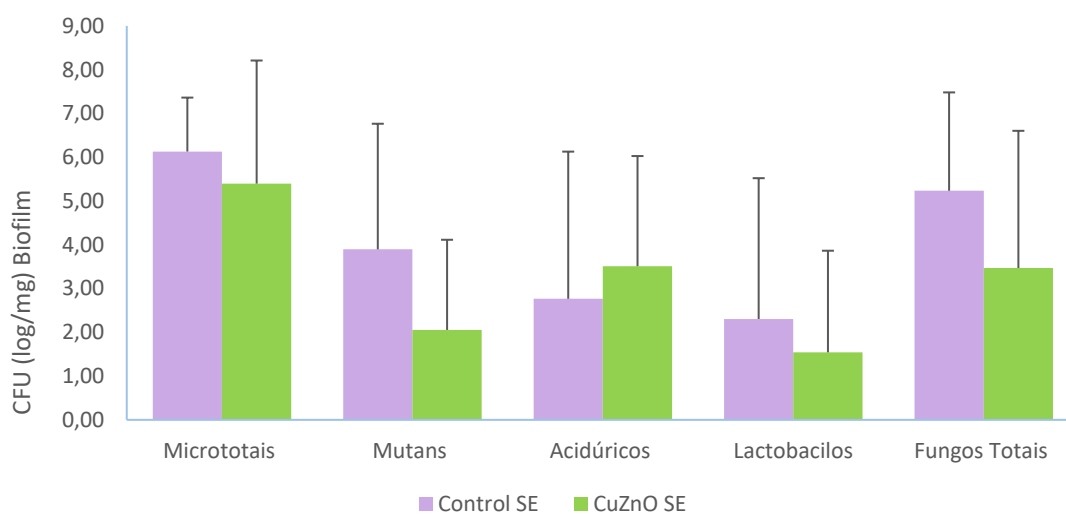
a)



(*) log= escala logarítmica de todos os valores. **Fonte:** O autor.

Gráfico 2. Contagem microbiológica, com as medias e o desvio padrão para estratégia autocondicionante

b)

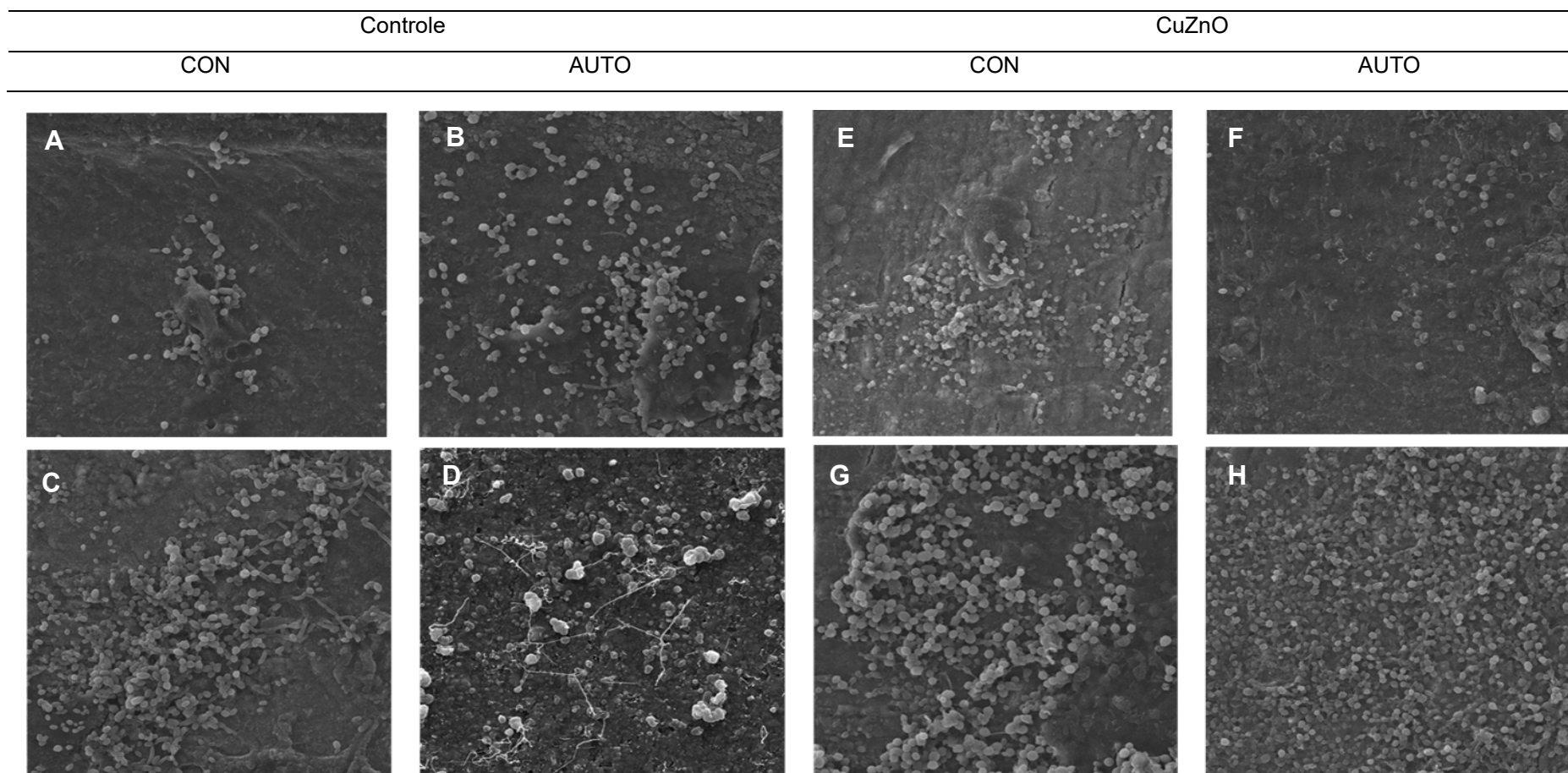


(*) log= escala logarítmica de todos os valores. **Fonte:** O autor.

Gráficos a) e b) A adição de CuZnONps no adesivo resultou em uma redução significativa na contagem de UFC tanto para *estreptococos do grupo mutans* e fungos totais ($p < 0,053$), quando comparado ao controle

6.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA BACTERIANA (MEV)

Figura 8. Imagens do MEV da morfologia bacteriana do desafio cariogênico, por cada estratégia adesiva.



(*) **CON**: Condicionamento e lavagem **AUTO**: Autocondicionante; **(A-B)** Biofilme com cocos, diplococos, bacilos e bactérias em forma de fusiforme; **(C-D)** Biofilme com cocos, bacilos, bactérias em forma de fusiforme e matriz extracelular; **(E-F)** Biofilme com cocos e bactérias em forma de diplococos; **(G-H)** Biofilme complexo com estreptococos e bactérias em forma de fusiforme.

As imagens selecionadas do microscópio eletrônico de varredura (MEV), apresentam o biofilme dental na figura 8. Essas imagens foram escolhidas de quatro voluntários aleatórios, para as duas estratégias adesivas dos dois adesivos. Assim como os resultados da contagem microbiológica, com as imagens se consegue corroborar que independente da estratégia adesiva os mesmos microrganismos formaram o biofilme com uma morfologia tridimensional complexa. Podemos observar uma alta densidade de microrganismos, principalmente de microrganismos com aspecto esférico e ovalado. Pelo que se pode dizer que representam os cocos e os estreptococos. Também se pode observar que em alguns biofilmes tem bacilos, bactérias fusiformes e matriz extracelular seja de fungos ou bactérias. Isso representa que existe co-agregação entre a variedade da morfologia bacteriana, em outras palavras a dependência mútua de crescimento e nutrição. A variabilidade também pode depender de cada indivíduo, e sua própria microbiota. Enquanto aos adesivos, a amostra com o adesivo com cobre de um voluntário apresentou uma menor quantidade de biofilme na superfície quando comparado com o controle, mas independente do adesivo o biofilme continua com as mesmas características.

6.3 MICRODUREZA SUPERFICIAL DE KNOOP E PERDA MINERAL

Os valores de microdureza e perda mineral após desafio cariogênico estão apresentados na Tabela 2. Ambos adesivos, controle e CuZnO, mostraram perda mineral na dentina em diferentes distâncias da camada híbrida, independentemente da estratégia adesiva. A adição de CuZnO reduziu significativamente a perda mineral em 20 μm ($p=0,0002$), 50 μm ($0,0000002$) e 100 μm ($p= 0,000001$) em comparação com o grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2. Médias e desvios padrão da microdureza Knoop no tempo (IM), após o desafio cariogênico (DC), e perda mineral (ML, %) após o DC em cada distância desde a camada híbrida por cada condição experimental (*).

Adesivo		Microdureza de Knoop						PM %		
		IM			DC					
		20 μ m	50 μ m	100 μ m	20 μ m	50 μ m	100 μ m	20 μ m	50 μ m	100 μ m
Controle	CON	49,37 $\pm$ 5,3	53,88 $\pm$ 7,1	53,39 $\pm$ 6,6	24,50 $\pm$ 7,0	23,31 $\pm$ 6,9	23,31 $\pm$ 7,2	-56,56 $\pm$ 7,3 B	-57,92 $\pm$ 9,4 b	-59,08 $\pm$ 8,7 ^B
	AUTO	48,47 $\pm$ 7,3	50,85 $\pm$ 5,5	51,26 $\pm$ 6,6	21,33 $\pm$ 7,6	20,22 $\pm$ 4,0	19,25 $\pm$ 6,4	-61,94 $\pm$ 8,4 B	-61,75 $\pm$ 7,1 b	-65,23 $\pm$ 9,8 ^B
CuZnO	CON	45,92 $\pm$ 6,1	49,63 $\pm$ 4,4	50,57 $\pm$ 6,7	30,71 $\pm$ 5,0	32,18 $\pm$ 5,6	32,10 $\pm$ 6,4	-27,99 $\pm$ 8,5 A	-31,78 $\pm$ 8,7 a	-34,54 $\pm$ 7,4 ^A
	AUTO	49,42 $\pm$ 7,2	47,69 $\pm$ 8,0	46,58 $\pm$ 7,0	29,32 $\pm$ 5,3	31,21 $\pm$ 6,0	33,43 $\pm$ 6,5	-39,15 $\pm$ 7,4 A	-33,68 $\pm$ 8,8 a	-30,70 $\pm$ 9,1 ^A

(*) As comparações são válidas apenas dentro de cada distância após a camada híbrida. Médias identificadas com a mesma letra maiúscula, minúscula ou sobrescrita são estatisticamente similares ($p > 0.05$)

6.4 RESISTÊNCIA DE UNIÃO

A falha adesiva foi observada como o principal modo de falha para todos os grupos no tempo imediato e após o desafio cariogênico (Tabela 3). O modo mais frequente de falha foi adesivo ou falhas adesivas/mistas (80.5 % de todas as amostras), seguido por falhas coesivas (15.9 %) e falha prematura (3.5 %).

Tabela 3. Número de espécimes (%) dos padrões de fratura e falhas prematuras dos diferentes grupos experimentais após o teste de resistência de união, no tempo imediato e após o desafio cariogênico.

Adesivo		Padrões de fratura					
		IM			Desafio cariogênico		
		A/M	CD/CR	FP	A/M	CD/CR	FP
Controle	CON	23 (82,1)	5 (17,9)	-	28 (82,3)	4 (11,8)	2 (5,9)
	AUTO	17 (81)	4 (19)	-	22 (75,9)	3 (10,3)	4 (13,8)
CuZnO	CON	26 (83,9)	5 (16,1)	-	21 (84)	2 (8)	2 (8)
	AUTO	27 (87,1)	4 (12,9)	-	18 (66,7)	9 (33,3)	-

(*) A adesiva; M mista; CD coesiva de dentina; CR coesiva de resina, FP falha prematura. (*) $X^2 = 1,14$; p-valor= 0,29

A análise estatística revelou que a ANOVA de três fatores "adesivos vs. estratégias adesivas vs. tempo" teve efeitos significativos nos valores de resistência de união à microtração (Tabela 4; $p = 0,000000003$). No tempo imediato, a adição de CuZnO diminuiu significativamente os valores de μ TBS para a estratégia [AUTO] (Tabela 4; $p < 0,002$), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada na estratégia [CON] (Tabela 4). Após o desafio cariogênico, ambos grupos, controle e o grupo CuZnO, quando aplicado na estratégia [CON], diminuiram significativamente os valores de μ TBS em comparação com os valores iniciais (Tabela 4; $p < 0,002$). Por outro lado, não foi observada diminuição significativa nos valores de μ TBS para o grupo CuZnO quando aplicado na estratégia [AUTO] ao comparada os valores iniciais e após o desafio cariogênico (Tabela 4)

Tabela 4. Média e desvio padrão dos valores de resistência de união (MPa) no tempo imediato e após o desafio cariogênico de todos os grupos experimentais (*).

Adesivo		Imediato	Após o desafio cariogênico
Controle	CON	53,7 ± 5,0 A	38,2 ± 5,6 C,D
	AUTO	50,6 ± 6,4 A	30,8 ± 7,6 D
CuZnO	CON	51,3 ± 6,9 A	36,0 ± 6,7 D
	AUTO	46,3 ± 6,1 B	46,5 ± 5,6 B,C

(*) Mesmas letras indicam similaridade estatística entre grupos ($p > 0,05$)

6.5 GRAU DE CONVERSÃO

A análise estatística revelou que a interação cruzada de dois fatores “adesivos vs. estratégias adesivas”, bem como os fatores principais “adesivo” e “estratégias adesivas”, não tiveram efeitos significativos nos valores de grau de conversão (Tabela 5; $p > 0,29$). Isso significa que a adição de CuZn no adesivo não teve nenhum impacto no grau de conversão do adesivo utilizado (Tabela 2).

Tabela 5. Média e desvio padrão do grau de conversão (%) para todos os grupos experimentais (*).

Adesivo	Estratégia adesiva	
	Condicionamento e lavagem	Autocondicionante
Controle	79,6 ± 4,3 A	78,01 ± 3,0 A
CuZnO	79,0 ± 3,8 A	77,46 ± 2,9 A

(*) Mesmas letras indicam similaridade estatística entre grupos ($p > 0,05$)

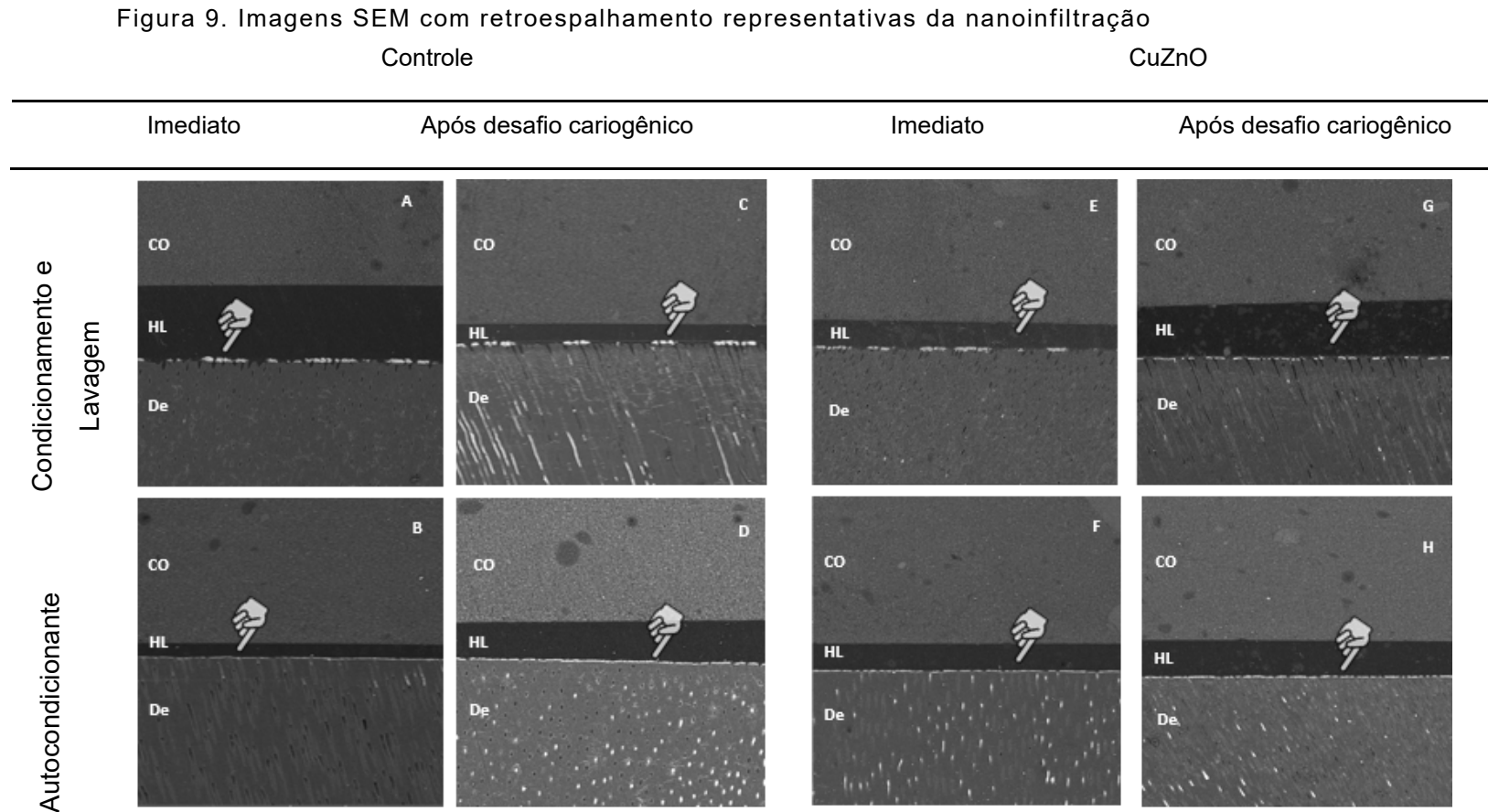
6.6 ANÁLISE DA NANOINFILTRAÇÃO (NI) POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A ANOVA de três fatores “adesivos vs. estratégias adesivas vs. tempo” não mostrou diferenças significativas nos valores de nanoinfiltração (Tabela 6; $p=0,39$). No tempo imediato (IM), a adição de CuZnO reduziu significativamente os valores de NL em comparação com o grupo controle em ambas as estratégias adesivas (Tabela 6 e Figura 9; $p < 0,001$). Após o desafio cariogênico (DC), o grupo controle apresentou valores de NL significativamente aumentados em comparação com o grupo CuZnO (Tabela 6 e Figura 9; $p < 0,001$). Comparando IM e DC, o grupo controle mostrou valores de NL significativamente aumentados (Tabela 6 e Figura 9; $p < 0,001$). Por outro lado, CuZnO apresentou valores de NL estatisticamente semelhantes entre IM e DC (Tabela 6 e Figura 9; $p=0,43$).

Tabela 6. Média e desvio-padrão da nanoinfiltração (%) no tempo imediato e após o desafio cariogênico para todas as condições experimentais (*).

Adesivo		IM	Após Desafio Cariogênico
Controle	CON	4,99 ± 0,9 B	6,80 ± 0,8 C
	AUTO	4,87 ± 0,7 B	6,21 ± 0,8 C
CuZnO	CON	2.47 ± 0.7 A	2.05 ± 0.9 A
	AUTO	2.36 ± 0.9 A	1.96 ± 0.6 A

(*) Letras iguais indicam similaridade estatística entre os grupos ($p > 0.05$)



(*) Interface dentinária de acordo com as diferentes estratégias adesivas e adesivos experimentais para o tempo imediato (IM) [A, B, E e F] e após o desafio cariogênico (DC) [C, D, G, H]. Em ambas as estratégias adesivas, uma camada mais fina de nitrato de prata foi observada para o adesivo CuZnO (ponteiro branco E-F) para o IM, em comparação com o adesivo controle. Após o DC, uma menor quantidade de NL foi encontrada na HL para ambas as estratégias adesivas para o adesivo CuZnO (ponteiro branco G-H), em comparação com o controle (ponteiro branco C-D). (*) Co= Compósito; HL= Camada híbrida; De= Dentina.

7 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo *in situ* que avaliou os efeitos da adição de CuZnONps em um adesivo universal nas propriedades antimicrobianas e adesivas. O adesivo contendo CuZnONps apresentou atividade antimicrobiana, principalmente contra *estreptococos do grupo mutans* e fungos totais. No entanto, a adição dessas nanopartículas não afetou as características da formação do biofilme, quando comparada ao adesivo sem nanopartículas. Interessantemente, a adição de CuZnONps ao adesivo universal permitiu menor perda mineral na camada híbrida e na dentina em baixo após o desafio cariogênico (DC). Assim a primeira hipótese nula foi parcialmente rejeitada.

O biofilme cariogênico é caracterizado por um processo de formação complexo, incluindo uma variedade de microrganismos comensais e patógenos. Incorporados em um conjunto de polissacarídeos extracelulares criados pelo próprio indivíduo, (Mosaddad et al. ³⁶ 2019) que são responsáveis por reduzir a penetração antimicrobiana e manter a formação do biofilme (Benoit et al. ⁵⁸ 2019), impedindo sua total erradicação (Thomas e Nakaishi ⁵⁹ 2006). Assim como foi observado neste estudo com a presença de biofilme independentemente do adesivo utilizado com ou sem CuZnONps.

No entanto, foi observada uma tendência de reduzir a quantidade de bactérias com o adesivo CuZnONps. Isso pode ser devido ao contato próximo das CuZnONps com o biofilme, com sua liberação tendo um efeito antimicrobiano (Amiri et al. ⁶⁰ 2017; Gutiérrez et al. ⁶¹ 2019; Lee et al. ⁶² 2020; Torres-Rosas et al. ⁶³ 2020). Isso significa que apenas as nanopartículas superficiais de cobre e óxido de zinco da camada adesiva poderiam ter entrado em contato com as bactérias colonizadoras do biofilme inicial, enquanto o restante permaneceu dentro do adesivo polimerizado. Deve-se ressaltar que uma interação letal completa entre CuZnONps e as bactérias não poderia ser esperada, pois para esse efeito seria necessária uma adesão contínua das nanopartículas à matriz extracelular do biofilme e sua subsequente inclusão (Franco et al. ⁶⁴ 2022).

Os microrganismos predominantemente afetados pelos CuZnONps foram os *estreptococos do grupo mutans* e fungos totais. Ambos os microrganismos desempenham um papel fundamental no primeiro estágio da organização do biofilme. O *S. mutans* é a principal bactéria a transformar o ambiente homeostático

em um ambiente acidúrico, ajudado a desenvolver outras espécies (Lemos et al. ¹¹ 2019), e os fungos ativam a formação do biofilme, ajudando a se fixar e aderir ao tecido da mucosa e às superfícies duras (Chenicheri et al. ¹³ 2017). Assim, o mecanismo antimicrobiano do CuZnONps sobre os *estreptococos do grupo mutans* poderia estar no início da adesão bacteriana sobre a primeira camada de biofilme e, portanto, na colonização por fungos. Uma das teorias sobre os mecanismos antimicrobianos das nanopartículas metálicas, no entanto, ainda não foi totalmente explicada. Uma das teorias é da “atração-morte-liberação”: a carga positiva dos íons metálicos permite uma atração eletrostática entre a carga negativa da membrana da célula bacteriana e os íons positivos, produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO), danificando a membrana da célula, e posteriormente afetando suas organelas resultando na morte celular (Allaker ⁴⁹ 2010). Além disso, ambas as nanopartículas, Cu e ZnO, podem se ligar a grupos sulfidríla (-SH) essenciais da enzima, que desnaturam as proteínas bacterianas, e posteriormente o DNA para replicação (Allaker ⁴⁹ 2010; Sabella et al. ⁶⁵ 2014).

Em conjunto com a diminuição do conteúdo de *estreptococos do grupo mutans* e fungos totais do adesivo CuZnONps, a desmineralização da dentina devido à atividade bacteriana também foi reduzida. Foi observada uma menor perda mineral na camada híbrida e na dentina profunda, quando comparado com o adesivo controle (comercial), após o DC. É importante destacar que o DC mostrou uma complexidade na produção constante de ácido não só pelos *estreptococos do grupo mutans*, mas por outras bactérias cariogênicas (microrganismos acidúricos) que se aproveitam das condições ácidas criadas pelo *S. mutans*, resultando na perda mineral dos tecidos dentinários (Pitts et al. ³ 2017), como foi observado tanto para o adesivo experimental como para o controle. Apesar de não apresentar uma diminuição significativa no número de bactérias acidúricas no biofilme analisado, a redução da perda mineral do grupo CuZnO ratificou que um agente antimicrobiano local estava agindo contra os *estreptococos do grupo mutans* devido à redução na produção de ácido, levando a uma menor perda mineral na dentina superficial até 100 µm da interface.

Além disso, a adição de CuZnO ao sistema adesivo influenciou nas propriedades adesivas, com exceção do grau de conversão, de modo que a segunda hipótese nula foi parcialmente aceita. Neste estudo, a adição de CuZnO diminuiu significativamente os valores de resistência de união para a estratégia

AUTO no tempo IM. No entanto, os valores de resistência de união estão de acordo com outros estudos realizados com o mesmo adesivo universal (Ambar Universal APS, 45 a 50 Mpa para AUTO) (Nonato et al. ⁶⁶ 2022), o que indica que a adição de CuZnONps não poderia prejudicar as propriedades de união do adesivo. Da mesma forma, a tendência de redução da resistência de união para a estratégia AUTO após a adição de CuZnONps também foi observada em estudos anteriores, mas sem nenhuma diferença significativa entre as estratégias adesivas (Gutiérrez et al. ²⁸ 2019; Gutiérrez et al. ⁶¹ 2019).

O desafio cariogênico realizado neste estudo gerou uma degradação da interface observada como valores reduzidos de resistência de união para todos os grupos. Entretanto, a adição de CuZnONps ao adesivo pode evitar ou minimizar essa degradação. Isso pode explicado pelas interações ou pela atividade de cada nanopartícula. As nanopartículas de cobre podem atuar como um agente de reticulação, atuando na lisil oxidase (Rucker et al. ⁶⁷ 1998). Uma amina oxidase dependente de cobre que intervêm na reticulação covalente de diferentes tipos de colágenos, levando a reticulações interfibrilares e intermoleculares (Vallet e Ricard-Blum ⁶⁸ 2019). Por isso, o cobre é a chave para a resistência e a estabilidade das fibrilas de colágeno (Bedran-Russo et al. ⁶⁹ 2014), melhorando as propriedades biomecânicas da dentina e tornando a camada híbrida menos propensa à degradação (Breschi et al. ⁷⁰ 2018). Além disso, o efeito de ligação cruzada pode ser reforçado pela atividade das nanopartículas de ZnO. Elas poderiam promover a formação de cristalitos de apatita nas fibrilas de colágenos, permitindo assim a mineralização da dentina (Toledano et al. ⁷¹ 2013).

Por outro lado, o Zn permite a deposição de minerais que fossilizam as MMPs, ativadas reduzindo a degradação do colágeno (Toledano et al. ²⁶ 2022).(Toledano et al. ²⁶ 2022). Isso significa que as fibrilas de colágeno são remineralizadas após a exposição de ácidos bacterianos, com a formação de cristais de apatita com os minerais de cálcio (Ca) e fosfato (P) depositados ao longo da interface (Toledano et al. ²⁶ 2022; Toledano et al. ⁷¹ 2013), observando-se como uma menor perda mineral nos grupos CuZnO após o DC. Portanto, possivelmente há mais cálcio depositado no substrato, o que poderia aumentar a interação química com o 10-MDP-Ca durável (Van Meerbeek et al. ¹⁷ 2020; Yoshida et al. ⁴⁰ 2004). Isso também poderia explicar o aumento da resistência de união do adesivo CuZnO aplicado no modo AUTO em comparação com o modo CON. Como o ácido

fosfórico não é usado na estratégia AUTO, a rede de HAp-colágeno não é liberada, permitindo que mais conteúdo mineral interaja com o 10-MDP (Van Meerbeek et al.¹⁷ 2020).

A rede de colágeno reforçada resultante da atividade de reticulação de ambas as nanopartículas aumenta a resistência do colágeno e reduz a degradação enzimática (Gutiérrez et al.²² 2017; Gutiérrez et al.²³ 2017; Gutiérrez et al.⁶¹ 2019). Estudos anteriores reportaram a atividade anti-MMPs de Cu e ZnO (Gutiérrez et al.²⁸ 2019), principalmente contra MMPs que são ativadas durante o processo cariogênico (Mazzoni et al.² 2015). Assim, a estabilidade da interface adesiva pode ser mantida, conforme foi observado nos valores de nanoinfiltração do adesivo CuZnO, mesmo após o desafio cariogênico de 21 dias. De forma interessante, previamente foi reportado que um adesivo contendo cobre poderia servir como um reservatório para o cobre, permitindo uma liberação controlada gradual e consistente do cobre ao redor das fibras de colágeno dentro da camada híbrida (Ñaupari-Villasante et al.⁷² 2022). Pelo que em teoria, isso também poderia acontecer com o ZnO. Assim, com ambas as nanopartículas na interface adesiva, mesmo em baixas concentrações, poderia ser possível manter ou retardar a degradação da união na interface oral, prolongando a longevidade das restaurações adesivas de resina-dentina.

Também é importante mencionar que a incorporação de nanopartículas de CuZnO não afetou o grau de conversão do adesivo, o que mostra a compatibilidade e afinidade química das nanopartículas com os monômeros de metacrilato no adesivo (Gutiérrez et al.²⁸ 2019). Isso poderia ser explicado pelo grau de hidrofobicidade das nanopartículas, que além de ser importante para a atividade antimicrobiana (Allaker⁴⁹ 2010), poderia limitar a sorção de água e evitar a degradação hidrolítica das ligações adesivas.

Com relação ao modelo *in situ* do estudo, a influência dos voluntários desempenha um papel importante. O uso adequado dos dispositivos intraorais e a consistência de seguir as instruções é um fator que os pesquisadores não podem controlar totalmente (Sung et al.⁵⁵ 2014). Portanto, para evitar de alguma forma o desânimo do voluntário durante o processo do desafio cariogênico, o uso do grupo controle ou experimental em cada uma das duas rodadas de 21 dias foi randomizado, reduzindo também alguns vieses. Uma limitação do estudo pode ser a falta de informações sobre o processo de esterilização da amostra, em relação

ao efeito da temperatura e da pressão sobre a estrutura proteica da matriz de colágeno. O fato que o desafio cariogênico durou 21 dias para cada fase, com apenas quatro momentos de açúcar, em vez de 14 dias com oito momentos de açúcar, deveu-se ao tamanho do espécime e sua área de apenas 0,8 mm², ao contrário de um espécime de meio dente com uma área de superfície maior exposta ao DC. Portanto, o método tradicional de desafio cariogênico poderia ter sido muito agressivo para a sobrevivência do espécime para sua análise posterior. Contudo, uma exposição à sacarose quatro vezes ao dia é suficiente para o desenvolvimento de uma lesão cáriosa (Díaz-Garrido et al. ⁷³ 2016). De acordo com a literatura, a representação de um alto consumo de açúcar seria igual a uma exposição de quatro ou cinco vezes à sacarose. Sendo suficiente para aumentar a cariogenicidade do biofilme dependendo da dose de sacarose, sugerindo um padrão de consumo moderado de açúcar. Por outro lado, uma exposição de oito a dez vezes ao açúcar seria equivalente a pessoas com consumo extremamente alto de sacarose e risco muito alto de cárie (Díaz-Garrido et al. ⁷³ 2016).

8 CONCLUSÃO

A adição de CuZnONps (0,2/5%) em um adesivo universal pode proporcionar uma atividade antimicrobiana local e reduzir a perda mineral, aumentando suas propriedades adesivas em um ambiente cariogênico.

REFERÊNCIAS

1. Bernabe E, Marcenes W, Hernandez CR, Bailey J, Abreu LG, Alipour V, et al. Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *J Dent Res*. 2020; Apr;99(4):362-73.
2. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015; Feb;94(2):241-51.
3. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; May 25;3:17030.
4. Bowen WH. Dental caries - not just holes in teeth! A perspective. *Mol Oral Microbiol*. 2016; Jun;31(3):228-33.
5. Demarco FF, Collares K, Correa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJ. Should my composite restorations last forever? Why are they failing? *Braz Oral Res*. 2017; Aug 28;31(suppl 1):e56.
6. Nedeljkovic I, De Munck J, Slomka V, Van Meerbeek B, Teughels W, Van Landuyt KL. Lack of Buffering by Composites Promotes Shift to More Cariogenic Bacteria. *J Dent Res*. 2016; Jul;95(8):875-81.
7. Heintze SD, Loguercio AD, Hanzen TA, Reis A, Rousson V. Clinical efficacy of resin-based direct posterior restorations and glass-ionomer restorations - An updated meta-analysis of clinical outcome parameters. *Dent Mater*. 2022; May;38(5):e109-e35.
8. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res*. 2020;54(1):7-14.
9. Askar H, Krois J, Göstemeyer G, Bottenberg P, Zero D, Banerjee A, et al. Secondary caries: what is it, and how it can be controlled, detected, and managed? *Clin Oral Investig*. 2020; May;24(5):1869-76.
10. Jokstad A. Secondary caries and microleakage. *Dent Mater*. 2016; Jan;32(1):11-25.
11. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019; Jan;7(1).
12. Mo SS, Bao W, Lai GY, Wang J, Li MY. The microfloral analysis of secondary caries biofilm around Class I and Class II composite and amalgam fillings. *BMC Infect Dis*. 2010; Aug 17;10:241.
13. Chenicheri S, R U, Ramachandran R, Thomas V, Wood A. Insight into Oral Biofilm: Primary, Secondary and Residual Caries and Phyto-Challenged Solutions. *Open Dent J*. 2017;11:312-33.
14. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2018; Dec;16(12):745-59.

15. Kreth J, Merritt J, Pfeifer CS, Khajotia S, Ferracane JL. Interaction between the Oral Microbiome and Dental Composite Biomaterials: Where We Are and Where We Should Go. *J Dent Res*. 2020; Sep;99(10):1140-9.
16. 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. *Dental Materials*. 2016;32(2):e41-e53.
17. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Van Landuyt K, Yoshida Y, Peumans M. From Buonocore's Pioneering Acid-Etch Technique to Self-Adhering Restoratives. A Status Perspective of Rapidly Advancing Dental Adhesive Technology. *J Adhes Dent*. 2020;22(1):7-34.
18. Spencer P, Ye Q, Song L, Parthasarathy R, Boone K, Misra A, et al. Threats to adhesive/dentin interfacial integrity and next generation bio-enabled multifunctional adhesives. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019; Nov;107(8):2673-83.
19. Chen L, Suh BI, Yang J. Antibacterial dental restorative materials: A review. *Am J Dent*. 2018; Nov 15;31(Sp Is B):6b-12b.
20. Agnihotri R, Gaur S, Albin S. Nanometals in Dentistry: Applications and Toxicological Implications-a Systematic Review. *Biol Trace Elem Res*. 2020; Sep;197(1):70-88.
21. Xu VW, Nizami MZI, Yin IX, Yu OY, Lung CYK, Chu CH. Application of Copper Nanoparticles in Dentistry. *Nanomaterials (Basel)*. 2022; Feb 27;12(5).
22. Gutiérrez MF, Malaquias P, Matos TP, Szesz A, Souza S, Bermudez J, et al. Mechanical and microbiological properties and drug release modeling of an etch-and-rinse adhesive containing copper nanoparticles. *Dent Mater*. 2017; Mar;33(3):309-20.
23. Gutiérrez MF, Malaquias P, Hass V, Matos TP, Lourenço 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; Jun;61:12-20.
24. Vidal O, de Paris Matos T, Núñez A, Méndez-Bauer L, Sutil E, Ñaupari-Villasante R, et al. A universal adhesive containing copper nanoparticles improves the stability of hybrid layer in a cariogenic oral environment: An in situ study. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2022; Feb;126:105017.
25. Matos TP, Ñaupari-Villasante R, Kunz PVM, Hass V, Reis A, Gutiérrez MF, et al. 48-month clinical evaluation of a copper-containing universal adhesive in non-carious cervical lesions: A double-blind randomised clinical trial. *Dent Mater*. 2023; Sep;39(9):820-30.
26. Toledano M, Toledano-Osorio M, Hannig M, Carrasco-Carmona Á, Osorio MT, García-Godoy F, et al. Zn-containing Adhesives Facilitate Collagen Protection and Remineralization at the Resin-Dentin Interface: A Narrative Review. *Polymers (Basel)*. 2022; Feb 8;14(3).

27. Gutierrez MF, Alegria-Acevedo LF, Mendez-Bauer L, Bermudez J, Davila-Sanchez A, Buvinic S, et al. Biological, mechanical and adhesive properties of universal adhesives containing zinc and copper nanoparticles. *Journal of dentistry*. 2019; Mar;82:45-55.
28. Gutiérrez MF, Bermudez J, Dávila-Sánchez A, Alegría-Acevedo LF, Méndez-Bauer L, Hernández M, et al. Zinc oxide and copper nanoparticles addition in universal adhesive systems improve interface stability on caries-affected dentin. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2019; Dec;100:103366.
29. Ferracane JL. Models of Caries Formation around Dental Composite Restorations. *J Dent Res*. 2017; Apr;96(4):364-71.
30. Nedeljkovic I, De Munck J, Ungureanu AA, Slomka V, Bartic C, Vananroye A, et al. Biofilm-induced changes to the composite surface. *J Dent*. 2017; Aug;63:36-43.
31. Hollanders ACC, Kuper NK, Maske TT, Huysmans M. Secondary Caries in situ Models: A Systematic Review. *Caries Res*. 2018;52(6):454-62.
32. Demarco FF, Cenci MS, Montagner AF, de Lima VP, Correa MB, Moraes RR, et al. Longevity of composite restorations is definitely not only about materials. *Dent Mater*. 2023; Jan;39(1):1-12.
33. Eltahlah D, Lynch CD, Chadwick BL, Blum IR, Wilson NHF. An update on the reasons for placement and replacement of direct restorations. *J Dent*. 2018; May;72:1-7.
34. Spencer P, Ye Q, Song L, Parthasarathy R, Boone K, Misra A, et al. Threats to adhesive/dentin interfacial integrity and next generation bio-enabled multifunctional adhesives. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 2019; Nov;107(8):2673-83.
35. Delaviz Y, Finer Y, Santerre JP. Biodegradation of resin composites and adhesives by oral bacteria and saliva: a rationale for new material designs that consider the clinical environment and treatment challenges. *Dent Mater*. 2014; Jan;30(1):16-32.
36. Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdanian A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdanian M, et al. Oral microbial biofilms: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019; Nov;38(11):2005-19.
37. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res*. 1955; Dec;34(6):849-53.
38. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*. 1982; May;16(3):265-73.
39. Perdigão J, Araujo E, Ramos RQ, Gomes G, Pizzolotto L. Adhesive dentistry: Current concepts and clinical considerations. *J Esthet Restor Dent*. 2021; Jan;33(1):51-68.
40. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res*. 2004; Jun;83(6):454-8.
41. Perdigão J. Current perspectives on dental adhesion: (1) Dentin adhesion - not there yet. *Jpn Dent Sci Rev*. 2020; Nov;56(1):190-207.

42. Mokeem LS, Garcia IM, Melo MA. Degradation and Failure Phenomena at the Dentin Bonding Interface. *Biomedicines*. 2023; Apr 23;11(5).
43. Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, et al. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng*. 2010; Jun;38(6):1989-2003.
44. 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; Feb;32(2):e41-53.
45. 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; Mar;83(3):216-21.
46. Guo X, Yu Y, Gao S, Zhang Z, Zhao H. Biodegradation of Dental Resin-Based Composite-A Potential Factor Affecting the Bonding Effect: A Narrative Review. *Biomedicines*. 2022; Sep 18;10(9).
47. Nedeljkovic I, Teughels W, De Munck J, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL. Is secondary caries with composites a material-based problem? *Dent Mater*. 2015; Nov;31(11):e247-77.
48. Balhaddad AA, Garcia IM, Mokeem L, Alsahafi R, Collares FM, Sampaio de Melo MA. Metal Oxide Nanoparticles and Nanotubes: Ultrasmall Nanostructures to Engineer Antibacterial and Improved Dental Adhesives and Composites. *Bioengineering (Basel)*. 2021; Oct 19;8(10).
49. Allaker RP. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res*. 2010; Nov;89(11):1175-86.
50. Nizami MZI, Xu VW, Yin IX, Yu OY, Chu CH. Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Caries Prevention: A Review. *Nanomaterials (Basel)*. 2021; Dec 20;11(12).
51. Garcia IM, Balhaddad AA, Ibrahim MS, Weir MD, Xu HHK, Collares FM, et al. Antibacterial response of oral microcosm biofilm to nano-zinc oxide in adhesive resin. *Dent Mater*. 2021; Mar;37(3):e182-e93.
52. Elkassas D, Arafa A. The innovative applications of therapeutic nanostructures in dentistry. *Nanomedicine*. 2017; May;13(4):1543-62.
53. Melo MA, Weir MD, Rodrigues LK, Xu HH. Novel calcium phosphate nanocomposite with caries-inhibition in a human in situ model. *Dent Mater*. 2013; Feb;29(2):231-40.
54. Armstrong S, Breschi L, Özcan M, Pfefferkorn F, Ferrari M, Van Meerbeek B. Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μ TBS) approach. *Dent Mater*. 2017; Feb;33(2):133-43.
55. Sung YH, Kim HY, Son HH, Chang J. How to design in situ studies: an evaluation of experimental protocols. *Restor Dent Endod*. 2014; Aug;39(3):164-71.
56. Ramalho CMVDS, Françoise. Azevedo, Marina Sousa. CENCI, Maximiliano Sérgio,. Avaliação da adesão de paciente ao tratamento da doença cárie através de um método microbiológico simplificado CIC ENPOS II MOSTRA CIENTIFICA. 2010;XIX(XII).

57. Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Yu H, Buzalaf MA, et al. Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: hardness and mineral content correlation. *Caries Res.* 2013;47(2):162-70.
58. Benoit DSW, Sims KR, Jr., Fraser D. Nanoparticles for Oral Biofilm Treatments. *ACS Nano.* 2019; May 28;13(5):4869-75.
59. Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc.* 2006; Nov;137 Suppl:10s-5s.
60. Amiri M, Etemadifar Z, Daneshkazemi A, Nateghi M. Antimicrobial Effect of Copper Oxide Nanoparticles on Some Oral Bacteria and Candida Species. *J Dent Biomater.* 2017; Mar;4(1):347-52.
61. Gutiérrez MF, Alegría-Acevedo LF, Méndez-Bauer L, Bermudez J, Dávila-Sánchez A, Buvinic S, et al. Biological, mechanical and adhesive properties of universal adhesives containing zinc and copper nanoparticles. *J Dent.* 2019; Mar;82:45-55.
62. Lee M-J, Seo Y-B, Seo J-Y, Ryu J-H, Ahn H-J, Kim K-M, et al. Development of a Bioactive Flowable Resin Composite Containing a Zinc-Doped Phosphate-Based Glass. *Nanomaterials.* 2020;10(11):2311.
63. Torres-Rosas R, Torres-Gómez N, García-Contreras R, Scougall-Vilchis RJ, Domínguez-Díaz LR, Argueta-Figueroa L. Copper nanoparticles as nanofillers in an adhesive resin system: An in vitro study. *Dent Med Probl.* 2020; Jul-Sep;57(3):239-46.
64. Franco D, Calabrese G, Guglielmino SPP, Conoci S. Metal-Based Nanoparticles: Antibacterial Mechanisms and Biomedical Application. *Microorganisms.* 2022;10(9):1778.
65. Sabella S, Carney RP, Brunetti V, Malvindi MA, Al-Juffali N, Vecchio G, et al. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale.* 2014; Jun 21;6(12):7052-61.
66. Nonato R, Moreira P, Silva D, Ferreira M, Reis A, Cardenas A, et al. Long-term Evaluation of Bonding Performance of Universal Adhesives based on Different Dentinal Moisture Levels. *J Adhes Dent.* 2022;24(1):395-406.
67. Rucker RB, Kosonen T, Clegg MS, Mitchell AE, Rucker BR, Uriu-Hare JY, et al. Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am J Clin Nutr.* 1998; May;67(5 Suppl):996s-1002s.
68. Vallet SD, Ricard-Blum S. Lysyl oxidases: from enzyme activity to extracellular matrix cross-links. *Essays Biochem.* 2019; Sep 13;63(3):349-64.
69. Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater.* 2014; Jan;30(1):62-76.
70. Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, Cadenaro M, Tjäderhane L, et al. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dent Mater.* 2018; Jan;34(1):78-96.

71. Toledano M, Sauro S, Cabello I, Watson T, Osorio R. A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dent Mater.* 2013; Aug;29(8):e142-52.
72. Ñaupari-Villasante R, Gutiérrez MF, Matos TdP, Nuñez A, Fernandez E, Reis A, et al. Four-year effects of copper-nanoparticles on durability of resin-dentin interfaces. *International Journal of Adhesion and Adhesives.* 2022; 2022/12/01/;119:103253.
73. Díaz-Garrido N, Lozano C, Giacaman RA. Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. *Eur J Dent.* 2016; Jul-Sep;10(3):345-50.

ANEXO A - APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da adição de nanopartículas de óxido de zinco e cobre em um sistema adesivo universal nas propriedades adesivas e antimicrobianas: estudo in situ.

Pesquisador: Alessandro Dourado Loguercio

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68380323.2.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.976.093

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa:

Efeito da adição de nanopartículas de óxido de zinco e cobre em um sistema adesivo universal nas propriedades adesivas e antimicrobianas: estudo in situ. A incorporação de nanopartículas de óxido de zinco e cobre em um sistema adesivo universal fornecerá atividade antimicrobiana e preservação das propriedades adesivas à dentina em um ambiente oral cariogênico, quando comparado a uma adesivo sem nanopartículas

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de óxido de zinco e cobre (ZnO/CuNp) em um sistema adesivo universal na atividade antimicrobiana e na preservação das propriedades adesivas à dentina quando submetido ao desafio oral cariogênico.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar a eficácia da adição de ZnO/CuNp em um sistema adesivo universal na atividade antimicrobiana quando submetido ao desafio oral

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

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3282

E-mail: propespsecretaria@uepg.br

Continuação do Parecer: 5.976.093

cariogênico. 2. Avaliar a eficácia da adição de ZnO/CuNp em um sistema adesivo universal na diminuição da perda mineral em dentina quando submetido ao desafio oral cariogênico. 3. Avaliar a eficácia da adição de ZnO/CuNp em um sistema adesivo universal na melhora da resistência de união quando submetido ao desafio oral cariogênico. 4. Avaliar a eficácia da adição de ZnO/CuNp em um sistema adesivo universal na diminuição da nanoinfiltração da interface adesivo-dentina num ambiente oral cariogênico. 5. Avaliar a eficácia da adição de ZnO/CuNp em um sistema adesivo universal na melhora do grau de conversão do adesivo na interface adesivo-dentina. 6. Avaliar a eficácia da adição de ZnO/CuNp em um sistema adesivo universal na melhora da nanodureza da interface adesivo-dentina num ambiente oral cariogênico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

-Possível desmineralização dos dentes pela aplicação de solução de sacarose. Para isto, os voluntários serão instruídos e monitorados a utilizar uma mesma pasta dental de 1000 ppm, durante toda a pesquisa para que suas atividades de higiene oral sejam potencializadas no período de vinte um dia e após este período os voluntários não utilizarão mais o dispositivo intra-oral.

-Dispositivo intra-oral causar incômodo ao voluntário. Todos os voluntários da pesquisa receberão instruções de como proceder com sua utilização.

Os aparelhos serão testados e todos os ajustes para evitar este desconforto serão realizados. Caso o desconforto persista, os voluntários poderão suspender o seu uso e estarão cientes que poderão abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem que isto cause danos ou prejuízos ao voluntário.

-Há riscos para os pesquisadores de contaminação, ferimento com instrumentos cortantes e alergia a materiais utilizados, que devem ser minimizados com a utilização de equipamento de proteção individual (EPI)

Benefícios:

A pesquisa contribuirá para um melhor entendimento sobre o efeito da adição de nanopartículas de óxido de zinco e cobre no sistema adesivo como

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

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3282

E-mail: propespsecretaria@uepg.br

Continuação do Parecer: 5.976.093

agentes antimicrobianos na degradação da interface de união adesivo-dentina, consequentemente, preservação de estrutura dental em detrimento

da necessidade de troca de restaurações. Os benefícios para os voluntários pesquisados são:

- Os voluntários serão acompanhados e receberão esclarecimentos do pesquisador responsável sobre eventuais dúvidas durante toda a pesquisa;

- Receberão uma profilaxia prévia a colocação do dispositivo intra-oral e outra profilaxia após a retirada deste dispositivo (este procedimento será

realizado pelos demais pesquisadores juntamente com o pesquisador responsável);

- Os voluntários receberão tratamento odontológico quando necessário durante todo o período da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nos últimos anos, uma das propostas dos materiais odontológicos é a adição de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONp) e cobre (CuNp) nos

sistemas adesivos universais para melhorar a atividade antimicrobiana contra o *Streptococcus mutans* (S. mutans) e antienzimática contra várias

metaloproteinases *in vitro*. Com isto, ocorreu uma significativa preservação da interface adesivo-dentina, sem comprometer as propriedades

mecânicas do adesivo em si após 1 ano de armazenagem em água. Porém, estudos adicionais são necessários para avaliar o comportamento

desses materiais em ambientes que simulem a cavidade oral. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar se a incorporação de

nanopartículas (Np) de óxido de zinco e cobre (ZnO/CuNp) em um sistema adesivo universal (Ambar Universal, FGM, Joinville, SC, Brasil) melhora

as propriedades antimicrobianas e adesivas à dentina quando submetidos ao desafio cariogênico, *in situ*.

Metodologia: 120 terceiros molares hígidos

serão divididos em quatro grupos (n=30) de acordo com a presença de nanopartículas e as estratégias adesivas: adesivo sem Np (condicionamento

e lavagem ou autocondicionante) e adesivo com ZnO/CuNp (5/0,2%) (condicionamento e lavagem ou autocondicionante). Todos os dentes terão o

esmalte removido e serão restaurados com resina composta, seguindo as indicações do fabricante. Após as restaurações, os dentes serão

armazenados por 24hrs e cortados para obter espécimes no formato de “palitos” de 0,80 mm². Os

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

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3282

E-mail: propespsecretaria@uepg.br

Continuação do Parecer: 5.976.093

palitos obtidos (n=16) de cada dente serão distribuídos nos grupos experimentais, uma metade (n=8) para o teste imediato (após 24hrs) e a outra (n=8) para o desafio cariogênico. Trinta voluntários utilizarão os dispositivos palatais por 21 dias contendo os palitos dos grupos experimentais seguindo de um período washout de 7 dias, e depois 21 dias contendo os palitos dos grupos controle. O estudo será dividido em duas fases: Fase 1: Avaliação das propriedades antimicrobianas: serão utilizados três testes: (1) Caracterização do biofilme, (2.) Teste de Viabilidade bacteriana (LIVE/DEAD Test) e análise da morfologia bacteriana no MEV, e (3) Perda de mineral (PM) a través do teste de microdureza superficial (MDS) e microdureza transversal (MDT). Fase 2: Avaliação das propriedades adesivas: Os palitos de cada dente de cada grupo serão avaliados no tempo e imediato e após desafio cariogênico nos testes de resistência de união (n=5), grau de conversão e os mesmos para nanoinfiltração (n=2), e nanodureza (n=1). Todos os dados serão submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, e após a confirmação serão feitos os seguintes testes estatísticos: ANOVA (= 0,05) de três e dois fatores para as propriedades adesivas e mecânicas respectivamente, e o teste t-student para a análise antimicrobiana. O teste de Tukey será utilizado para comparação pareada dos grupos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em anexo e de acordo com as normas 466/2012 e 510/2016

Recomendações:

Enviar o relatório final ao término do projeto por Notificação via Plataforma Brasil para evitar pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise documental considera-se aprovado este projeto e devidamente autorizado para seu

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

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3282

E-mail: propespsecretaria@uepg.br

Continuação do Parecer: 5.976.093

início conforme cronograma apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2088811.pdf	17/03/2023 08:47:14		Aceito
Outros	Banco_de_Dentes_Humanos.pdf	17/03/2023 08:43:31	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	19/02/2023 19:19:41	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	19/02/2023 19:18:00	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa.doc	19/02/2023 19:16:20	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rostro.pdf	19/02/2023 19:05:39	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTA GROSSA, 30 de Março de 2023

Assinado por:
ULISSES COELHO
(Coordenador(a))

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

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3282

E-mail: propespsecretaria@uepg.br