

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

TAISE ALESSANDRA HANZEN

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE COBRE NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E
ADESIVAS À DENTINAS DE UM SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL**

**PONTA GROSSA
2018**

TAÍSE ALESSANDRA HANZEN

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE COBRE NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E
ADESIVAS À DENTINAS DE UM SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL**

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia na 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.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio

Co-orientador: Prof. Dr. Andrés Felipe Millan Cardenas

**PONTA GROSSA
2018**

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

H233 Hanzen, Taíse Alessandra Hanzen
 Efeito da incorporação de cobre nas
 propriedades mecânicas e adesivas à
 dentinhas de um sistema adesivo universal/
 Taíse Alessandra Hanzen Hanzen. Ponta
 Grossa, 2018.
 66f.

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

 Orientador: Prof. Dr. Alessandro
 Dourado Loguercio.

 Coorientadora: Prof^a Dr^a Andrés Felipe
 Millan Cardenas.

 1.Adesivos. 2.Cárie dentária. 3.Erosão
 dentária. 4.Cobre. 5.Resistência à tração.
 I.Loguercio, Alessandro Dourado. II.
 Cardenas, Andrés Felipe Millan. III.
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Mestrado em Odontologia. IV. T.

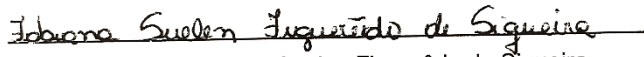
CDD: 617.695

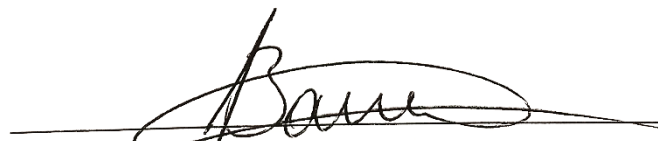
TAÍSE ALESSANDRA HANZEN

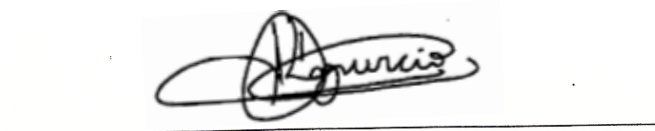
**Efeito da incorporação de cobre nas propriedades mecânicas e adesivas
à dentinas de um sistema adesivo universal**

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 Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais.

Ponta Grossa, 20 de fevereiro de 2018.


Prof.^ª. Dr.^ª. Fabiana Suelen Figuerêdo de Siqueira
UNICEUMA


Prof. Dr. José Roberto de Oliveira Bauer
UNICEUMA


Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio
Universidade Estadual de Ponta Grossa

DADOS CURRICULARES
TAÍSE ALESSANDRA HANZEN

NASCIMENTO 25/08/1991

Medianeira, Paraná, Brasil

FILIAÇÃO

Sueli Vier
Ernani João Hanzen

2011 - 2015

Curso de Graduação em Odontologia,
Universidade Estadual de Ponta Grossa
(UEPG). Ponta Grossa – PR, Brasil.

2015 - 2015

Curso de Aperfeiçoamento em Estética e
Prótese Metal – Free. Associação Brasileira
de Odontologia - Regional Ponta Grossa.
Ponta Grossa - PR, Brasil.

2016 – 2018

Curso de Pós-Graduação em Odontologia.
Área de Concentração: Dentística
Restauradora. Nível: Mestrado em
Odontologia. Universidade Estadual de
Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa – PR,
Brasil.

DEDICATÓRIA

A Deus,

Por estar sempre ao meu lado protegendo, iluminando e guiando meu

Caminhar,

Por nunca me deixar fracassar, mesmo diante dos momentos de fraqueza,

Pela sabedoria e por permitir que os Teus planos, maiores e melhores que os

meus, se concretizassem.

Aos meus pais, Sueli Vier e Ernani João Hanzen,

e ao meu irmão Felipe Augusto Hanzen,

Pelo amor incondicional;

Por sempre se fazerem presentes mesmo diante da distância,

me conduzindo sempre no caminho do bem, da ética e sobretudo do respeito;

Por compreenderem minha ausência perante os anos de graduação e agora

de pós,

me apoiando em todos os momentos e estando ao meu lado em todas as

minhas conquistas.

Obrigada por serem meu porto seguro, meu lar.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG e ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Odontologia, na pessoa da coordenação, **Profª. Drª. Denise Wambier**, e da Vice-coordenação **Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio**;

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio**, por ter aceitado me orientar, por todo ensinamento compartilhado, pela paciência e confiança;

À **Profª Drª Alessandra Reis**, que compartilha conosco seu vasto conhecimento dentro e fora das clínicas sempre com um sorriso no rosto, inspirando-nos a cada dia;

Ao meu trio de faculdade, **Manuella Beluzzo e Caroline Moreira**, pela amizade ímpar, troca de apoio e carinho, por sempre me incentivarem a continuar a caminhada, e pela alegria e risadas contagiantes nas oportunidades em que conseguimos nos rever após formadas;

Às colegas de mestrado e doutorado, **Laína Vochikovski, Veridiana Eleutério Campos, Bianca Medeiros Maran e Francine Morikawa**, obrigada pela amizade, pela ajuda no laboratório, por serem pessoas de tamanha dedicação e empenho. **Bianca**, obrigada pela companhia e parceria nas viagens para Casa;

À **Profª Drª Vivi Hass**, pelo auxílio, ensinamentos mil e pela prestatividade ímpar. Você é brilhante;

À **Profª Drª Fabiana S. F. Siqueira** e ao meu co-orientador **Prof. Dr. Andrés F. M. Cardenas** (Fabi e Pipe, casal mais “maravida” possível), por toda ajuda, carinho e amizade. Obrigada pelas dicas, correções, ensinamentos compartilhados, e especialmente pelas conversas e risadas de laboratório. Vocês têm o meu respeito e minha admiração, e são o casal mais sucesso e alto astral com quem tive o prazer de trabalhar;

À **Pâmela Malaquias e Mario Felipe Gutiérrez**, pela dedicação em me ensinar absolutamente tudo no laboratório, pela prestatividade e ajuda sempre; se eu hoje sei algo de laboratório, foi graças à vocês, que não mediram esforços pra me ensinar com excelência e paciência. E não obstante, vocês são incríveis e “são muito bons no que fazem” (MALAQUIAS, P.);

À **Adriele Burey**, doutoranda mais inteligente e *fitness ever*, obrigada pela parceria nas viagens (juntamente com a Bianca Medeiros Maran), assim como nas dietas e nessa vida fit que apreciamos. Um “thanks” especial por ter disposto do teu tempo e dos teus conhecimentos nas correções do meu trabalho e na realização das fotos. Você tem um futuro lindo, pleno e de muito sucesso pela frente;

À minha amiga, colega, dupla e parceira de laboratório e clínica, **Thalita Matos** (em breve Sra. RJC), pela dedicação ímpar, organização invejável, por dedicar esforço e tempo nos meus testes (mesmo quando eles não deram certo), pelo apoio e paciência; por me ensinar tanto, todos os dias, sobre todos os assuntos que compartilhamos. Você é dona de um potencial sem tamanho! Obrigada por ser a “fortaleza”, por me ensinar e especialmente, por me colocar nas tuas orações diárias. Agradeço todos os dias à Deus por me permitir trabalhar com uma pessoa tão especial como você;

À minha amiga e colega **Alexandra Mara de Paula**, pela amizade, dedicação e ajuda, pelo esforço de vir de Castro (cidade mãe do Paraná) sempre que preciso para se empenhar nos meus testes, inclusive nos finais de semana; pela parceria inigualável em todos os congressos e cursos possíveis; por aturar e acompanhar meus papos fitness (sdds pimenta negra) e também por essa musicalidade incrível, minha dupla cover e backing vocal nas músicas; Sem palavras pra você e pra sua amizade, você merece o Tocantins inteiro;

À **Bianca Linhares**, secretária da Pós-Graduação, pela dedicação e carinho, não medindo esforços pra ajudar em tudo que precisamos; e também aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPG, vocês fazem parte da conquista nota 5 e merecem os agradecimentos por fazerem a nossa pós cada dia melhor;

À **Vanessa Chagury**, ao **André**, à **Carol** e demais funcionários do **CLABMU**, pelo apoio técnico nos testes realizados e por se dedicarem tanto ao que fazem; vosso trabalho e dedicação é de muita excelência;

Às **alunas orientadas de IC**, pelo empenho, ajuda e dedicação no laboratório, pelo tempo disposto em aprender e reproduzir nossos ensinamentos, obrigada pela confiança.

RESUMO

HANZEN, TA. **Efeito da incorporação de cobre nas propriedades mecânicas e adesivas à dentinas de um sistema adesivo universal.** [Dissertação - Mestrado em Odontologia – Área de Concentração - Dentística Restauradora]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2018.

O propósito deste estudo *in vitro* foi avaliar o efeito da adição de nanopartículas de cobre em um sistema adesivo universal sobre a resistência de união (RU) e nanoinfiltração (NI) da interface resina-dentina hígida, erosionada e cariada, nas estratégias adesivas convencional (*total-etch* [TE]) e autocondicionante (*self-etch* [SE]). Bem como grau de conversão (GC), morfologia da interface de união (MI), resistência máxima à tração (RT), sorção cumulativa de água (SO) e solubilidade (SB) do sistema adesivo e radiopacidade do cobre (RC). O sistema adesivo experimental foi formulado com a adição de nanopartículas de cobre a 0,1% no adesivo Ambar Universal. Para os testes de RU e NI, 120 molares humanos foram aleatoriamente distribuídos em doze condições experimentais ($n = 10$) com base na combinação das variáveis: concentração de cobre [0 e 0,1%] vs. superfície dentinária (hígida, erosionada e cariada) vs. estratégias adesivas (TE e SE). Aplicado o sistema adesivo, os dentes foram restaurados com resina composta e após 24h, seccionados longitudinalmente para se obter palitos de resina-dentina ($0,8 \text{ mm}^2$), testados em tensão a $0,5 \text{ mm/min}$ quanto a RU. Para NI, 3 palitos de cada dente foram preparados e analisados em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para avaliação do GC, 3 palitos de resina-dentina de cada condição experimental foram analisados por espectroscopia Raman. Para MI, 3 palitos de resina-dentina foram preparados e analisados por FEG. Para RT, 5 corpos de prova de adesivo de cada condição experimental foram testados nos tempos imediato (24h) e após 28 dias de armazenamento ($n = 10$). Para SO e SB, 10 corpos de prova de adesivo ($n=10$) de cada condição experimental foram testados durante o período de 56 dias. Para avaliação da RC, 5 corpos de prova de cada condição experimental ($n = 5$) foram submetidos a 5 radiografias digitais, para comparação em escala de cinza. Os dados de RU, NI e GC foram analisados por ANOVA 3 fatores, submetidos ao teste *post-hoc* de Tukey para múltiplas comparações. Para RT, os dados foram analisados por ANOVA 2 fatores para medidas repetidas. Os dados de RC foram analisados por ANOVA fator único. Os dados de SO e SB foram submetidos à análise por test-t pareado. A significância estatística foi predefinida em 5%. A inclusão de nanopartículas de cobre na concentração 0,1% no sistema adesivo universal aumentou os valores de RU sobre os substratos hígido e erosionado. O adesivo contendo cobre melhorou a NI no substrato hígido, em ambas as estratégias. Para RT, RC, SO e SB, a adição de cobre não apresentou diferenças estatísticas. O GC foi mais afetado em substrato erosionado quando na técnica convencional associada ao adesivo contendo cobre, que resultou na formação de *tags* menores e em quantidade reduzida.

Palavras-chave: Adesivos; Cárie dentária; Erosão dentária; Cobre; Resistência à tração.

ABSTRACT

HANZEN, TA. **Effect of copper incorporation on mechanical and adhesive properties of a universal adhesive system.** [Dissertation – Master`s Degree in Dentistry – Concentration Area: Restorative Dentistry]. Ponta Grossa: State University of Ponta Grossa, 2018.

The purpose of this in vitro study was to evaluate the effect of addition of copper nanoparticles on a universal adhesive system in microtensile bond strength (μ TBS) and nanoleakage (NL) of sound, eroded and carious resin-dentin interface, using both self-etch [SE] and total-etch [TE] adhesive strategies. As well as degree of conversion (DC), interface micromorphology (IM), ultimate tensile strength (UTS), cumulative water sorption (WS) and solubility (So) of the adhesive system and copper radiopacity (CR). The experimental adhesive system was formulated with the addition of 0,1% copper nanoparticles on Ambar Universal. For μ TBS and NL, 120 human third molars were randomly distributed in 12 experimental conditions (n=10) based on the combination of the variables: concentration of copper [0 and 0,1%] vs. dentin surface (sound, eroded and carious) vs. adhesive strategies (TE and SE). After bonding procedures and restored with composite resin, teeth were stored for 24h and then longitudinally sectioned to obtain specimens – dentin-resin sticks (0,8mm²), tested in a tension of 0,5mm/min for μ TBS. For NL, 3 specimens per tooth were prepared and analyzed by scanning electron microscopy (SEM). For DC, 3 sticks of resin-dentin of each experimental condition were analyzed by Raman spectroscopy. For IM, 3 sticks of resin-dentin were prepared and analyzed by FEG. For UTS, 5 samples of each condition were tested after 24 hours and 28 days of storage (n = 10). For WS and So, 10 samples of each experimental condition (n = 10) were tested during 56 days. For radiopacity, 5 CPAs of each experimental condition (n = 5) were submitted to 5 digital radiographs, for comparison in gray scale in Adobe Photoshop Software. The data of μ TBS, NL and DC (Raman) were analyzed by three-way ANOVA, submitted to Tukey's post hoc test for multiple comparisons. For UTS, data were analyzed by two-way ANOVA. For CR, data were analyzed by one-way ANOVA. The data of WS and So were evaluated by Student's T-test. Statistical significance was set at $\alpha = 0.05$. The inclusion of 0,1% of copper nanoparticles on the universal adhesive system improved μ TBS values on sound and eroded substrates. The copper adhesive improved NL on sound dentin, for both strategies. For UTS, radiopacity, WS and So, the addition of copper showed no statistical difference in the results. DC was most affected by eroded dentin associated with ER strategy and adhesive containing copper, which resulted in smaller tags, in reduced quantity.

Keywords: Adhesives; Dental caries; Tooth erosion; Copper, Tensile strength.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diagrama explicativo das etapas 1 e 2 do estudo (n amostral para cada condição experimental).....	25
Figura 2. Confeção dos corpos-de-prova para o teste de RT. (A) Matriz metálica em forma de ampulheta; (B) lubrificação prévia da matriz; (C) adesivo dispensado até o completo preenchimento; (D) jato de ar - evaporação do solvente; (E) lâmina de vidro lubrificada sobre a matriz previamente à fotoativação; (F) fotoativação (20s); (G) corpo-de-prova confeccionado.....	27
Figura 3. Protocolo para RT. (A) Corpos-de-prova (B) mensuração com paquímetro digital; (C) cola de cianoacrilato gel; (D) corpo-de-prova fixado na garra de Geraldeli; (E) Máquina de ensaios universais – Kratos; (F) conjunto garra + corpo-de-prova acoplado na máquina de ensaios universais.....	28
Figura 4. Confeção dos corpos-de-prova para o teste de SO e SB. (A) Matriz metálica cilíndrica; (B) lubrificação das superfícies da matriz; (C) adesivo dispensado até o completo preenchimento; (D) jato de ar - evaporação do solvente; (E) fotoativação (20s); (F) corpo-de-prova confeccionado; (F) mensuração com paquímetro digital.....	28
Figura 5. Protocolo de SO e SB. (A) corpo-de-prova na sílica gel em estufa pré-condicionada a 37°C; (B) pesagem; (C) mensuração com paquímetro digital; (D) armazenamento individual em poços contendo 10mL de água destilada a 37°C.....	29
Figura 6. Análise das radiografias digitais a partir da função histograma do software de computação gráfica (Adobe Photoshop).....	30
Figura 7. Preparo dos dentes. (A) molar humano hígido obtido no Banco de Dentes Humanos; (B) remoção esmalte oclusal em recortador de gesso; (C e D) aspecto do dente após remoção do esmalte oclusal; (E) esmalte lateral desgastado com ponta diamantada em alta rotação; (F) preparo finalizado.....	32
Figura 8. Fluxograma do desenho experimental.....	32
Figura 9. Protocolo da ciclagem erosiva <i>in vitro</i> . (A) imersão dos dentes em Coca-Cola (90 s sob agitação); (B) lavagem com água deionizada (10 s); (C) imersão em solução remineralizante (3 h); (D) aspecto dentina erosionada.....	33
Figura 10. Protocolo da indução de lesões de cárie artificial (A e B) inoculação de <i>S. mutans</i> à solução de cárie artificial; (C) dentes transferidos	

asépticamente para os tubos de ensaio; (D) incubação em jarra de anaerobiose; (E) aspecto da dentina cariada..... 34

Figura 11. Estratégia adesiva convencional. (A) condicionamento ácido; (B) lavagem e secagem; (C) aspecto do dente após condicionamento ácido; (D) aplicação do adesivo; (E) jato de ar - evaporação do solvente; (F) fotoativação. (Todos os procedimentos realizados segundo as indicações do fabricante, discriminados na Tabela 1)..... 35

Figura 12. Protocolo para a obtenção dos palitos resina-dentina. (A) Restauração com resina composta em 3 incrementos; (B) fotoativação; (C) dente restaurado; (D) restauração marcada com caneta permanente; (E) Isomet 1000 – Máquina utilizada para o corte dos dentes; (F) dente fixado com cera pegajosa ao dispositivo da máquina de corte; (G) cortes perpendiculares nos sentidos M-D e V-L; (H) palitos armazenados em *eppendorfs* contendo água destilada..... 36

Figura 13. Protocolo para RU. (A) palitos de resina-dentina; (B) mensuração com paquímetro digital; (C) seta azul indicando a interface adesiva; (D) cola de cianoacrilato gel; (E) palito fixado na garra de Geraldeli; (F) conjunto garra-palito acoplado na máquina de ensaios universais..... 37

Figura 14. Esquema de classificação das falhas de acordo com o tipo de fratura. (A) falha CD exclusivamente em dentina; (B) falha CR exclusivamente em resina composta; (C) falha A/M envolvendo a interface adesiva e os substratos vizinhos..... 38

Figura 15. Preparação de amostras para NI: (A e B) imersão dos palitos em solução aquosa de nitrato de prata na ausência de luz (24h); (C) imersão em solução reveladora sob luz fluorescente (8h); (D) palitos revelados montados em *stubs* de alumínio; (E) palitos dessecados em sílica (24h); (F) metalização carbono-ouro..... 39

Figura 16. Grau de conversão (Raman): (A) polimento da amostra em lixa carbureto de silício #1500; (B) lavagem dos palitos em cuba ultrassônica; (C) equipamento Raman para leitura do espectro..... 40

Figura 17. Gráfico representativo das médias de SO ao longo dos 56 dias. Linha em laranja: AMB CT; linha em amarelo: AMB 0,1% cobre..... 42

Figura 18. Imagens representativas da interface de união à dentina em MEV obtidas em cada condição experimental. RE, resina; CH, camada híbrida, DE, dentina. Nenhum grupo apresentou interface livre de nanoinfiltração. O nitrato de prata (setas vermelhas) infiltrou ao longo da camada híbrida em todos os grupos. Na dentina cariada, a deposição do nitrato de prata ocorreu dentro da camada híbrida e se estendeu para baixo, na região dos túbulos dentinários (I-L). Em dentina hígida e erosionada, a adição de 0,1% de cobre no adesivo reduziu a nanoinfiltração para ambas estratégias (C,D,G,H)..... 47

Figura 19. Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por FEG (5000X) de cada condição experimental. Em dentina hígida, maior formação de *tags* resinosos foi obtida (A-D) (setas vermelhas) em comparação com os demais substratos. Em dentina erosionada e cariada, as setas vermelhas indicam a formação de uma camada híbrida com incompleta formação de *tags* e em menor número (E-L).....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema adesivo (Marca)/Lote, composição, concentração de cobre e modo de aplicação (*).....	24
Tabela 2. Médias $\pm$ desvios padrão de resistência máxima à tração (RT) dos grupos controle (0%) e experimental (0,1% Cu), nos tempos imediato (IM) e após 28 dias de armazenamento.....	42
Tabela 3. Sorção cumulativa de água (SO) e Solubilidade (SB) dos grupos controle (0%) e experimental (0,1% Cu) após 56 dias de armazenamento em água.....	42
Tabela 4. Médias $\pm$ desvios padrão da radiopacidade do esmalte, dentina e dos sistemas adesivos - grupos controle (0%) e experimental (0,1% Cu), por análise em histograma da escala de cinza.....	43
Tabela 5. Número de palitos (%) de acordo com o modo de fratura.....	44
Tabela 6. Médias $\pm$ desvios padrão de resistência de união à dentina (RU, MPa) das diferentes condições experimentais.....	45
Tabela 7. Médias $\pm$ desvios padrão da nanoinfiltração na interface de união à dentina (NI) das diferentes condições experimentais por análise em MEV...	46
Tabela 8. Médias $\pm$ desvios padrão do grau de conversão (GC) das diferentes condições experimentais por análise em espectroscopia Raman...	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Ambar Adesivo Universal
A/M	Falha Adesiva / Mista
ANOVA	Análise de variância
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CD	Falha Coesiva em Dentina
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPA	Corpo de Prova de Adesivo
CR	Falha Coesiva em Resina
CT	Controle
Cu	Cobre
DC	Dentina cariada
DE	Dentina erosionada
DH	Dentina hígida
ED	Erosão dentária
ER	<i>Etch-and-Rinse</i> ou Condicionamento total
FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
FP	Falhas Prematuras
GC	Grau de conversão
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
IM	Imediato
KCl	Cloreto de Potássio
LED	<i>Light-emitting diode</i>
MDP	10-Metacrilóiloxidecil dihidrogênio fosfato
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMPs	Metaloproteinases da matriz
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sódio
NI	Nanoinfiltração
RT	Resistência máxima à tração
RU	Resistência de união à microtração
SB	Solubilidade
SE	<i>Self-etch</i> ou autocondicionante
SiC	Carbeto de Silício
SO	Sorção cumulativa de água
TE	Total-etch ou Condicionamento total
UTS	Resistência máxima à tração
UVA	Ultravioleta A

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

#	Antífen
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
<	Menor que
=	Igual
>	Maior que
g	Gramas
H	Horas
Hz	Hertz
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
kV	Quilovolt
m	Massa
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm ²	Milímetro quadrado
mm ³	Milímetro cúbico
mm/min	Milímetro por minuto
MPa	Mega Pascal
mW	Miliwatt
mW/cm ²	MiliWatt por centímetro quadrado
N	Newton
n	Número amostral
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
<i>p</i>	Valor de probabilidade
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
v	Volume
x	Número de vezes
X	Aumento da lente óptica (objetiva)
α	Alfa (nível de significância)
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
®	Registrado
™	Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	16
2 PROPOSIÇÃO	21
2.1.OBJETIVO GERAL	21
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 INCORPORAÇÃO DE COBRE NO SISTEMA ADESIVO	21
3.2 ETAPA 1	24
3.2.1 Teste de resistência máxima à tração (RT)	24
3.2.2 Sorção cumulativa de água (SO) e Solubilidade (SB)	26
3.2.3 Teste de radiopacidade	29
3.3 ETAPA 2	30
3.3.1 Modelo de ciclagem erosiva	32
3.3.2 Modelo de lesões de cárie artificial em dentina	33
3.3.3 Procedimento restaurador e obtenção dos palitos de resina-dentina	34
3.3.4 Resistência de união à microtração (RU)	35
3.3.5 Nanoinfiltração (NI)	37
3.3.6 Grau de conversão – Espectroscopia micro-Raman	38
3.3.7 Análise morfológica da camada híbrida – Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG)	39
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4 RESULTADOS	40
4.1 ETAPA 1	40
4.1.1 Resistência máxima à tração	40
4.1.2 Sorção cumulativa de água e solubilidade	41
4.1.3 Radiopacidade do cobre	42
4.2 ETAPA 2	43
4.2.1 Resistência de união à microtração (RU)	43
4.2.2.Nanoinfiltração (NI)	45
4.2.3 Grau de conversão (palitos resina-dentina)	47
4.2.4 Análise morfológica da camada híbrida	47
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	54
7 REFERÊNCIAS	55
ANEXO A Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdades Ponta Grossa / PR – Parecer Consubstanciado do CEP	63

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Durante a última década, a compreensão dos mecanismos envolvidos na degradação da interface adesivo-dentina tem avançado substancialmente (Tjaderhane *et al.* ¹ 2013) e medidas para melhorar a durabilidade da adesão dentinária tornaram-se os principais tópicos de pesquisa na odontologia (Carvalho *et al.* ² 2012; Tjaderhane *et al.* ³ 2013; Frassetto *et al.* ⁴ 2016).

Apesar dos avanços significativos realizados no campo dos materiais dentários, a longevidade das restaurações adesivas continua a ser uma preocupação. Um dos principais os motivos que justificam a substituição das restaurações de resina composta se resumem a lesões de cárie adjacentes à restauração e fraturas, indicando possíveis falhas no processo de adesão (Ding *et al.* ⁵ 2009; Nedeljkovic *et al.* ⁶ 2015)

Atualmente, 50 a 70% das substituições são devido a falhas de restaurações precedentes, uma vez que a média da durabilidade dessas restaurações é de apenas 5 anos (Jokstad *et al.* ⁷ 2001), o que resulta em bilhões de dólares despendidos anualmente (Beazoglou *et al.* ⁸ 2007). Adicionalmente ainda há que se considerar que a substituição de restaurações demanda o maior tempo na prática clínica, consistindo em 60% de todo o trabalho operacional do cirurgião-dentista (Mjör ⁹ 1989). Estes números mostram que mesmo com o constante desenvolvimento dos materiais dentários, a durabilidade das restaurações adesivas ainda é o ponto mais crítico (Manhart *et al.* ¹⁰ 2004).

A integridade da interface adesivo-dentina é diariamente exposta a diversos fatores, dentre eles água, enzimas, tensões oclusais tanto da mastigação quanto de hábitos parafuncionais, variação de temperatura e microorganismos derivados do biofilme dental (Amaral *et al.* ¹¹ 2007; Breschi *et al.* ¹² 2008). Ao que se sabe, *Streptococcus mutans* e outras espécies são responsáveis pelo processo de formação de cárie adjacente a restauração levando a consequentes falhas marginais (Zalkind *et al.* ¹³ 1998; Busscher *et al.* ¹⁴ 2010). A soma de todos estes aspectos torna-se deletéria e contribui para o enfraquecimento da adesão (Spencer *et al.* ¹⁵ 2010).

Sabendo que os procedimentos adesivos não conseguem prevenir o desenvolvimento de lesões de cárie adjacentes à restauração e são igualmente incapazes de eliminar o biofilme por completo (Khalichi *et al.* ¹⁶ 2004; Garcia-Godoy *et al.* ¹⁷ 2010; Spencer *et al.* ¹⁸ 2010), um recurso seria o desenvolvimento de materiais

dentários com propriedades antimicrobianas, no intuito de reduzir o acúmulo de biofilme na interface da restauração, sem prejudicar as propriedades mecânicas do material, tornando a interface menos vulnerável à degradação (Thomas e Nakaishi ¹⁹ 2006; Chen *et al.* ²⁰ 2012).

Nesse sentido, o uso de íons metálicos na forma de nanopartículas despertou grande interesse na odontologia. Dentre eles, cobre, prata, zinco e ouro parecem ser os mais promissores por suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas reconhecidas (Allaker ²¹ 2010; Cocco *et al.* ²² 2015). Cada um apresenta diferentes propriedades e espectros de ação, diretamente proporcional a sua superfície de contato, ou seja, quanto maior a superfície das nanopartículas, maior a gama de interações com outras moléculas orgânicas e inorgânicas (Bundy *et al.* ²³ 1980; Pal *et al.* ²⁴ 2007).

Presentes nas ligas de amálgama, a prata e o cobre são responsáveis pelo grande sucesso clínico desse material, caracterizado como potencialmente antimicrobiano, capaz de retardar a invasão bacteriana e reduzir os índices de falhas (Morrier *et al.* ²⁵ 1998). Prova disso é que as restaurações em resina composta apresentam incidência de cárie 3,5 vezes maior que as de amálgamas (Bernardo *et al.* ²⁶ 2007). No intuito de explorar tais benefícios, a incorporação dessas nanopartículas aos polímeros tem sido estudada por vários investigadores (Morones *et al.* ²⁷ 2005; Ruparelia *et al.* ²⁸ 2008; Allaker ²¹ 2010) e resultados promissores com o emprego do cobre tem sido demonstrados (Foley e Blackwell ²⁹ 2003; Yoon *et al.* ³⁰ 2007; Ruparelia *et al.* ²⁸ 2008).

Em comparação com a prata, o cobre além da fácil disponibilidade e do baixo custo (Usman *et al.* ³¹ 2013), promove maior efeito antibacteriano contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (Foley e Blackwell ²⁹ 2003; Yoon *et al.* ³⁰ 2007). Sua oxidação no ar e em meios aquosos resulta em nanopartículas de óxido de cobre, que permitem a reprodução de polímeros estáveis quanto às propriedades físico-químicas (Usman *et al.* ³¹ 2013; Ingle *et al.* ³² 2014).

Com respeito ao mecanismo de ação, sugere-se que o cobre limita o crescimento bacteriano por inibição da glicólise pela oxidação dos grupos tiol de várias enzimas, reduzindo a produção de ácido (Oppermann e Johansen ³³ 1980). A atuação do íon controla a formação de glucano pela glucose transferase e interrompe reações metabólicas importantes por bactérias anaeróbias orais (Davey e Embery ³⁴ 1992).

Além disso, a lixiviação localizada do cobre promove um dissipador de elétrons infinito que pode alterar a membrana bacteriana, causando a dissolução das células (Ingle *et al.* ³² 2014). Esse conjunto de atividades caracterizam o cobre como potencial agente antimicrobiano, capaz de reduzir o número de bactérias nas superfícies dos dentes, e por conseguinte, contribuir para o menor acúmulo de placa (Oppermann e Johansen ³³ 1980; Davey e Embury ³⁴ 1992).

Embora o cobre apresente resultados promissores, o substrato que recebe o material restaurador e seu comportamento também são relevantes. Sabe-se que a adesão ao substrato dentário não é tão favorável por características pertinentes a sua fisiologia e composição, tais como o maior grau de umidade e composição orgânica (Garone Filho ³⁵ 2002; Reis *et al.* ³⁶ 2002), o que exige que a técnica adesiva seja rigorosamente executada (Hilgert *et al.* ³⁷ 2008). Normalmente, a desmineralização parcial ou completa é um pré-requisito para a obtenção de uma adequada interface adesiva, seguida da infiltração do colágeno desmineralizado com monômeros resinosos, capaz de criar uma camada híbrida colágeno-adesivo responsável pela adesão resina-dentina (Tjaderhane *et al.* ³⁸ 2015).

Infelizmente, uma completa difusão de monômeros resinosos dentro da dentina desmineralizada não é totalmente alcançada. A presença de uma zona desmineralizada na interface resina-dentina é criada por uma difusão incompleta de monômeros resinosos na trama colágena após aplicação do sistema adesivo (Nakabayashi e Takarada ³⁹ 1992; Hashimoto *et al.* ⁴⁰ 2000; Reis *et al.* ⁴¹ 2013), deixando fibras colágenas parcial ou totalmente expostas na parte inferior da camada híbrida, sem a proteção de monômeros resinosos (Spencer e Swafford ⁴² 1999; Wang e Spencer ⁴³ 2002; ⁴⁴ 2003; Spencer *et al.* ¹⁸ 2010).

A falta de proteção de monômeros resinosos e a presença de água deixa as fibras colágenas vulneráveis à degradação hidrolítica dependente do tempo e propensas a solubilização dentro desta camada por metaloproteinasas da matriz (MMPs) e cisteínas-catepsinas, o que torna susceptível a infiltração, invasão bacteriana e consequentemente falha precoce das restaurações (Carrilho *et al.* ⁴⁵ 2007). Essa degradação por enzimas colagenolíticas endógenas fornece um caminho para a proliferação bacteriana, com consequente desenvolvimento de cárie adjacente à restauração (Pashley *et al.* ⁴⁶ 2004).

Essa desvantagem na adesão parece ser ainda mais significativa quando esta superfície é acometida por patologias como a erosão e a cárie dental, em virtude das alterações morfológicas destes substratos. Estes são caracterizados pela redução no conteúdo mineral (Kinney *et al.* ⁴⁷ 2003), bem como das propriedades físicas e mecânicas, tornando crítica a adesão a estes substratos (Scheffel *et al.* ⁴⁸ 2013). Adicionalmente, os ciclos de des-remineralização, com queda de pH e a neutralização por tampões salivares leva a exposição da matriz orgânica e também tem potencial para ativar a atividade funcional das MMPs da saliva ou dentina e das cisteína-catepsinas (Tjaderhane *et al.* ³⁸ 2015).

Recentemente, além de demonstrar seus benefícios anticariogênicos e antibacterianos (Thneibat *et al.* ⁴⁹ 2008), o cobre demonstrou alto potencial inibitório de MMPs 2 e 9 (Souza *et al.* ⁵⁰ 2001; Guo *et al.* ⁵¹ 2005). No entanto, esse potencial apenas foi demonstrado pela liberação de cobre em restaurações com amálgama. Assim, adicionar nanopartículas de cobre aos sistemas adesivos e testar em substratos com intensa atividade proteolítica, como na erosão dental e cárie, poderia ser uma alternativa para garantir o sucesso das restaurações adesivas nestes dois substratos.

Por outro lado, o procedimento adesivo na odontologia restauradora está baseado em duas estratégias, convencional (*total-etch* no idioma inglês [TE]) e autocondicionante (*self-etch* no idioma inglês [SE]) (Reis *et al.* ⁴¹ 2013). No intuito de encurtar o tempo clínico, simplificar os passos e minimizar a sensibilidade da técnica, os adesivos universais ou multi-modo foram lançados no mercado e permitem sua aplicação tanto no modo autocondicionante como no convencional (Hanabusa *et al.* ⁵² 2012). Esta versatilidade resulta da inclusão de monômeros funcionais ácidos, tais como 10-Metacrilóiloxidecil dihidrogênio fosfato (MDP) em sua composição, responsável pela união química ao cálcio dos tecidos através da formação de sais de MDP-Ca (Muñoz *et al.* ⁵³ 2013). Porém, uma recente revisão sistemática mostrou que ainda são necessários estudos para avaliar o desempenho desses adesivos em diferentes substratos (Rosa *et al.* ⁵⁴ 2015).

Outra lacuna ainda não explorada é que, embora a inclusão do cobre tenha sido testada em diversos materiais dentários, tais como o ionômero de vidro (Renné *et al.* ⁵⁵ 2017), sistema adesivo (Afseth *et al.* ⁵⁶ 1983; Argueta-Figueroa *et al.* ⁵⁷ 2015; Sabatini *et al.* ⁵⁸ 2015; Gutiérrez *et al.* ⁵⁹ 2017; Gutiérrez *et al.* ⁶⁰ 2017) e implantes

(Gosau *et al.* ⁶¹ 2016; Rosenbaum *et al.* ⁶² 2017), até a extensão do nosso conhecimento, nenhum estudo foi feito sobre a adição do cobre nas propriedades de um sistema adesivo universal. Quanto ao substrato, poucos são os estudos que relatam o desempenho de sistemas adesivos universais sobre dentina erosionada (Cruz *et al.* ⁶³ 2012; Cruz *et al.* ⁶⁴ 2015) e cariada (Yoshiyama *et al.* ⁶⁵ 2002; Hass *et al.* ⁶⁶ 2016; Costa *et al.* ⁶⁷ 2017)

Assim, o objetivo do presente estudo *in vitro* foi investigar o efeito da adição do cobre sobre as propriedades mecânicas e adesivas de um sistema adesivo universal sobre dentina erosionada e cariada, utilizando ambas estratégias adesivas – convencional (*etch-and-rinse* ou *total-etch*) e autocondicionante (*self-etch*), quando comparada a dentina sadia.

2 PROPOSIÇÃO

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de cobre em um sistema adesivo universal nas propriedades mecânicas e adesivas à dentina hígida, erosionada e cariada.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da adição de nanopartículas de cobre (0,1%) em um sistema adesivo universal na resistência máxima à tração, sorção cumulativa de água; solubilidade e radiopacidade;
- Avaliar o efeito da adição de nanopartículas de cobre (0,1%) em um sistema adesivo universal nas propriedades adesivas (resistência de união e nanoinfiltração) nas estratégias convencional e autocondicionante em dentina hígida, erosionada e cariada,
- Avaliar o efeito da adição de nanopartículas de cobre (0,1%) no grau de conversão e morfologia da interface de união de um sistema adesivo universal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdades Ponta Grossa, com parecer consubstanciado sob número 2.072.217 (Anexo A).

3.1 INCORPORAÇÃO DE COBRE NO SISTEMA ADESIVO

O adesivo experimental foi formulado a partir da adição de nanopartículas de cobre (99.9% puro, 40-60nm, SkySpring Nanomaterials, Inc., Houston, TX, EUA) no sistema adesivo Ambar Universal (FGM Prod. Odont., Ltda, Joinville, SC, Brasil), com

solvente à base de água e etanol. Previamente a incorporação, as nanopartículas foram caracterizadas morfológicamente por microscopia de força atômica [AFM], potencial Z [Z-Sizer], microscopia eletrônica da varredura por efeito de campo [FEG], e quimicamente por espectroscopia de energia dispersiva de raios X [EDS], de acordo com os estudos anteriores (Gutiérrez *et al.* ⁵⁹ 2017; Gutiérrez *et al.* ⁶⁰ 2017).

Assim, as nanopartículas de cobre foram pesadas em balança analítica de precisão (AY220 Marte/Shimadzu, Tóquio, Japão) em ambiente escuro e 6 mg de cobre, que corresponde a concentração de 0,1%, foi adicionado ao sistema adesivo em sua fórmula original por agitação em um misturador Speedmix (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA).

O sistema adesivo utilizado, composição, concentração de cobre e modo de aplicação estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sistema adesivo (Marca)/Lote, composição, concentração de cobre e modo de aplicação (*)

SISTEMA ADESIVO (MARCA)/LOTE	COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE COBRE	MODO DE APLICAÇÃO	
			SE	TE
Ambar Universal (FGM Prod. Odont. Ltda, Joinville, SC, Brasil) / 050416	Uretano dimetacrilato (UDMA) 2-hidroxi etil metacrilato (HEMA), monômeros hidrofílicos metacrílicos (10-MDP), monômeros ácidos metacrílicos, Etanol, Dióxido de silício silanizado e canforoquinona	0%	1. Aplicação de uma gota de adesivo (10 s) vigorosamente;	1. Condicionamento com ácido fosfórico 37% - Condac 37 (FGM Prod. Odont. Ltda, Joinville, SC, Brasil) por 15 s;
		0,1%	2. Aplicação de outra gota de adesivo (10 s); 3. Jato de ar por (10 s) à distância, mantendo uma camada uniforme e brilhante; 4. Fotoativação (10 s).	2. Enxaguar completamente; 3. Remova os excessos de água com jato de ar por 1-2 s; 4. Aplique o sistema adesivo igual ao modo autocondicionante.

*Os materiais foram aplicados de acordo com as recomendações do fabricante.

O estudo consistiu em duas etapas (Figura 1):

1. Avaliação da resistência máxima à tração (imediato e após 28 dias), sorção e solubilidade em água (imediata e após 56 dias) e radiopacidade do adesivo contendo cobre;
2. Avaliação imediata das propriedades adesivas - resistência de união e nanoinfiltração, bem como grau de conversão (Raman) e morfologia da interface de união nos três diferentes substratos dentinários, utilizando adesivo com e sem cobre, nas diferentes estratégias adesivas;

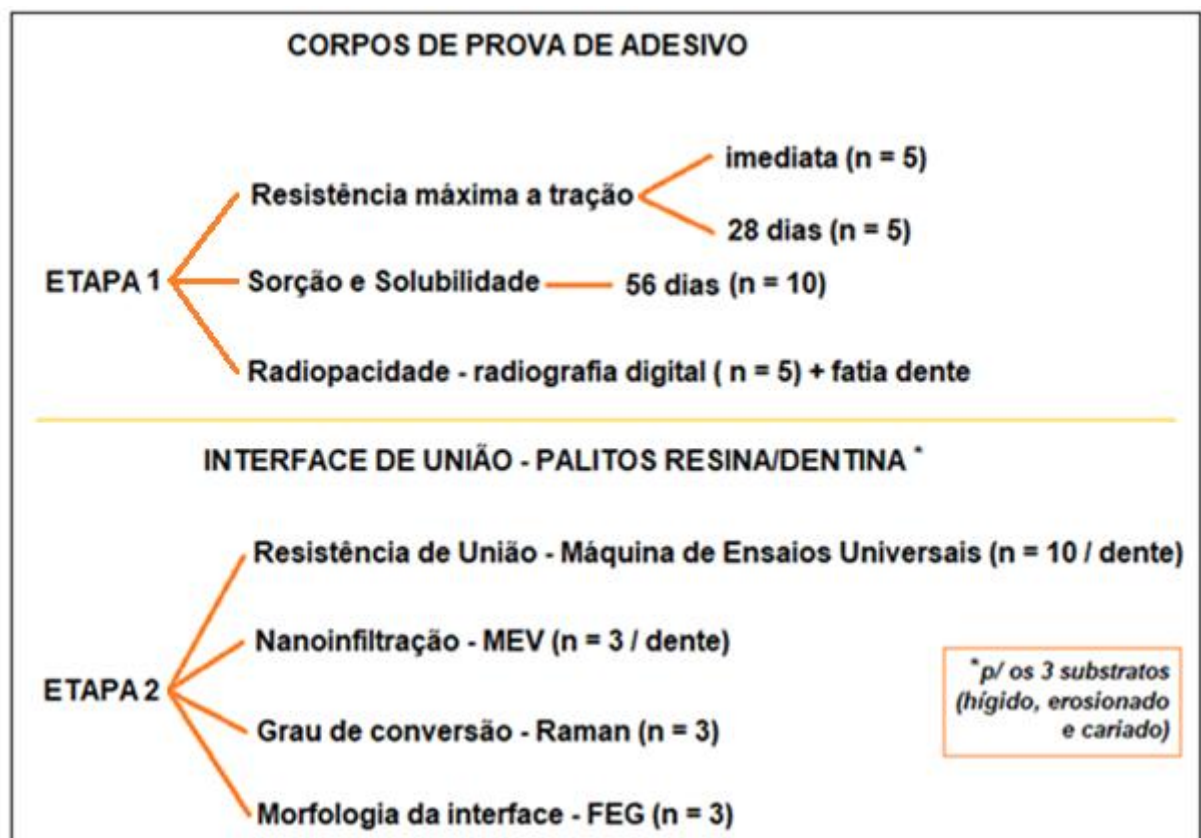


Figura 1. Diagrama explicativo das etapas 1 e 2 do estudo (n amostral para cada condição experimental).

3.2 ETAPA 1

3.2.1 Teste de resistência máxima à tração

Corpos-de-prova do sistema adesivo (n = 10) com cada concentração de nanopartículas de cobre (0% e 0,1%) foram confeccionados em uma matriz metálica em forma de ampulheta (10mm de comprimento x 2mm de largura x 1mm de profundidade; Odeme Prod. Odont. Ltda, Joaçaba, SC, Brasil). Após lubrificação das

superfícies da matriz com K-Y® Gel (Johnson & Johnson, Estados Unidos), uma tira de poliéster foi colocada em contato com a base. Devidamente posicionada sobre a base, a matriz foi encaixada e os adesivos foram gotejados nos orifícios até o completo preenchimento. Todas as bolhas de ar visíveis foram cuidadosamente removidas com o auxílio de um microaplicador (Cavibrush® FGM, Prod Odont. Ltda, Joinville, SC, Brasil). Em seguida, aplicou-se jato de ar durante 20 s a uma distância de aproximadamente 10 cm para evaporação do solvente.

A seguir, foi posicionada uma lâmina de vidro lubrificada com K-Y® Gel sobre a matriz, e seguiu-se a fotoativação com um aparelho fotopolimerizador a base de LED por 20 s com uma intensidade de 1200 mW/cm^2 (Radii-cal, SDI, Bayswater, Victoria, Austrália), com densidade de energia adotada em $4,8 \text{ J/cm}^2$. Após polimerizados, os corpos-de-prova foram retirados da matriz cuidadosamente com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15, e as rebarbas de adesivo que permaneceram ao redor foram removidas (Figura 3).

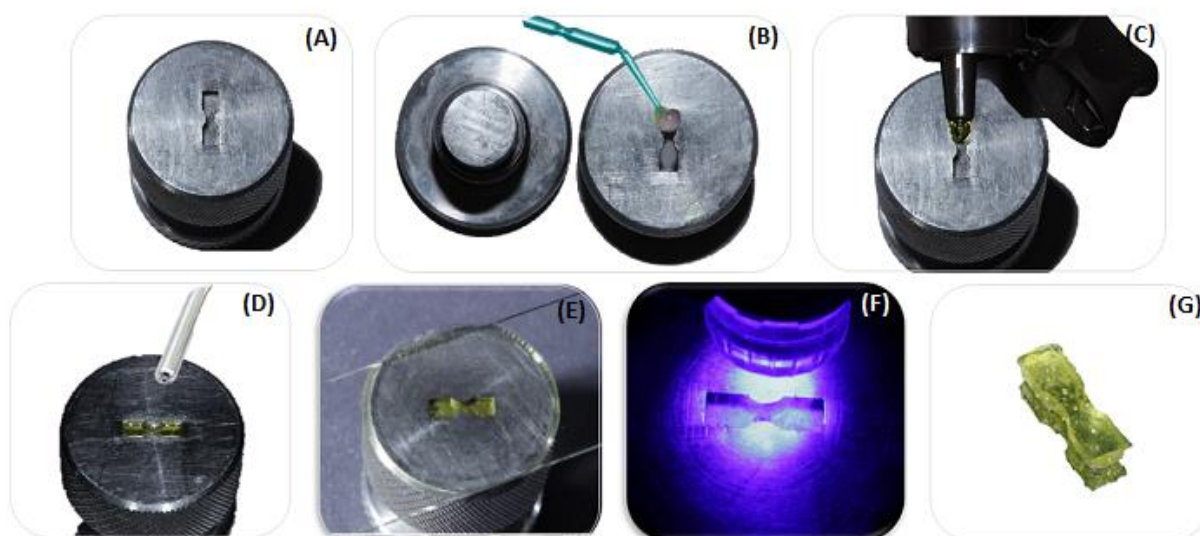


Figura 2. Confeção dos corpos-de-prova para o teste de RT. (A) Matriz metálica em forma de ampulheta; (B) lubrificação prévia da matriz; (C) adesivo dispensado até o completo preenchimento; (D) jato de ar - evaporação do solvente; (E) lâmina de vidro lubrificada sobre a matriz previamente à fotoativação; (F) fotoativação (20s); (G) corpo-de-prova confeccionado.

Metade dos corpos-de-prova ($n = 5$) foram testados imediatamente (24 h) após a confecção e a outra metade ($n = 5$) foram armazenados em água durante 28 dias a 37°C . Após os respectivos tempos de armazenamento, os mesmos foram individualmente mensurados com paquímetro digital e fixados em garras de Geraldeli, com aplicação de cola de cianoacrilato gel (Loctite Superbond Power Easy Gel,

Henckel, SP, Brasil) nas extremidades. Após a polimerização da cola, o conjunto garra – corpo-de-prova foi acoplado na máquina de ensaios universais (Kratos, Cotia, SP, Brasil) e testado por tração a uma velocidade de 0,5 mm/min com célula de carga de 100 N, até o rompimento da interface (Stanislawczuk *et al.* ⁶⁸ 2014) (Figura 4).

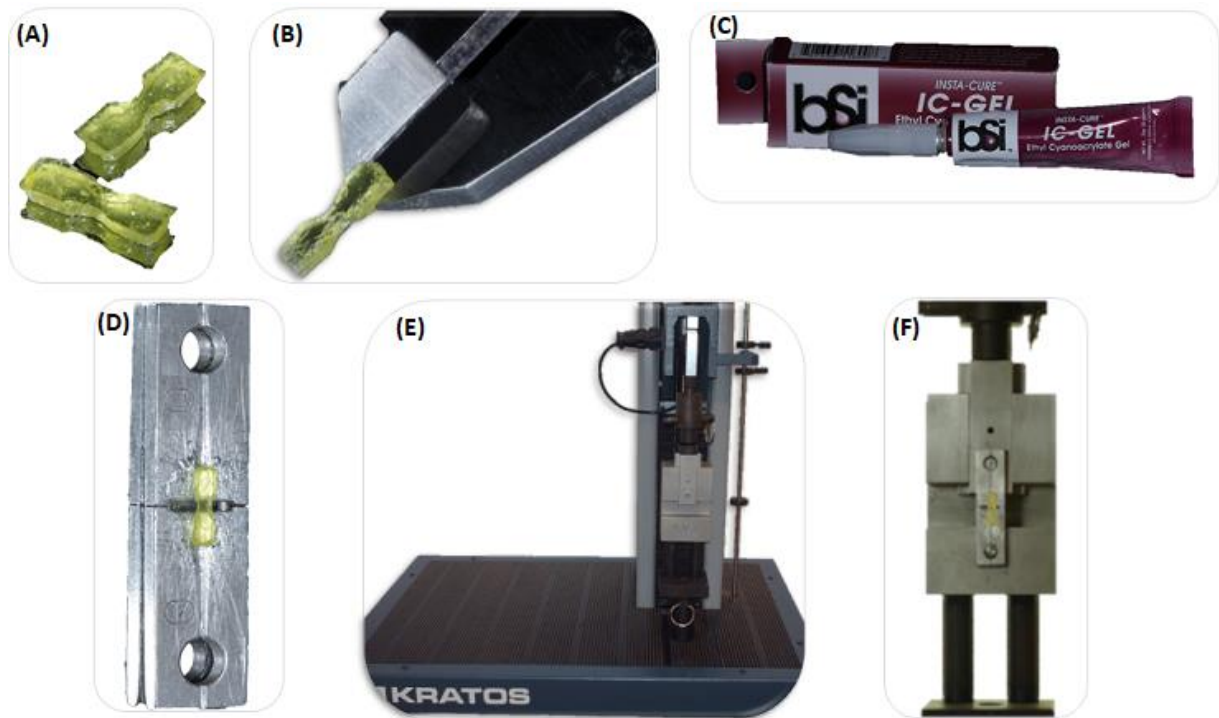


Figura 3. Protocolo para RT. (A) Corpos-de-prova (B) mensuração com paquímetro digital; (C) cola de cianoacrilato gel; (D) corpo-de-prova fixado na garra de Geraldeli; (E) Máquina de ensaios universais – Kratos; (F) conjunto garra + corpo-de-prova acoplado na máquina de ensaios universais.

3.2.2 Sorção cumulativa de água (SO) e Solubilidade (SB)

Corpos-de-prova do sistema adesivo ($n = 10$) com cada concentração de nanopartículas de cobre (0% e 0,1%) foram confeccionados em uma matriz metálica cilíndrica (5,0mm de diâmetro x 1,0mm de espessura; Odeme Prod. Odont. Ltda, Joaçaba, SC, Brasil). Após lubrificar todas as superfícies da matriz com K-Y® Gel (Johnson & Johnson, Estados Unidos), uma tira de poliéster foi colocada sobre base e a matriz foi então devidamente posicionada e encaixada sobre a base. Os adesivos foram gotejados dentro dos orifícios até o completo preenchimento. Todas as bolhas de ar visíveis foram cuidadosamente removidas com o auxílio de um microaplicador (Cavibrush® FGM, Prod Odont. Ltda, Joinville, SC, Brasil). Para evaporação do

solvente, jato de ar foi aplicado durante 20 s a uma distância de aproximadamente 10 cm.

Em seguida, uma lâmina de vidro lubrificada com K-Y® Gel foi colocada sobre a matriz, e foi realizada a fotoativação com um aparelho fotopolimerizador a base de LED por 20 s com uma intensidade de 1200mW/cm^2 (Radii-cal, SDI, Bayswater, Victoria, Austrália). Por último, os corpos-de-prova foram retirados da matriz cuidadosamente com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15, e as rebarbas de adesivo que permaneceram ao redor foram removidas (Figura 5).

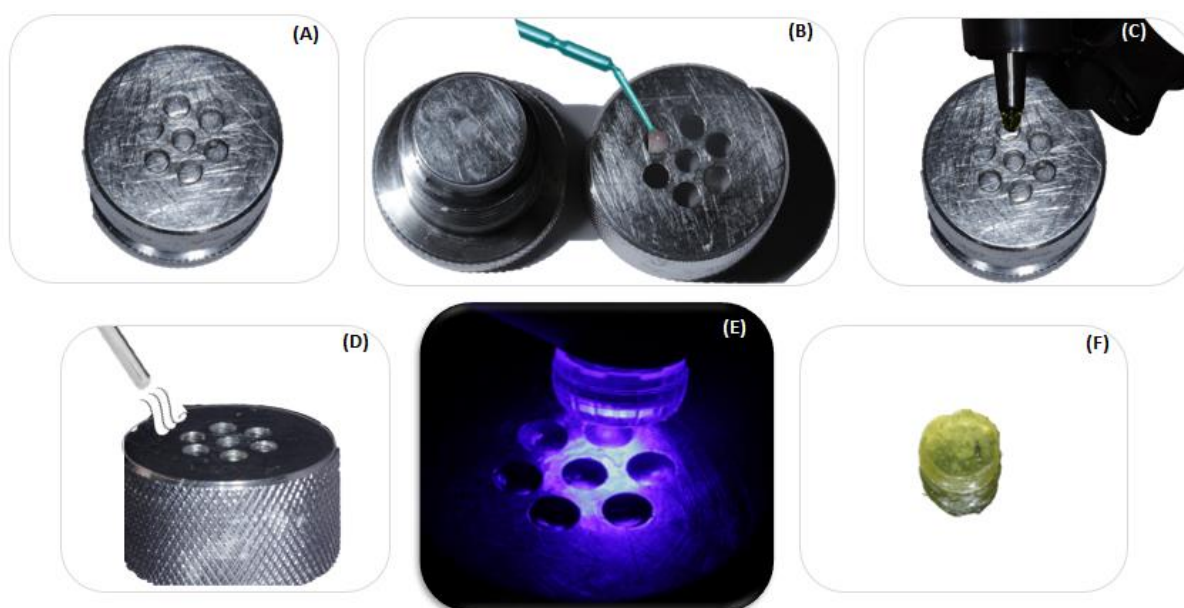


Figura 4. Confeção dos corpos-de-prova para o teste de SO e SB. (A) Matriz metálica cilíndrica; (B) lubrificação das superfícies da matriz; (C) adesivo dispensado até o completo preenchimento; (D) jato de ar - evaporação do solvente; (E) fotoativação (20s); (F) corpo-de-prova confeccionado;

Seguindo o modelo proposto por (Malacarne *et al.* ⁶⁹ 2006) e (Reis *et al.* ⁷⁰ 2007), e de acordo com a especificação ISO 4049 (Fan *et al.* ⁷¹ 2002), determinou-se a SO e SB. Posteriormente à polimerização, os espécimes foram colocados em dessecadores contendo sílica gel e armazenados em estufa pré-aquecida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias. Após esse período, os corpos de prova foram pesados em balança analítica de precisão (AY220 Marte/Shimadzu, Tóquio, Japão) em intervalos de 24 h até estabilização da massa entre dois dias consecutivos, com variação menor que 0,2 mg (m_1). Espessura e diâmetro foram medidos com auxílio de um paquímetro digital (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Kanagawa, Tóquio, Japão) de precisão 0,01 mm, para cálculo do volume de cada amostra (em mm^3) (Figura 6).

Na sequência, cada espécime foi colocado em um poço contendo 10 mL de água destilada (pH 7,2) a 37 °C. Após intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8h e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 28 e 56 dias de armazenamento, os espécimes foram removidos da estufa e deixados à temperatura ambiente por 30 min. Cada espécime foi lavado separadamente em água corrente, limpo cuidadosamente com papel absorvente e pesados em balança analítica (m_2), sendo devolvidos ao poço de origem com 10 mL de água destilada fresca (Figura 6).

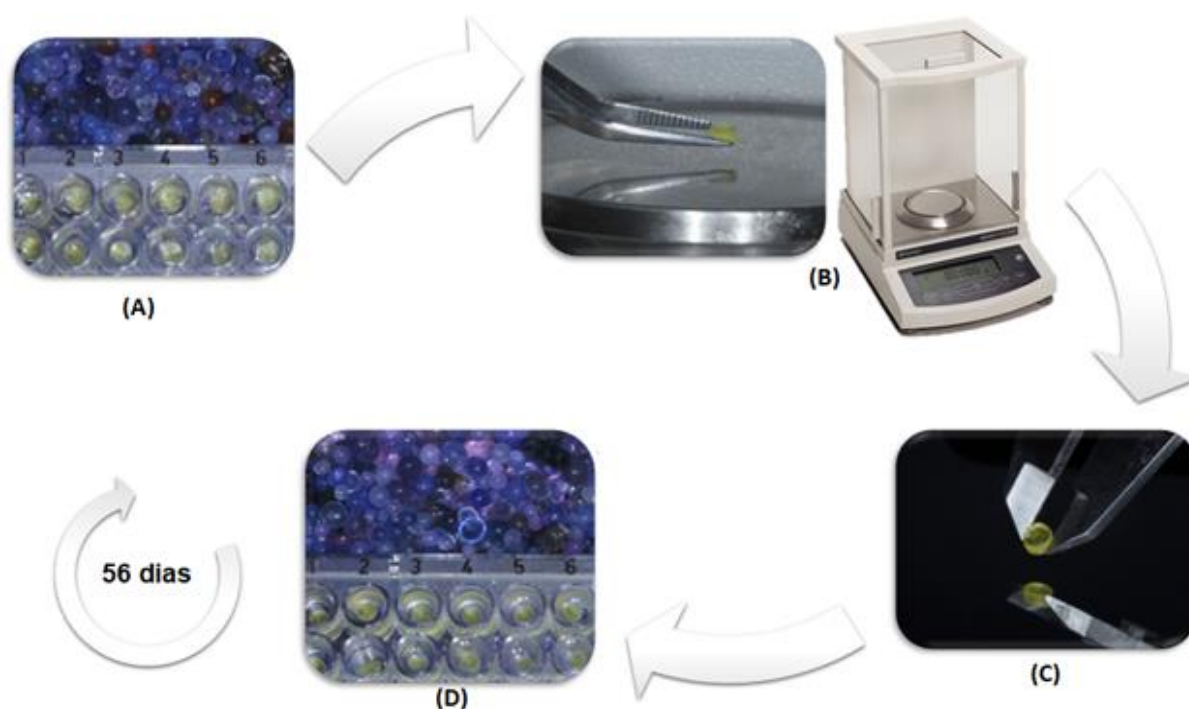


Figura 5. Protocolo de SO e SB. (A) corpo-de-prova na sílica gel em estufa pré-condicionada a 37°C; (B) pesagem; (C) mensuração com paquímetro digital; (D) armazenamento individual em poços contendo 10mL de água destilada a 37°C.

Após 56 dias de armazenamento, as amostras foram secas em dessecadores contendo sílica gel a 37 °C, permanecendo em repouso durante 10 dias ou até estabilização das massas – variações inferiores a 0,2 mg, obtendo-se uma massa constante (m_3). Para o cálculo da variação da massa, foram relacionadas as mudanças na massa com o tempo de armazenamento, resultando na cinética de SO durante todo o período de armazenamento em água. A SO e a SB ao longo dos 56 dias foram mensurados de acordo com as seguintes fórmulas:

$SO = \frac{(m_2 - m_3)}{V}$	$SB = \frac{(m_1 - m_3)}{V}$
------------------------------	------------------------------

3.2.3 Teste de Radiopacidade

Conforme anteriormente descrito para o teste de SO e SB, foram confeccionados dez corpos-de-prova ($n = 10$) de cada condição experimental (0% e 0,1%), medindo aproximadamente 5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. A partir de cortes no sentido longitudinal de um molar humano hígido, foram obtidas fatias de dente (esmalte-dentina) também de 1 mm de espessura. Selecionada uma fatia de dente, esta e os corpos-de-prova de ambas as condições experimentais foram submetidos a 5 radiografias digitais, todos posicionados no mesmo filme para posterior comparação. A metodologia usada para tomada radiográfica foi adaptada segundo (Martins *et al.* ⁷² 2015) com tempo de exposição padronizado em 0.5 s e a posição do feixe central do raio-x incidindo sobre o filme em um ângulo de 90°, distante aproximadamente 30 cm e paralelismo entre o cone e o filme, operando a 7 mA e 70 kVp (Heliodent Vario Sirona, Bensheim, Alemanha).

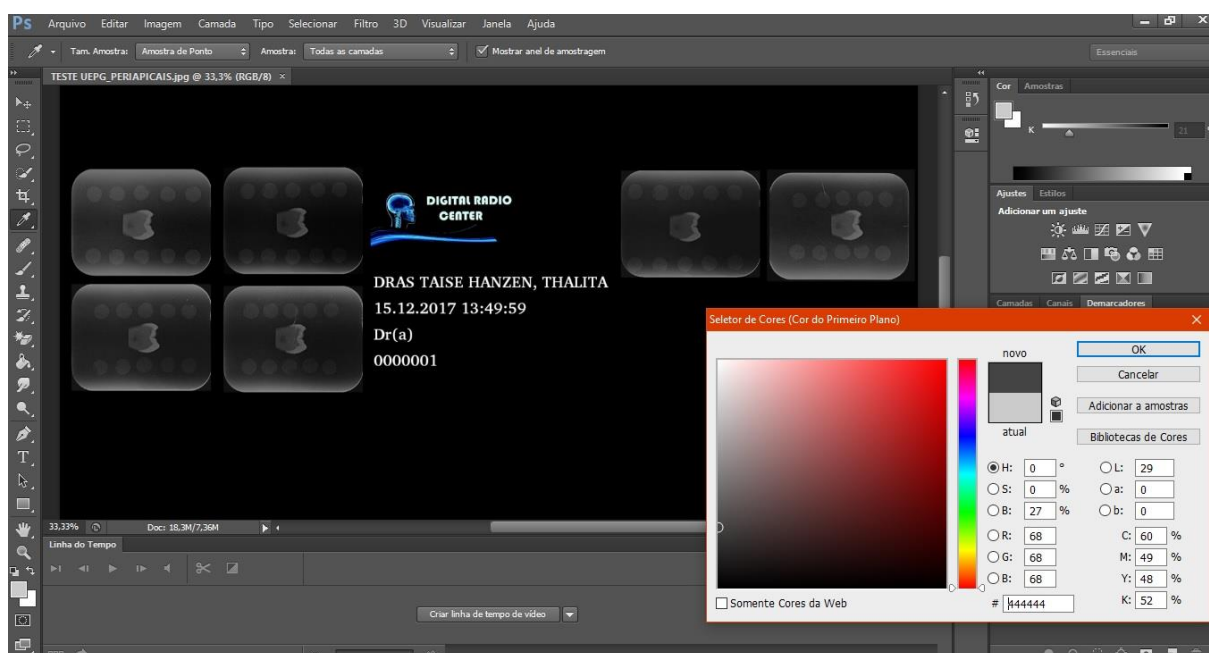


Figura 6. Análise das radiografias digitais a partir da função histograma do software de computação gráfica (Adobe Photoshop).

A radiopacidade digital foi mensurada por análise de histograma e os valores da escala de cinza para cada condição testada (esmalte, dentina e corpo-de-prova de adesivo) foram mensurados a partir da função histograma do software de computação gráfica (Adobe Photoshop CS5 Extended, Adobe Systems, San Jose, CA, EUA), a fim de verificar as diferenças entre os tons de cinza. A radiografia digital determina

nuances de níveis de cinza variando do 0 (preto) ao 255 (branco), mensurada para cada pixel da imagem radiográfica (Figura 7).

3.3 ETAPA 2

Para esta etapa, 120 molares humanos hígidos obtidos do Banco de Dentes Humanos da UEPG foram utilizados. Os dentes foram desinfetados em cloramina 0,5% e armazenados em água destilada trocada semanalmente até sua utilização. O preparo dos dentes incluiu a remoção da superfície do esmalte oclusal com uma máquina recortadora de gesso (VH Softline, São Paulo, SP, Brasil), sob irrigação a água até a exposição da dentina e o esmalte lateral foi desgastado com a ponta diamantada nº 4137 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em alta rotação sob irrigação constante deixando apenas tecido dentinário (Figura 8). A seguir, a *smear layer* foi padronizada por 60s, utilizando lixas carbeto de silício de granulação #600 (Extec, Enfield, CT, EUA) sob irrigação com água. Posteriormente, os dentes foram aleatoriamente distribuídos em doze condições experimentais (n = 10) com base na combinação das variáveis, isto é concentração de cobre no sistema adesivo [0 e 0,1%] vs. superfície dentinária [H: dentina hígida, C: dentina cariada e E: dentina erosionada] vs. estratégias adesivas [TE e SE] (Figura 9).

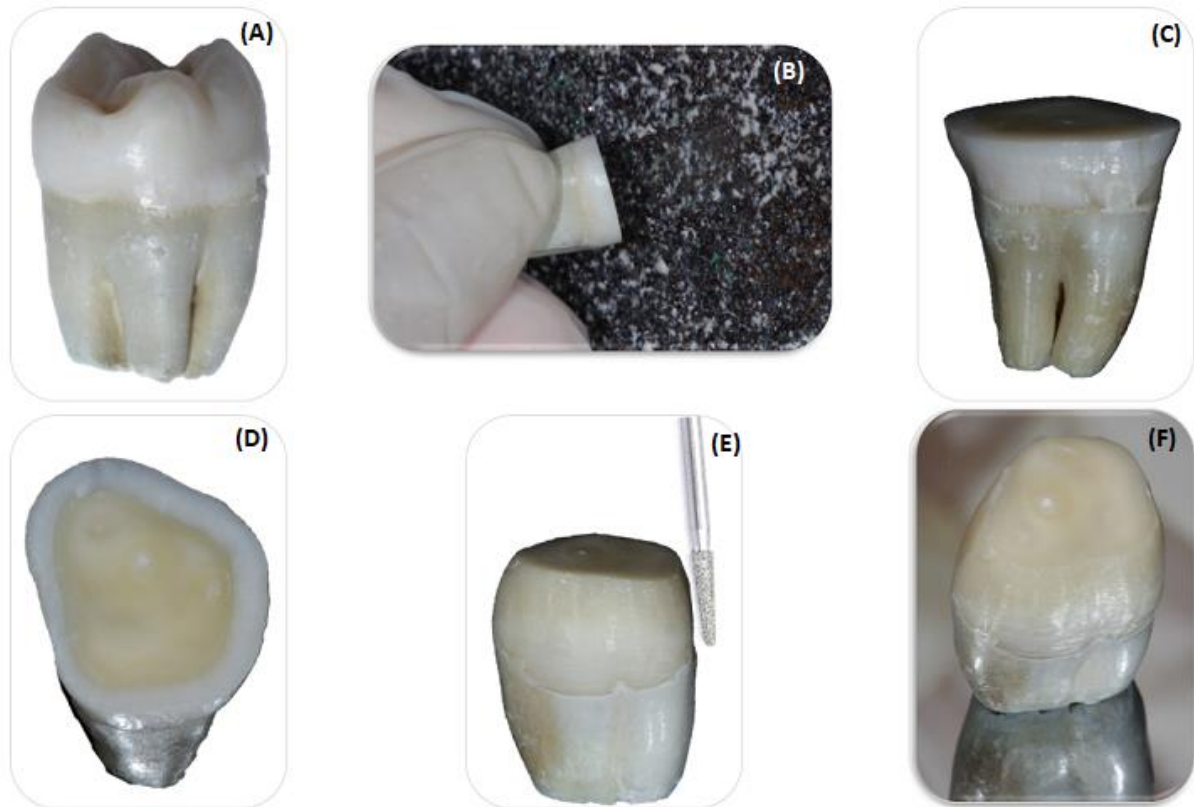


Figura 7. Preparo dos dentes. (A) molar humano hígido obtido no Banco de Dentes Humanos; (B) remoção esmalte oclusal em recortador de gesso; (C e D) aspecto do dente após remoção do esmalte oclusal; (E) esmalte lateral desgastado com ponta diamantada em alta rotação; (F) preparo finalizado.

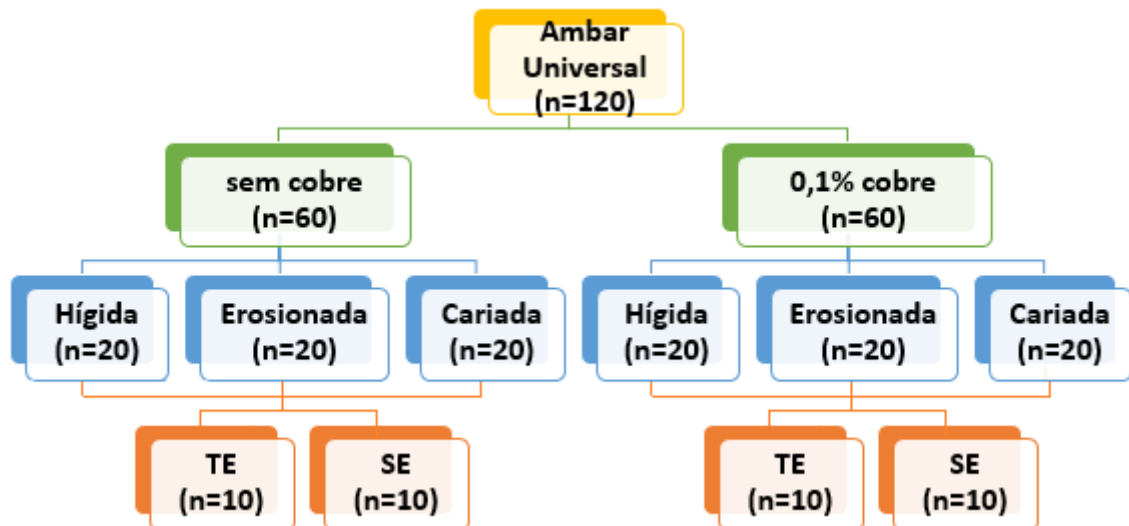


Figura 8. Fluxograma do desenho experimental.

3.3.1 Modelo de ciclagem erosiva

Após o preparo da superfície oclusal dos dentes ($n = 40$), os mesmos tiveram toda a superfície protegida com uma camada de verniz de unhas (Colorama Maybelline Ltda, Sao Paulo, SP, Brasil) com exceção da superfície oclusal, e foram submetidos a ciclos de desmineralização erosiva com um refrigerante, quatro ciclos por dia, durante 5 dias (Figura 10). Cada ciclo consistiu na imersão dos dentes em um refrigerante (Coca-Cola, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por 90 s, seguida por lavagem com água deionizada (10s) e imersão em solução remineralizante (4.08 mM H_3PO_4 , 20.10 mM KCl, 11.90 mM Na_2CO_3 e 1.98 mM $CaCl_2$ - pH 6.7, 10 mL / espécime, não agitados, 25 ° C) durante 1 h, adaptado segundo (Zimmerli *et al.* ⁷³ 2012).



Figura 9. Protocolo da ciclagem erosiva *in vitro*. (A) imersão dos dentes em Coca-Cola (90 s sob agitação); (B) lavagem com água deionizada (10 s); (C) imersão em solução remineralizante (3 h); (D) aspecto dentina erosionada.

Após cada ciclo, as soluções foram descartadas para evitar qualquer tipo de contaminação e nova solução foi empregada. Os dentes foram mantidos em temperatura ambiente durante a ciclagem e em estufa bacteriológica a 37 °C após o processo erosivo.

3.3.2 Modelo de lesões de cárie artificial em dentina

Quarenta molares hígidos retirados do banco de dentes humanos foram submetidos ao desenvolvimento de lesões de cárie artificial. Após o preparo da superfície oclusal, cada dente teve toda a superfície protegida com uma camada de verniz de unhas (Colorama Maybelline Ltda, Sao Paulo, SP, Brasil) com exceção da superfície oclusal, para que esta ficasse em contato com a solução cariogênica.

De acordo com a metodologia adaptada por (Marquezan *et al.* ⁷⁴ 2009), os dentes foram depositados assepticamente em tubos de ensaio contendo 25 mL de uma solução cariogênica, composta por 3,7 g de cultura BHI suplementada com 0,5 g de extrato de levedura, 2,0 g de sacarose, 1,0 g de glicose em 100 mL de água destilada e 100 mL de cultura primária jovem de *S. mutans* ATCC25175, com o pH em torno de 4,0. Os tubos de ensaio foram incubados a 37 °C em jarra de anaerobiose (microaerofílica - sistema BL GasPak, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, EUA). A cada 48 h, o caldo foi desprezado e sem fazer a lavagem dos dentes, estes foram transferidos para um novo tubo de ensaio contendo solução de cárie artificial, com nova inoculação de *S. mutans*. Após 14 dias, os dentes foram esterilizados em ciclo de autoclave e lavados em água deionizada, finalizando o ciclo cariogênico (Figura 11).

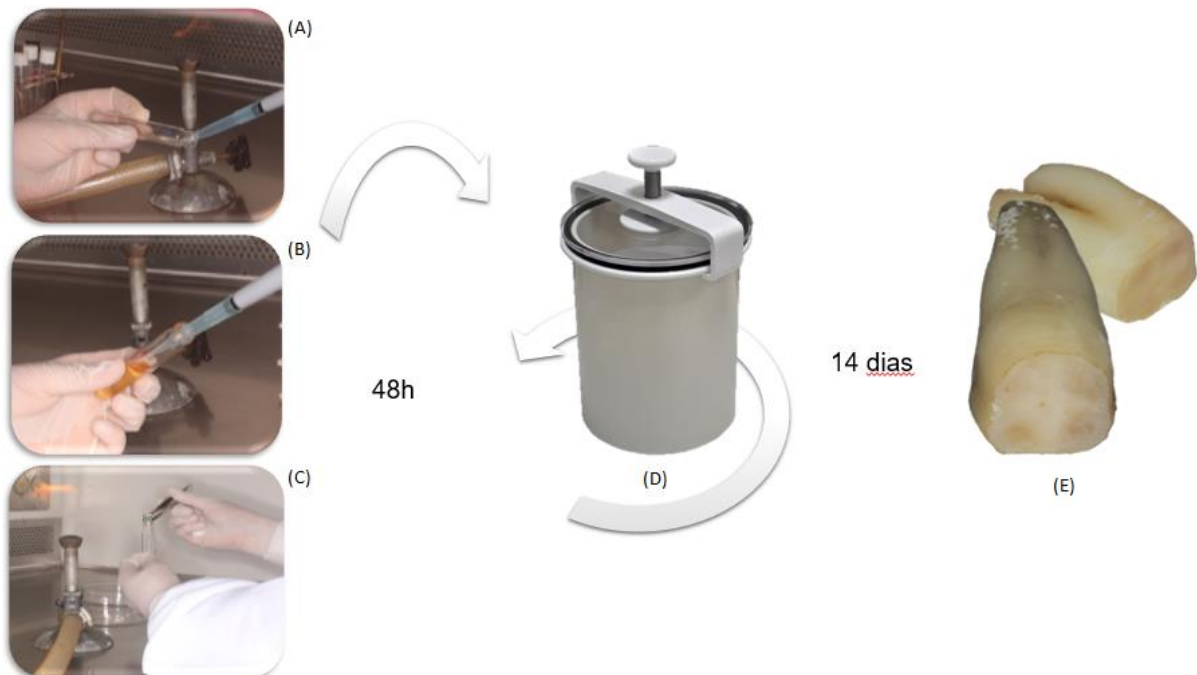


Figura 10. Protocolo da indução de lesões de cárie artificial (A e B) inoculação de *S. mutans* à solução de cárie artificial; (C) dentes transferidos assepticamente para os tubos de ensaio; (D) incubação em jarra de anaerobiose; (E) aspecto da dentina cariada.

Antes do procedimento restaurador, a superfície oclusal de cada dente foi polida em lixas de carbeto de silício de granulação #600, durante um tempo previamente testado e padronizado em 30 s, após análise da dureza de superfície em microdurômetro, no intuito de remover apenas a dentina infectada, para que a adesão fosse testada sobre dentina afetada.

3.3.3 Procedimento restaurador e obtenção dos palitos de resina-dentina

O passo a passo de todos os procedimentos de adesão está descrito na Tabela 1. Os sistemas adesivos foram aplicados de acordo com as recomendações do fabricante e fotoativados com um aparelho fotopolimerizador Radii Cal (SDI, Bayswater, Victoria, Australia; 1200 mW/cm²) (Figura 12).

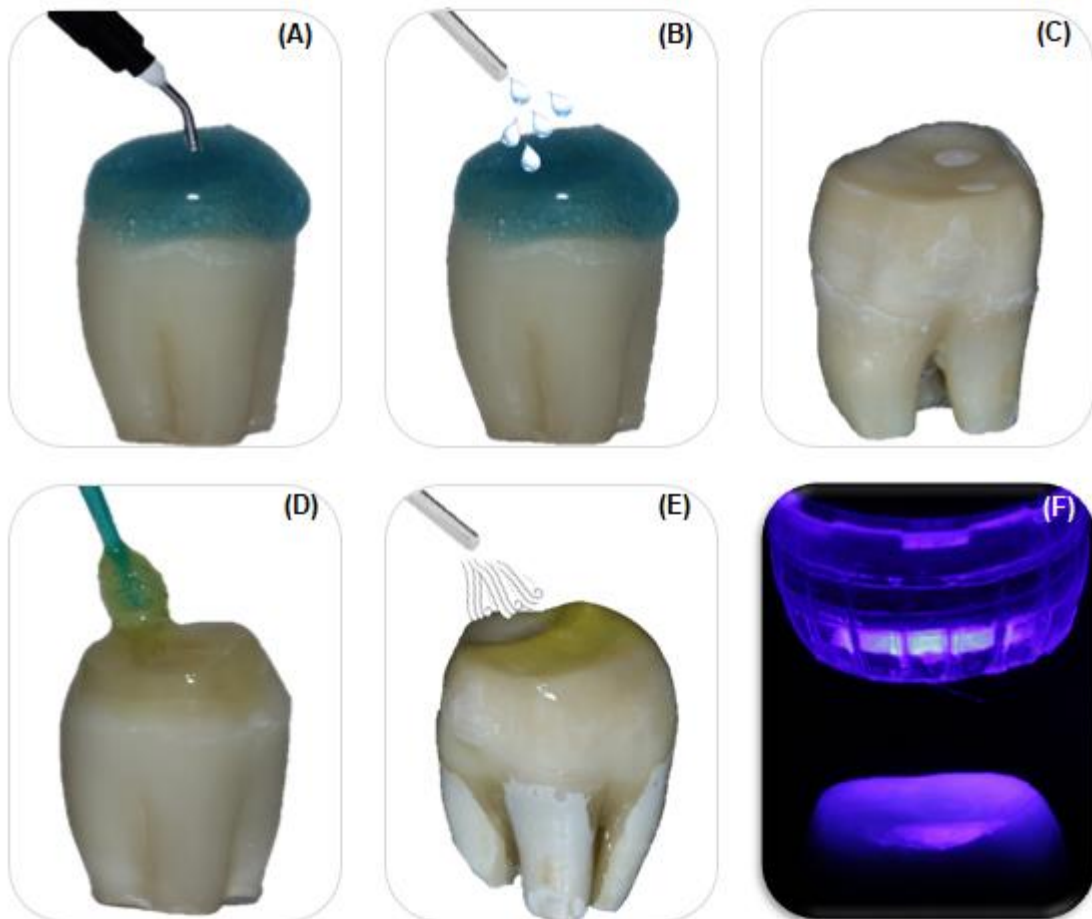


Figura 11. Estratégia adesiva convencional. (A) condicionamento ácido; (B) lavagem e secagem; (C) aspecto do dente após condicionamento ácido; (D) aplicação do adesivo; (E) jato de ar - evaporação do solvente; (F) fotoativação. (Todos os procedimentos realizados segundo as indicações do fabricante, discriminados na Tabela 1).

Em seguida, esses dentes foram incrementalmente restaurados com resina composta (Opalis, FGM, Joinville, SC, Brasil) e as três camadas foram

fotopolimerizadas por 20 s cada com o mesmo aparelho fotopolimerizador previamente descrito. Após armazenamento dos dentes em água destilada a 37 °C por 24 h, os mesmos foram fixados com cera pegajosa aquecida (Asfer Indústria Química Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em um dispositivo que, acoplado à máquina de corte (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) permite que os dentes sejam seccionados longitudinalmente nas direções mesio-distal e vestibulo-lingual através da interface adesiva, com ajuda de um disco de corte diamantado, em baixa velocidade, sobre irrigação constante para se obter palitos de resina-dentina (Figura 13). Registrou-se o número de palitos que apresentavam falha prematura (FP) para cada dente.

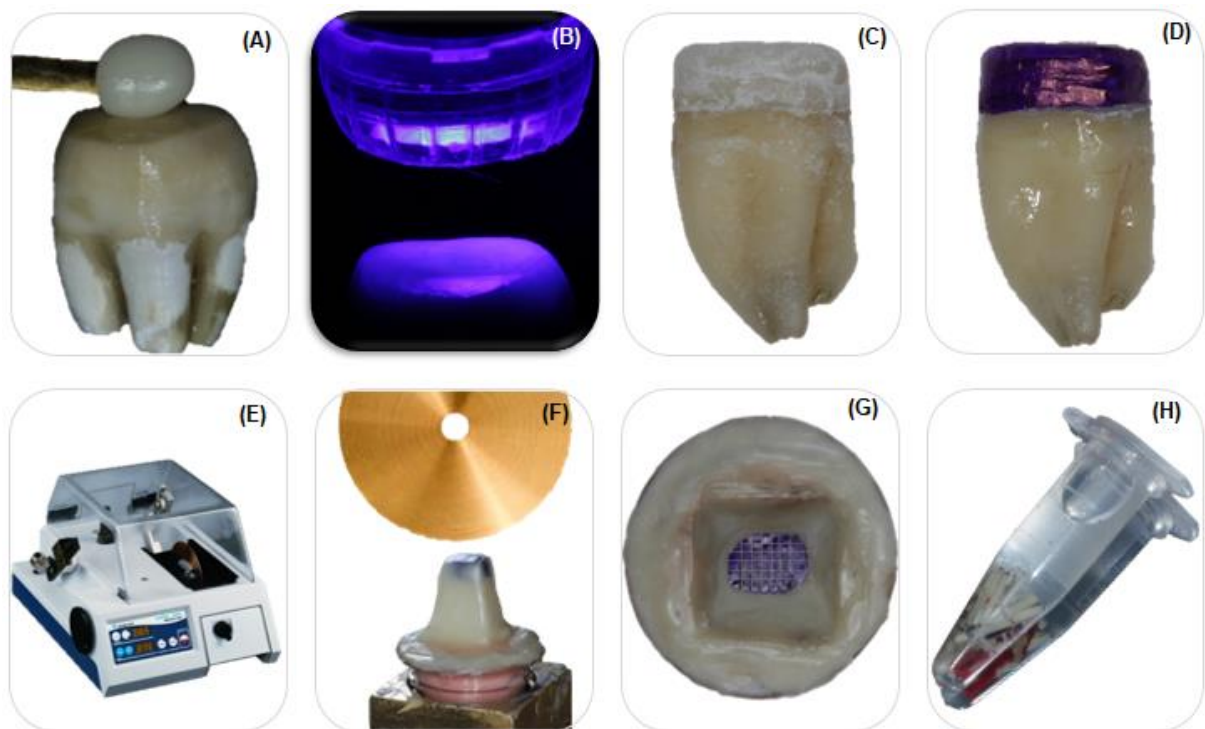


Figura 12. Protocolo para a obtenção dos palitos resina-dentina. (A) Restauração com resina composta em 3 incrementos; (B) fotoativação; (C) dente restaurado; (D) restauração marcada com caneta permanente; (E) Isomet 1000 – Máquina utilizada para o corte dos dentes; (F) dente fixado com cera pegajosa ao dispositivo da máquina de corte; (G) cortes perpendiculares nos sentidos M-D e V-L; (H) palitos armazenados em *eppendorfs* contendo água destilada.

3.3.4 Resistência de união à microtração (RU)

Com o auxílio de um paquímetro digital (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Tóquio, Japão), foi mensurada a área de secção transversal de cada palito, aproximada de 0,8 mm². Em seguida, os mesmos foram individualmente fixados em garras de Geraldeli (Perdigao *et al.* ⁷⁵ 2002) com cola de cianoacrilato gel (IC-GEL™, BSI,

Atascadero, CA, EUA) que permite o controle da aplicação, de forma que as extremidades sejam fixadas e a interface seja posicionada ao centro da garra. Após polimerização da cola, o conjunto garra – palito foi acoplado na máquina de ensaios universais (Kratos Dinamometros, Cotia, SP, Brasil) e testado a 0,5 mm/min de tensão, com uma carga de 100 N, até a ruptura da interface adesiva, para obter valores de RU em MPa (Figura 14).

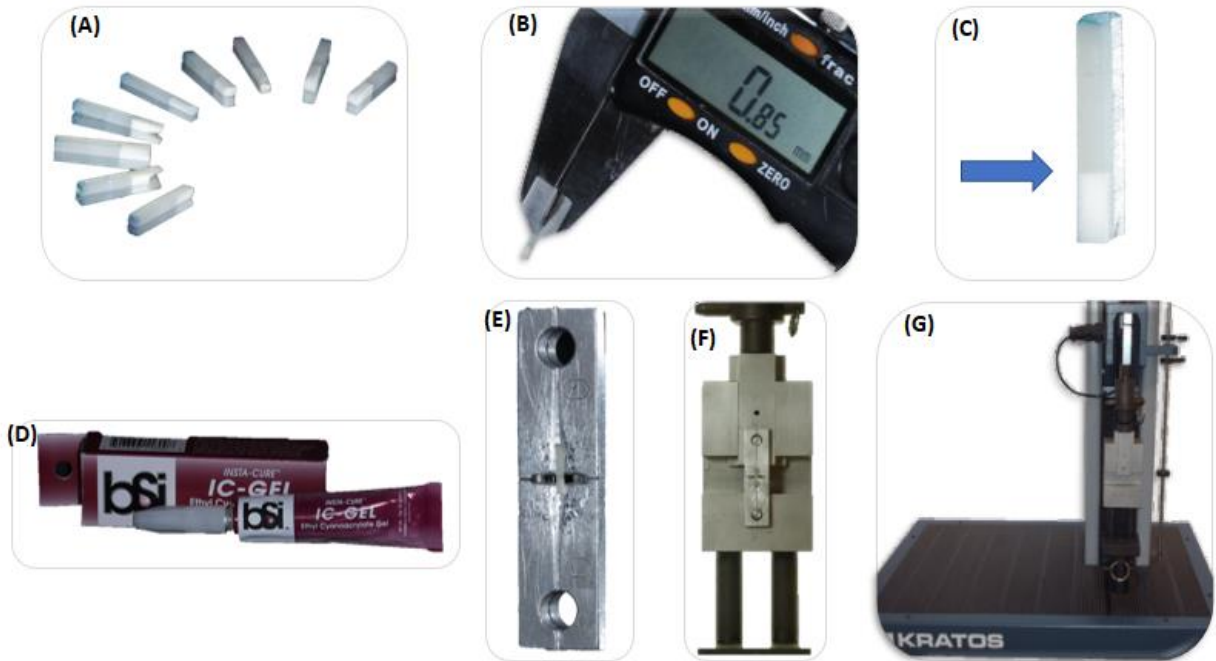


Figura 13. Protocolo para RU. (A) palitos de resina-dentina; (B) mensuração com paquímetro digital; (C) seta azul indicando a interface adesiva; (D) cola de cianoacrilato gel; (E) palito fixado na garra de Geraldeli; (F) conjunto garra-palito acoplado na máquina de ensaios universais; (G) Kratos – Máquina de ensaios universais.

Utilizando uma lupa estereoscópica com magnificação de 100 x (Olympus SZ40, Shinjuku-ku, Tóquio, Japão), classificou-se a falha de cada palito segundo o tipo de fratura em: coesiva em dentina (falha coesiva exclusiva dentro da dentina) (CD); coesiva em resina (falha de exclusividade dentro da resina) (CR); adesiva/mista (falha na interface resina / dentina que incluiu falha coesiva dos substratos vizinhos) (A/M) (Figura 15) e falhas prematuras (palitos que fraturaram antes dos testes).

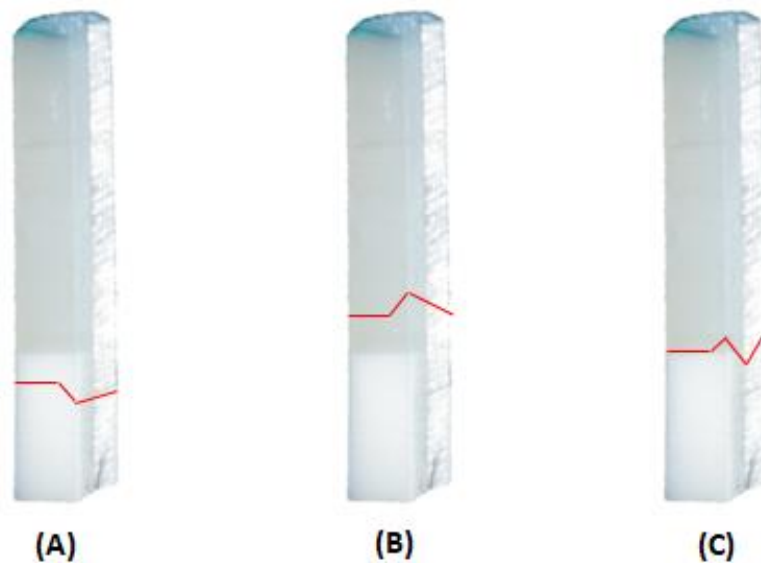


Figura 14. Esquema de classificação das falhas de acordo com o tipo de fratura. (A) falha CD exclusivamente em dentina; (B) falha CR exclusivamente em resina composta; (C) falha A/M envolvendo a interface adesiva e os substratos vizinhos.

3.3.5 Nanoinfiltração (NI)

Três palitos randomizados de cada dente, que não foram testados para RU, foram imersos em solução amoniacal de nitrato de prata a 50 % em peso (Tay *et al.* ⁷⁶2002) por 24 h em ambiente escuro protegido da luz. Após esse processo, os palitos foram lavados em água destilada e armazenados em solução reveladora (Kodak, Rochester, Nova York, EUA) sob luz fluorescente por 8 h para que houvesse redução dos íons de prata ao longo das microporosidades na interface de união. Em seguida, os palitos foram fixados em *stubs* de alumínio e polidos com lixas de SiC de granulação #600, #1000, #1200, #1500, #2000 e #2500 e pastas diamantadas granulação 1 e 0,25 μm (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), com banho em cuba ultrassônica entre as lixas por 5 min.

Por fim, os *stubs* foram lavados em cuba ultrassônica por 10 min, desidratados em ambiente contendo sílica durante 24 h e metalizados com ouro-carbono (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) (Figura 16). As interfaces foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no modo de elétrons retroespalhados a 12 kV (Vega 3 Tescam, Shimadzu, Tóquio, Japão), na magnificação de 600x.



Figura 15. Preparação de amostras para NI: (A e B) imersão dos palitos em solução aquosa de nitrato de prata na ausência de luz (24h); (C) imersão em solução reveladora sob luz fluorescente (8h); (D) palitos revelados montados em *stubs* de alumínio; (E) palitos dessecados em sílica (24h); (F) metalização carbono-ouro.

Três microfotografias foram obtidas para cada espécime: a primeira ao centro, e as outras duas a 0,3 mm para direita e esquerda a partir da primeira microfotografia (Reis *et al.* ⁷⁷ 2007). A porcentagem de nanoinfiltração dentro das camadas adesiva e híbrida foram mensuradas por um software específico de domínio público *Image J Software Program* (version 1.42q; NIH, Bethesda, Maryland, EUA) (Schneider *et al.* ⁷⁸ 2012).

3.3.6 Grau de conversão – Espectroscopia micro-Raman

O grau de conversão (em palitos de resina-dentina preparados) foi analisado por espectroscopia micro-Raman (Guzman-Armstrong *et al.* ⁷⁹ 2003). Após polidos em lixas de Sic de granulação #1500 e #2000 e lavados em cubra ultrassônica, três palitos ($n = 3$) de cada condição experimental foram submetidos ao espectrômetro / microscópio micro-Raman dispersivo (Horiba Scientific Xplora, Villeneuve d'Ascq, França) (Figura 17), com um laser diodo de 638 nm através de uma objetivo de X100

/ 0,9 NA. O sinal Raman foi adquirido com grade de 600 linhas / mm, centrado entre 10 e 3400 cm^{-1} , e os parâmetros de configuração foram: 100 Mw de potência, resolução espacial de 3 μm , resolução espectral 5 cm^{-1} , tempo de acumulação de 30 s com 5 co-adições. Os espectros foram obtidos na interface dentina-adesiva, em três sítios aleatórios (por palito) na dentina infiltrada intertubular. Antes das análises, o equipamento foi calibrado para redefinir o zero utilizando padrões de silício com valores de coeficiente conhecidos e os espectros de adesivos não polimerizados foram tomados como referência.



Figura 16. Grau de conversão (Raman): (A) polimento da amostra em lixa carbureto de silício #1500; (B) lavagem dos palitos em cuba ultrassônica; (C) equipamento Raman para leitura do espectro.

A proporção de ligações duplas do adesivo não-polimerizado e após polimerização (conversão monômero em polímero) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

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

Considerando as ligações duplas dos carbonos alifáticos (1639 cm^{-1} , pico reativo, onde verificam-se as mudanças) e aromáticos (1609 cm^{-1} , pico referência, estável, sem mudanças), para ambas as análises (polimerizado e não-polimerizado) foram determinados os valores da integrada (i) e a altura dos picos registrados utilizando o software do equipamento.

3.3.7 Análise morfológica da camada híbrida – Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG)

Após polimento usando lixa de SiC de granulação #1500, 2000 e 2500 e limpeza em cuba ultra-sônica, três palitos de resina-dentina ($n = 3$) de cada condição

experimental foram desmineralizados em HCl (6N) durante 30s e desproteinizados em NaOCl a 1% durante 10 min para revelar a camada híbrida. Em seguida, foram desidratados em graus ascendentes de etanol: 25% (20 min), 50% (20 min), 75% (20 min), 95% (30 min) e 100% (60 min) (Yiu *et al.* ⁸⁰ 2005). Por fim, os palitos foram montados em *stubs* e revestidos com ouro-carbono em um evaporador de vácuo (SCD 050, Balzers). A superfície foi examinada sob um microscópio eletrônico de varredura (Vega, Tescan, Warrendale, PA, EUA), sendo realizadas três fotomicrografias de áreas de superfície representativas com uma ampliação de 5000X.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os testes da etapa 1, os dados de SO e SB foram submetidos ao teste-t pareado (concentração de cobre) e os dados de RT (MPa) a análise de variância de 2 fatores (concentração de cobre vs. período de armazenamento). No caso dos dados de radiopacidade, foi utilizada análise de variância de fator único (concentração de cobre). Quanto a etapa 2, os resultados de RU (MPa), NI (%) e GC (Raman) foram analisados por análise de variância de 3 fatores (concentração de cobre vs. substrato vs. estratégia). Para múltiplas comparações, foi aplicado o teste *post-hoc* de Tukey, sendo a significância estatística pré-estabelecida em $\alpha=0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ETAPA 1

4.1.1 Resistência máxima à tração

Os resultados de RT, testados após 24 h e 28 dias estão apresentados na Tabela 4. Foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os tempos de armazenamento, com aumento da resistência após 28 dias. Entre as concentrações de cobre no adesivo para o mesmo tempo, não foram registradas diferenças estatísticas.

Tabela 2. Médias $\pm$ desvios padrão de resistência máxima à tração (RT) dos grupos controle (0%) e experimental (0,1% Cu), nos tempos imediato (IM) e após 28 dias de armazenamento.

Concentração	24 h	28 dias
0% Cobre	22,3 $\pm$ 3,1 B,C	29,9 $\pm$ 2,9 A
0,1% Cobre	18,3 $\pm$ 0,7 C	24,9 $\pm$ 2,8 A,B

(*) Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (teste post-hoc de Tukey, $p \geq 0,05$).

4.1.2 Sorção cumulativa de água e solubilidade

Os resultados de SO e SB encontram-se na Tabela 5 e no gráfico (Figura 19). A adição de cobre não alterou estatisticamente os valores de SO e SB, comparado ao grupo controle.

Tabela 3. Sorção cumulativa de água (SO) e Solubilidade (SB) dos grupos controle (0%) e experimental (0,1% Cu) após 56 dias de armazenamento em água.

Concentração	SORÇÃO ($\mu\text{g}/\text{mm}^3 \cdot 10^{-6}$)	SOLUBILIDADE ($\mu\text{g}/\text{mm}^3 \cdot 10^{-6}$)
0% Cobre	163,4 $\pm$ 35,1 A	119,7 $\pm$ 19,7 a
0,1% Cobre	156,7 $\pm$ 28,1 A	124,3 $\pm$ 39,3 a

(*) Letras iguais maiúsculas e minúsculas indicam resultados estatisticamente similares dentro de cada propriedade (teste post-hoc de Tukey, $p \geq 0,05$).

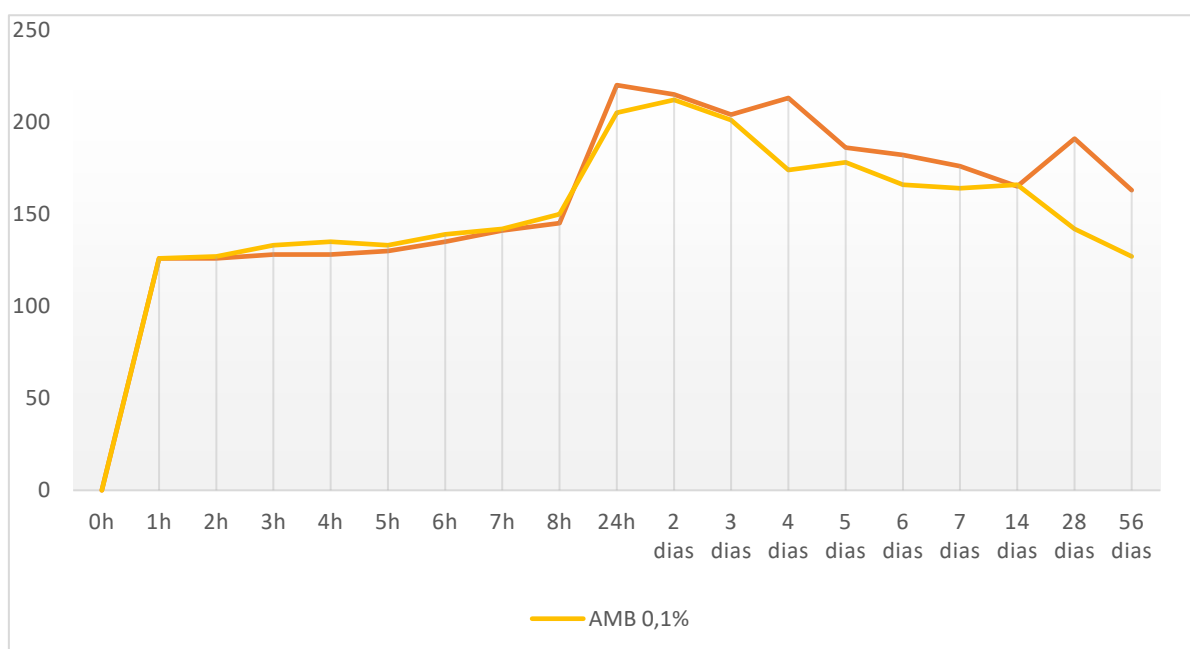


Figura 17. Gráfico representativo das médias de SO ao longo dos 56 dias. Linha em laranja: AMB CT; linha em amarelo: AMB 0,1% cobre.

4.1.3 Radiopacidade

Os resultados para RC encontram-se na Tabela 6. A adição de cobre no sistema adesivo testado não provocou alteração significativa na escala de cinza.

Tabela 4. Médias $\pm$ desvios padrão da radiopacidade do esmalte, dentina e dos sistemas adesivos - grupos controle (0%) e experimental (0,1% Cu), por análise em histograma da escala de cinza.

Concentração	Escala de cinza
Esmalte	91 $\pm$ 3,4 A
Dentina	66 $\pm$ 5,1 B
0% Cobre	48,5 $\pm$ 2,1 C
0,1% Cobre	49,5 $\pm$ 2,9 C

(*) Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (teste post-hoc de Tukey, $p \geq 0,05$).

4.2 ETAPA 2

4.2.1 Resistência de união à microtração

Aproximadamente 15-20 palitos de resina-dentina foram obtidos por dente, incluindo os que falharam prematuramente. A área de secção transversal média foi de 0.8 mm². O padrão de falha e a porcentagem correspondente a cada uma encontram-se na Tabela 7. Para todos os grupos, a falha adesiva/mista prevaleceu. O número de falhas coesivas aumentou no grupo contendo cobre em comparação com o grupo controle em dentina hígida. O maior número de falhas prematuras foi observado no substrato erosionado.

Tabela 5. Número de palitos (%) de acordo com o modo de fratura.

SUBSTRATO																		
	<i>HÍGIDO</i>						<i>EROSIONADO</i>						<i>CARIADO</i>					
	TE			SE			TE			SE			TE			SE		
	A/M	C	FP	A/M	C	FP	A/M	C	FP	A/M	C	FP	A/M	C	FP	A/M	C	FP
0%	39(97)	0(0)	1(3)	35(87)	5(13)	0(0)	35(87)	4(10)	1(3)	31(77)	6(15)	3(8)	39(97)	1(3)	0(0)	39(97)	0(0)	1(3)
0,1%	29(73)	8(20)	3(7)	32(80)	6(15)	2(5)	35(87)	3(8)	2(5)	36(90)	1(3)	3(7)	40(100)	0(0)	0(0)	40(100)	0(0)	0(0)

Abreviaturas: A/M – falha adesiva / mista; C – coesiva; FP – falha prematura.

As médias e os desvios-padrão obtidos de RU para todos os grupos são mostrados na tabela 8. Ambos substratos induzidos a alterações morfológicas, erosão e cárie, reproduziram valores menores de RU, comparados ao substrato hígido. Os maiores valores médios de RU foram observados na dentina hígida. Para o substrato erosionado, valores estatisticamente maiores de RU foram encontrados quando empregado adesivo contendo cobre, independente da estratégia adesiva. No substrato cariado, a estratégia convencional apresentou resultados estatisticamente melhores de RU quando empregado o adesivo contendo cobre em comparação com a estratégia autocondicionante para o mesmo sistema adesivo.

Tabela 6. Médias $\pm$ desvios padrão de resistência de união à dentina (RU, MPa) das diferentes condições experimentais.

	SUBSTRATO					
	<i>HÍGIDO</i>		<i>EROSIONADO</i>		<i>CARIADO</i>	
	TE	SE	TE	SE	TE	SE
0% Cobre	41,58 $\pm$ 1,37 B	32,87 $\pm$ 3,32 C	25,30 $\pm$ 2,14 D	25,88 $\pm$ 1,18 D	28,58 $\pm$ 3,14 C,D	27,94 $\pm$ 3,21 C,D
0,1% Cobre	51,96 $\pm$ 1,21 A	46,24 $\pm$ 3,90 B	29,36 $\pm$ 2,03 C	29,77 $\pm$ 2,20 C	32,13 $\pm$ 1,97 C	23,61 $\pm$ 3,05 D

(*) Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (teste post-hoc de Tukey, $p \geq 0,05$).

4.2.2 Nanoinfiltração

Os dados de NI na interface de união à dentina, testados após 24 h de armazenamento em água, estão descritos na Tabela 9. Nenhum dos grupos apresentou interface livre de NI. No substrato hígido, menor grau de NI foi observado no grupo do adesivo contendo cobre independente da estratégia. Comparando as estratégias dentro de cada substrato, não foi observada diferença estatística. O pior desempenho foi observado para o substrato cariado, com deposição de nitrato de prata tanto ao longo da camada híbrida quanto abaixo, em direção aos túbulos dentinários (Figura 20).

Tabela 7. Médias $\pm$ desvios padrão da nanoinfiltração na interface de união à dentina (NI) das diferentes condições experimentais, por análise em MEV.

SUBSTRATO						
	<i>HÍGIDO</i>		<i>EROSIONADO</i>		<i>CARIADO</i>	
	TE	SE	TE	SE	TE	SE
0% Cobre	14,07 $\pm$ 3,27 B,C	16,54 $\pm$ 2,88 C	14,59 $\pm$ 2,16 B,C	11,71 $\pm$ 2,57 A,B	27,59 $\pm$ 4,52 D	29,69 $\pm$ 4,66 D
0,1% Cobre	7,31 $\pm$ 1,96 A	10,49 $\pm$ 2,48 A	11,97 $\pm$ 3,36 A,B	10,61 $\pm$ 3,09 A	28,09 $\pm$ 5,20 D	30,64 $\pm$ 5,97 D

(*) Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (teste post-hoc de Tukey, $p \geq 0,05$).

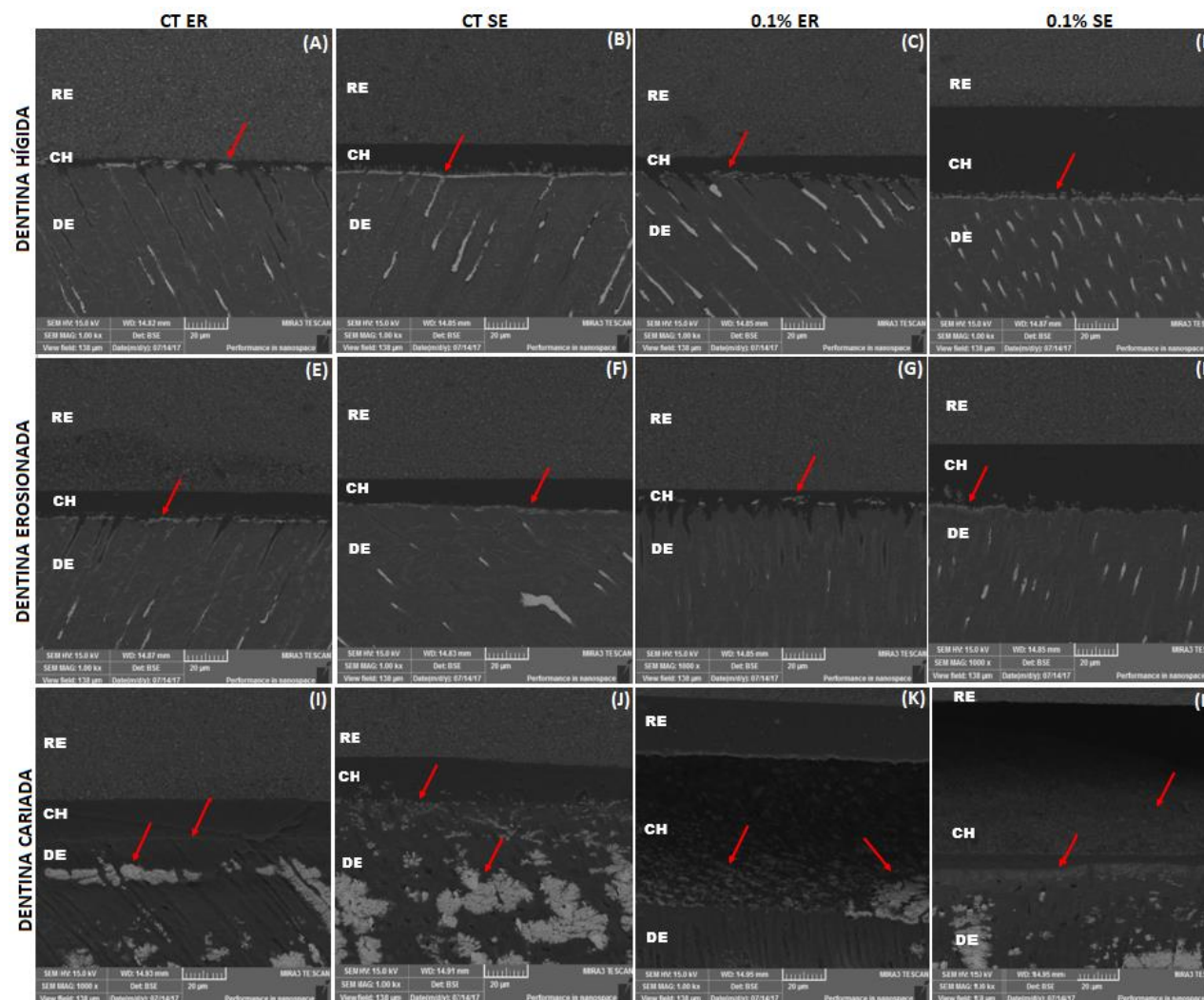


Figura 18. Imagens representativas da interface de união à dentina em MEV obtidas em cada condição experimental. RE, resina; CH, camada híbrida, DE, dentina. Nenhum grupo apresentou interface livre de nanoinfiltração. O nitrato de prata (setas vermelhas) infiltrou ao longo da camada híbrida em todos os grupos. Na dentina cariada, a deposição do nitrato de prata ocorreu dentro da camada híbrida e se estendeu para baixo, na região dos túbulos dentinários (I-L). Em dentina hígida e erosionada, a adição de 0,1% de cobre no adesivo reduziu a nanoinfiltração para ambas estratégias (C,D,G,H).

4.2.3 Grau de conversão (palitos resina-dentina)

As médias e desvios-padrão obtidos para GC dentro da camada híbrida analisados em espectroscopia Raman estão dispostos na Tabela 10. Em dentina hígida, valores médios de GC mais elevados foram observados no grupo controle quando empregada a estratégia convencional. Quando o sistema adesivo foi aplicado no modo autocondicionante, as maiores médias dos valores de GC foram observadas para o grupo cariado. Por outro lado, comparando os diferentes tipos de substratos, menor GC foi revelado pelo substrato erosionado, quando utilizado sistema adesivo contendo cobre na estratégia convencional.

Tabela 8. Médias $\pm$ desvios padrão do grau de conversão (GC) das diferentes condições experimentais, por análise em espectroscopia Raman.

SUBSTRATO						
	<i>HÍGIDO</i>		<i>EROSIONADO</i>		<i>CARIADO</i>	
	TE	SE	TE	SE	TE	SE
0% Cobre	83,30 $\pm$ 1,8 A	75,22 $\pm$ 3,0 B,C	78,69 $\pm$ 3,0 A,B	78,54 $\pm$ 2,2 A,B	76,13 $\pm$ 3,0 B,C	81,06 $\pm$ 2,4 A,B
0,1% Cobre	77,73 $\pm$ 3,8 A,B	70,52 $\pm$ 2,1 C	63,80 $\pm$ 1,5 D	72,91 $\pm$ 4,0 C	80,84 $\pm$ 1,0 A,B	77,15 $\pm$ 2,5 B

(*) Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (teste post-hoc de Tukey, $p \geq 0,05$).

4.2.4 Análise morfológica da camada híbrida

A análise da formação de *tags* resinosos com fins ilustrativos foi realizada por FEG. As fotomicrografias (5000 X) representativas obtidas a partir da análise morfológica das interfaces resina-dentina de cada condição experimental estão apresentadas na Figura 21. Para dentina hígida, observou-se uma camada híbrida com maior integridade, com maior número e maior formação de *tags* de resina em comparação com os demais substratos. Para dentina erosionada, essas características foram mais evidenciadas no modo autocondicionante se comparado ao convencional. As imagens de dentina cariada mostram camadas híbridas com incompleta formação de *tags* e em número muito menor quando comparado com o substrato hígido.

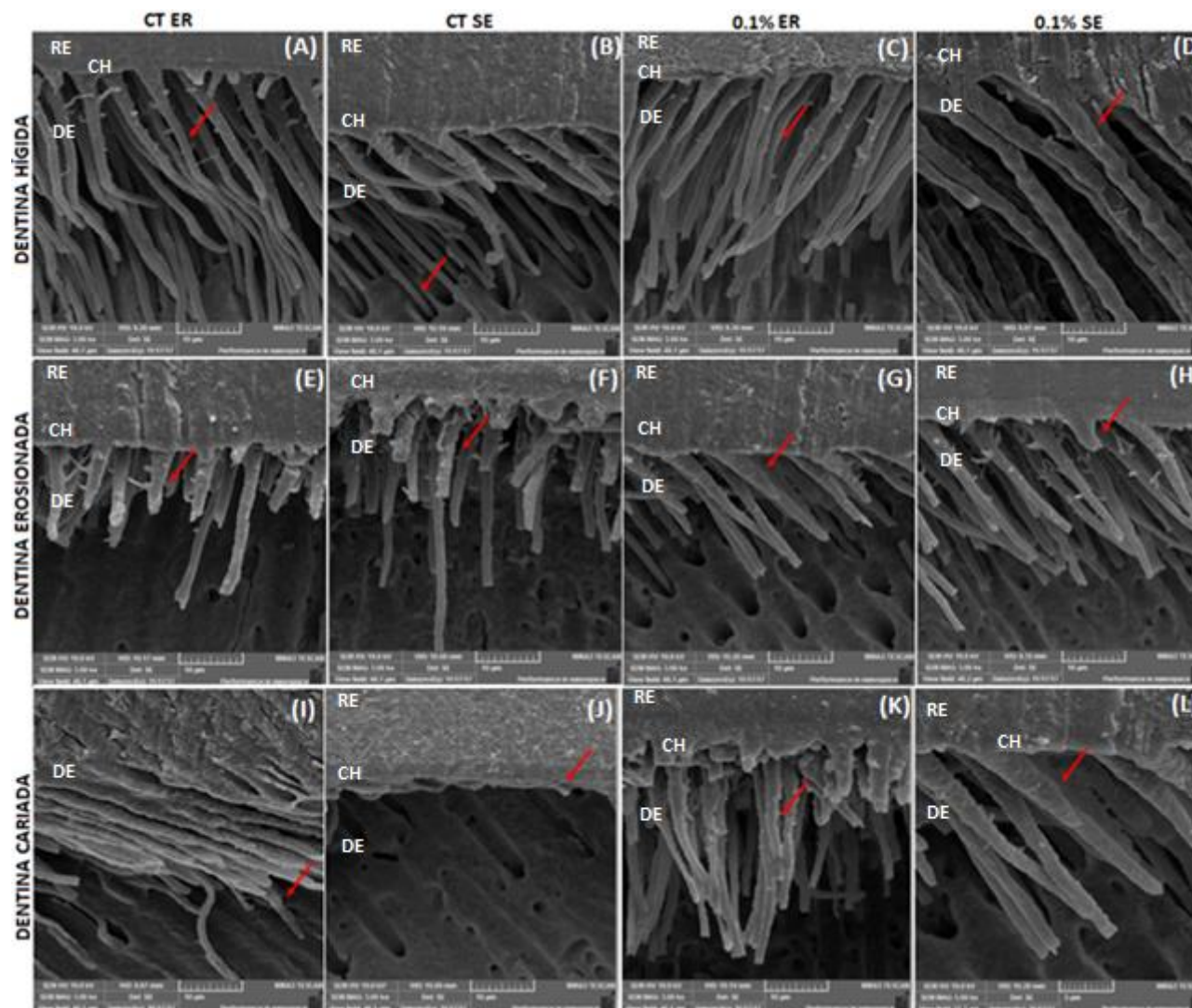


Figura 19. Fotomicrografias representativas das imagens obtidas por FEG (5000X) de cada condição experimental. Em dentina hígida, maior formação de tags resinosos foi obtida (A-D) (setas vermelhas) em comparação com os demais substratos. Em dentina erosionada e cariada, as setas vermelhas indicam a formação de uma camada híbrida com incompleta formação de tags e em menor número (E-L).

5 DISCUSSÃO

Conforme o estudo de Gutiérrez et al (Gutiérrez et al. ⁶⁰ 2017), quando a concentração de 0,1% de cobre foi avaliada em um adesivo convencional, este mostrou ter capacidade antimicrobiana, sem afetar as propriedades mecânicas e adesivas, e esse foi o principal motivo para a escolha e utilização desta mesma concentração no presente estudo.

A radiopacidade é uma propriedade física de interesse, já que permite ao material contrastar com a estrutura dental nas radiografias (Hara et al. ⁸¹ 2001), minimizando possíveis erros de interpretação radiográfica, assim como falso diagnóstico de cárie adjacente às margens da restauração (Espelid et al. ⁸² 1991) e detecção de falhas marginais (Tveit e Espelid ⁸³ 1986), evitando trocas desnecessárias de restaurações (Pamir et al. ⁸⁴ 2010). Visto que, a maioria dos sistemas adesivos disponíveis no mercado são radiolúcidos (Hotta e Yamamoto ⁸⁵ 2009), a obtenção de um adesivo com características de radiopacidade seria interessante e, esta foi uma das tentativas quando se decidiu por testar a inclusão das nanopartículas de cobre ao sistema adesivo. Entretanto, não foi observada diferença no histograma da escala de cinza entre as amostras, as quais apresentaram grau de radiolucidez mais próximo da dentina (Yoshida et al. ⁸⁶ 2012), possivelmente pela baixa concentração de cobre utilizada no estudo, a ponto de não gerar radiopacidade perceptível radiograficamente.

Com relação às propriedades mecânicas testadas, a adição de nanopartículas de cobre no adesivo não afetou as propriedades de resistência máxima a tração e sorção e solubilidade. Ambos os adesivos absorveram quantidades significativas de água, principalmente nas primeiras 24 h de armazenamento, corroborando resultados de estudos anteriores (Malacarne et al. ⁶⁹ 2006; Reis et al. ⁷⁷ 2007; Gutiérrez et al. ⁵⁹ 2017). A afinidade dos monômeros hidrofílicos contidos na formulação dos adesivos universais resultaria em polímeros mais propensos a sorção quando comparados aos polímeros de natureza hidrofóbica (Wagner et al. ⁸⁷ 2014), sendo uma possível explicação para essa significativa absorção inicial de água.

Acerca da necessidade de se avaliar o desempenho dos adesivos sobre substratos com intensa atividade proteolítica, simulou-se os substratos erosionado e cariado sobre dentina. Para simular a erosão dental, foi empregado o modelo de ciclagem erosiva de pH utilizando imersão em bebida ácida, com alto potencial erosivo

devido ao seu baixo pH (2,6) e baixas concentrações de fluoreto e de cálcio (Yoshihara *et al.* ⁸⁸ 2011). Reconhecido e aceito na literatura (Shellis *et al.* ⁸⁹ 2011), o modelo utiliza condições clínicas com exposição curta ao ácido e sua remoção por ação da solução remineralizante, que imita o desafio erosivo que acontece na cavidade oral, simulando o consumo regular de bebidas ácidas consideradas de risco para a erosão dental (Van Meerbeek *et al.* ⁹⁰ 2003).

Quanto à cárie, embora os protocolos artificiais não simulem a totalidade de eventos envolvidos no processo natural, o desempenho da união a este substrato é prejudicado por alterações isoladas na indução artificial. Vale também a pena ressaltar que, a efetividade da adesão pode se comportar de forma diferente em dentina cariada naturalmente e sobre lesões de cárie formadas artificialmente, já que em lesões de cárie naturais, os túbulos dentinários apresentam-se obliterados por depósitos minerais ácido-resistentes oriundos dos odontoblastos, que limitam tanto a infiltração dos monômeros resinosos como a formação dos *tags* (Banerjee *et al.* ⁹¹ 2010). Assim, mesmo considerando as limitações de falta de padronização nos diferentes métodos (Van Meerbeek *et al.* ⁹² 2010) e o pequeno número de estudos, com resultados controversos (Espelid *et al.* ⁸² 1991; Hara *et al.* ⁸¹ 2001; Van Meerbeek *et al.* ⁹² 2010), o uso do modelo microbiológico parece ser mais adequado para os testes laboratoriais uma vez que promove suavidade, alterações de cor e zonas de desmineralização distintas, com formação evidente de uma camada de dentina infectada (Marquezan *et al.* ⁷⁴ 2009). Além disso, este modelo contribui para a obtenção de uma superfície plana de dentina, condição esta, difícil de se obter em lesões naturais de cárie considerando a variabilidade de tamanho e forma dos dentes (Tveit e Espelid ⁸³ 1986), sendo este um requisito para alcançar melhor orientação de carga interfacial para avaliação da união.

Com relação à RU, os resultados encontrados para dentina erosionada foram inferiores à dentina hígida, o que está em concordância com estudos anteriores (Pamir *et al.* ⁸⁴ 2010; Zimmerli *et al.* ⁷³ 2012). Todo o processo de modificação que a dentina erosionada sofre pode explicar esta diminuição dos resultados nesse substrato (Zimmerli *et al.* ⁷³ 2012).

No que diz respeito à dentina cariada, os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com estudos anteriores que utilizaram protocolo de indução de cárie

artificial tanto em dentes permanentes como em decíduos (Erhardt *et al.* ⁹³ 2008; Scheffel *et al.* ⁴⁸ 2013; Lenzi *et al.* ⁹⁴ 2015). No presente estudo, foram observados menores valores de resistência de união quando executada a adesão sobre dentina afetada por cárie, independente do sistema adesivo e da estratégia utilizados. São resultados esperados, uma vez que a cárie é associada a eventos dinâmicos de perda de mineral e desnaturação gradual das fibrilas colágenas (Yoshiyama *et al.* ⁶⁵ 2002), ocasionando aumento da porosidade na dentina intertubular, prejudicando a hibridização sobre o substrato cariado (Wang *et al.* ⁹⁵ 2007), como evidenciado pela análise nas imagens em MEV para todas as condições deste grupo. Além disso, ao contrário do que acontece na dentina intertubular, a presença de depósitos minerais ácido-resistentes no interior dos túbulos dentinários pode dificultar a formação dos *tags* resinosos (Wang *et al.* ⁹⁵ 2007). De acordo com a análise morfológica da camada híbrida em FEG, esse bloqueio dos túbulos em dentina cariada pode ter interferido com o condicionamento ácido na técnica convencional e com a infiltração dos monômeros resinosos em ambas as estratégias (Hass *et al.* ⁶⁶ 2016), o que pode explicar o pior desempenho da adesão sobre ambos os substratos de morfologia alterada.

Muito embora a estratégia adesiva para os sistemas universais seja controversa na literatura (Muñoz *et al.* ⁵³ 2013; Lenzi *et al.* ⁹⁴ 2015), seu desempenho deveria ser similar para ambas, uma vez que o processo de ionização resulta dos monômeros ácidos (Wagner *et al.* ⁸⁷ 2014). Essa similaridade de desempenho foi obtida em substrato erosionado, corroborando com estudos prévios (Cruz *et al.* ⁶⁴ 2015; Tjaderhane *et al.* ³⁸ 2015; Siqueira *et al.* ⁹⁶ 2018). Obviamente, realizar o condicionamento ácido sobre uma área de colágeno dentinário fragilizado levaria a um prejuízo adicional na adesão ao substrato erosionado e cariado (Yoshiyama *et al.* ⁶⁵ 2002; Zimmerli *et al.* ⁷³ 2012; Hass *et al.* ⁶⁶ 2016; Costa *et al.* ⁶⁷ 2017) e, portanto, se esperaria que o adesivo quando aplicado na técnica autocondicionante tivesse um resultado potencialmente melhor. Contudo, levando em consideração que os resultados sobre substrato erosionado e cariado não demonstraram diferenças entre as técnicas adesivas, o passo do condicionamento ácido parece ser dispensável durante o procedimento adesivo neste tipo de substrato.

Com relação à nanoinfiltração, é esperada uma relação inversamente proporcional à resistência de união (Guzman-Armstrong *et al.* ⁷⁹ 2003; Ding *et al.* ⁵

2009; Stanislawczuk *et al.* ⁹⁷ 2009) que ocorreu no presente estudo, já que, quando comparados os substratos, menores valores de NI foram encontrados para os substratos hígidos. Isto é justificado pelo fato de que substratos cariado e erosionado apresentam uma exposição da trama colágena de dentina maior em profundidade, diferentemente da dentina hígida, o que dificulta a infiltração dos monômeros resinosos, desfavorecendo a adesão (Zimmerli *et al.* ⁷³ 2012). Isto provavelmente ocorre devido à presença de maior quantidade de água no interior da camada híbrida e na camada adesiva na interface resina-dentina (Tay *et al.* ⁷⁶ 2002) e também, ao colapso das fibras colágenas, levando a uma incompleta polimerização dos monômeros adesivos (Zimmerli *et al.* ⁷³ 2012), responsáveis pelo maior grau de NI.

A incorporação de 0,1% de cobre no sistema adesivo reduziu significativamente os valores de NI em substrato hígido, em concordância com resultados de outros estudos (Gutiérrez *et al.* ⁵⁹ 2017; Gutiérrez *et al.* ⁶⁰ 2017). Um decréscimo de aproximadamente 52% foi observado, confirmando a boa compatibilidade química do cobre (Argueta-Figueroa *et al.* ⁵⁷ 2015; Sabatini *et al.* ⁵⁸ 2015). Esses resultados podem estar relacionados com o potencial inibitório do cobre sobre MMPs, especificamente sobre os subtipos -2 e -9 (Souza *et al.* ⁵⁰ 2001; Guo *et al.* ⁵¹ 2005) e também com uma possível atuação indireta do cobre como agente reticulador de colágeno, aumentando a resistência da trama colágena pela relação cobre-dependência da enzima reticuladora de colágeno lisila-oxidase (LOX) (Marelli *et al.* ⁹⁸ 2015), tornando o substrato hígido menos vulnerável a degradação por enzimas proteolíticas do hospedeiro (Gutiérrez *et al.* ⁶⁰ 2017).

Porém, diferentemente do que ocorre no substrato hígido, em substratos morfológicamente alterados, como é o caso da erosão e da cárie, os resultados parecem controversos. A adição do cobre ao adesivo não influenciou os resultados de RU e NI, possivelmente porque o cobre não seria capaz de produzir interfaces livres de nanoinfiltração (Ingle *et al.* ³² 2014), tampouco alterar a hidrofiliabilidade do adesivo, bem como a taxa de evaporação da água/solvente (Yiu *et al.* ⁸⁰ 2005) ou reduzir a permeabilidade da interface adesiva (Hass *et al.* ⁶⁶ 2016). Outra possível explicação seria uma ação reversa do cobre, atuando como complexo de cobre-tripeptídeo, capaz de aumentar a atividade proteolítica das MMP-2 (Siméon *et al.* ⁹⁹ 1999) e consequentemente prejudicar a união da interface dente-restauração. Com relação a

isso, novos estudos são necessários para confirmar tal atividade do cobre sobre a atuação enzimática.

As imagens em dentina hígida mostraram *tags* de resina longos e camada híbrida íntegra, contrapondo-se a menor formação de *tags* e curta penetração em regiões dentinárias desmineralizadas tanto nas imagens do substrato erodido quanto do cariado, em conformidade com estudos anteriores (Costa *et al.* ⁶⁷ 2017; Siqueira *et al.* ⁹⁶ 2018). Além disso, o alto teor de água nos substratos simulados pode comprometer a polimerização do sistema adesivo e evidenciar o fenômeno de separação das fases (Yoshiyama *et al.* ⁶⁵ 2002), afetando tanto a integridade da camada híbrida como o grau de conversão (Wang *et al.* ⁹⁵ 2007), uma vez que monômeros hidrofílicos, por maior afinidade, tendem a penetrar no substrato úmido, enquanto a porção hidrofóbica infiltra em menor grau (Wang e Spencer ¹⁰⁰ 2003). No entanto, para os sistemas adesivos testados, apenas ocorreu uma alteração significativa para o adesivo com cobre quando aplicado na dentina erodida, fato este que ainda não sabemos explicar.

Diante dos resultados obtidos, nota-se que a incorporação do cobre no sistema adesivo universal pode ser uma boa opção visando melhorar suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas. Contudo, estudos de longa duração necessitam ser realizados para comprovar o quanto a presença do cobre poderá diminuir a degradação. Além disso, há de se considerar sobre os estudos *in vitro* e sua relação com resultados clínicos, tomando as avaliações de resultados imediatos apenas como uma base, objetivando mensurar resultados à longo prazo para então, poder prever a eficácia clínica destes adesivos (Van Meerbeek *et al.* ⁹² 2010).

6 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia proposta, considerando as condições deste estudo *in vitro*, pode-se afirmar as seguintes conclusões:

- (1) Melhor desempenho adesivo foi verificada em dentina hígida, com o emprego do sistema adesivo contendo cobre, observados os maiores valores de RU e menor grau de NI, o que sugere que a adição de cobre a sistemas adesivos universais poderia retardar a degradação da interface de união para este substrato, necessitando de estudos à longo prazo para confirmar essa hipótese.
- (2) A adesão parece ser prejudicada nos substratos erosionado e cariado. O condicionamento ácido mostrou-se um passo desnecessário no procedimento adesivo para estes tipos de substratos quando utilizados sistemas adesivos universais, uma vez que ambas estratégias obtiveram resultados semelhantes.
- (3) Melhor desempenho foi verificado quando aplicada a estratégia convencional sobre dentina hígida. Nos demais substratos, não houve diferença significativa entre as técnicas adesivas, com exceção do grupo cariado contendo cobre, que apresentou melhores resultados também com o emprego da técnica convencional.

7 REFERÊNCIAS

1. TJADERHANE, L. et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. **Dent Mater**, v. 29, n. 1, p. 116-35, Jan 2013.
2. CARVALHO, R. M. et al. Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. **Dent Mater**, v. 28, n. 1, p. 72-86, Jan 2012.
3. TJADERHANE, L. et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. **Dent Mater**, v. 29, n. 10, p. 999-1011, Oct 2013.
4. FRASSETTO, A. et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability--A literature review. **Dent Mater**, v. 32, n. 2, p. e41-53, Feb 2016.
5. DING, P. G. et al. Relationship between microtensile bond strength and nanoleakage at the composite–dentin interface. **Dental Materials**, v. 25, n. 1, p. 135-141, 2009.
6. NEDELJKOVIC, I. et al. Is secondary caries with composites a material-based problem? **Dental Materials**, v. 31, n. 11, p. e247-e277, 2015.
7. JOKSTAD, A. et al. Quality of dental restorations FDI Commission Project 2–95. **International dental journal**, v. 51, n. 3, p. 117-158, 2001.
8. BEAZOGLOU, T. et al. Economic impact of regulating the use of amalgam restorations. **Public Health Reports**, v. 122, n. 5, p. 657-663, 2007.
9. MJÖR, I. Amalgam and composite resin restorations: longevity and reasons for replacement. **Quality evaluation of dental restorations—criteria for placement and replacement**. Chicago: Quintessence Publishing Co, p. 61-8, 1989.
10. MANHART, J. et al. Review of the clinical survival of direct and indirect restorations in posterior teeth of the permanent dentition. **OPERATIVE DENTISTRY-UNIVERSITY OF WASHINGTON-**, v. 29, p. 481-508, 2004.
11. AMARAL, F. L. et al. Assessment of in vitro methods used to promote adhesive interface degradation: a critical review. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 19, n. 6, p. 340-353, 2007.
12. BRESCHI, L. et al. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. **Dental Materials**, v. 24, n. 1, p. 90-101, 2008.

13. ZALKIND, M. M. et al. Accumulation of Streptococcus mutans on Light-Cured Composites and Amalgam: An In Vitro Study. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 10, n. 4, p. 187-190, 1998.
14. BUSSCHER, H. et al. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. **Journal of dental research**, v. 89, n. 7, p. 657-665, 2010.
15. SPENCER, P. et al. Adhesive/dentin interface: the weak link in the composite restoration. **Annals of biomedical engineering**, v. 38, n. 6, p. 1989-2003, 2010.
16. KHALICHI, P.; CVITKOVITCH, D.; SANTERRE, J. Effect of composite resin biodegradation products on oral streptococcal growth. **Biomaterials**, v. 25, n. 24, p. 5467-5472, 2004.
17. GARCIA-GODOY, F. et al. Long-term degradation of enamel and dentin bonds: 6-year results in vitro vs. in vivo. **Dental Materials**, v. 26, n. 11, p. 1113-1118, 2010.
18. SPENCER, P. et al. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. **Ann Biomed Eng**, v. 38, n. 6, p. 1989-2003, Jun 2010.
19. THOMAS, J. G.; NAKAISHI, L. A. Managing the complexity of a dynamic biofilm. **The Journal of the American Dental Association**, v. 137, p. S10-S15, 2006.
20. CHEN, L.; SHEN, H.; SUH, B. I. Antibacterial dental restorative materials: a state-of-the-art review. **Am J Dent**, v. 25, n. 6, p. 337-346, 2012.
21. ALLAKER, R. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **Journal of dental research**, v. 89, n. 11, p. 1175-1186, 2010.
22. COCCO, A. R. et al. A systematic review about antibacterial monomers used in dental adhesive systems: Current status and further prospects. **Dental Materials**, v. 31, n. 11, p. 1345-1362, 2015.
23. BUNDY, K.; BUTLER, M.; HOCHMAN, R. An investigation of the bacteriostatic properties of pure metals. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 14, n. 5, p. 653-663, 1980.
24. PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1712-1720, 2007.
25. MORRIER, J.-J. et al. Antimicrobial activity of amalgams, alloys and their elements and phases. **Dental Materials**, v. 14, n. 2, p. 150-157, 1998.

26. BERNARDO, M. et al. Survival and reasons for failure of amalgam versus composite posterior restorations placed in a randomized clinical trial. **The Journal of the American Dental Association**, v. 138, n. 6, p. 775-783, 2007.
27. MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346, 2005.
28. RUPARELIA, J. P. et al. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. **Acta biomaterialia**, v. 4, n. 3, p. 707-716, 2008.
29. FOLEY, J.; BLACKWELL, A. Ion release from copper phosphate cement and influence on *Streptococcus mutans* growth in vitro: A comparative study. **Caries research**, v. 37, n. 6, p. 416-424, 2003.
30. YOON, K.-Y. et al. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. **Science of the Total Environment**, v. 373, n. 2, p. 572-575, 2007.
31. USMAN, M. S. et al. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 4467, 2013.
32. INGLE, A. P.; DURAN, N.; RAI, M. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 1001-1009, 2014.
33. OPPERMANN, R. V.; JOHANSEN, J. R. Effect of fluoride and non-fluoride salts of copper, silver and tin on the acidogenicity of dental plaque in vivo. **European Journal of Oral Sciences**, v. 88, n. 6, p. 476-480, 1980.
34. DAVEY, H.; EMBERY, G. Metal ions in oral hygiene products. **Clinical and Biological Aspects of Dentifrices**. pp165-172. **New York: Oxford Medical Publications**, 1992.
35. GARONE FILHO, W. Adesão em esmalte e dentina. **Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Dentística/Laser. São Paulo: Artes Médicas**, p. 27-55, 2002.
36. REIS, A. et al. Sistemas adesivos atuais. **JBC j. bras. clin. odontol. integr**, v. 5, n. 30, p. 455-66, 2002.
37. HILGERT, L. A. et al. CE 2 Adhesive Procedures in Daily Practice: Essential Aspects. **Compendium**, v. 29, n. 4, p. 208, 2008.
38. TJADERHANE, L. et al. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'. **Caries Res**, v. 49, n. 3, p. 193-208, 2015.

39. NAKABAYASHI, N.; TAKARADA, K. Effect of HEMA on bonding to dentin. **Dent Mater**, v. 8, n. 2, p. 125-30, Mar 1992.
40. HASHIMOTO, M. et al. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. **J Dent Res**, v. 79, n. 6, p. 1385-91, Jun 2000.
41. REIS, A. et al. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. **Oper Dent**, v. 38, n. 4, p. E1-E25, Jul-Aug 2013.
42. SPENCER, P.; SWAFFORD, J. R. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. **Quintessence Int**, v. 30, n. 7, p. 501-7, Jul 1999.
43. WANG, Y.; SPENCER, P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. **J Biomed Mater Res**, v. 59, n. 1, p. 46-55, Jan 2002.
44. _____. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. **J Dent Res**, v. 82, n. 2, p. 141-5, Feb 2003.
45. CARRILHO, M. R. et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **J Dent Res**, v. 86, n. 6, p. 529-33, Jun 2007.
46. PASHLEY, D. H. et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J Dent Res**, v. 83, n. 3, p. 216-21, Mar 2004.
47. KINNEY, J. H. et al. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin. **J Dent Res**, v. 82, n. 12, p. 957-61, Dec 2003.
48. SCHEFFEL, D. L. et al. Effect of reducing acid etching time on bond strength to noncarious and caries-affected primary and permanent dentin. **Pediatr Dent**, v. 35, n. 7, p. 199-204, 2013.
49. THNEIBAT, A. et al. Anticariogenic and antibacterial properties of a copper varnish using an in vitro microbial caries model. **Oper Dent**, v. 33, n. 2, p. 142-8, Mar-Apr 2008.
50. SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; LINE, S. R. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. **Biomaterials**, v. 22, n. 14, p. 2025-30, Jul 2001.
51. GUO, H. et al. Effects of copper and zinc on the production of homocysteine-induced extracellular matrix metalloproteinase-2 in cultured rat vascular smooth muscle cells. **Acta Cardiol**, v. 60, n. 4, p. 353-9, Aug 2005.
52. HANABUSA, M. et al. Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 6, p. 475-484, 2012.

53. MUÑOZ, M. A. et al. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. **Journal of Dentistry**, v. 41, n. 5, p. 404-411, 2013.
54. ROSA, W. L.; PIVA, E.; SILVA, A. F. Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. **J Dent**, v. 43, n. 7, p. 765-76, Jul 2015.
55. RENNÉ, W. G. et al. Antibacterial properties of copper iodide-doped glass ionomer-based materials and effect of copper iodide nanoparticles on collagen degradation. **Clinical oral investigations**, v. 21, n. 1, p. 369-379, 2017.
56. AFSETH, J.; OPPERMANN, R.; RØLLA, G. Accumulation of Cu and Zn in human dental plaque in vivo. **Caries research**, v. 17, n. 4, p. 310-314, 1983.
57. ARGUETA-FIGUEROA, L. et al. An evaluation of the antibacterial properties and shear bond strength of copper nanoparticles as a nanofiller in orthodontic adhesive. **Australian orthodontic journal**, v. 31, n. 1, p. 42, 2015.
58. SABATINI, C. et al. Incorporation of bactericidal poly-acrylic acid modified copper iodide particles into adhesive resins. **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 5, p. 546-555, 2015.
59. GUTIÉRREZ, M. et al. Mechanical and microbiological properties and drug release modeling of an etch-and-rinse adhesive containing copper nanoparticles. **Dental Materials**, v. 33, n. 3, p. 309-320, 2017.
60. GUTIÉRREZ, M. F. 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. **Journal of Dentistry**, v. 61, p. 12-20, 2017.
61. GOSAU, M. et al. Antimicrobial effect and biocompatibility of novel metallic nanocrystalline implant coatings. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 104, n. 8, p. 1571-1579, 2016.
62. ROSENBAUM, J. et al. Antibacterial properties of nanostructured Cu–TiO₂ surfaces for dental implants. **Biomaterials science**, v. 5, n. 3, p. 455-462, 2017.
63. CRUZ, J. B. et al. Eroded dentin does not jeopardize the bond strength of adhesive restorative materials. **Brazilian oral research**, v. 26, n. 4, p. 306-312, 2012.
64. CRUZ, J. B. et al. Bonding stability of adhesive systems to eroded dentin. **Brazilian oral research**, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2015.
65. YOSHIYAMA, M. et al. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. **Journal of dental research**, v. 81, n. 8, p. 556-560, 2002.

66. HASS, V. et al. Degradation of dentin-bonded interfaces treated with collagen cross-linking agents in a cariogenic oral environment: An in situ study. **Journal of Dentistry**, v. 49, p. 60-67, 2016.
67. COSTA, A. R. et al. Influence of Different Dentin Substrate (Caries-Affected, Caries-Infected, Sound) on Long-Term μ TBS. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, n. 1, p. 16-23, 2017.
68. STANISLAWCZUK, R. et al. Mechanical properties and modeling of drug release from chlorhexidine-containing etch-and-rinse adhesives. **Dental Materials**, v. 30, n. 4, p. 392-399, 2014.
69. MALACARNE, J. et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. **Dental Materials**, v. 22, n. 10, p. 973-980, 2006.
70. REIS, A.; GIANNINI, M.; PEREIRA, P. Influence of water-storage time on the sorption and solubility behavior of current adhesives and primer/adhesive mixtures. **Oper Dent**, v. 32, n. 1, p. 53-59, 2007.
71. FAN, P. et al. Curing-light intensity and depth of cure of resin-based composites tested according to international standards. **The Journal of the American Dental Association**, v. 133, n. 4, p. 429-434, 2002.
72. MARTINS, G. C. et al. Does Making An Adhesive System Radiopaque by Filler Addition Affect Its Bonding Properties? **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 17, n. 6, 2015.
73. ZIMMERLI, B. et al. Long-term bonding to eroded dentin requires superficial bur preparation. **Clinical oral investigations**, v. 16, n. 5, p. 1451-1461, 2012.
74. MARQUEZAN, M. et al. Artificial methods of dentine caries induction: a hardness and morphological comparative study. **archives of oral biology**, v. 54, n. 12, p. 1111-1117, 2009.
75. PERDIGAO, J. et al. In vivo influence of residual moisture on microtensile bond strengths of one-bottle adhesives. **J Esthet Restor Dent**, v. 14, n. 1, p. 31-8, 2002.
76. TAY, F. R. et al. Single-step adhesives are permeable membranes. **J Dent**, v. 30, n. 7-8, p. 371-82, Sep-Nov 2002.
77. REIS, A. et al. A 2-year evaluation of moisture on microtensile bond strength and nanoleakage. **Dent Mater**, v. 23, n. 7, p. 862-70, Jul 2007.
78. SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-5, Jul 2012.
79. GUZMAN-ARMSTRONG, S.; ARMSTRONG, S.; QIAN, F. Relationship between nanoleakage and microtensile bond strength at the resin-dentin interface. **Oper Dent**, v. 28, n. 1, p. 60-66, 2003.

80. YIU, C. K. et al. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6863-6872, 2005.
81. HARA, A. T. et al. Radiopacity of esthetic restorative materials compared with human tooth structure. **Am J Dent**, v. 14, n. 6, p. 383-386, 2001.
82. ESPELID, I. et al. Radiopacity of restorations and detection of secondary caries. **Dental Materials**, v. 7, n. 2, p. 114-117, 1991.
83. TVEIT, A.; ESPELID, I. Radiographic diagnosis of caries and marginal defects in connection with radiopaque composite fillings. **Dental Materials**, v. 2, n. 4, p. 159-162, 1986.
84. PAMIR, T. et al. The influence of bonding agents on the decision to replace composite restorations. **Oper Dent**, v. 35, n. 5, p. 572-578, 2010.
85. HOTTA, M.; YAMAMOTO, K. Comparative radiopacity of bonding agents. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 11, n. 3, 2009.
86. YOSHIDA, Y. et al. Self-assembled nano-layering at the adhesive interface. **Journal of dental research**, v. 91, n. 4, p. 376-381, 2012.
87. WAGNER, A. et al. Bonding performance of universal adhesives in different etching modes. **Journal of Dentistry**, v. 42, n. 7, p. 800-807, 2014.
88. YOSHIHARA, K. et al. Self-etch monomer-calcium salt deposition on dentin. **Journal of dental research**, v. 90, n. 5, p. 602-606, 2011.
89. SHELLIS, R. P. et al. Methodology and Models in Erosion Research: Discussion and Conclusions. **Caries research**, v. 45(suppl 1), n. Suppl. 1, p. 69-77, 2011.
90. VAN MEERBEEK, B. et al. Microtensile bond strengths of an etch&rinse and self-etch adhesive to enamel and dentin as a function of surface treatment. **OPERATIVE DENTISTRY-UNIVERSITY OF WASHINGTON**, v. 28, n. 5, p. 647-660, 2003.
91. BANERJEE, A. et al. An in vitro evaluation of microtensile bond strengths of two adhesive bonding agents to residual dentine after caries removal using three excavation techniques. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 6, p. 480-489, 2010.
92. VAN MEERBEEK, B. et al. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. **Dental Materials**, v. 26, n. 2, p. e100-e121, 2010.

93. ERHARDT, M. C. G. et al. In vitro μ TBS of one-bottle adhesive systems: Sound versus artificially-created caries-affected dentin. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 86, n. 1, p. 181-187, 2008.
94. LENZI, T. L. et al. Bonding Performance of a Multimode Adhesive to Artificially-induced Caries-affected Primary Dentin. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 17, n. 2, 2015.
95. WANG, Y.; SPENCER, P.; WALKER, M. P. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 81, n. 2, p. 279-286, 2007.
96. SIQUEIRA, F. et al. Three-Year Effects of Deproteinization on the In Vitro Durability of Resin/Dentin-Eroded Interfaces. **Oper Dent**, v. 43, n. 1, p. 60-70, 2018.
97. STANISLAWCZUK, R. et al. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin bonds. **Oper Dent**, v. 34, n. 4, p. 481-490, 2009.
98. MARELLI, B. et al. Newly identified interfibrillar collagen crosslinking suppresses cell proliferation and remodelling. **Biomaterials**, v. 54, p. 126-135, 2015.
99. SIMÉON, A. et al. Expression and Activation of Matrix Metalloproteinases in Wounds: Modulation by the Tripeptide–Copper Complex Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine-Cu²⁺. **Journal of investigative dermatology**, v. 112, n. 6, p. 957-964, 1999.
100. WANG, Y.; SPENCER, P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. **Journal of dental research**, v. 82, n. 2, p. 141-145, 2003.

ANEXO A

Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdades Ponta
Grossa / PR – Parecer Consubstanciado do CEP

FACULDADES PONTA GROSSA/ PR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da inclusão de nanopartículas de cobre em sistemas adesivos universais nas propriedades mecânicas e adesivas à dentina.

Pesquisador: Alessandro Dourado Loguercio

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 66784417.3.0000.5689

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.072.217

Apresentação do Projeto:

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de nanopartículas de cobre, em diferentes concentrações, em dois sistemas adesivos universais (Ambar Universal [AU, FGM] e Prime&Bond Elect Universal [PBE, Dentsply]) sobre o grau de conversão de corpos de prova de adesivos (GC-c) e na interface de união a dentina (GC-i), resistência máxima à tração (RT) e liberação de cobre (LC) durante 28 dias, bem como a resistência de união (RU) e nanoinfiltração (NI) na interface de união à dentina nos tempos imediatos (IM) e após 1 ano (1A) nas estratégias self-etch (autocodicionante) e total-etch (condicionamento ácido), em dentes hígidos, erosionados e cariados. Os dados do RT serão analisados por uma análise de variância de 3 fatores. Para liberação de cobre, os dados serão analisados por análise de variância de dois fatores, e para RU e NI os dados serão submetidos a análise de variância de 3 fatores para medidas repetidas. Também será feito o teste post hoc de Tukey para múltiplas comparações. A significância estatística será predefinida em $\alpha = 0,05$.

Endereço: Rua Tomazina, 710

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.025-510

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3025-8555

Fax: (42)3025-8556

E-mail: cep@facul.dadespontagrossa.com.br

FACULDADES PONTA GROSSA/ PR



Continuação do Parecer: 2.072.217

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de cobre, em diferentes concentrações, em dois sistemas adesivos universais, nas propriedades mecânicas e adesivas à dentina.

Objetivo Secundário:

Avaliar a inclusão de nanopartículas de cobre sobre as seguintes propriedades dos adesivos: resistência máxima à tração (RT); resistência de união à microtração (RU) da interfase resina-dentina; nanoinfiltração (NI) da interfase resina-dentina; grau de conversão (GC) do adesivo na interfase resina-dentina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não haverá riscos, pois serão utilizados dentes humanos obtidos a partir do banco de dentes, e para os pesquisadores não haverá riscos pois serão utilizados todos os EPIs necessários (óculos de proteção, luva e máscara).

Benefícios:

Melhora nas propriedades mecânicas e adesivas à dentina com a inclusão de nanopartículas de cobre nos adesivos universais testados, o que será de grande benefício para a prática clínica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância para a área e com potencial de geração de patente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados adequadamente, porém foi identificada discrepância entre o número de amostras apresentado no resumo do trabalho e na declaração do banco de dentes da IES (360 amostras) e o apresentado no item 25.1 do protocolo de pesquisa (240 amostras)

Recomendações:

Compatibilizar as informações apresentadas sobre o número efetivo de amostras a serem utilizadas na pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Adequar o número de amostras nos diferentes documentos que compõe o projeto de pesquisa.

Endereço: Rua Tomazina, 710

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.025-510

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3025-8555

Fax: (42)3025-8556

E-mail: cep@faculdadespontagrossa.com.br

FACULDADES PONTA GROSSA/ PR



Continuação do Parecer: 2.072.217

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_875518.pdf	27/04/2017 20:13:42		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	declaracao_uso_imagem.pdf	27/04/2017 20:11:07	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito
Dedaração de Pesquisadores	declaracao_pesquisador.pdf	27/04/2017 20:10:28	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito
Dedaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_banco_dentes.pdf	26/04/2017 12:09:29	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	14/03/2017 11:37:23	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	protocolo_de_pesquisa.docx	03/03/2017 16:57:30	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	03/03/2017 16:53:08	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTA GROSSA, 19 de Maio de 2017

Assinado por:
Cristiane Ansbach Pereira Mendes
(Coordenador)

Endereço: Rua Tomazina, 710

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.025-510

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3025-8555

Fax: (42)3025-8556

E-mail: cep@faculdadespontagrossa.com.br