



LARISSA FERREIRA PACHECO

**EFETIVIDADE DE ANTIOXIDANTES SOBRE A DENTINA
AFETADA POR CÁRIE NA DEGRADAÇÃO DA UNIÃO COM
SISTEMAS ADESIVOS**

PIRACICABA

2014



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

LARISSA FERREIRA PACHECO

**EFETIVIDADE DE ANTIOXIDANTES SOBRE A DENTINA
AFETADA POR CÁRIE NA DEGRADAÇÃO DA UNIÃO COM
SISTEMAS ADESIVOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria Puppim Rontani

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Larissa Ferreira Pacheco e orientada pela Profa. Dra. Regina Maria Puppim Rontani.

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

P115e Pacheco, Larissa Ferreira, 1983-
Efetividade de antioxidantes sobre a dentina afetada por cárie na degradação da união com sistemas adesivos / Larissa Ferreira Pacheco. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Regina Maria Puppim Rontani.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Dentina. 2. Cárie dentária. 3. Antioxidantes. 4. Adesivos dentários. I. Puppim Rontani, Regina Maria, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effectiveness of deproteinizing agents on caries-affected dentin in degradation of bonding systems

Palavras-chave em inglês:

Dentin
Dental caries
Antioxidants
Dental adhesives

Área de concentração: Odontopediatria

Titulação: Doutora em Odontologia

Banca examinadora:

Regina Maria Puppim Rontani [Orientador]

Gisele Maria Corrêa

Elisana Rodrigues

Andréia Bolzan de Paula

Fabiana Scarparo Naufel

Data de defesa: 27-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2014, considerou a candidata LARISSA FERREIRA PACHECO aprovada.

Profa. Dra. REGINA MARIA PUPPIN RONTANI

Profa. Dra. GISELE MARIA CORRER

Profa. Dra. ELIANA RODRIGUES

Profa. Dra. ANDRÉIA BOLZAN DE PAULA

Profa. Dra. FABIANA SCARPARO NAUFEL

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade dos antioxidantes (EDTA e NaOCl a 6%) no tratamento da dentina afetada por cárie (DAC) e diferentes sistemas adesivos na degradação da interface dentina/resina, ao longo do tempo. Cento e oito blocos de dentina obtidos de terceiros molares humanos foram submetidos ao modelo biológico de produção de cárie (*S. Mutans*) e distribuídos em grupos de acordo com: tratamento- NaOCl à 6%, EDTA, e grupo sem tratamento (Controle); sistemas adesivos- Clearfil SE Bond (SE) e Single Bond 2 (SB); e tempo de armazenamento- 24h, 12 e 18 meses. Foram construídos blocos de 4mm de altura em resina (Charisma) aderidos sobre a dentina de acordo com os fabricantes e estocados por 24h em água deionizada. Foram então, seccionados obtendo-se palitos com 2,0 mm² de área de secção transversal. Os palitos foram submersos em 1 mL de água deionizada por: 24h, 12 e 18m, e submetidos ao teste de μ -TBS. Os padrões de fratura foram analisados em MEV. A nanoinfiltração, ao longo do tempo, foi avaliada por meio de fatias obtidas de secções longitudinais seriadas de espécimes produzidos de modo similar ao descrito. Estas foram imersas em solução traçadora de nitrato de prata amoniacal por 24 h, lavadas em água deionizada e imersas em solução reveladora por 8 h. Todos os espécimes foram observados em MEV para identificar os escores, de acordo com o grau de nanoinfiltração. Os resultados da RU foram submetidos aos testes Shapiro-Wilk, ANOVA Fatorial (axbxc) e Tukey post hoc ($p < 0,05$). Os dados da nanoinfiltração e padrão de fratura foram analisados por estatística descritiva. Com relação ao tempo de armazenamento, independente do tratamento, o adesivo SE apresentou valores de RU significativamente maiores, comparado ao SB, exceto aos 18 meses, em que as médias de ambos não diferiram significativamente. Independente do sistema adesivo utilizado, enquanto o tratamento com EDTA apresentou menores valores de RU nos tempos de 24 h e 12 m, e no tempo de 18 m o tratamento os valores maiores, o oposto foi verificado pelo uso do NaOCl, sendo que o NaOCl apresentou maiores valores que o controle em 24h e 12m. Porém, ao final do experimento, aos 18m os maiores valores de RU foram obtidos quando a DAC foi tratada com EDTA. A utilização do SB/EDTA e SE/NaOCl produziu as maiores médias de RU. Padrão de fratura mistos foram observados em todos os grupos, mas principalmente após

18 meses. Os sistemas adesivos utilizados, independente do tratamento, apresentaram algum grau de nanoinfiltração porém menores que o apresentado pelo controle. Baseando-se nos resultados, pode-se concluir que a RU mostrou-se adesivo dependente quando a dentina foi tratada com antioxidantes; e em relação ao tempo, a RU pode ser considerada adesivo/tratamento dependente, pois, quando se utiliza o SE a RU se mantém em valores similares aos imediatos (24h), diminuindo significativamente aos 18m, chegando aos valores da RU com o uso do SB mantendo-se estável durante todo o experimento; e quando do uso do EDTA, maiores médias de RU são observadas aos 18m.

Palavras-chave: dentina afetada por cárie, agentes antioxidantes, degradação, resistência de união, nanoinfiltração.

ABSTRACT

The study evaluated the effectiveness of antioxidants and different adhesive systems on degradation of carious affected-dentin(DAC)/resin interface over time. One hundred and eight third human molars were submitted to a biological model of caries production (*S. mutans*). It was perpendicular cut to long axis of tooth to obtain a flat dentin surface. The factors evaluated were: treatment - 6% NaOCl, EDTA, and a group without treatment (Controle); adhesive systems - Clearfil SE Bond (SE) and Single Bond 2 (SB); and storage time - 24 hours (h), 12 and 18 months. Were built blocks of resin composite (Charisma) over dentin, with a total height of 4 mm. After 24 h immersed in deionized water, each specimen was sectioned to obtain sticks with an average size of approximately 2 mm² to realize the bond strength test (μ TBS). Parts of sticks obtained remain submerged in 1 ml of deionized water for: 12 and 18 months and then subjected to bond strength test. Fracture patterns were analyzed in Scanning Electron Microscopy (SEM). Nanoleakage evaluation, over time, was measured with slices obtained of serial sections of other specimens. These were embedded in tracer solution of ammoniacal silver nitrate for 24 h, washed in distilled water and immersed in a developing solution for 8 h. All samples were observed under SEM, to identify degree of nanoleakage. Results of μ TBS were analyzed for normality by Shapiro-Wilk test being checked normal data distribution, and then, by Factorial ANOVA (axbxc) and Tukey post hoc test ($p < 0.05$). Nanoleakage data and fracture pattern were analyzed using descriptive statistics. The results showed that, with respect to storage time, SB adhesive had higher RU, compared with SE and control, except in time of 18 months. Although EDTA treatment, had higher RU in time of 24 h and 12 m, and at time of 18 m NaOCl treatment showed higher values, and the two treatments were above control values. Use of SB/EDTA and SE/NaOCl produced highest RU average, being considered dependent adhesive-treatment. Largest percentage of fracture pattern was mixed, in all groups, but especially after 18 months. Nanoleakage results showed that adhesive systems used, independent counsel of treatment, showed some degree of nanoleakage but smaller than presented in control.

Keywords: dentin, dental caries, antioxidants, dental adhesives, degradation.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	05
3 PROPOSIÇÃO	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO	62

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a **Deus**, que provém tudo em minha vida, e a minha família. A meus pais, **Amariles e Nelson**, pelo apoio incondicional, pela dedicação dada a minha educação e a formação da pessoa que me tornei hoje. Por muitas vezes terem aberto mão de seus próprios sonhos para realizar os meus e principalmente por todo amor dedicado, o que me faz sentir todos os dias uma pessoa privilegiada por tê-los como meus pais. A meu irmão e minha cunhada, **Diego e Thayssa**, por todo carinho e apoio, a meu irmão principalmente que me inspira a ser sempre uma profissional melhor. E ao mais novo príncipe da família, meu afilhado, **Rafael**, que desperta em mim os melhores sentimentos e o melhor de mim. A vocês dedico todo meu amor, hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Regina Maria Puppim Rontani**, exemplo de conhecimento e dedicação à pesquisa científica e à docência. Obrigada principalmente pela paciência, compreensão, orientação, por contribuir para a minha formação como profissional e científica, e, além disso, pelos conselhos, ensinamentos e carinho.

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge**.

À Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade de Campinas, nas pessoas do Diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**. E Diretor associado, **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**.

À **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, presidente da comissão Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

À **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, coordenadora da Pós-Graduação em Odontologia, pelo acolhimento e carinho dedicado aos alunos.

À **CAPES e ao CNPq**, pelo apoio financeiro durante o curso do doutorado.

À **Profa. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião e a Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa**, pelo profissionalismo e dedicação dado aos alunos, e conhecimento repassado.

Ao **Prof. Dr. Érico Barbosa Lima e Profa. Dra. Regina Célia Rocha Peres**, pelas trocas de experiência na Clínica e exemplo de dedicação à Odontopediatria.

Aos **Profs. Drs. Maria Beatriz B. de Araújo Magnani, Vânia Célia Vieira de Siqueira, João Sarmiento Pereira Neto**, pela imensa e significativa contribuição interdisciplinar e aprendizado dado ao longo de todos os anos de pós-graduação.

Aos **Profs. Drs. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti, Fernanda Miori Pascon, Kamila Rosamília Kantovitz** pela imensa e significativa contribuição apresentada nos exames de qualificação desta tese.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora, **Área de Materiais Dentários**, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao engenheiro **Marcos Blanco Cangiani (Marcão)**, por todo o apoio e disponibilidade em ajudar nos experimentos laboratoriais. Obrigada pela paciência.

Aos técnicos **Adriano Luis Martins e Eliene A. Orsini Narvaes**, do Centro de Microscopia e Imagens da FOP/UNICAMP, pela disposição e incentivo a pesquisa. Obrigada pela compreensão durante a realização deste trabalho, e principalmente pela amizade.

Aos funcionários do departamento de Odontologia Infantil, **Marcelo Corrêa Maistro e Shirley**, pela amizade e disposição em ajudar.

À **Érica A. Pinho Sinhoreti, Raquel Q. Marcondes César Sacchi, Roberta Clares Morales dos Santos e Ana Paula Carone**, pelo profissionalismo e carinho com que tratam os alunos de pós-graduação.

À **Maria Elisa dos Santos e Eliane Melo Franco de Souza** por estarem sempre prontas a ajudar.

A todos os **funcionários** da FOP – UNICAMP, que nos recebem sempre com sorriso e fazem com que seja possível o andamento de todos os trabalhos realizados nesta faculdade.

A **todos** os alunos e professores da graduação que direta ou indiretamente contribuíram para realização desta pesquisa, e, além disso, pela troca de conhecimentos.

Às colegas da pós-graduação da Área de Odontopediatria que fui encontrando ao longo do tempo, **Annicelle, Thais Parisotto, Patrícia, Fernanda Frasseto, Darlle, Natália**. Obrigada pela oportunidade da troca de experiência e pelos conselhos recebidos. Em especial quero agradecer a **Fê, Carol, Kamila, Karllinha, Éfani, Marcela, Ale, Van, Lu**, pela amizade, pelo carinho e atenção recebida, sem a ajuda de vocês com certeza tudo teria sido muito mais difícil, vou guardar vocês sempre no meu coração.

Aos amigos **Marina, Carolzita, Lipi e Fabi**, que com toda dedicação, carinho e amizade me ajudaram a passar por momentos difíceis e mostraram que de mãos dadas podemos ir muito além, somos muito melhores juntos.

À **Livinha**, mais um anjo da guarda que Deus colocou no meu caminho para cuidar de mim, e me mostrou que podia aprender muito mais com as dificuldades do que

sofrer com elas. Com carinho e gestos diários de amizade você me fez admirar mulher de aço que você esconde atrás de toda essa fragilidade.

À **Ana Rubia** por ser uma mãe quando esta não estava presente.

À **Renata Jaime e Luciana Chaim**, exemplos de dedicação e amor pelo trabalho realizado, força de vontade e garra para continuar lutando pelos seus objetivos. Mesmo de longe sempre me incentivaram e participaram da minha vida profissional e pessoal.

À **Lázara, Angelina, Carlos, Ivanilde, Karina, Cristiane e Roberson** pelo carinho com que me acolheram.

À **Larissa, Márcia, Karen, Suzara, Camila e Andrea**, minhas grandes amigas. Não tenho como agradecer através de palavras o quanto elas foram importantes na minha caminhada, mesmo estando distantes. Obrigada por tudo!

Aos amigos “**piracicabanos**” e “**não-piracicabanos**”, que sempre estiveram ao meu lado e torceram para que meus projetos fossem realizados. Obrigada!

1 INTRODUÇÃO

Atualmente na odontologia restauradora, com os conceitos de mínima invasão da estrutura dentária, a remoção da cárie envolve apenas a camada mais externa e altamente infectada da dentina cariada. Isso facilita a preservação da camada mais interna de dentina, passível de remineralização, diminuindo a possibilidade de exposição pulpar, o que tem reduzido em até 75% a necessidade de procedimentos endodônticos (Yoshiama *et al.*, 2002; Maltz *et al.*, 2007). Paralelamente, se essa camada de dentina for selada por sistemas adesivos adequados a esse substrato, poderia ocorrer a prevenção da progressão da lesão, pela formação de uma área ácido resistente (Shinohara *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008). Porém segundo Yoshiyama *et al.* (2002) a aplicação de sistemas adesivos dentinários em do tipo *self-etching* e *total-etching* na dentina afetada por cárie não afeta o desempenho de restaurações adesivas.

Com o acelerado desenvolvimento dos sistemas adesivos, a determinação da resistência de união às estruturas dentinárias modificadas por cárie se tornou de grande importância e interesse, uma vez que, é geralmente, sobre esse substrato de dentina alterada que se realiza o procedimento restaurador. Até a década de 1990, poucos estudos avaliaram as propriedades adesivas em substratos clinicamente relevantes, como dentina cariada e/ou esclerótica, devido às dificuldades técnicas dos testes existentes até então, já que essas lesões são geralmente pequenas e se apresentam de forma irregular (Goracci *et al.*, 2005).

A adesão à estrutura dentinária depende de fatores como tempo de condicionamento ácido, tipo de sistema adesivo, umidade presente na dentina e, certamente, o tipo de dentina (Carvalho *et al.*, 2004).

No entanto, a qualidade da adesão ao substrato está diretamente relacionada à eficiência da penetração dos monômeros nos espaços interfibrilares, e consequente envolvimento das fibrilas colágenas expostas pelo condicionamento ácido; e ao grau de conversão adesivo (Pashley *et al.*, 2000). Estudos que utilizam dentina afetada por cárie têm demonstrado resistência de união inferior à da dentina hígida, devido, à maior porosidade na dentina intertubular pela perda mineral em decorrência do processo da cárie, e à presença nos espaços intratubulares de cristais de cálcio ácido-resistentes, que impedem

a infiltração dos monômeros resinosos dentro dos túbulos (Yoshiyama *et al.*, 2002; Arrais *et al.*, 2004).

Com o desenvolvimento de adesivos autocondicionantes, foi criada uma nova alternativa para otimizar a adesão ao substrato cariado, já que esses sistemas adesivos não requerem a remoção da camada de *smear layer* pelo condicionamento ácido, mas pelo uso de monômeros ácidos que podem simultaneamente condicionar e penetrar, eliminando os passos de condicionamento, lavagem e secagem que podem ser críticos, e têm grande parte do sucesso atribuído ao desempenho e às condições do operador.

Dessa forma, este conceito de ácido-primer é atrativo, pois, na teoria, após a incorporação da *smear layer*, estes sistemas se infiltrariam, permeando as fibras colágenas, enquanto descalcificariam os componentes inorgânicos na mesma profundidade, minimizando a existência de uma região de dentina desmineralizada não envolvida por resina (Erhardt *et al.*, 2008).

Mesmo assim, ainda existem preocupações sobre a eficiência destes sistemas adesivos. A *smear layer* reforçada por resina (*smear layer* hibridizada) pode ser muito frágil para fornecer resistência e propriedades mecânicas duráveis. A presença de uma espessa camada de *smear layer* pode interferir na difusão do primer autocondicionante pela dentina subjacente intacta, então o condicionamento ácido, separadamente, pode ser considerado já que produz uma superfície molhável, ajudando os monômeros do sistema de união a infiltrar nos espaços interfibrilares desmineralizados (Ceballos *et al.*, 2003; Borges *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2013). Inversamente, tem sido sugerido que o colágeno exposto não impregnado por monômeros adesivos é altamente susceptível à degradação enzimática ou hidrolítica ao longo do tempo, conduzindo a redução da resistência de união ao longo do tempo (Erhardt *et al.*, 2008; Tjäderhane *et al.*, 2013).

A identificação na dentina de zonas parcialmente condicionadas e não infiltradas, com ambos os adesivos autocondicionantes de 1 e 2 passos, abaixo da camada híbrida aumentaria a possibilidade de degradação da adesão criada (Ceballos *et al.*, 2003).

A modificação da matriz de colágeno não impregnada por adesivo, com agentes proteolíticos, como hipoclorito de sódio (NaOCl) poderia ter efeito benéfico à união de sistemas adesivos à dentina cariada, facilitando a infiltração dos monômeros e favorecendo

a interação química entre os monômeros e o substrato dentinário. A dentina tratada com NaOCl é rica em cristais de hidroxiapatita expostos e pode resultar em uma interface mais estável, ao longo do tempo, por que é essencialmente composta de mineral (Borges *et al.*, 2009).

Além disso, o tratamento da dentina pode ser feito com o uso do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) que pode causar a desnaturação do colágeno, melhorando a qualidade da camada híbrida e sua durabilidade, na presença de cristais residuais de apatita deixados dentro da matriz de colágeno subsequente ao condicionamento ácido da dentina (Breschi *et al.*, 2008).

A longevidade da camada híbrida parece envolver fatores químicos e físicos. Os fatores físicos como as forças oclusais da mastigação e o repetitivo estresse de contração e expansão, além das mudanças de temperatura dentro da cavidade oral, supostamente afetam a estabilidade da interface. Agentes químicos ácidos, no fluido dentinário, saliva, alimentos, bebida e produtos bacterianos, representam outro desafio para a interface dente/material, resultando em vários padrões de degradação das fibras colágenas desprotegidas, eluição dos monômeros residuais e degradação dos componentes poliméricos (Breschi *et al.*, 2008).

Como a camada híbrida é formada pela mistura da matriz orgânica da dentina, cristais de hidroxiapatita residuais, monômeros e solventes do adesivo, o envelhecimento pode afetar cada um dos componentes individualmente, ou pode ser resultado da combinação do fenômeno de degradação dentro da camada híbrida (Correr *et al.*, 2004; Breschi *et al.*, 2008).

São descritos dois tipos de padrão de degradação dentro da camada híbrida, sendo a desorganização das fibras colágenas e a hidrólise do adesivo a partir dos espaços interfibrilares dentro da camada híbrida (Hashimoto *et al.*, 2003). A hidrólise é um processo químico que quebra as ligações covalentes entre os polímeros pela adição de água, nos adesivos a base de éster, resultando em perda de massa de resina e contribui para a redução da resistência de união criada pelos adesivos ao longo do tempo. Na degradação da resina é relatada a absorção de água em alguns adesivos simplificados que foram estudados (Erhardt *et al.*, 2008).

A degradação hidrolítica ocorre na presença de água, devido à hidrofília do adesivo, absorção de água e subsequente degradação hidrolítica, sendo que a menor absorção de água ocorre nas resinas hidrófobas que nos sistemas de resina hidrófilos usados com adesivos autocondicionantes (Ito *et al.*, 2005; Malacarne *et al.*, 2006). Ainda, independentemente da estratégia adesiva utilizada, pela combinação de monômeros resinosos hidrófilos e iônicos nos adesivos simplificados, a interface de união deixa uma camada híbrida de revestimento de resina hidrófoba. Isso conduz à criação de uma camada híbrida que age como uma membrana semipermeável, permitindo a movimentação da água por toda a interface adesiva, mesmo depois da polimerização do adesivo. Assim, a utilização de agentes antioxidantes pode promover um substrato menos suscetível à degradação favorecendo a penetração dos sistemas adesivos mais eficiente e menos suscetível a degradação (Toledano *et al.*, 2002; Yamauti *et al.*, 2003; Sauro *et al.*, 2009).

A dificuldade de infiltração e envolvimento da matriz colágena na dentina alterada pela cárie dentária ou por processos de envelhecimento dentário promoveria maior quantidade de colágeno exposto e, portanto, maior possibilidade de degradação da zona de união dentina/resina. Além disso, as propriedades dos sistemas adesivos e suas limitações quando aplicados neste substrato alterado dos adesivos induz a busca de novos tratamentos e protocolos de aplicação, por isso a utilização de agentes antioxidantes pode favorecer o processo de união e influenciar positivamente na preservação da interface dentina/resina ao longo do tempo, diminuindo a possibilidade de colágeno exposto residual.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SUBSTRATO DENTINÁRIO

A união de materiais restauradores aos substratos dentários tem sido extensivamente relatada na literatura, focando-se o aperfeiçoamento desta união e o prolongamento da vida útil do elemento acometido por cárie ou trauma. A união ao esmalte apresenta-se bem definida na literatura, entretanto, o elo fraco na união dos materiais restauradores à estrutura dentária deve-se à presença de substratos extremamente diversos que devem, até o momento, ser tratados de forma uniforme e pelos mesmos materiais, esmalte e dentina (Marshall *et al.*, 1997).

Ao contrário do esmalte, a dentina é considerada um composto complexo formado essencialmente por aproximadamente 50% em volume por minerais, e o restante por colágeno tipo I e proteínas não colagenosas (30%) e água (aproximadamente 20%). O conhecimento desse substrato quanto a composição, ultraestrutura e fisiologia é de suma importância para o estudo da união de materiais restauradores (Swift *et al.*, 1995).

A cárie dental apresenta um caráter invasivo e destrutivo que pode levar à perda irreparável dos tecidos dentais. No entanto, a odontologia contemporânea prioriza uma prática em que se criam condições favoráveis para deter o processo de atividade dessa doença, trabalhando com a mínima intervenção restauradora. Nesse contexto de mínima intervenção surgiu a possibilidade da remoção parcial da dentina cariada, seguida do selamento hermético da cavidade, podendo ser observada redução bacteriana e alterações qualitativas da dentina remanescente (Wei *et al.*, 2008; Nakajima *et al.*, 2011).

Alguns estudos demonstraram que a simples remoção do tecido infectado, altamente cariado, a partir da curetagem superficial das lesões, e posterior selamento da cavidade tornaria dificultada a obtenção de substratos e sobrevivência dos microrganismos no tecido cariado (Oliveira, 1999; Yoshiyama *et al.*, 2002).

As lesões de cárie em dentina apresentam, segundo Marshall *et al.* (1997) e Zavorodniy *et al.* (2008), duas camadas de tecido cariado: uma mais externa, que se encontra completamente destruída, infectada por bactérias, sem sensibilidade e capacidade

de remineralização, e uma mais interna, que apresenta menor contaminação, tem a capacidade remineralizadora, apresenta vitalidade, possui maior conteúdo mineral que a anterior e, dessa forma, é mais endurecida. Clinicamente, a camada mais externa apresenta-se com um aspecto amarelado e amolecido, e a mais interna com coloração castanha e menos amolecida (Pashley & Carvalho, 1997). Mais recentemente, Pugach *et al.* (2009), avaliando o conteúdo mineral, a estrutura e as propriedades das zonas de dentina cariada observaram que mesmo a zona mais pigmentada por corante, referente clinicamente à área de dentina mais desmineralizada, a ser removida pelo clínico, contém cerca de 25% do conteúdo mineral.

Além dessa distribuição, a dentina afetada por cárie apresenta características peculiares como uma fase mineral, composta por carbonato rico em hidroxiapatita. Que ocorre com um processo dinâmico da cárie em dentina, com episódios cíclicos de desmineralização e remineralização (Marshall *et al.*, 1997). Um estudo utilizando imagens por espectroscopia transformada de Fourier - RAMAN mostrou que a fase mineral da dentina afetada por cárie apresentava-se menos cristalina, e com menor quantidade de mineral (Wang *et al.*, 2007). Cristais minerais na dentina afetada por cárie estão dispersos e randomicamente distribuídos, com cristais de apatita maiores e espaços intercristalinos comparados com a dentina hígida (Daculsi *et al.*, 1979). A matriz orgânica da dentina contém diferentes proteínas extracelulares, como colágeno tipo I, proteoglicanos, fosfoproteínas e sialoproteínas dentinárias, no entanto, alterações na estrutura da matriz orgânica associada a cárie e alteração na quantidade dos componentes desta matriz, já foram reportadas (Daculsi *et al.*, 1979).

Há também uma camada transparente, localizada abaixo da camada de destruição (mais superficial), que se forma durante o processo cariioso, a partir do continuo depósito de mineral que ocorre no lúmen dos túbulos, formando uma camada de esclerose dentinária. De fato, a maioria dos túbulos dentinários na dentina afetada por cárie são ocluídos por cristais minerais. Os cristais no lúmen dos túbulos tornam o índice refratário do lúmen similar ao da dentina intertubular, o que torna esta camada transparente (Nakajima *et al.*, 2011).

Como há perda mineral da matriz dentinária durante o processo cariioso, esse volume é substituído por água. Sendo que, o conteúdo normal de água é de 20% na dentina hígida, e a dentina afetada por cárie, por sua vez, mostrou maiores valores que variaram de 14% a 53%. Além disso, a permeabilidade da dentina afetada por cárie diminui também devido a oclusão dos túbulos (Nakajima *et al.*, 2011).

Quanto à microbiologia, é bem conhecido que a cárie dentária é uma doença decorrente da atividade bacteriana localizada, sendo a espécie mais influente os *Streptococos* do grupo *Mutans* que podem estar presentes na placa bacteriana, na saliva e na língua. Porém, a cariogenicidade provida por esses microrganismos decorre de características como a acidogenicidade, pela produção de ácidos a partir da fermentação e carboidratos e açúcares, e aciduricidade apresentada, estando estas relacionadas à perda mineral promovida pelos ácidos produzidos, sendo que o pH final do meio de cultura contendo estes microrganismos pode variar de 4,36 a 3,89 (Marshall *et al.*, 1997).

Com o desenvolvimento da cárie, ciclos de desmineralização e remineralização podem promover a deposição de grandes cristais de fosfato de cálcio, que são menos solúveis ao condicionamento ácido do que a hidroxiapatita da dentina normal, dificultando a união com os materiais restauradores, podendo diminuir a resistência dente/material restaurador (Pashley & Carvalho, 1997; Nakajima *et al.*, 2011). Outro fator que dificulta a estruturação da interface da união é a *smear layer*, que decorre dos preparos cavitários com instrumentos rotários, entre outros; e resulta na formação de uma camada de resíduos sobre a superfície dentinária, cujas características são dependentes do método/instrumento utilizado, como sua densidade e espessura. A *smear layer* preenche os orifícios dos túbulos dentinários, formando tampões de smear, causando a redução na permeabilidade da dentina. No entanto, as microporosidades na *smear layer* ainda permitem difusão do fluido dentinário (Omar *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2010).

A *smear layer* dentinária é composta principalmente de micropartículas de debris do colágeno mineralizado, e difere, tanto em composição como em estrutura, da camada de dentina subjacente. A *smear layer* formada na dentina afetada por cárie pode ser diferente química e morfológicamente daquela formada na dentina hígida, isso por que a dentina afetada por cárie é parcialmente desmineralizada, diferindo principalmente quanto ao

conteúdo mineral e orgânico, comparado com a dentina hígida. De fato, a smear layer da dentina afetada por cárie é mais grossa e parece ser enriquecida de componentes orgânicos, comparada àquela da dentina hígida (Omar *et al.*, 2007; Erhardt *et al.*, 2011) (Figura 1).

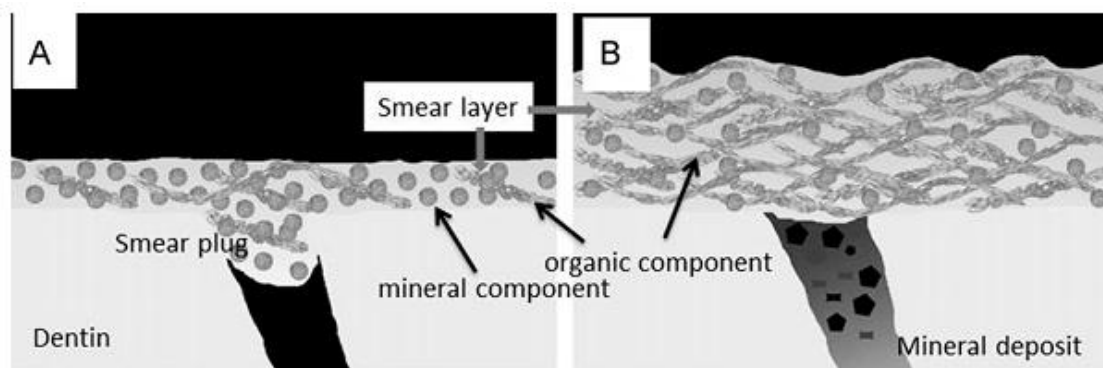


Figura 1. Figura ilustrativa da *smear layer* da dentina hígida e da dentina afetada por cárie. A smear layer da dentina afetada por cárie é grossa e enriquecida de componentes orgânicos (B) comparada com a smear layer da dentina hígida (A).

Fonte: Nakajima *et al.*, 2011.

Além disso, quanto às propriedades mecânicas, a dentina afetada por cárie pode apresentar metade dos valores de dureza comparada com a dentina hígida por causa dos depósitos oclusais dos túbulos dentinários (Erhardt *et al.*, 2011; Sirin Karaarslan *et al.*, 2012). Além disso, a resistência de união resina-dentina afetada por cárie é mais baixa que os valores obtidos para a dentina hígida, e essa característica tem uma correlação positiva com a dureza Knoop com relação ao substrato (Wei *et al.*, 2010; Erhardt *et al.*, 2011; Nakajima *et al.*, 2011; Pacheco *et al.*, 2013).

2.2 SISTEMAS ADESIVOS

Com o desenvolvimento de novas técnicas restauradoras, houve o aprimoramento dos materiais restauradores, e os sistemas adesivos tornaram-se elementos fundamentais em diversas aplicações clínicas, sendo responsáveis pela união do material restaurador às estruturas dentárias (Proença *et al.*, 2007; Nakajima *et al.*, 2011).

Os sistemas adesivos resultam da combinação entre monômeros resinosos de diferentes pesos moleculares e viscosidades, diluentes resinosos e solventes orgânicos, como: acetona, etanol e água (Omar *et al.*, 2007). Os monômeros resinosos podem ser hidrófilos, os quais permitem que o adesivo seja compatível com a umidade natural do substrato dentinário, ou hidrófobos, que apresentam maior peso molecular, são mais viscosos e conferem maior resistência mecânica e estabilidade ao material (Swift *et al.*, 1995).

Mas sabe-se que a união resina-dentina constitui-se em um desafio pois, uma vez que este substrato é intrinsecamente úmido, tornando o procedimento adesivo altamente sensível, depende de um protocolo bem definido e executado pelo operador (Swift *et al.*, 1995; Perdigão *et al.*, 2007).

De acordo com a classificação, os sistemas adesivos podem ser divididos em convencionais (condiciona e lava) ou autocondicionantes (Frankenberger *et al.*, 2001).

Os adesivos convencionais são os sistemas que empregam o passo de condicionamento ácido da superfície de esmalte e dentina separadamente dos outros passos clínicos. Podem ser de dois passos (o condicionamento ácido feito separadamente, com ácido fosfórico entre 30% e 37%; e a combinação de primer e agente adesivo em um único frasco), ou três passos (o condicionamento ácido, com ácido fosfórico entre 30% a 37%, o primer e o agente adesivo em frascos separados). Estes sistemas adesivos produzem a remoção completa da *smear layer* e desmineralização da subsuperfície dentinária intacta, através da utilização do condicionamento ácido, mesmo considerando curtos períodos de condicionamento (Perdigão *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2010).

A aplicação do sistema adesivo, tem como objetivo a hibridização, ou seja, formação da “camada híbrida”, a qual pode ser definida como impregnação de um monômero à superfície dentinária desmineralizada, formando uma camada ácido resistente de dentina reforçada por resina (Nakabayashi *et al.*, 1991; Milia *et al.*, 2012).

Deve-se considerar que os sistemas adesivos que contém água na sua formulação e que, conseqüentemente, evaporam mais lentamente, devem ser aplicados de forma ativa, de modo a favorecer a evaporação da água já no momento da aplicação. Estes apresentam menor sensibilidade em relação à umidade de superfície e modo de aplicação. Já os

sistemas adesivos que não contém água e que, normalmente, contém solventes altamente voláteis como a acetona e o etanol, não devem ser aplicados de forma ativa, sob o risco dos solventes evaporarem precocemente e não exercerem sua função de deslocar a água residual, presente entre as fibrilas, comprometendo a infiltração dos monômeros resinosos (Wei *et al.*, 2010; Perdigão *et al.*, 2010).

Quando a profundidade de desmineralização da dentina é maior que a infiltração dos monômeros resinosos, as fibrilas de colágeno desmineralizadas e não envoltas por resina, ou seja, expostas, tenderão a sofrer lenta degradação enzimática da matriz de colágeno pelas enzimas do hospedeiro (Hashimoto *et al.*, 2010), além de permitir a percolação da água para o interior da camada híbrida, a chamada nanoinfiltração, que pode levar à hidrólise dos polímeros, e compromete a durabilidade da união. Clinicamente, a degradação desta interface pode enfraquecer a adesão e conduzir à sensibilidade do paciente, formação de cáries secundárias e fendas entre o dente e o material restaurador (Lenzi *et al.*, 2012).

Na tentativa de eliminar uma das principais falhas no processo de adesão ao substrato dentinário, o excesso de desmineralização que distancia a área desmineralizada e a área infiltrada pelo agente de união, foi proposta uma técnica adesiva com sistemas de união denominados de autocondicionantes. Esses sistemas não requerem a aplicação isolada de ácido para produzir porosidades no substrato, mas apresentam em sua composição monômeros ácidos (pH aproximadamente 2,8) que teoricamente condicionariam o substrato simultaneamente à penetração do adesivo. Embora os sistemas autocondicionantes apresentem como vantagem a ausência do passo operatório de condicionamento ácido, ainda não se pode afirmar que ocorreria a perfeita penetração dos monômeros entre as fibrilas de colágeno expostas pelo condicionamento ácido (Perdigão *et al.*, 2013; Tjäderhane *et al.*, 2013).

Diversos tipos de sistemas adesivos encontram-se disponíveis no mercado com o objetivo de simplificar as técnicas de aplicação, e suas formulações foram sendo modificadas, de modo que se tornassem altamente hidrófilas e compatíveis com o substrato dentinário úmido. Além disso, existe a tendência de que a simplificação dos materiais e do uso reflita o desejo da redução do tempo clínico e eficiência do material; no entanto, essa

evolução nem sempre vem acompanhada por bons resultados, que se traduzam em durabilidade e resistência desses materiais (Frankenberger *et al.*, 2001; Joves *et al.*, 2013).

Os monômeros resinosos ácidos dos sistemas adesivos autocondicionantes permitem o tratamento da camada de detritos, a desmineralização da porção mais superficial da dentina subjacente e, simultaneamente, a infiltração da resina adesiva nos tecidos dentais, ou seja, a *smear layer* é incorporada na interface de união. Tay *et al.* (2000) observaram que os primers autocondicionantes utilizados (Clearfil SE Bond e Clearfil Liner Bond 2V) penetravam de 3 a 4 μm pela *smear layer* e foram capazes de desmineralizar a dentina intertubular em profundidades de 0,4 a 0,5 μm . Nesses sistemas ocorreu a difusão dos agente resinosos por entre as fibrilas de colágeno na porção mais superficial da dentina (0,1 a 0,2 μm), formando uma camada híbrida pouco espessa. No entanto, apesar da pequena espessura desta camada, geralmente abaixo de 2 μm , alta resistência de união inicial foi obtida.

O sistemas autocondicionantes podem ser de dois passos, onde o agente condicionador e o primer estão combinados em um mesmo frasco e o adesivo hidrófobo é aplicado separadamente; ou de passo único, que combina ácido, primer e adesivo em uma mesma aplicação (Perdigão *et al.*, 2007). Alguns autores relataram que estes materiais são menos suscetíveis às variações de umidade da dentina (Osorio *et al.*, 2008). Isso ocorre porque o primer é acidificado, ou seja, ao mesmo tempo em que condiciona a estrutura dentária promove, junto com o adesivo, o embricamento micromecânico, o que elimina a etapa do condicionamento com ácido fosfórico, e a posterior lavagem e secagem, resultando em profundidade menor desmineralização da estrutura dentária (Perdigão *et al.*, 2010). Esses primers ácidos apresentam capacidade tampão, com um pH entre 1,5 e 4,5 na superfície dentinária um minuto após a aplicação, o que preserva o ataque da dentina mineralizada hígida subjacente, levando a menor extensão de desmineralização (Marshall *et al.*, 1997).

Estudos utilizando a dentina afetada por cárie têm demonstrado que as características da *smear layer* presente compromete a eficácia dos sistemas autocondicionantes, pois é composta por colágeno desorganizado e por partículas de detritos minerais (Pashley *et al.*, 1993; Spencer *et al.*, 2001).

Dessa forma a *smear layer* presente na dentina afetada por cárie pode favorecer a adesão pelos sistemas adesivos autocondicionantes (Nakajima *et al.*, 2011).

A composição dos diferentes sistemas adesivos, seu mecanismo de ação nos substratos dentinários, a forma de aplicação clínica e os desafios existentes no ambiente bucal constituem-se fatores essenciais para o sucesso e durabilidade da união adesiva (Frankenberger *et al.*, 2001; Perdigão *et al.*, 2007).

O conhecimento das características intrínsecas da dentina favoreceu o desenvolvimento de sistemas adesivos com formulações cada vez mais hidrófilas, possibilitando a retenção dos compósitos resinosos à dentina e garantindo o sucesso imediato do procedimento adesivo neste substrato (Pashley & Carvalho, 1997; Ceballos *et al.*, 2003). Porém, em médio e longo prazo, muitas restaurações perdem a capacidade de selar e proteger os tecidos dentários íntegros, levando à formação de fendas e infiltração marginal e recorrência da cárie, o que caracteriza o insucesso das restaurações adesivas (Omar *et al.*, 2007; Perdigão *et al.*, 2007; Toledano *et al.*, 2007).

Quando o substrato dentinário apresenta-se afetado por cárie, as diferenças de estrutura e composição encontradas não interferem apenas no procedimento de condicionamento ácido, mas também na penetração dos monômeros resinosos na dentina desmineralizada, o que induz a grandes diferenças na interface adesiva quando comparada à encontrada em dentina hígida (Perdigão *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2010). Vários estudos mostraram que a resistência de união dos sistemas adesivos à dentina cariada é menor do que à dentina hígida (Swift *et al.*, 1995; Joves *et al.*, 2013). A dentina afetada por cárie apresenta maior permeabilidade na dentina intertubular e baixa permeabilidade na dentina intratubular. A maior permeabilidade da dentina intertubular está associada ao fato de que o condicionamento ácido ataca mais este substrato, o qual já se encontra parcialmente desmineralizado, e é mais poroso que a dentina hígida, levando a maior infiltração do sistema de união. Já a infiltração do adesivo na dentina intratubular é dificultada pela presença de depósitos de minerais nos túbulos dentinários, que são resistentes ao ataque ácido, atuando como barreira, que diminui a infiltração do ácido e do sistema adesivo (Perdigão *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2010; Nakajima *et al.*, 2011).

O uso de ácido fosfórico parece ser muito agressivo para a dentina afetada por cárie, entretanto, ácidos fortes ou longos períodos de condicionamento foram sugeridos para solubilizar os depósitos de minerais presentes na luz dos túbulos dentinários, permitindo assim a formação dos “tags” de resina, o que aumentaria a resistência de união dentina-resina. Arrais *et al.* (2004), relatou que a extensão do tempo do ataque ácido fosfórico a 35%, de 15 segundos(s) para 45s, aumentou a resistência de união do Single Bond (3M ESPE) a dentina afetada por cárie, no entanto a resistência de união continua a ser menor que à dentina hígida. E mesmo após longos períodos de exposição, observou-se que os cristais ainda são resistentes à dissolução ácida. O longo período de condicionamento apenas produz uma camada desmineralizada mais profunda na dentina intertubular. Dessa forma, a união à dentina afetada por cárie requer tratamentos específicos, como a utilização dos agentes antioxidantes (Arrais *et al.*, 2004).

2.3 DURABILIDADE DA UNIÃO À DENTINA AFETADA POR CÁRIE

Shono *et al.* (1999) foram os primeiros que demonstraram a diminuição a resistência da união resina/dentina ao longo do tempo. A partir de então, a preocupação com a durabilidade da união resina/dentina tomou corpo, e alguns estudos utilizando vários tipos de sistemas adesivos foram testados e demonstraram queda na resistência da união ao longo do tempo (Hashimoto, 2010). Por isso a importância de estudar protocolos que previnam essa ação.

As restaurações adesivas são expostas a diversos desafios na cavidade oral. Estresses oclusais e térmicos, desafios ácidos e enzimáticos, que podem afetar a interface de união resina/dentina, comprometendo a integridade da restauração.

Na verdade, a degradação da interface de união se deve a vários fatores, além dos citados, dentre eles, a exposição à água proveniente do fluido dentinário, do meio ambiente oral e de fatores enzimáticos, inerentes ao hospedeiro (Tjaderhane *et al.*, 2013). Porém, qual desses fatores atua primordialmente na desestabilização da união, ainda não foi estabelecido.

Acredita-se que a desestabilização da união resina/dentina se inicia com a ação do ácido na região dentinária, onde as fibras colágenas expostas pelo condicionamento não são totalmente permeadas pelo adesivo. Uma hipótese para a degradação da união resina/dentina encontra-se baseada nos danos proporcionados pela remoção dos minerais pelo condicionamento ácido, por ácido fosfórico, por monômeros resinosos ácidos durante o procedimento adesivo, ou pela cárie. Essa desmineralização expõe parte da matriz de colágeno, causando alterações no arranjo molecular, como por exemplo, a quebra das ligações cruzadas entre as fibrilas do colágeno, expondo sítios catalíticos de união. A matriz de metaloproteinases (MMPs) tem sido envolvida em vários processos patológicos e fisiológicos do complexo dentina-polpa (Tjäderhane *et al.*, 2001). A detecção das MMPs em dentina mineralizada e afetada por cárie indica que estas estão presas na periferia da dentina, e podem ser ativadas quando expostas à desmineralização ácida (Tezvergil-Mutluay *et al.*, 2013). As MMPs encontram-se na dentina, principalmente as MMP-9, são especialmente ativadas em pH ácido, e sugere-se que estejam envolvidas na degradação da matriz dentinária em processo de cárie de dentina. Ainda, essa exposição altera as fibras colágenas na interface dentina-resina que podem ficar mais suscetíveis a desorganização e desnaturação do colágeno na exposição direta à água, principalmente na interface adesiva (Perdigão *et al.*, 2013).

Estudos de durabilidade de união à dentina afetada por cárie ainda são limitados (Nakajima *et al.*, 2011). As fibrilas de colágeno na camada híbrida que estão presentes na resina adesiva sobrejacente mineralizada que foi destruída, são os únicos elementos estruturais contínuos que ligam a camada adesiva à dentina subjacente, e sua perda coincidiu com diminuições na força de ligação (Carrilho *et al.*, 2007).

Erhardt *et al.* (2008) reportaram que a dentina afetada por cárie diminuiu a resistência de união independente do sistema adesivo usado após 6 meses de exposição da interface à água. Eles indicaram que a interface de união na dentina afetada por cárie estava mais inclinada à degradação hidrolítica do que a dentina hígida. Recentemente, Pashey *et al.* (2004) demonstraram que as MMPs na matriz da dentina promovem a exposição à degradação do colágeno desprotegido, com incompleta infiltração da dentina após o ataque ácido. O uso de inibidores de MMPs, após o ataque ácido, poderia prevenir e minimizar a

degradação do colágeno exposto e com incompleta infiltração da resina na camada híbrida, contribuindo para a longevidade da camada híbrida e manutenção da resistência de união.

Van Meerbeek *et al.* (1998) e Tay *et al.* (1996) encontraram manchas de metal pesado entre as fibrilas colágenas em imagens analisadas em Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e 20 nm de espaços interfibrilares, provavelmente preenchidos com resina infiltrada. Armstrong *et al.* (2004) foram os primeiros a examinar cuidadosamente tais camadas híbridas em dentina-resina, que haviam sido armazenadas em água por 5 anos. As imagens em TEM revelaram que quase 70% das fibrilas de colágeno havia desaparecido. E tinham um aspecto de "ghost-like".

2.4 AGENTES ANTIOXIDANTES

Aproximadamente 50% do volume da dentina é composto de minerais, o resto é colágeno tipo I e proteínas não colagenosas (30%) e água (20%). Durante a união com os compósitos restauradores, os componentes minerais da superfície e subsuperfície da dentina são removidos em totalidade pelo ataque ácido nos adesivos convencionais, ou parcialmente nos primers dos adesivos autocondicionantes. Na realidade, no entanto, os monômeros adesivos não são capazes de encapsular a matriz de colágeno exposta, deixando as fibras de colágeno total ou parcialmente expostas na base da camada híbrida, sem a proteção da resina polimerizada. A falta da proteção da resina e presença de água deixam as fibras colágenas desmineralizadas vulneráveis à degradação hidrolítica.

A degradação das fibras colágenas e componentes hidrófilos da resina causam a destruição da camada híbrida e perda da resistência de união ao longo do tempo. Recentemente, estudos sobre a presença e a função das MMPs na degradação da camada híbrida aumentaram, levando às pesquisas a descobrir como prevenir ou inibir sua ação.

Devido ao elevado potencial de desinfecção, os hipocloritos são conhecidos e empregados em grande escala.

A técnica da desproteinização da dentina tem sido desenvolvida com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) em diferentes tempos e concentrações. Essa substância é utilizada para remoção das fibras colágenas, após o condicionamento ácido, por ser um

agente proteolítico, não específico, capaz de remover matéria orgânica e ainda solubilizar as fibrilas que estão abaixo da matriz mineralizada (Toledano *et al.*, 2002).

A solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) pode dissolver efetivamente o substrato orgânico dos materiais biológicos. Taniguchi *et al.* (2009), demonstraram que o tratamento com NaOCl da *smear layer* que cobre a dentina afetada por cárie, corroeu e diluiu os componentes orgânicos desta. Além disso, eles reportaram que o pré-tratamento com NaOCl a 6%, por 15s, pode aumentar significativamente a resistência de união dos sistemas adesivos autocondicionantes de 1 e 2 passos à dentina afetada por cárie, enquanto que o pré-tratamento com NaOCl por 30s não os afetaram. Por outro lado, para a dentina hígida, o pré-tratamento de NaOCl por 15s não alterou a resistência de união, e por 30s reduziu a resistência. Tem sido especulado que a aplicação de NaOCl, por 30s ou mais, resulta na reação dos radicais livres residuais, resultantes do tratamento da dentina com o NaOCl, e que tem produzido o efeito antioxidante do NaOCl, e isso compete com a propagação de radicais livres gerados durante a ativação da luz, resultando na reação prematura em cadeia e polimerização incompleta.

O hipoclorito de sódio apresenta desvantagens, como a formação de subprodutos indesejáveis, por exemplo, os ácidos graxos, criando uma película viscosa sobre a dentina que é de difícil remoção. Além disso, esta substância requer tempo de aplicação de até 2 minutos para completar a remoção do colágeno, e tem limite de concentração entre 6 a 12% (Tezvergil-Mutluay *et al.*, 2013).

Especula-se que a dissolução parcial das fibrilas de colágeno e/ou desestabilização das moléculas que compõem a estrutura da dentina ocorrem durante a desproteínização, um fator que pode comprometer a formação de uma interface de ligação resistente. O uso do hipoclorito de sódio ainda é controverso, especialmente pelos resultados de resistência de união serem dependentes do sistema adesivo utilizado (Correr *et al.*, 2004; Erhardt *et al.*, 2008; Sauro *et al.*, 2009). Perdigão *et al.* (2000), relataram que o oxigênio liberado do hipoclorito de sódio é outro fator que pode justificar a diminuição do valor da resistência de união, pois pode inibir a polimerização do sistema adesivo e ainda comprometer o desempenho mecânico da interface adesiva.

Além deste agente, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) inativa as MMPs e preserva as propriedades mecânicas. O EDTA como ácido já foi sugerido para favorecer a maior resistência da camada híbrida à degradação e produzir aumento imediato da resistência de união onde foi realizada a exposição ao NaOCl (Yamauti *et al.*, 2003). O EDTA dissolve a fase mineral dentinária sem deslocar as proteínas da dentina, evitando maiores alterações na estrutura fibrilar do colágeno e conferindo estabilidade para a matriz orgânica. A manutenção da resistência de união obtida após o tratamento com EDTA na dentina afetada por cárie pode ser relacionada à sua capacidade de prevenir as mudanças de configuração induzidas pelo $-H^+$, preservando o caráter poroso da matriz de colágeno tratada (Marshall *et al.*, 1997; Osorio *et al.*, 2005).

Isto pode ser devido à melhor infiltração da resina na matriz de colágeno desmineralizada com EDTA, de forma que o mineral residual nas fibras de colágeno pode aumentar a estabilidade da matriz orgânica e desempenhar o papel protetor das fibrilas de colágeno que não foram completamente infiltradas por resina. Estas fibrilas de colágeno inalteradas são responsáveis por conter a maioria do mineral intrafibrilar e, portanto, são menos afetadas por desidratação, uma vez que o apoio estrutural do mineral está presente e a infiltração da resina pode ser facilitada (Sauro *et al.*, 2009).

Já o NaOCl dissolve completa ou parcialmente as proteínas expostas independentemente da presença, ausência e/ou inibição das enzimas ligadas ao colágeno.

Essas soluções poderiam ter um papel importante na preservação da união resina/dentina. Trabalhos realizados com os dois agentes, mostraram melhor desempenho do EDTA em relação ao NaOCl na resistência de união (Carvalho *et al.*, 2003; Sauro *et al.*, 2009). E segundo Sauro *et al.* (2009), substratos tratados com estes agentes de imediato diminuíram a resistência de união, mas outros estudos realizados (Sauro *et al.*, 2009; Taniguchi *et al.*, 2009; Sauro *et al.*, 2011) que observaram o comportamento dos agentes ao longo do tempo, mostraram aumento da penetração dos sistemas adesivos e preservação da interface resina-dentina. Ainda, outros trabalhos sugerem que para a remoção completa do material orgânico e inorgânico é recomendado o uso dos agentes simultaneamente (Sano *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 2000).

2.5 RESISTÊNCIA DE UNIÃO E NANOINFILTRAÇÃO

Dos ensaios mecânicos, o mais utilizado para avaliar a resistência de união de materiais, e que tem melhor precisão é o ensaio de microtração. A metodologia utilizada é uma variação do teste de tração, desenvolvida por Sano *et al.* (1994) que facilita a verificação da magnitude da resistência, pois limita a ação das forças de tração em uma pequena área da interface adesiva. Este método oferece versatilidade e é de grande relevância para estudos de adesão de materiais restauradores utilizados clinicamente (Pashley *et al.*, 1999).

O substrato dentinário é um complexo biologicamente hidratado, com túbulos constituídos por processos celulares e fluídos, dentina peritubular altamente mineralizada e dentina intertubular composta principalmente de colágeno e depósitos de apatita, sendo que as características regionais podem ser modificadas por processos fisiológicos, idade e doença. Além disso, a presença da *smear layer* e a variação morfológica e estrutural da dentina dificultam os procedimentos adesivos, o que talvez possa explicar a variabilidade dos resultados de testes de resistência de união (Pashley *et al.*, 1999).

Carvalho *et al.* (2001) confirmaram a hipótese de que a orientação e a densidade dos túbulos dentinários podem influenciar na resistência de união, e que essa tende a ser mais fraca quando o número de túbulos por área é aumentado.

Pashley *et al.* (1996) afirmaram, com relação à variabilidade existente entre as diferentes regiões da dentina, que os valores de adesão são maiores em dentina superficial do que em profunda, por causa da não uniformidade na quantidade de túbulos, da permeabilidade da dentina e da velocidade de movimentação do fluido dentinário nos túbulos que podem sofrer interferência sob pressão pulpar.

A verificação da interação entre tecido biológico e biomateriais na interface é de extrema importância. Sendo assim, para avaliar a resistência de união da interface resina-dentina, um dos testes realizados é o ensaio de microtração, no qual os espécimes usados são preparados de modo a resultar em seções transversais com área de aproximadamente 1 mm², produzindo distribuição mais uniforme da tensão e resultados mais precisos do que os testes de tração e cisalhamento, que utilizam área de 7 a 12 mm². Os espécimes utilizados

no teste de microtração são obtidos a partir de sucessivos cortes do mesmo utilizando discos diamantados. Esses cortes geram fatias delgadas e, estas originam basicamente dois tipos de amostra: em forma de ampulheta ou em forma de palito, e através de uma máquina de ensaio universal é realizado o teste de resistência de união do material aderido à estrutura dental. Nestes testes, com o uso dos sistemas adesivos atuais, associados às técnicas de condicionamento total e adesão à dentina úmida, duas evidências passaram a ser registradas: aumento, tanto dos valores de resistência adesiva, quanto do número das fraturas coesivas em dentina, permanecendo a interface de união intacta (Sano *et al.*, 1994; Pashley *et al.*, 1999).

Os resultados deste estudo demonstram que a “natureza” dinâmica da morfologia do substrato dentinário é certamente um fator importante para os mecanismos de adesão de materiais restauradores na estrutura dentária. Neste sentido, os diferentes resultados de resistência de união encontrados na literatura, com diferentes sistemas adesivos, favorecem a necessidade de pesquisas adicionais, laboratoriais e clínicas, para obter um sistema adesivo que promova adequada adesão em todos os níveis de profundidade dentinária. Além disso, a variabilidade associada ao teste de microtração diminuiu para 10-25%, ao invés de 30-50% comumente encontrada nos testes convencionais, garantindo uma maior fidelidade nos resultados (Frankenberger *et al.*, 2001).

Um dos testes mais indicados para se avaliar a degradação da interface de união ao longo do tempo, demonstrando as variações que ocorrem nesse local, é o teste de nanoinfiltração. O termo “nanoinfiltração” foi introduzido para se descrever a ocorrência de espaços nanométricos dentro da camada híbrida, mesmo na ausência de fendas na interface de união (Sano *et al.*, 1994). Esta técnica utiliza um traçador de baixo peso molecular como o nitrato de prata (AgNO_3) para evidenciar tais porosidades na interface. Posteriormente, esta área de união é observada em microscopia eletrônica de varredura ou transmissão. A deposição de grãos de prata na camada híbrida dos sistemas que utilizam o condicionamento ácido prévio é atribuída à existência de regiões onde as fibras colágenas não foram totalmente envolvidas pela resina adesiva, ou onde a resina não foi adequadamente polimerizada. A degradação da união tem sido atribuída à penetração de fluidos nestas porosidades (Sano *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2001). Uma nova forma de

manifestação da nanoinfiltração nas interfaces foi relatada por Li *et al.* (2011). E Tay *et al.* (2003) observaram a deposição de grãos de prata não só na camada híbrida, mas também na camada de adesivo.

Sabe-se que as propriedades mecânicas dos adesivos podem influenciar as propriedades da interface de união e, conseqüentemente, podem estar relacionadas com a longevidade das restaurações (Milia *et al.*, 2012).

Nos adesivos que utilizam o condicionamento ácido prévio, a presença dos solventes orgânicos, como o etanol e a acetona, é de fundamental importância para que ocorra a remoção da água existente na região de dentina desmineralizada e a substituição pela resina adesiva. Apesar desse papel crucial na infiltração dos monômeros na rede de colágeno exposta pelo condicionamento ácido, a evaporação incompleta desses solventes e da água pode ocorrer (Pashley *et al.*, 1998). A presença de água e solventes residuais pode interferir na polimerização dos adesivos, diminuindo a qualidade da união e permitindo a ocorrência de porosidades nanométricas na camada híbrida (Pereira *et al.*, 2001).

A ocorrência da nanoinfiltração nas interfaces resina-dentina produzidas pelos sistemas adesivos é difícil de ser evitada. A manifestação dos padrões de nanoinfiltração varia consideravelmente, dependendo principalmente da composição, do modo de aplicação dos materiais utilizados e do tempo de armazenamento dos espécimes (Reis *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2004). A utilização do nitrato de prata amoniacal permite a visualização não somente de regiões onde existem espaços não infiltrados pelo adesivos, mas também de grupos polares hidrófilos que permitem a formação de pontes de hidrogênio com moléculas de água. Inicialmente, o conceito de nanoinfiltração foi atribuído às regiões da camada híbrida que não haviam sido completamente infiltradas pela resina adesiva (Tay *et al.*, 2002). Assim, não era de se esperar que a nanoinfiltração fosse observada em interfaces de união produzidas por sistemas adesivos autocondicionantes, que desmineralizam e infiltram a dentina simultaneamente. Entretanto, foi provado que esse conceito não se aplica a realidade (Pereira *et al.*, 2001; Okuda *et al.*, 2002; Tay *et al.*, 2002). Os trabalhos demonstram a ocorrência da nanoinfiltração em interfaces produzidas tanto pela técnica de condicionamento ácido prévio quanto pela técnica autocondicionante (Tay *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2005).

Uma vez que o mecanismo de degradação das interfaces da dentina afetada por cárie ainda não foi totalmente elucidado e controlado, a investigação em longo prazo das propriedades físicas dos sistemas adesivos, da resistência de união, da nanoinfiltração, e a utilização de agentes antioxidantes pode trazer melhorias importantes nos procedimentos adesivos uma vez que estes são indispensáveis na prática clínica.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a efetividade de antioxidantes no tratamento da dentina afetada por cárie, considerando o tipo de adesivo e tempo de armazenamento. Os fatores em estudo são o tratamento da dentina, tempo de armazenamento e tipo de adesivo sendo as variáveis de resposta:

- a. Resistência de união e padrão de fratura;
- b. Nanoinfiltração da camada híbrida.

Baseando-se nas informações e na revisão de literatura apresentadas, a seguinte hipótese foi testada neste trabalho:

O tratamento com agentes antioxidantes aumenta a resistência de união resina/dentina afetada por cárie, diminui a nanoinfiltração na camada híbrida, ao longo do tempo e é diferente para os sistemas adesivos autocondicionantes e convencional (do tipo condiciona/ lava – “etch & rise”).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi conduzido após a aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (Anexo 1).

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O modelo experimental totalmente casualizado, em um modelo fatorial a x b x c. Os fatores em estudo foram: **a.** tratamento (Controle – sem tratamento, NaOCl a 6% e EDTA, 0,1M); **b.** sistema adesivo (Clearfil SE Bond e Adper Single Bond 2); **c.** tempo de armazenamento (24 h, 12 e 18 meses). Os grupos de estudo constituídos para este experimento podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de acordo com os fatores em estudo.

Tratamento da Dentina	Tempo de Armazenamento	Sistemas Adesivos	
		Clearfil SE Bond (n=6)	Adper Single Bond 2 (n=6)
NaOCl a 6% (n=6)	24 h	G1	G2
	12 meses	G3	G4
	18 meses	G5	G6
EDTA 0,1 M (pH=7.4) (n=6)	24 h	G7	G8
	12 meses	G9	G10
	18 meses	G11	G12
Sem tratamento (Grupo Controle) (n=6)	24 h	G13	G14
	12 meses	G15	G16
	18 meses	G17	G18

4.3 PREPARO DOS ESPÉCIMES

Cento e oito terceiros molares humanos hígidos foram obtidos, higienizados e limpos com pasta de pedra-pomes utilizando uma escova de Robson, e em seguida foram armazenados em água deionizada à 4°C por até dois meses após a extração (Figura 2- a). A dentina média foi determinada para cada dente por meio de uma tomada radiográfica, utilizando a técnica *bitewing* e uma tela milimetrada, considerando a distância entre a junção esmalte-dentina e a polpa. A porção oclusal e as raízes (na junção cimento-esmalte) foram seccionadas por um disco diamantado (EXTEX DIA.WAFER, 4"x.012 x ½ HIGH CONCEN, EXTEC Corp., Enfield, CT, USA - #1010-392) utilizando uma máquina de corte ISOMET 1000 (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA), e depois foram descartadas (Figura 2- b,c). Os espécimes foram cobertos com verniz ácido resistente para unhas (Colorama; CEIL Com. Exp. Ind. Ltda., São Paulo, SP, Brasil), com exceção da porção oclusal da dentina, e foram fixados em tampas plásticas de recipientes de vidro com fio ortodôntico (Morelli Ortodontia Ltda, Sorocaba, SP, Brasil) (Figura 2- d), colocadas no frasco com água deionizada (Figura 2-e). foram esterilizados por radiação gama com dose de 14,5 kGy.

4.4 PRODUÇÃO DE CÁRIE

Para a produção de cárie foram utilizadas cepas de *S. mutans* (AU 159) que estavam armazenadas e foram reativadas, e então transferidas para um frasco contendo 50 mL de caldo BHI (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD 21152, USA), suplementado com extrato de levedura (Himedia Laboratories Pvt Ltd., Mumbai, India), glicose a 0,5% (Synth, Labsynth, Diadema, SP, Brasil), 1% de sacarose (Synth, Labsynth, Diadema, SP, Brasil) e 2% de *S. mutans* (AU 159) (Figura 2-f). A concentração dessa suspensão de bactérias foi mensurada pelo comprimento de onda (densidade óptica) a 660 nm (A_{660}), e a coloração de Gram foi realizada para verificar se havia contaminação por outras bactérias. A inoculação de *S. mutans* foi realizada somente no primeiro dia do experimento, mas o meio de cultura foi renovado a cada 48 horas, durante 14 dias (Figura

2-g,h). A lesão de cárie foi identificada por meio de microscopia óptica em estudo piloto (Carvalho *et al.*, 2008).

O tecido cariado infectado e amolecido foi identificado por meio de critério clínico de sensação tátil com sonda exploradora e exame visual, identificando-se a superfície amolecida e umedecida, e removido com broca carbide #8 (KG Sörensen, Barueri, São Paulo, Brasil) sob baixa rotação até a identificação do tecido mais endurecido com cor mais escurecida, como descrito por Carvalho *et al.* (2008).

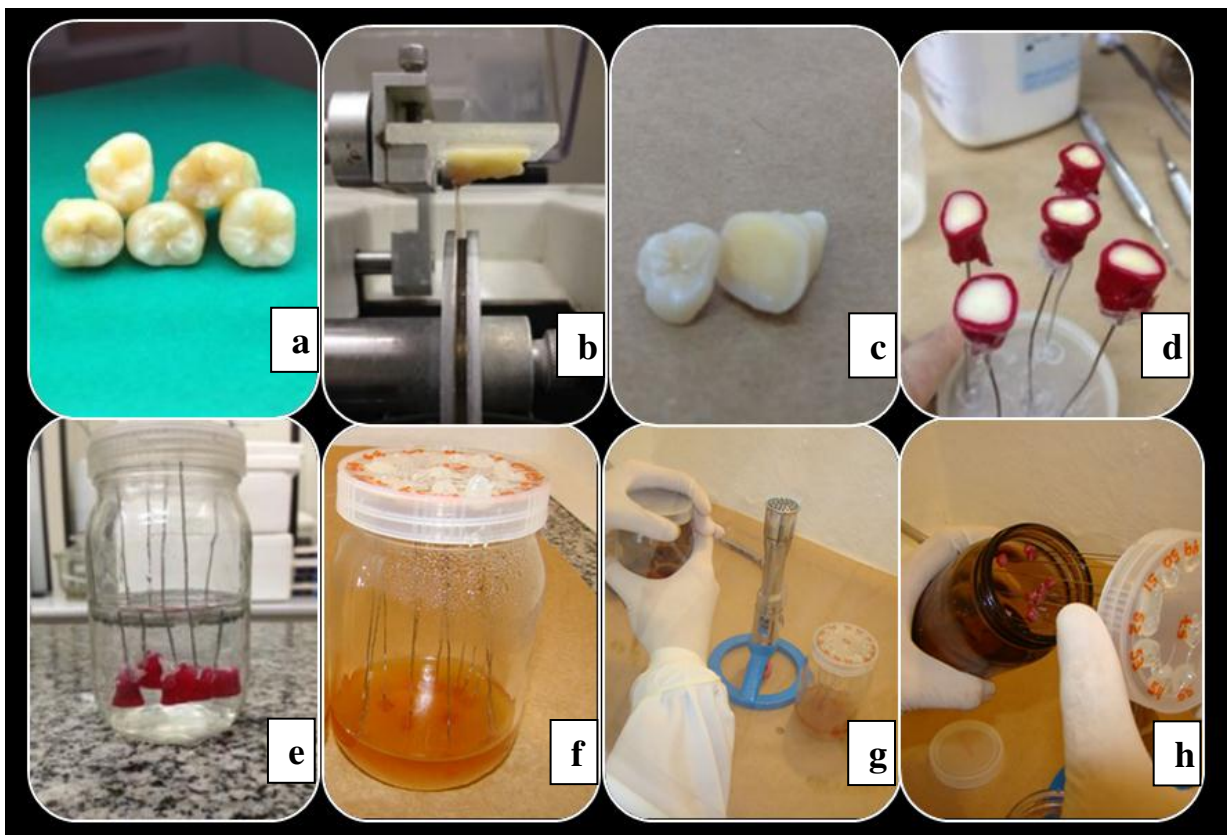





Figura 2. Produção da lesão de cárie em dentina. a. Terceiros molares humanos hígidos utilizados no estudo; b. Seccionamento e remoção da superfície oclusal; c. Remanescente oclusal e superfície dentinária utilizado no estudo; d. Espécimes impermeabilizados com verniz ácido-resistente; e. Espécimes preparados para esterilização; f-h. Troca da solução utilizada para produção de cárie.

4.5 TRATAMENTO DA DENTINA POR ANTIOXIDANTES E PROCEDIMENTOS ADESIVOS

Após a produção de cárie artificial pelo modelo biológico (*S. mutans*) e a dentina infectada removida, os espécimes foram aleatorizados por meio de uma tabela do Excell[®] e distribuídos em três grupos de acordo com o tratamento da dentina realizado, em seguida, em dois grupos de acordo com o sistema adesivo empregado e, então, em três grupos de acordo com o tempo de armazenamento (n=6) (Tabela 1). Os materiais utilizados neste estudo, assim como, marcas comerciais, principais componentes, fabricantes, números de lote e os valores de pH dos sistemas adesivos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos sistemas adesivos, composição, fabricantes, números do lote, valores de pH e técnica de aplicação dos materiais utilizados no estudo.

Sistema Adesivo	Composição	Fabricante (número do lote)	Valores de pH *
Adper Single Bond 2 (SB) 	(1)Ataque ácido (Scotchbond™ Etchant): Ácido fosfórico a 35% (2) Primer/Adesivo: HEMA, Bis-GMA, dimetacrilatos metacrilatos, etanol, água, UDMA, glicerolato de Bisfenol-A, copolímero do ácido polialcenoico, canforoquinona	3M Dental Products, St. Paul, MN, EUA (ácido: 25VY ; adesivo: 8RY)	pH = 0.6 (ácido) pH = 4.7 (primer + adesivo)
Clearfil SE Bond (SE) 	Primer: água, MDP, HEMA, dimetacrilato hidrófilo, N-Dietanol-p-toluidina, canforoquinona Adesivo: MDP, HEMA, Bis-GMA, dimetacrilato hidrófobo, Canforoquinona, N-Dietanol-p-toluidina, sílica coloidal silanizada	Kuraray Medical Inc, Kurashiki, Tokio, Japão (Primer: 00861A) (Adesivo: 01262A)	pH = 2.0 (primer) pH = 2.0 (adesivo)
Resina Composta Fotopolimerizável Charisma 	—	Heraeus Kulzer, Weheim, Alemanha (010503)	—

* informações do fabricante. BisGMA – bisfenol A diglicidil metacrilato; HEMA – hidroxietil metacrilato; MDP – 10-ácido fosfórico metacrilóiloxidecametileno; UDMA – uretano dimetacrilato.

Durante o procedimento restaurador, de acordo com os grupos (antes da aplicação do primer nos sistemas autocondicionantes e após o ataque ácido nos sistemas adesivos convencionais), os espécimes foram tratados por 90 segundos com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 6% (Proderma, Piracicaba, São Paulo) ou ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (0,1 M) (Proderma, Piracicaba, São Paulo), utilizando “microbrush” (KG

brush Fine, KG Soresen, Cotia, São Paulo – # 6187/0908), e depois levemente secos com papel absorvente (Perdigão *et al.*, 2013).

Os procedimentos adesivos foram realizados seguindo as instruções dos fabricantes de ambos os sistemas utilizados (Figura 3).

Adper Single Bond 2 - Foi realizado condicionamento com ácido fosfórico a 37% (Scotchbond™ Etchant – 3M, Dental Products, MN, EUA – #070410), por 15 segundos, sobre a dentina afetada, e após, lavagem com água por 30 s. Realizou-se a aplicação dos tratamentos de acordo com os grupos: com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) à 6% (Proderma, Piracicaba, São Paulo) (G2, G4, G6), ou com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (0,1 M) (Proderma, Piracicaba, São Paulo) (G8, G10, G12), utilizando “microbrush” (KG brush Fine, KG Soresen, Cotia, São Paulo – # 6187/0908), e depois foram levemente secos com papel absorvente (Perdigão *et al.*, 2013), exceto os grupos controles (G14, G16, G18), que receberam os sistemas adesivos sem tratamento prévio. O sistema adesivo foi aplicado com o uso de microbrush e seu espalhamento e remoção de excesso se deu com leve jato de ar, seguido da fotoativação por 10s com o aparelho VALO® Fotoativador LED de Amplo Espectro (Ultradent, Salt Lake City, Utah, EUA), cuja intensidade de luz (1400 mW) foi avaliada antes da fotoativação com o radiômetro portátil digital (Hilux Dental Curing Light Meter, Inc. Dental Benlioglu, Turkey).

Clearfil SE Bond – Realizou-se a aplicação dos tratamentos de acordo com os grupos: NaOCl à 6% (G1, G3, G5), ou com EDTA (G7, G9, G11), utilizando “microbrush”, e depois foram levemente secos com papel absorvente (Perdigão *et al.*, 2013), exceto os grupos controles (G13, G15, G17), que receberam os sistemas adesivos sem tratamento prévio. Foi então feita a aplicação do Primer com microbrush, por 20 s, seguido de leve jato de ar e, logo após, o adesivo foi aplicado com microbrush, e seu espalhamento realizado com leve jato de ar, sendo então fotoativado, por 10 s, utilizando o aparelho VALO® Fotoativador LED de Amplo Espectro.

A resina composta Charisma, foi utilizada completando o procedimento restaurador, dessa forma, formando blocos de 4 mm de altura, colocados em incrementos de 2 mm. Cada incremento foi fotoativado utilizando o aparelho Fotoativador LED Valo (Ultradent, Salt Lake City, Utah, EUA), cuja intensidade de luz (1400 mW/cm²) foi avaliada antes da

fotoativação com o radiômetro portátil digital (Hilux Dental Curing Light Meter, Inc. Dental Benlioglu, Turkey). As superfícies dentinárias restauradas foram armazenadas em umidade relativa por 24 h.

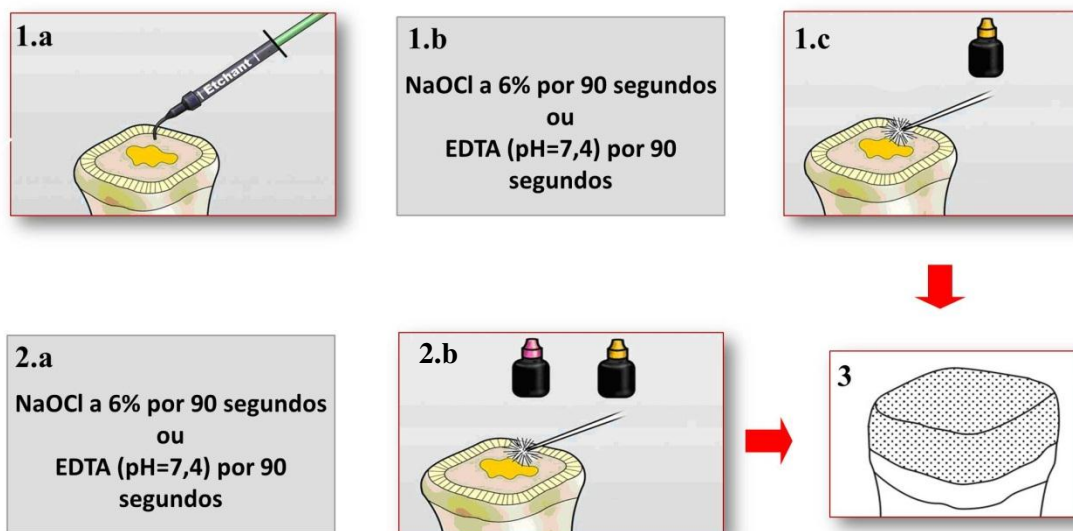


Figura 3. Esquema representativo da aplicação dos sistemas adesivos de acordo com os fabricantes e construção do bloco de resina. 1.a – Aplicação do ácido fosfórico; 1.b – Aplicação dos tratamentos de acordo com os grupos; 1.c – Aplicação do adesivo Adper Single Bond; 2.a – Aplicação dos tratamentos de acordo com os grupos; 2.b - Aplicação do sistema adesivo Clearfil SE Bond; 3. Bloco de compósito. Sendo que após do ataque ácido nos sistemas adesivos convencionais e antes da aplicação do primer nos sistemas autocondicionantes foi realizado a aplicação do tratamento de acordo com os grupos.

4.6 ENSAIO DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO

Após 24 horas, para o teste de microtração, os espécimes foram seccionados perpendicularmente à interface adesiva com disco diamantado (EXTEX DIA.WAFER, 4"x.012 x ½ HIGH CONCEN, EXTEC Corp., Enfield, CT, USA - #1010-392), utilizando uma máquina de corte ISOMET 1000 (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA), com uma

velocidade de 250 rotações por minuto, produzindo palitos de aproximadamente 2,0 mm² de área de secção transversal (Figura 4), mensurada com paquímetro digital (CD-6"BS, Mitutoyo Corporation, Tokyo, Japan), os quais foram armazenados em água destilada a 37°C de acordo com o tempo de armazenamento (24 h, 12 meses e 18 meses).

Os palitos foram individualmente posicionados no centro do dispositivo de microtração e fixados pelas extremidades com adesivo à base de cianocrilato (Super Bonder Power Flex-Gel Control, LOCTITE, Henkel Ltda, Itapevi, São Paulo, Brasil - # EDF), e submetidos sob carga de tração (50 N) à uma velocidade de 0,5mm/min até ocorrer a ruptura, na máquina de ensaio EZ-TEST (EZ-S 500N, Shimadzu Corporation, Nakagui-ku, Kyoto, Japan). A tensão necessária para causar ruptura dos espécimes foi determinada pela razão entre a carga (Kgf) no momento da fratura e a área da seção transversal do espécime em cm². Os valores obtidos foram convertidos em MPa e, conseqüentemente, passaram a se referir ao valor de resistência de união (RU) de cada espécime testado. Após a fratura, os espécimes foram cuidadosamente removidos e armazenados para análise de padrão de fratura.

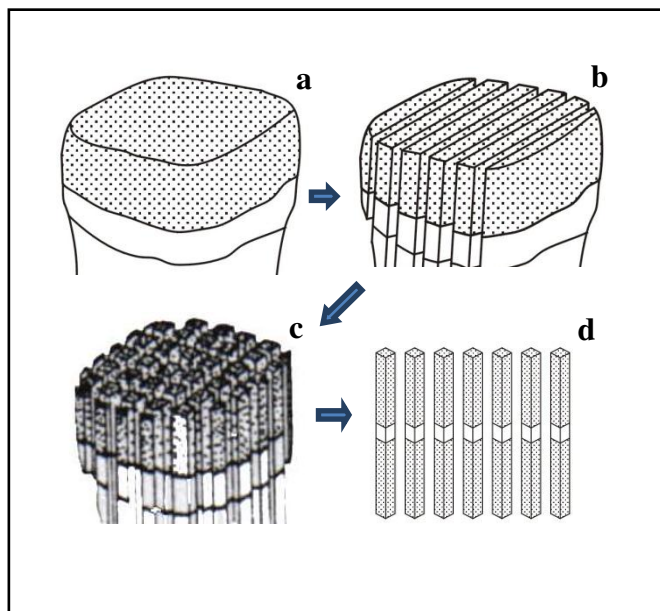


Figura 4. Sequência das etapas de seccionamento dos conjuntos dentina/resina para obtenção dos palitos. **a.** Bloco de resina (Charisma) - dentina (de acordo com os grupos) **b.**

Secção transversal do bloco no sentido vestibulo-lingual **c**. Secção transversal do bloco no sentido mesio-distal **d**. Palitos prontos para o ensaio de microtração.

4.7 ANÁLISE DO PADRÃO DE FRATURA

Após o ensaio de resistência de união, os espécimes fraturados foram coletados, foram devidamente identificadas e armazenados em água. Posteriormente, todas os espécimes, foram colocados em recipiente contendo sílica e levados à estufa à 37°C por 2 horas para promover sua desidratação, sendo então pareados e posicionados em porta espécimes de alumínio para metalização com ouro (Balzers-SCD 050 Sputter Coater, Liechtenstein). Os padrões de fraturas dos espécimes foram observados em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (JEOL-JSM 5600LV, Tokyo, Japão), com aumentos de 50X e 150X. As fraturas foram classificadas em: fratura coesiva, rompimento do tecido dentinário ou do compósito (em dentina ou em resina); adesiva, rompimento da união na interface dentina/compósito; ou fratura mista, rompimento coesivo no compósito e adesivo na dentina (Figura 5).

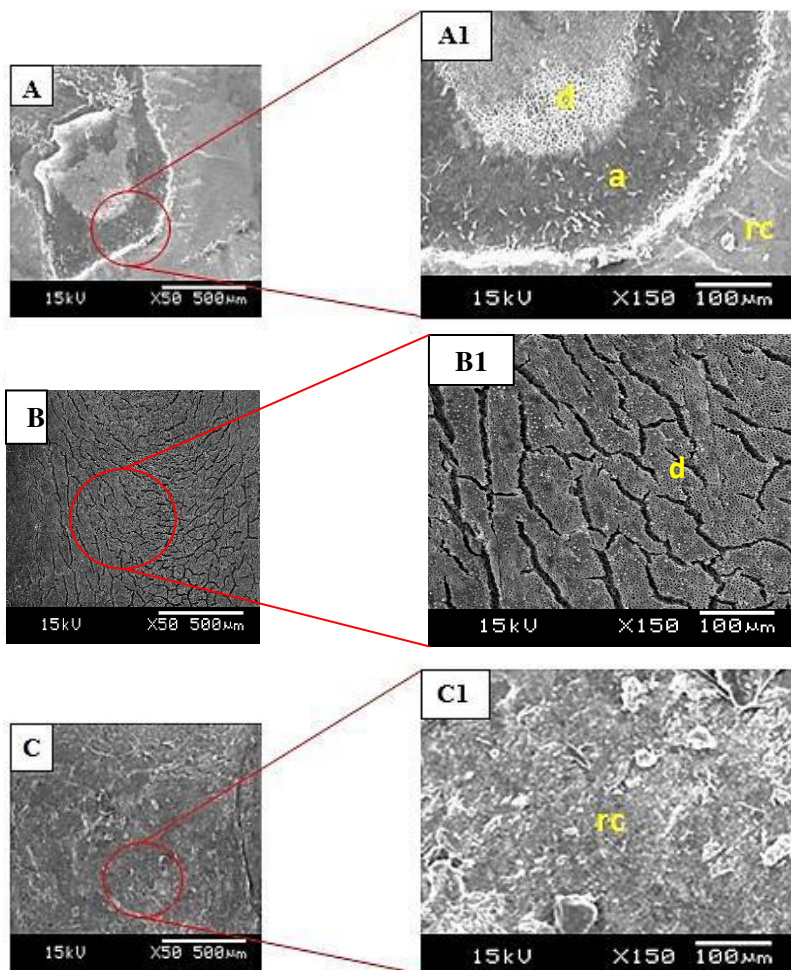


Figura 5. Imagens ilustrativas dos padrões de fratura. Mista (A), Adesiva (B) e Coesiva (C) - imagens com aumento de 50X (15kV), e (A1), (B1) e (C1- coesiva em resina) imagens com aumento de 150X (15kV). Em amarelo: Dentina (d), Adesivo (a) e Resina Composta (rc).

4.8 AVALIAÇÃO DA NANOINFILTRAÇÃO

Para avaliação da nanoinfiltração foram produzidas 5 fatias com disco diamantado (EXTEX DIA.WAFER, 4"x.012 x ½ HIGH CONCEN, EXTEC Corp., Enfield, CT, USA - #1010-392), utilizando uma máquina de corte ISOMET 1000 (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) (por grupo), com 1 mm de espessura. As fatias foram imersas em água destilada e

armazenadas de acordo com o tempo de armazenamento (24 h, 12 e 18 meses), em estufa à 37°C. Após cada período de armazenamento, os espécimes foram retirados da água, secos em papel absorvente e impermeabilizados com verniz ácido resistente para unhas (Colorama; CEIL Com. Exp. Ind. Ltda., São Paulo, SP, Brasil), deixando um espaço de 1 mm acima e abaixo da interface de união. Os espécimes foram imersos em água destilada por 20 minutos, e em seguida, em solução de nitrato de prata, que foi preparada com 25 g de cristais de nitrato de prata (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em 50 mL de água destilada e 50 mL de hidróxido de amônia a 28% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) com pH = 11,0. Esses espécimes permaneceram na ausência de luz, armazenados em frascos pretos de filme fotográficos, lacrados e depois envolvidos em papel alumínio, por 24 h. Os espécimes foram lavados e imersos em solução fotoreveladora Kodak (Carestream Health Inc., Verona St., Rochester, NY, USA - #121501T0V1) por 8h sob luz fluorescente. Novamente, os espécimes foram lavados com água destilada e cada espécime foi polido sob água em uma politriz (Metaserv 2000, Buehler, UK Ltd., Lake Bluff, IL, USA) usando lixas de 600-, 1200-, e 2000- de granulação (Carbimet Disc Set, Buehler, UK Ltd., Lake Bluff, IL, USA - #305208025), e pastas de polimento de 0.3 μ e 1 μ (ALPHA MICROPOLISH II DEAGGLOMERATEO ALUMINA, Buehler, UK Ltd., Lake Bluff, IL, USA) sob disco de feltro (Buehler, UK Ltd., Lake Bluff, IL, USA). Os espécimes foram desmineralizados por ácido fosfórico a 37% por 5 s, lavados com água destilada por 30 s, e secos com papel absorvente e depois deixados por 24 h em temperatura ambiente (Sacramento, 2010). Os espécimes foram então montados em suportes de alumínio, cobertos com carbono (Delton Vacuum Desk II, Moorestown, NJ) e examinados em MEV (JEOL-JSM 5600LV, Tokyo, Japan) com os aumentos de 50X e 300X.

A penetração da prata na interface de união, camada híbrida e camada de adesivo foram avaliadas e as imagens foram classificadas em escores: **escore 1**, nenhuma infiltração; **escore 2**, penetração somente na base da camada híbrida e ao redor dos *tags* de resina; **escore 3**, infiltração dentro da camada híbrida e/ou adesiva.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos a partir do ensaio de resistência de união resina/dentina à microtração foram analisados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, sendo verificada a distribuição normal dos dados e em seguida, pelo teste ANOVA Fatorial (axbxc) e teste Tukey ($p < 0,05$). Os dados da nanoinfiltração e padrão de fratura foram analisados por estatística descritiva.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO E PADRÃO DE FRATURA

O Quadro 1 mostra os resultados obtidos na ANOVA três fatores.

Fator de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento (TR)	2	0,04615	0,02308	13,4558 **
Tempo (TE)	2	0,00049	0,00024	0,1429 ns
Sistema Adesivo (SA)	1	0,01292	0,01292	7,5318 **
Int TR xTE	4	0,05009	0,01252	7,3018 **
Int TR x SA	2	0,09477	0,04739	27,6314 **
Int TE x SA	2	0,03072	0,01536	8,9553 **
Int TR x TE x SA	4	0,01382	0, 00345	2,0141 ns
Tratamentos	17	0,24895	0,01464	8,5392 **
Resíduo	342	0,58650	0,00171	
Total	359	0,83545		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

Quadro 1 - ANOVA três fatores, considerando-se: tratamento em três níveis (Controle, EDTA, NaOCl), tempo (24 h, 12 meses, 18 meses) e os sistemas adesivos (Adper Single Bond 2 e Clearfil SE Bond), para a variável dependente resistência de união resina/ DAC (MPa).

Pela análise do quadro 1, pode-se observar que não houve interação significativa entre os três fatores em estudo. Entretanto, as interações duplas entre os fatores foram significativas ($p < 0,05$). Os fatores isolados, tratamento e sistema adesivo, apresentaram

diferenças significativas ($p < 0,01$), mas o fator tempo não apresentou. Não houve interação significativa entre os três fatores em estudo. Entretanto, as interações duplas foram significativas ($p < 0,01$).

Tabela 3 – Médias dos valores (desvio padrão) da resistência de união resina/DAC (MPa), considerando-se o tratamento da superfície dentinária e o tempo de armazenamento dos espécimes.

<i>Tratamento</i>	<i>Tempo</i>		
	24h	12m	18m
NaOCl	11,51 aA (2,5)	11,22 aA (2,4)	8,40 bB (1,7)
EDTA	8,56 bB (2,0)	9,04 abB (2,0)	10,57 aA (2,2)
Controle	8,50 bA (1,9)	8,08 bA (1,7)	8,01 bA (1,8)

Letras minúsculas diferentes para colunas e letras maiúsculas para linhas identificam diferenças entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na tabela 3 podem ser visualizados as médias dos valores de resistência da união resina/DAC, tratada pelos antioxidantes EDTA e NaOCl, de acordo com o tempo de armazenamento.

Pôde-se observar que, no tempo armazenamento de 24 h o tratamento com NaOCl apresentou maiores médias de resistência de união que o tratamento com EDTA e o controle, no tempo de 12 meses esse mesmo resultado foi encontrado, porém, no tempo 18 meses, o tratamento com EDTA apresentou médias significativamente maiores que os demais grupos.

Ao longo do tempo, os resultados mostraram que o tratamento com NaOCl, manteve as médias de resistência de união nos dois primeiros tempos de armazenamento, (24 h, 12 m) apresentando uma diminuição no último tempo (18 m). Já o tratamento com EDTA, manteve os mesmos valores até os 12 meses, e aos 18 meses foi observado um aumento significativo das médias de resistência de união. E o controle, manteve e não apresentou alteração nas médias durante o tempo de armazenamento.

Tabela 4 – Médias dos valores (desvio padrão) da resistência de união resina/DAC (MPa), considerando-se o tratamento da superfície dentinária e o sistema adesivo utilizado.

<i>Tratamento</i>	<i>Sistema Adesivo</i>	
	SE	SB
NaOCl	12,53 aA (2,5)	8,22 bB (1,8)
EDTA	8,52 bB (1,7)	10,26 aA (2,3)
CONTROLE	8,47 bA (1,8)	7,93 bA (1,8)

Letras minúsculas diferentes para colunas e letras maiúsculas para linhas identificam diferenças entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na tabela 4, encontram-se as médias dos valores da resistência de união resina/DAC, em função do tratamento com antioxidantes e sistema adesivo utilizado.

Esta tabela demonstrou que, o tratamento com NaOCl, quando associado ao sistema adesivo SE apresentou maiores médias de resistência de união, comparado aos valores apresentados quando este sistema adesivo, foi associado ao tratamento com EDTA e controle. Quanto ao sistema adesivo SB, observamos que este apresentou melhor desempenho, quando associado ao tratamento com EDTA, obtendo valores significativamente maiores que os apresentados, quando este foi associado ao tratamento com NaOCl e controle.

Pode-se verificar que, o tratamento com a NaOCl apresentou melhor desempenho quando foi associado ao sistema adesivo SE, comparado aos valores obtidos quando este tratamento foi associado ao sistema adesivo SB. O mesmo não aconteceu ao tratamento com EDTA, pois este produziu menores valores resistência de união quando associado ao sistema adesivo SE, e quando foi utilizado associado ao uso do sistema adesivo SB, apresentou maiores valores. Já o controle apresentou o mesmo desempenho quando associado aos dois sistemas adesivos.

Tabela 5 – Médias dos valores (desvio padrão) da resistência de união resina/DAC (MPa), considerando-se o sistema adesivo utilizado e o tempo de armazenamento dos espécimes.

<i>Sistema Adesivo</i>	<i>Tempo</i>		
	24h	12m	18m
SE	10,30 aAB (2,2)	10,65aA (2,1)	8,57 aB (1,9)
SB	8,75 bA (2,3)	8,25 bA (2,0)	9,42aA (2,1)

Letras minúsculas diferentes para colunas e letras maiúsculas para linhas identificam diferenças entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A tabela 5, evidencia as médias dos valores da resistência de união resina/DAC em função do sistema adesivo utilizado e o tempo de armazenamento.

Observou-se que, no tempo inicial (24 h), o sistema adesivo SE apresentou os maiores valores da resistência de união resina comparados ao sistema adesivo SB, aos 12 meses de armazenamento, o mesmo pode resultado foi obtido, entretanto, aos 18 meses não foram observadas diferenças significativas na resistência de união comparando os dois sistemas adesivos utilizados.

Ao longo do tempo de armazenamento, o sistema adesivo SE, manteve valores da resistência de união durante os dois primeiros tempos de armazenamento, apresentando menores valores aos 18 meses, enquanto que para o sistema adesivo SB, as médias dos valores de resistência da união se mantiveram os mesmos durante todos os tempos de armazenamento.

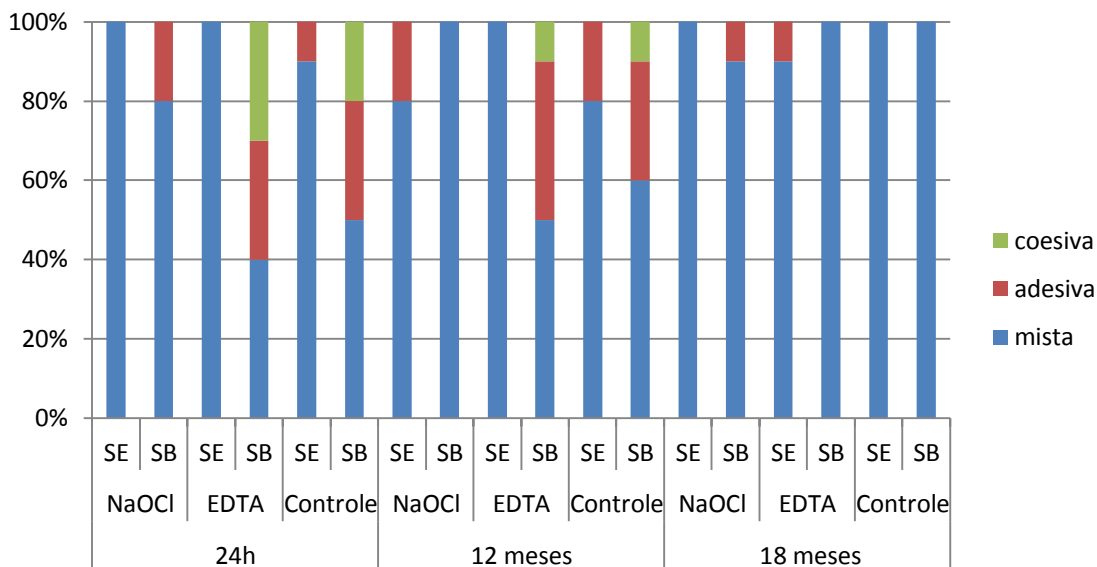


Figura 6 – Ilustração gráfica da distribuição dos percentuais de tipo de fratura entre os grupos.

A Figura 6, demonstrou os padrões de fratura observados após o teste de resistência de união. Os maiores percentuais do padrão de fratura foram mistos, na maioria dos grupos, com relação aos tempos observados, mas, principalmente após 18 meses de armazenamento. No tempo de 24 h, quando o tratamento EDTA foi utilizado associado ao sistema adesivo SB e quando o controle foi associado ao sistema adesivo SB ocorreu maior frequência de fraturas adesivas e coesivas. No tempo de armazenamento de 12 meses, houve maior ocorrência de fraturas adesivas, quando utilizou-se o tratamento com EDTA associado ao sistema adesivo SB, e quando o controle foi associado ao sistema adesivo SB.

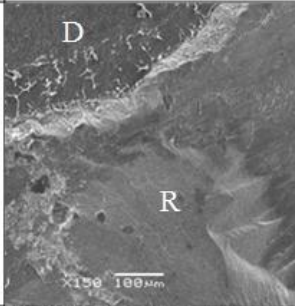
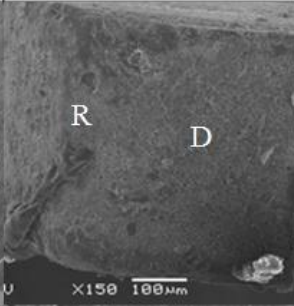
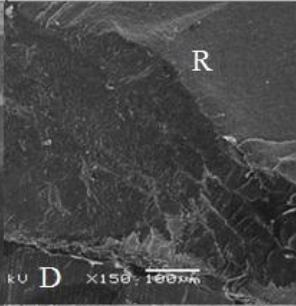
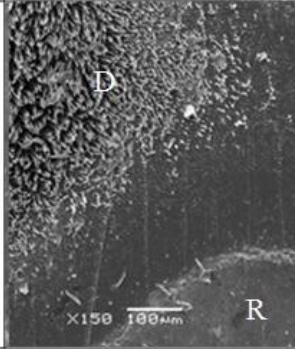
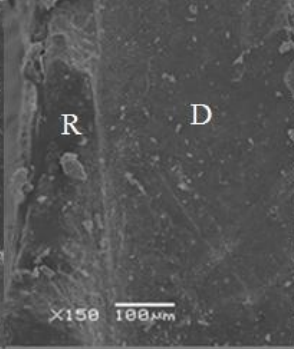
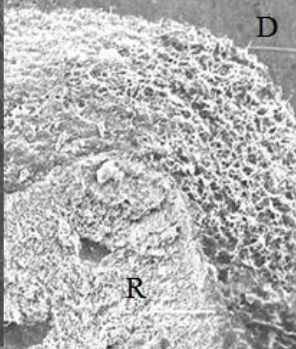
Tratamento da dentina	Tempo	NaOCl		
		24 h	12 m	18 m
Sistemas Adesivos	SE			
	SB			

Figura 7 – Micrografias dos padrões de fratura que receberam o tratamento de NaOCl. R – resina; D – dentina.

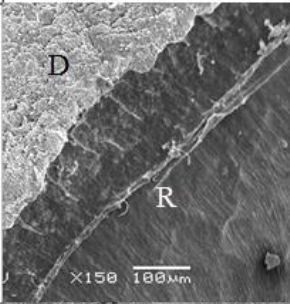
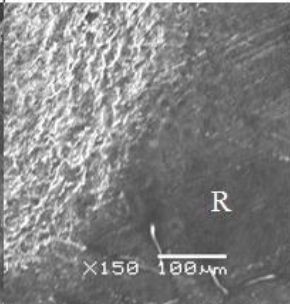
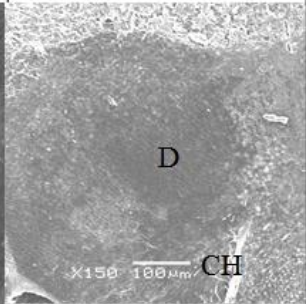
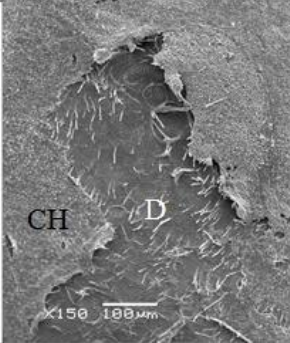
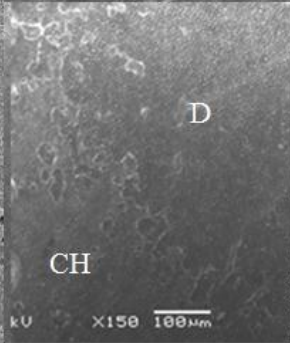
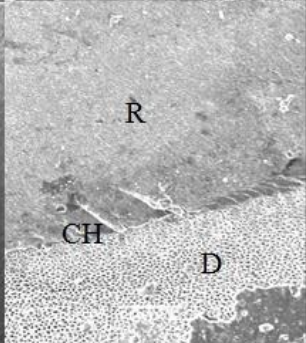
Tratamento da dentina	Tempo	EDTA		
		24 h	12 m	18 m
Sistemas Adesivos	SE			
	SB			

Figura 8 – Micrografias dos padrões de fratura que receberam o tratamento de EDTA. R – resina; D- dentina; CH – camada híbrida.

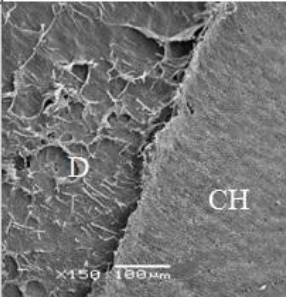
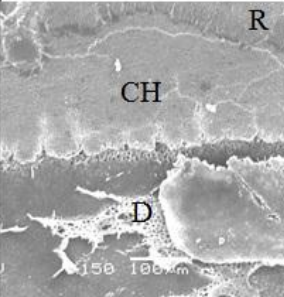
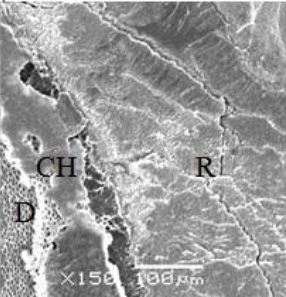
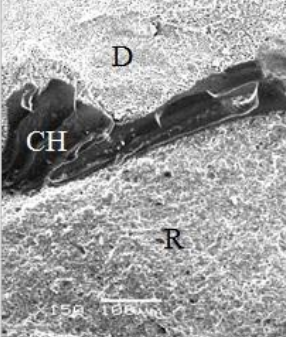
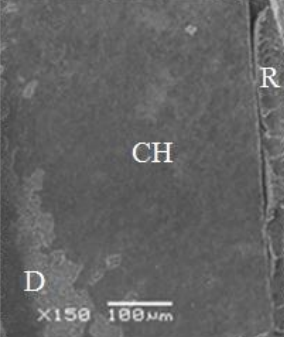
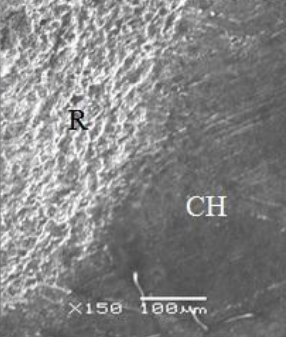
Tratamento da dentina	Tempo	Sem Tratamento		
		24 h	12 m	18 m
Sistemas Adesivos	SE			
	SB			

Figura 9 – Microrradiografias dos padrões de fratura do grupo controle. R – resina; D – dentina; CH – camada híbrida.

5.2 AVALIAÇÃO DA NANOINFILTRAÇÃO

A figura 10 ilustra os percentuais dos escores observados de nanoinfiltração para os grupos em relação ao tratamento da dentina afetada por cárie com antioxidantes, tempo de degradação em água e sistemas adesivos utilizados.

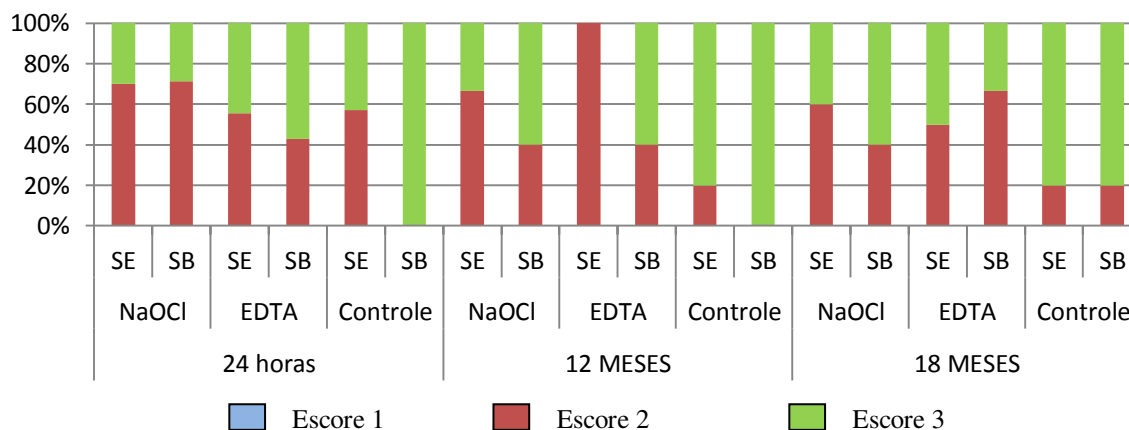


Figura 10 - Distribuição dos percentuais dos escores de nanoinfiltração encontrados para os grupos.

Pode se observar que todos os espécimes apresentaram algum tipo de infiltração de nitrato de prata na interface, sendo predominante o escore 2, no grupo de degradação após 24 h esse escore foi encontrado principalmente nos grupos que receberam tratamento com NaOCl, seguidos dos grupos SE/EDTA e SE/Controle e por último no grupo SB/EDTA, exceto para o grupo controle, quando utilizado o sistema adesivo SB. Os percentuais de escore 3 aumentaram aos 12 meses de imersão em água exceto para os grupos SB/NaOCl e SB/EDTA, no entanto houve um aumento do escore 2 para o grupo SE/EDTA. Aos 18 meses pode ser observado similares resultados aos observados aos 12 meses para os grupos SE/NaOCl, SB/NaOCl e SE/Controle. Para o grupo SB/Controle observou-se que 20% dos espécimes apresentaram diminuição do escore 3, sendo observado nesses espécimes o escore 2, SE/Controle apresentou os mesmos níveis de infiltração por nitrato de prata aos 12 e 18 meses, SE/EDTA apresentou acentuado aumento de percentuais de escore 3 nos espécimes.

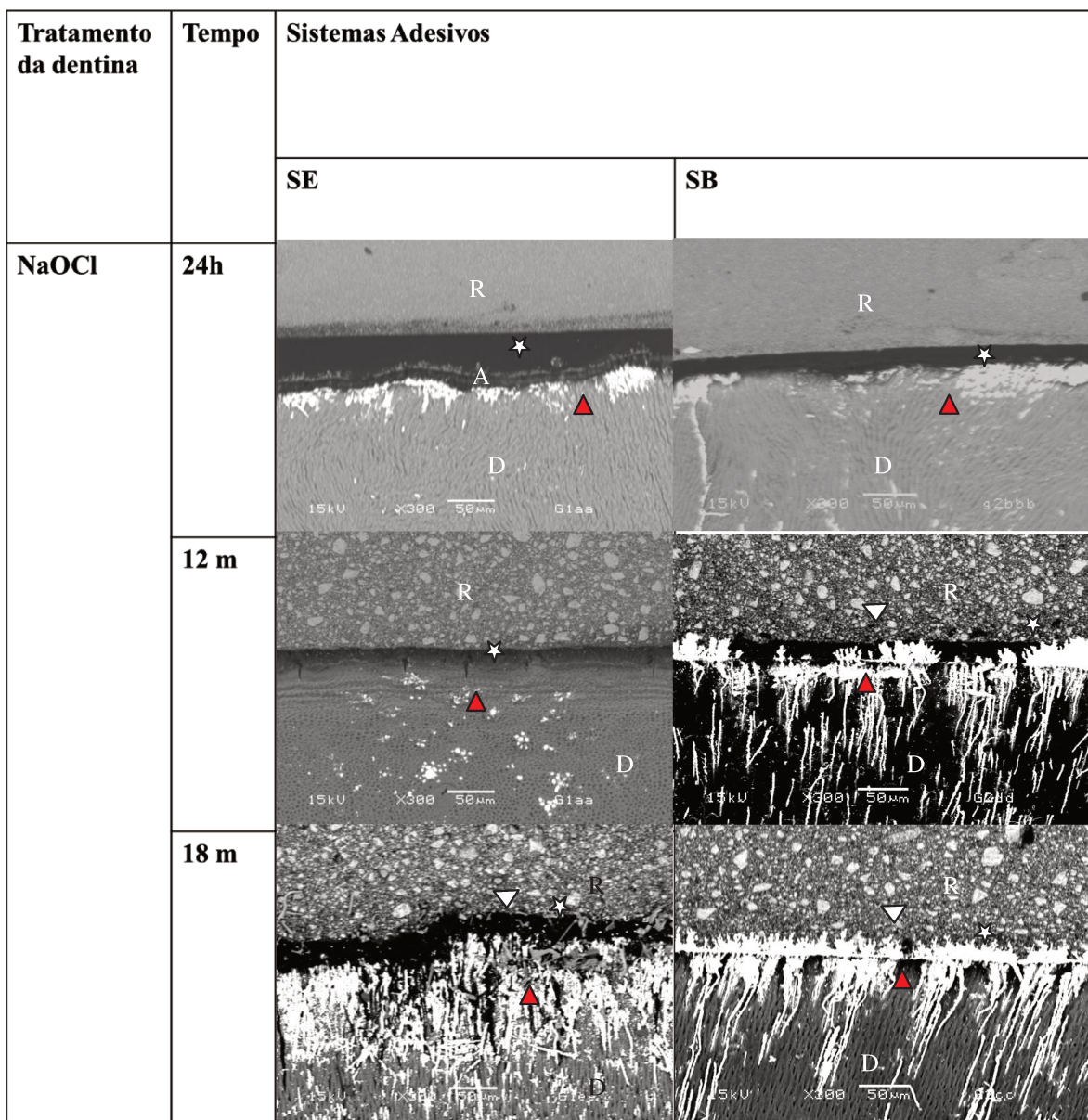


Figura 11 - Micrografias da avaliação da nanoinfiltração relativas aos espécimes que receberam o tratamento de NaOCl a 6%. R- resina, D – dentina, CH – camada híbrida, estrela/A – adesivo, triângulo – identificando a infiltração por nitrato de prata abaixo e acima da camada híbrida.

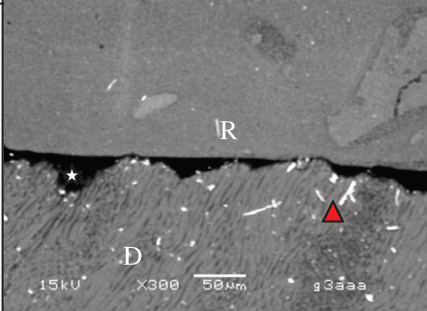
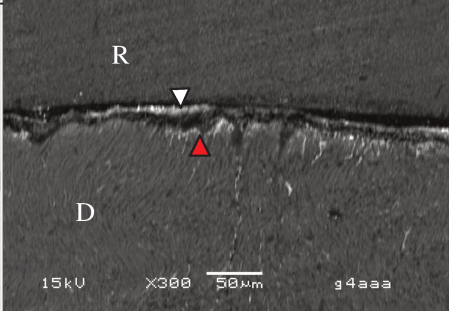
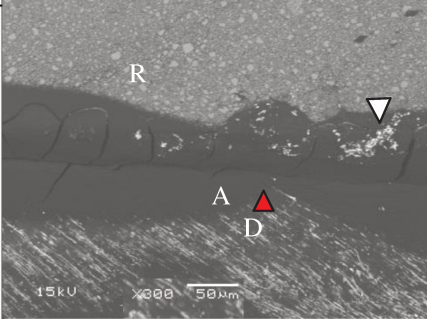
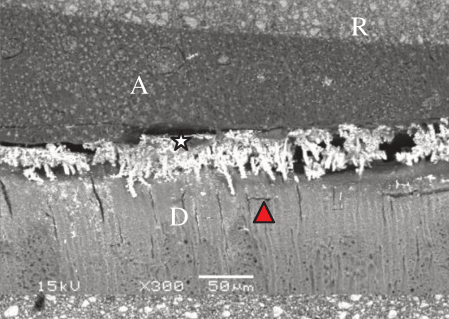
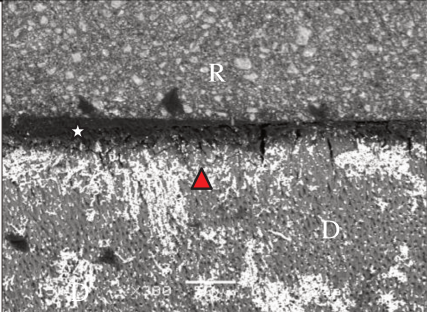
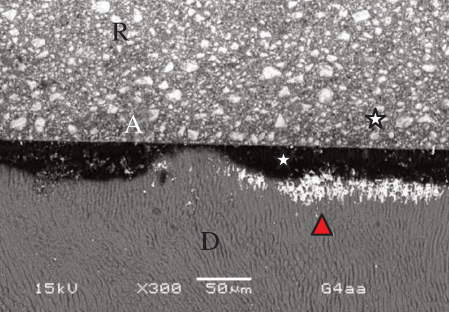
Tratamento da dentina	Tempo	Sistemas Adesivos	
		SE	SB
EDTA	24h		
	12 m		
	18 m		

Figura 12 - Micrografias da avaliação da nanoinfiltração relativas aos espécimes que receberam o tratamento de EDTA. R- Resina, D – Dentina, CH – camada híbrida, estrela/A – adesivo, triângulo – identificando a infiltração por nitrato de prata abaixo e acima da camada híbrida.

Tratamento da dentina	Tempo	Sistemas Adesivos	
		SE	SB
Sem Tratamento	24h		
	12 m		
	18 m		

Figura 13 - Micrografias da avaliação da nanoinfiltração relativas aos espécimes que do grupo controle. R- Resina, D – Dentina, CH – camada híbrida, estrela/A – adesivo, triângulo – identificando a infiltração por nitrato de prata abaixo e acima da camada híbrida.

6 DISCUSSÃO

A hipótese de que o tratamento com antioxidantes aumenta a resistência de união resina/DAC foi parcialmente confirmada, uma vez que não houve interação significativa entre os três fatores em estudo. No entanto, a interação entre o tratamento da DAC e o tempo de armazenamento, a interação entre o tratamento da DAC e o sistema adesivo utilizado, e o sistema adesivo utilizado e o tempo de armazenamento foram significativas.

O tratamento com NaOCl, apresentou maiores valores, ao longo do tempo, com exceção do tempo de 18 meses. O NaOCl é bem conhecido como agente proteolítico, capaz de dissolver efetivamente o substrato orgânico dos materiais biológicos, bem como os íons de magnésio e carbonato da dentina, e aumentar a penetração dos sistemas adesivos (Erhardt *et al.*, 2008).. A aplicação deste agente antioxidante altera ultra morfologicamente a superfície dentinária, expondo as fibras colágenas, redes laterais de canais e anastomoses, além de alargar a abertura dos túbulos dentinários. Assim, a dentina desmineralizada, inicialmente rica em colágeno, é transformada em uma estrutura porosa e sem colágeno, com múltiplas irregularidades e uma boa retenção mecânica para o adesivo, além de ser também resistente à degradação ao longo do tempo (Perdigão *et al.*, 2013). Estes resultados também foram encontrados por Kunawarote *et al.* (2011), Hashimoto (2010) e Nakajima *et al.* (2011), que demonstram que o tratamento com NaOCl da *smear layer*, que cobre a DAC, causa erosão e dilui a *smear layer*, assim como, causa a dissolução dos componentes orgânicos da *smear layer* superficial. Entretanto, a percolação pela água acontece, e a degradação hidrolítica da camada híbrida ocorre, como visto nas micrografias da nanoinfiltração (Fig 11), para ambos sistemas adesivos.

Já o grupo controle, apresentou os menores valores de resistência de união, isso porque a *smear layer* da DAC apresenta união fraca à dentina subjacente e irregular. Além disso, a DAC parece ser enriquecida de componentes orgânicos comparada à dentina hígida. O colágeno desorganizado e/ou mineral preso ao colágeno gelatinoso podem não ser removidos mesmo com o ataque ácido por ácido fosfórico. O colágeno desorganizado e a camada gelatinosa dentro da *smear layer* podem impedir a infiltração dos monômeros resinosos e dificultar o selamento perfeito da interface resina-dentina (Breschi *et al.*, 2008;

Joves *et al.*, 2013). Assim, a *smear layer* da DAC é enriquecida de componentes orgânicos que podem contribuir para uma inferior adesão a este substrato (Joves *et al.*, 2013). O EDTA também apresentou valores mais baixos de resistência de união nos dois primeiros tempos de armazenamento, mas foram significativamente maiores aos 18 meses, o que corrobora com os de Erdhart *et al.* (2008), que afirmaram que este ácido dissolve a fase mineral da dentina sem remover as proteínas de dentina, evitando grandes alterações da estrutura fibrilar de colágeno, conferindo estabilidade à matriz orgânica da dentina. Além disso, a manutenção da resistência de união obtida após tratamento com EDTA na DAC pode estar relacionada com a capacidade dessa solução na prevenção de mudanças de conformação induzidas pelas H^+ , preservando o caráter esponjoso da matriz de colágeno e, conseqüentemente, melhorando a infiltração de material resinoso nas porosidades da dentina. Dessa forma, o EDTA aumentou a resistência de união por produzir uma zona desmineralizada, causando o aumento da porosidade no substrato dentinário, o que pode potencialmente facilitar a infiltração dos sistemas adesivos, criando união micromecânica entre o substrato tratado e os sistemas adesivos (Erdhart *et al.*, 2008).

Os resultados das médias dos valores de resistência de união considerando o tratamento da superfície dentinária e o sistema adesivo utilizado (Tabela 4), apontaram que o EDTA quando utilizado associado com o sistema adesivo SE produziu menores valores de resistência de união, independente do tempo de armazenamento, este resultado concorda com os estudos que utilizaram o EDTA como tratamento desproteinizante e verificaram diminuição das propriedades mecânicas da camada híbrida (Sauro *et al.*, 2009; Sauro *et al.*, 2011), o que difere Carvalho *et al.* (2000) e Thompson *et al.* (2012) que sugeriram que o EDTA preserva as propriedades mecânicas da dentina e cria uma camada híbrida mais resistente à degradação. Quanto ao uso do NaOCl, este apresentou maiores valores de resistência de união quando utilizado com o adesivo SE, e apresentou menores valores quando foi utilizado com o sistema adesivo SB, o que concorda com os estudos de Wei *et al.* (2008), Wei *et al.* (2010) e Nakajima *et al.* (2011).

Estes resultados relatados, podem ser justificados, pois cada adesivo apresenta uma composição, e essa afeta diretamente a união à dentina afetada por cárie que, apresenta suas particularidades. Assim, os agentes antioxidantes podem atuar de maneira diferente quando

associado aos diferentes sistemas adesivos em substratos alterados por cárie (Nakajima *et al.*, 2000; Nakajima *et al.*, 2011; Tjäderhane *et al.*, 2013).

Neste estudo, pode ser observado que nos tempos iniciais (24 h) e 12 meses de armazenamento, o sistema adesivo SE apresentou os maiores valores de resistência da união (Tabela 5). Este resultado pode ter ocorrido pois o pré-tratamento recebido pela DAC pode ter aumentado as propriedades micromecânicas dos grupos que utilizaram o SE. No entanto, pequena fração das proteases, causadoras da degradação da camada híbrida é extraída pelos ácidos e pode ser ativada, e então essas proteases podem causar lentamente a hidrólise da matriz de colágeno (Tezvergil-Mutluay *et al.*, 2013). Entretanto, esses resultados discordam dos estudos de Wei *et al.* (2010) e Wei *et al.* (2008) que encontraram valores significativamente maiores para o SB comparado com o SE.

Aos 18 meses, não foram observadas diferenças significativas na resistência da união resina/DAC para o sistema adesivo SE comparado ao sistema adesivo SB, que pode ter sido ocasionada pela desmineralização da dentina causada pelo ataque ácido do sistema adesivo SB que também está envolvido no processo de adesão da mesma. E, além disso, nos procedimentos adesivos que utilizam sistemas adesivos convencionais, o ácido fosfórico é utilizado para exposição das fibras colágenas com a intenção de proporcionar a retenção micromecânica dos adesivos resinosos (Pashley *et al.*, 1993).

O SB manteve valores de resistência de união resina/DAC durante todos os períodos de avaliação, isso mostra que as taxas de sorção de água e solubilidade apresentadas pelos sistemas adesivos após a sua polimerização são importantes na determinação indireta da longevidade e da qualidade marginal da restauração. Enquanto que para o SE houve uma significativa queda nas médias dos valores de resistência da união após 18 meses de degradação em água. O que está de acordo com todos os aspectos observados por Kunawarote *et al.* (2011).

Estudos têm sugerido que ácidos fortes e maiores tempos de ataque ácido são necessários para solubilizar depósitos minerais ácido-resistentes da luz dos túbulos da DAC, levando a maior penetração lateral dos monômeros adesivos para a luz dos túbulos. Além disso, a técnica de adesão úmida é efetiva pela infiltração dos monômeros de resina dentro das camadas desmineralizadas mais profundas na DAC comparada com a técnica

convencional, influenciando maior resistência de união. Porém, regiões mais profundas da matriz de colágeno exposta são mais difíceis de serem permeadas pelos monômeros resinosos. Além disso, grande quantidade de água no fundo da zona desmineralizada pode dificultar a penetração dos monômeros dos adesivos resinosos, e os sistemas autocondicionantes podem não dissolver e remover depósitos minerais ácido-resistentes nos túbulos dentinários da DAC por causa do pH (Ceballos *et al.*, 2003). No entanto os estudos de Tay *et al.* (1996), Yoshiyama *et al.* (2000) e Wei *et al.* (2010) mostraram que a técnica de adesão úmida é considerada um procedimento comum, já que a superfície úmida da dentina é o substrato mais encontrado para adesão. E o ácido utilizado na superfície da dentina, tanto sobre a superfície seca quanto úmida, provoca o colapso da matriz de colágeno e impede a efetiva infiltração do primer, resultando desse modo em baixa resistência de união e excessiva nanoinfiltração.

O estudo de Edhart *et al.* (2008), mostrou que nenhum adesivo estudado foi capaz de prevenir totalmente a infiltração e promover um efetivo selamento do colágeno tanto na interface de união com a dentina hígida, quanto com a cariada. E a extensão da degradação da união dentina/resina é dependente do material, principalmente quanto ao potencial químico dos adesivos resinosos. Entretanto, outros fatores como mudanças no pH, carga oclusal e desafios enzimáticos também podem contribuir para degradação físico-química da união resina/dentina.

Ao longo do tempo, os presentes resultados mostraram que os espécimes apresentaram perda da resistência de união, resultante do aumento na exposição do colágeno e diminuição da qualidade da infiltração do adesivo na interface da dentina cariada, como observado por Erdhart *et al.* (2008). Esses indícios podem ser observados pela análise dos sítios de fratura que mostraram em sua maioria, para todos os grupos, fratura mista, com grande parte de fratura no substrato dentinário, e mais acentuadamente aos 18 meses (figuras 7, 8 e 9). Estes resultados concordam com os estudos de Proença *et al.* (2007) e Erhardt *et al.* (2011), que encontraram maior número de fraturas mistas quando utilizado o adesivo SE. E concordam ainda com os estudos de Wei *et al.* (2008) e Alves *et al.* (2013) que utilizaram os mesmos sistemas adesivos (SE e SB). Além disso, concordam ainda com este estudo, que após 24 h, foi evidenciado maior frequência de fraturas adesivas

e também mistas para os grupos SB/EDTA e SB/Controle, e após 12 meses maior ocorrência de fraturas adesivas no grupo SB/EDTA, aumento de fraturas adesivas no grupo SE/Controle e aumento de fraturas mistas no grupo SB/Controle. Ainda que tenham apresentado variação no padrão de fratura, a predominante foi a fratura mista.

Pode ser observado que todos os espécimes apresentaram algum tipo de infiltração de nitrato de prata na interface (Figuras 10, 11, 12, 13), sendo predominante o escore 2, no grupo de degradação após 24 h e 12 meses, exceto para o grupo controle, quando utilizado o sistema adesivo SB. Esse escore foi encontrado principalmente nos grupos que receberam tratamento com NaOCl, seguidos dos grupos SE/EDTA e SE/Controle e por último no grupo SB/EDTA. Apesar de ser grande o número de investigações sobre o tema, os mecanismos de degradação da interface resina-DAC ainda não foram totalmente elucidados. A adesão duradoura a um substrato vitalizado e úmido como a DAC tem se mostrado deficiente (Marshall *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2007). Além disso, as taxas de sorção de água e solubilidade apresentadas pelos sistemas adesivos após a polimerização são importantes na determinação indireta da longevidade e da qualidade marginal da restauração (Burrow *et al.*, 1999), e os testes que avaliam estas taxas não foram realizados no presente estudo.

Aos 18 meses pode ser observado similares resultados aos observados aos 12 meses para os grupos SE/NaOCl, SB/NaOCl e SE/Controle. Para o grupo SB/Controle observou-se que 20% dos espécimes apresentaram diminuição do escore 3, sendo observado nesses espécimes o escore 2. SE/Controle apresentou os mesmos níveis de infiltração de prata aos 12 e 18 meses. SE/EDTA apresentou acentuado aumento de percentuais de escore 3 nos espécimes. O tratamento com NaOCl por 30 s ou mais pode resultar na reação dos radicais livres presentes na dentina tratada, e estes podem produzir efeito oxidante do NaOCl, resultando no aumento dos radicais livres no momento da polimerização, e conseqüente terminação prematura da cadeia polimérica e incompleta polimerização (Lai *et al.*, 2001; Nakajima. *et al.*, 2011) o que pode resultar em deficiência do polímero formado e maior suscetibilidade a degradação.

No entanto, melhorias na adesão à dentina afetada por cárie, pode ser considerada um desafio, sugerindo o desenvolvimento de novas estratégias utilizando materiais

existentes, novos tratamentos, ou protocolos de aplicação, que possam reforçar e fortalecer o complexo dentina-restauração, protegendo de lesões recorrentes cárie e fratura dentais, proporcionando longevidade à restauração.

7 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que o tempo foi um fator determinante na resistência de união quando a DAC foi tratada principalmente com o EDTA; A utilização do SB/EDTA e SE/NaOCl produziram as maiores médias de resistência de união, evidenciando que a resistência da união à μ -TBS foi influenciada pelo tipo de sistema adesivo associado ao tratamento da dentina; E, considerando o tempo e os sistemas adesivos utilizados, observou-se que o tempo não influenciou a resistência de união quando SB foi utilizado. Entretanto, quando o SE foi utilizado houve diminuição da resistência de união.

REFERÊNCIAS*

- Alves FB, Lenzi TL, Reis A, Loguercio AD, Carvalho TS, Raggio DP. Bonding of simplified adhesive systems to caries-affected dentin of primary teeth. *J Adhes Dent.* 2013; 15(5): 439-45.
- Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffoon JE et al. Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. *Oper Dent.* 2004; 29(6): 705-12.
- Arrais CA, Gianini M, Nakagima M, Tagami J. Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112(5): 458-64.
- Borges AF, Puppini-Rontani RM, Bittar RA, Kantowitz KR, Pascon FM, Martin AA. Effects of acidic primer/adhesives on primary and permanent dentin. *Am J Dent.* 2009; 22(1): 30-6.
- Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Lenarda R, Dorigo ES. Dental adhesion review: Aging and stability of the interface. *Dent Mater.* 2008; 24(1): 90-101.
- Burrow MF, Nopnakeepong U, Phrukkanon S. A comparison of microtensile bond strengths of several dentin bonding systems to primary and permanent dentin. *Dent Mater.* 2002; 18(3): 239-45.
- Carrilho MR, Tay FR, Sword J, Donnelly AM, Agee KA, Nishitani Y et al. Dentine sealing provided by smear layer/smear plugs vs. adhesive resins/resin tags. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115(4): 321-9.
- Carvalho FG, Fucio SB, Sinhoreti MA, Correr-Sobrinho L, Puppini-Rontani RM. Confocal laser scanning microscopic analysis of the depth of dentin caries-like lesions in primary and permanent teeth. *Braz Dent J.* 2008; 19(2): 139-144.
- Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etching adhesives. *Biomaterials.* 2005; 26(9): 1035-42.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Carvalho RM, Fernandes CA, Villanueva R, Wang L, Pashley DH. Tensile strength of human dentin as a function of tubule orientation and density. *J Adhes Dent.* 2001; 3(4): 309-14.

Carvalho RM, Mendonça JS, Santiago SL, Silveira RR, Garcia FC, Tay FR et al. Effects of HEMA/solvent combinations on bond strength to dentin. *J Dent Res.* 2003; 82(8): 597-601.

Carvalho RM, Tay FR, Giannini M, Pashley DH. Effects of pre- and post-bonding hydration on bond strength to dentin. *J Adhes Dent.* 2004; 6(1): 13-7.

Carvalho RM, Tay F, Sano H, Yoshiyama M, Pashley DH. Long-term mechanical properties of EDTA-demineralized dentin matrix. *J Adhes Dent.* 2000; 2(3): 193-9.

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

Correr GM, Puppini-Rontani RM, Correr-Sobrinho L, Sinhoreti MAC, Consani S. Effect of sodium hypochlorite on dentin bonding in primary teeth. *J Adhes Dent.* 2004; 6(4): 307-312.

Daculsi G, Kerebel B, Le Cabellec MT, Kerebel LM. Qualitative and quantitative data on arrested caries in dentin. *Caries Res.* 1979; 13(4): 190-202.

Erhardt MC, Osorio E, Aguilera FS, Proença JP, Osorio R, Toledano M. Influence of dentin acid-etching and NaOCl-treatment on bond strengths of self-etch adhesives. *Am J Dent.* 2008; 21(1): 44-48.

Erhardt MC, Osorio R, Toledano M. Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin. *J Dent.* 2008; 36(12): 1068-73.

Erhardt MC, Pisani-Proença J, Osorio E, Aguilera FS, Toledano M, Osorio R. Influence of laboratory degradation methods and bonding application parameters on microTBS of self-etch adhesives to dentin. *Am J Dent.* 2011; 24(2): 103-8.

Erhardt MC, Toledano M, Osorio R, Pimenta LA. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin interfaces: effect of long-term water exposure. *Dent Mater.* 2008; 24(6): 786-98.

Frankenberger R, Perdigão J, Rosa BT, Lopes M. "No-bottle" vs "multi-bottle" dentin adhesives--a microtensile bond strength and morphological study. *Dent Mater.* 2001; 17(5): 373-80.

Goracci C, Sadek FT, Fabianelli A, Tay FR, Ferrari M. Evaluation of the adhesion of fiber posts to intraradicular dentin. *Oper Dent.* 2005; 30(5): 627-35.

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

Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. Resin-tooth adhesive interfaces after long-term function. *Am J Dent.* 2001; 14(4): 211-5.

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

Ito S, Hashimoto M, Wadganonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials.* 2005; 26(33): 6449-59.

Joves GJ, Inoue G, Nakashima S, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Mineral density, morphology and bond strength of natural versus artificial caries-affected dentin. *Dent Mater J.* 2013; 32(1): 138-43.

Kunawarote S, Nakajima M, Foxton RM, Tagami J. Effect of pretreatment with mildly acidic hypochlorous acid on adhesion to caries-affected dentin using a self-etch adhesive. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119(1): 86-92.

Lai SC, Mark YF, Cheung GS, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM et al. Reversal of compromised bonding to oxidized etched dentin. *J Dent Res.* 2001; 80(10): 1919-24.

Lenzi TL, Soares FZ, Rocha R de O. Degradation of resin-dentin bonds of etch-and-rinse adhesive system to primary and permanent teeth. *Braz Oral Res.* 2012; 26(6): 511-5. Epub 2012 Sep 27.

Li H, Wang WM, Yu SL, Wen Q. Morphological and microtensile bond strength evaluation of three adhesive systems to caries-affected human dentin with chemomechanical caries removal. *J Dent.* 2011; 39(4): 332-9.

Malacarne J, Carvalho RM, Goes MF, Svizzerd V, Pashley DH, Tay FR et al. Water sorption/solubility of dental adhesives resins. *Dent Mater.* 2006; 22(10): 973-80.

Maltz M, Oliveira EF, Fontanella V, Carminatti G. Deep caries lesions after incomplete dentine caries removal: 40-month follow-up study. *Caries Res.* 2007; 41(6): 493-6. Epub 2007 Oct 5.

Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997; 25(6): 441-58.

Milia E, Cumbo E, Cardoso RJ, Gallina G. Current dental adhesives systems. A narrative review. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(34): 5542-52.

Nakabayashi N, Nakamura M, Yasuda N. Hybrid layer as a dentin-bonding mechanism. *J Esthet Dent.* 1991; 3(4): 133-8.

Nakajima M, Kunawarote S, Prasansuttiorn T, Tagami J. Bonding to caries-affected dentin. *Jpn Dent Sci Rev.* 2011; 47(2): 102-14.

Okuda M, Pereira PN, Nakajima M, Tagami J, Pashley DH. Long-term durability of resin dentin interface: nanoleakage vs. microtensile bond strength. *Oper Dent.* 2002; 27(3): 289–96.

Oliveira, E.F. Estudo Clínico, Microbiológico e Radiográfico de Lesões Profundas de Cárie após a Remoção Incompleta de Dentina Cariada [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia; 1999.

Omar H, El-Badrawy W, El-Mowafy O, Atta O, Saleem B. Microtensile bond strength of resin composite bonded to caries-affected dentin with three adhesives. *Oper Dent.* 2007; 32(1): 24-30.

Osorio R, Erhardt MCG, Pimenta LAF, Osorio E, Toledano M. EDTA treatment improves resin-dentin bonds' resistance to degradation. *J Dent Res.* 2005; 84(8): 736-40.

Osorio R, Pisani-Proenca J, Erhardt MC, Osorio E, Aguilera FS, Tay FR et al. Resistance of ten contemporary adhesives to resin-dentine bond degradation. *J Dent.* 2008; 36(2): 163-9.

Pacheco LF; Banzi ECF; Rodrigues E; Soares LES, Pascon FM; Correr-Sobrinho L et al. Molecular and structural evaluation of dentin caries-like lesions produced by different artificial models. *Braz Dent J.* 2013; 24(6): 1-9.

Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent*. 1997; 25(5): 355-72.

Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakajima M, Yoshiyama M, Shono Y et al. The microtensile bond test: a review. *J Adhes Dent*. 1999; 1(4): 299-309.

Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996; 7(2): 104-33.

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

Pashley DH, Zhang Y, Agee KA, Rouse CJ, Carvalho RM, Russell CM. Permeability of desmineralized dentin to HEMA. *Dent Mater*. 2000; 16(1): 7-14.

Pashley EL, Tao L, Matthews WG, Pashley DH. Bond strengths to superficial, intermediate and deep dentin in vivo with four dentin bonding systems. *Dent Mater*. 1993; 9(1): 19-22.

Pashley EL, Zhang Y, Lockwood PE, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effects of HEMA on water evaporation from water-HEMA mixtures. *Dent Mater*. 1998; 14(1): 6-10.

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

Perdigao J. New concepts in dental adhesion. *Northwest Dent*. 2000; 79(4): 29-33.

Perdigão J. New developments in dental adhesion. *Dent Clin North Am*. 2007; 51(2): 333-57.

Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J Esthet Restor Dent*. 2013; 25(4): 219-41.

Pereira PN, Okuda M, Nakajima M, Sano H, Tagami J, Pashley DH. Relationship between bond strengths and nanoleakage: evaluation of a new assessment method. *Am J Dent*. 2001; 14(2): 100-4.

Proença JP, Polido M, Osorio E, Erhardt MC, Aguilera FS, García-Godoy F et al. Dentin regional bond strength of self-etch and total-etch adhesive systems. *Dent Mater*. 2007; 23(12): 1542-8.

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

Reis AF, Arrais CAG, Novaes PD, Carvalho RM, De Goes MF, Giannini M. Ultramorphological analysis of resin-dentin interfaces produced with water-based single step and two-step adhesives: nanoleakage expression. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004; 71(1): 90-8.

Reis AF, Bedran-Russo AK, Giannini M, Pereira PN. Interfacial ultramorphology of single-step adhesives: nanoleakage as a function of time. *J Oral Rehabil.* 2007; 34(3): 213-21.

Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, Pashley DH. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength-evaluation of a microtensile bond test. *Dent Mater.* 1994; 10(4): 236-40.

Sano H, Yoshiyama M, Ebisu S, Burrow MF, Takatsu T, Ciucchi B et al. Comparative SEM and TEM observations of nanoleakage within the hybrid layer. *Oper Dent.* 1995; 20(4): 160-7.

Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J et al. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res.* 1999; 78(4): 906-11.

Sauro S, Mannocci F, Toledano M, Osorio R, Pashley DH, Watson TF. EDTA or H₃PO₄/NaOCl dentine treatments may increase hybrid layers' resistance to degradation: a microtensile bond strength and confocal-micropermeability study. *J Dent.* 2009; 37(4): 279-88.

Sauro S, Toledano M, Aguilera FS, Mannocci F, Pashley DH, Tay FR et al. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. *Dent Mater.* 2010; 26(4): 368-79.

Sauro S, Toledano M, Aguilera FS, Mannocci F, Pashley DH, Tay FR et al. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. Part II: Effects of mechanical cycling load on microtensile bond strengths. *Dent Mater.* 2011; 27(6): 563-72.

Sacramento PA. Estudo Comparativo dos Efeitos de Antimicrobianos [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2010.

Shinohara MS, Bedran-de-Castro AK, Amaral CM, Pimenta LA. The effect of sodium hypochlorite on microleakage of composite resin restorations using three adhesives systems. *J Adhes Dent.* 2004; 6(2): 123-7.

Shono Y, Terashita M, Shimada J, Kozono Y, Carvalho RM, Russel CM et al. Durability of resin-dentin bonds. *J Adhes Dent.* 1999; 1(3): 211-8.

Sirin Karaarslan E, Yildiz E, Cebe MA, Yegin Z, Ozturk B. Evaluation of micro-tensile bond strength of caries-affected human dentine after three different caries removal techniques. *J Dent.* 2012; 40(10): 793-801.

Spencer P, Wang Y, Walker MP, Swafford JR. Molecular structure of acid-etched dentin smear layers-in situ study. *J Dent Res* 2001; 80(9): 1802-7.

Swift EJ Jr, Perdigão J, Heymann HO. Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art, 1995. *Quintessence Int.* 1995; 26(2): 95-110.

Taniguchi G, Nakajima M, Hosaka K, Iwamoto N, Ikeda M, Foxton RM et al. Improving the effect of NaOCl pretreatment on bonding to caries-affected dentin using self-etch adhesives. *J Dent.* 2009; 37(10): 769-75.

Tay FR, Carvalho RM, Yiu CK, King NM, Zhang Y, Agee K et al. Mechanical disruption of dentin collagen fibrils during resin-dentin bond testing. *J Adhes Dent.* 2000; 2(3): 175-92.

Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SH. The overwet phenomenon: an optical, micromorphological study of surface moisture in the acid-conditioned resin/dentin interface. *Am J Dent.* 1996; 9(1): 43-8.

Tay FR, Hashimoto M, Pashley DH, Peters MC, Lai SC, Yiu CK et al. Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin. *J Dent Res.* 2003; 82(7): 537-41.

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

Tezvergil-Mutluay A, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, Agee KA, Key WO, Scheffel DL et al. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. *J Dent Res.* 2013 Jan; 92(1): 87-91.

Thompson JM, Agee K, Sidow SJ, McNally K, Lindsey K, Borke J et al. Inhibition of endogenous dentin matrix metalloproteinases by ethylenediaminetetraacetic acid. *J Endod.* 2012; 38(1): 62-5.

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

Tjäderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res.* 2001; 15: 55-8.

Toledano M, Perdigão J, Osorio E, Osorio R. Influence of NaOCl deproteinization on shear Bond strength in function of dentin depth. *Am J Dent.* 2002; 15(4): 252-255.

Toledano M, Osorio R, Osorio E, Aguilera FS, Yamauti M, Pashley DH et al. Durability of resin-dentin bonds: effects of direct/indirect exposure and storage media. *Dent Mater.* 2007; 23(7): 885-92.

Van Meerbeek B, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, Duke ES, Eick JD, Robinson SJ. A TEM study of two water-based adhesive systems bonded to dry and wet dentin. *J Dent Res.* 1998; 77(1): 50-9.

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

Wei S, Ben-xiang H, Ya-lin L. Bond strength of different adhesives to normal and caries-affected dentins. *Chin Med J.* 2010; 123(3): 332-36.

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

Yamauti M, Hashimoto M, Sano H, Ohno H, Carvalho RM, Kaga M et al. Degradation of resin-dentin bonds using NaOCl storage. *Dent Mater.* 2003; 19(5): 399-405.

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

Zavgorodniy AV, Rohanizadeh R, Swain MV. Ultrastructure of dentine carious lesions. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(2): 124-32.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Efetividade de Antioxidantes sobre a Dentina Afetada por Cárie na Degradação da União com Sistemas Adesivos"**, protocolo nº112/2010, dos pesquisadores **LARISSA FERREIRA PACHECO** e **REGINA MARIA PUPPIN RONTANI**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 20/08/2010.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba – State University of Campinas, certify that project **"Effectiveness of Deproteinizing Agents on Caries-affected Dentin in Degradation of Bonding systems"**, register number **112/2010**, of **LARISSA FERREIRA PACHECO** and **REGINA MARIA PUPPIN RONTANI**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 20/08/2010.



Prof. Pablo Agustín Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP



Prof. Jacks Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.