



**LARISSA SGARBOSA NAPOLEÃO DE ARAÚJO**

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE VOLATILIZAÇÃO DE  
SISTEMAS ADESIVOS E BIOMODIFICAÇÃO DA DENTINA SOBRE A  
ESTABILIDADE DA CAMADA HÍBRIDA**

**EFFECT OF ADHESIVE VOATILIZATION TEMPERATURES AND DENTIN  
BIOMODIFICATION ON THE STABILITY OF THE HYBRID LAYER**

Piracicaba  
2015





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

**LARISSA SGARBOSA NAPOLEÃO DE ARAÚJO**

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE VOLATILIZAÇÃO DE  
SISTEMAS ADESIVOS E BIOMODIFICAÇÃO DA DENTINA SOBRE A  
ESTABILIDADE DA CAMADA HÍBRIDA**

**EFFECT OF ADHESIVE VOATILIZATION TEMPERATURES AND DENTIN  
BIOMODIFICATION ON THE STABILITY OF THE HYBRID LAYER**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutora em Clínica Odontológica, Área de Dentística.

Thesis presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Clinical Dentistry, in Restorative Dentistry area.

Orientadora: Profa. Dra. Giselle Maria Marchi Baron

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Larissa Sgarbosa Napoleão de Araújo e orientada pela Profa. Dra. Giselle Maria Marchi Baron

---

Assinatura da orientadora

Piracicaba  
2015

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Heloisa Maria Ceccotti - CRB 8/6403

Ar15e Araújo, Larissa Sgarbosa Napoleão de, 1984-  
Efeito de diferentes temperaturas de volatilização de sistemas adesivos e biomodificação da dentina sobre a estabilidade da camada híbrida / Larissa Sgarbosa Napoleão de Araújo. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Giselle Maria Marchi Baron.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Aquecimento. 2. Evaporação. 3. Dentina. 4. Colágeno. 5. Extrato de semente de uva. I. Marchi, Giselle Maria, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Effect of adhesive volatilization temperature and dentin biomodification on the stability of the hibryd layer

**Palavras-chave em inglês:**

Heating  
Evaporation  
Dentin  
Collagen  
Grape seed extract

**Área de concentração:** Dentística

**Titulação:** Doutora em Clínica Odontológica

**Banca examinadora:**

Giselle Maria Marchi Baron [Orientador]  
Cíntia Tereza Pimenta de Araújo  
Maria Cecília Caldas Giorgi  
Debora Alves Nunes Leite Lima  
Claudia Batitucci dos Santos Daroz

**Data de defesa:** 26-02-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Odontológica



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 26 de Fevereiro de 2015, considerou a candidata LARISSA SGARBOSA NAPOLEÃO DE ARAÚJO aprovada.

Profa. Dra. GISELLE MARIA MARCHI BARON

Profa. Dra. CÍNTIA TEREZA PIMENTA DE ARAÚJO

Profa. Dra. MARIA CECÍLIA CALDAS GIORGI

Profa. Dra. DEBORA ALVES NUNES LEITE LIMA

Profa. Dra. CLAUDIA BATITUCCI DOS SANTOS DAROZ



## Resumo

Os objetivos deste estudo foram: 1- avaliar a influência da aplicação de proantocianidina (PA) e de diferentes temperaturas para volatilização de sistemas adesivos sobre o módulo de elasticidade (E) e a variação de massa (% Wmc) da camada híbrida; 2- avaliar a influência de diferentes temperaturas de volatilização sobre o grau de conversão (GC) dos sistemas adesivos e a Resistência de União (RU) da interface adesiva submetida às técnicas de união alcoólica ou úmida. Capítulo 1: Neste estudo foram utilizados os adesivos Single Bond Plus, Excite, e One Step Plus para confecção de espécimes (n = 12 palitos) de adesivo (A) e de macro-modelos de camada híbrida (M) preparados a partir de fatias de dentina, ambos (A, M) após volatilização a 23°C ou 40°C. Para criar M, os espécimes de dentina foram desmineralizados e, nos grupos onde o PA foi aplicado, este permaneceu em contato com a dentina por 10 min, seguidos da infiltração por cada adesivo. ME e % Wmc foram avaliados a seco (24 h) e após imersão em água destilada (24 h, 1, 3 e 6 meses). Os dados de ME de A e M foram analisados pelo teste de Tukey e Wmc % por Kruskal Wallis e Dunn. A combinação do tratamento da dentina com PA, com a temperatura volatilização a 40°C, aumentou o E e diminuiu a Wmc % para os adesivos avaliados a longo prazo. Estes resultados sugerem que a volatilização a 40°C associada ao tratamento com PA, modulou positivamente o ME e a Wmc % de M, provavelmente devido a maior volatilização de solvente e às alterações na bioquímica de colágeno. Capítulo 2: 108 terceiros molares foram divididos em 12 grupos para RU (n=6), de acordo com o tipo de adesivo [One-Step (OS), Excite (EX) e Single Bond 2 (SB)], técnica de união úmida (álcool-TA; água-TU) e temperatura de volatilização (23°C; 40° C). Os palitos (0,7mm<sup>2</sup>) foram testados (0,5 mm/min) após 24 horas

ou após 12 meses e 30 meses de armazenamento em água. Para GC (faixa de 1665 a 1580  $\text{cm}^{-1}$ ), 6 grupos ( $n=5$ ) foram avaliados, de acordo com o tipo de adesivo (OS, EX, SB) e temperatura de volatilização (23°; 40° C). Três terceiros molares adicionais para cada grupo experimental foram utilizados para análise qualitativa da interface adesiva em microscopia de varredura confocal laser (MVLC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados quantitativos (RU e GC) foram analisados por ANOVA e teste de Tukey. Não foi observada diferença estatística entre TA e TU. Os corpos de prova volatilizados a 40° C apresentaram maior GC em todos os adesivos avaliados comparativamente a 23° C. Maiores valores de RU foram obtidos após volatilização a 40° para todos os grupos. Foram observadas reduções significativas em RU para os adesivos a partir de 12 meses de armazenamento. Menores características de degradação e nanoinfiltração (MVCL e MEV) foram observadas nos grupos que associaram TA com volatilização a 40°C. OS apresentou pior desempenho em GC, RU (30 meses) e além de maior nanoinfiltração.

**Palavras-chave:** Aquecimento; Evaporação; Dentina; Colágeno; Extrato de Semente de Uva.



## **Abstract**

**Objectives:** 1- To evaluate the influence of the volatilization temperature on the stiffness (E) and the mass change (Wmc %) of hybrid layers dentin matrix modified by proanthocyanidins (PA).; 2- To evaluate the influence of different volatilization temperature on the Degree of Conversion (DC) of adhesive systems and on the Microtensile Bond Strength ( $\mu$ TBS) of the adhesive interface subjected to ethanol (ET) or water (WT) wet- bonding technique. Chapter 1: In this study, Single Bond Plus, Excite, and One Step Plus were used for making beams (n = 12) of adhesive (A) and macro models of hybrid layer (M- prepared from a flat mid coronal dentin surface), both after volatilization temperature of 23 °C or 40 °C. To create M, the dentin beams were demineralized and, in groups where PA was applied, the PA it treated the dentin for 10 min, followed by adhesive infiltration. E and Wmc % were performed in both dry (24 hours) and after immersion in distilled water (24 h, 1, 3 and 6 months). Data from E of A and M were analyzed by Tukey-Kramer test and the Wmc % by Kruskal Wallis, and Dunn. The combination of pre- treated dentin with PA, along with warm temperature of volatilization increased the E and decreased the mass change for all adhesives evaluated in the long run (p < 0.05). These results suggest that volatilization at 40 °C associated with PA treatment, positively modulated Wmc % and E, most probably due to volatilization of the solvent and biochemical alterations in collagen. Chapter 2: 108 third molars were divided into 12 groups for  $\mu$ TBS (n = 6), according to the type of adhesive [One-Step (OS), Excite (EX) and Single Bond 2 (SB)], to the wet- bonding technique (ET or WT) and volatilization temperature (23 °C; 40 °C). The bonded sticks (0,7mm<sup>2</sup>) were tested (0.5mm / min) after 24 hours or after immersion in distilled water (12 and 30 months). Six groups (n = 5) were evaluated for DC

(peak intensities 1665-1580 cm<sup>-1</sup>), according to the type of adhesive (OS, EX, SB) and volatilization temperature (23; 40 ° C). Three additional third molars for each experimental group were used for qualitative analysis of the adhesive interface in confocal laser scanning microscopy (CSLM) and scanning electron microscopy (SEM). Quantitative data ( $\mu$ TBS and DC) were analyzed by ANOVA and Tukey test. There was no statistical difference between TA and TU. The bonded sticks volatilized of 40° C showed higher DC for each adhesive evaluated than the sticks volatilized by 23° C. The higher  $\mu$ TBS values were obtained after volatilization of 40° C for all groups. Significant reductions in  $\mu$ TBS were observed for both adhesives tested from 12 months of water storage. The Lowest interfacial degradation characteristics and nanoleakage (MVCL and SEM) were observed in groups that associated TA and volatilization at 40° C. OS demonstrated the worse performance in DC and in the  $\mu$ TBS (after 30 months), and higher nanoleakage.

Keywords: Heating; Evaporation; Dentin; Collagen; Grape Seed Extract.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                   |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>DEDICATÓRIA .....</b>                                                                                                                                                          | <b>xiii</b> |
| <b>AGRADECIMENTOS.....</b>                                                                                                                                                        | <b>xvii</b> |
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                           | <b>1</b>    |
| <b>CAPÍTULO 1: .....</b>                                                                                                                                                          | <b>3</b>    |
| Dental adhesives and strategies for displacement of water/ solvents from collagen fibrils                                                                                         |             |
| <b>CAPÍTULO 2:.....</b>                                                                                                                                                           | <b>27</b>   |
| Efeito de diferentes temperaturas de volatilização de sistemas adesivos sobre o seu grau de conversão e de diferentes técnicas de união sobre a estabilidade da interface adesiva |             |
| <b>CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>                                                                                                                                                  | <b>65</b>   |
| <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                                                            | <b>69</b>   |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                                                          | <b>71</b>   |
| <b>ANEXOS.....</b>                                                                                                                                                                | <b>75</b>   |



## **A DEUS**

Esta Dissertação eu dedico a Ele, o meu melhor Amigo, o meu maior Amor. Aquele que caminha comigo, que dirige meus passos, aquele que brilha para mim me mandando primeiro colocar os pés, para em seguida Ele colocar o caminho. Dedico a Ele a minha existência pois sem Ele eu não estaria aqui vivendo a realização de mais um sonho.

“Tudo quanto fizerdes, por palavra ou por obra, fazei-o em nome do Senhor Jesus, dando por ele graças a Deus Pai”.

(Col 3: 16 e 17)

## **Ao meu amor**

Quero agradecer por ser tão especial na minha vida e por me trazer a certeza de que tenho em você um porto seguro, um abrigo tranquilo em meio às tempestades da vida. Agradeço por toda compreensão esquecendo a distância e me incentivando na busca de meu sonho mesmo quando percebe minhas lágrimas ao telefone. Agradeço por dizer, algumas vezes, o que eu realmente precisava ouvir, em vez do que eu queria que você dissesse. A certeza da sua compreensão e do seu companheirismo é uma benção que Deus me deu. Agradeço por compartilhar seus sonhos comigo e fazer dos meus sonhos, seus sonhos. Agradeço por colocar tanta sabedoria, amor e cuidado no nosso namoro, noivado. Agradeço a Deus pelo nosso casamento que se aproxima. Pois você na minha vida faz uma grande e maravilhosa diferença. Amo você.

**A minha mãe**

A você que compartilhou os meus ideais, incentivando-me a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos; Do amor incondicional que me acompanha a cada momento da minha vida, ajudando a trilhar o meu caminho. Do amor que transformou meus sonhos em sua vontade, minhas tristezas em suas lágrimas, minhas alegrias em suas vitórias. Sem você não poderia chegar aonde cheguei. Com você aprendi a não desistir de meus sonhos, a me esforçar, a vencer meus limites. Esta é uma longa jornada. Sem a sua ajuda e fortaleza, esta seria uma tarefa interminável. Você me mostrou a possibilidade impossível, alimentando meus sonhos. Você é minha jóia mais preciosa. Eu te amo minha Mãe guerreira!

**Ao meu pai**

Agradeço a você meu Pai, que mesmo distante, em outro estado, manteve-se ao meu lado lutando comigo. Obrigada por me ensinar a importância dos estudos para alcançar as vitórias. Dedico essa conquista também a você que sempre sonhou comigo. O momento é de conquista. Alcancei mais uma meta. Mais um sonho realizado. Estou muito feliz e divido essa alegria com o sr que sempre me impulsiona a alcançar novos horizontes. Você é muito importante pra mim. Te amo meu Pai!

**Ao Maurício**

Ao meu “Paidrasto”, o meu mais sincero agradecimento por compartilhar este meu percurso com bastante estímulo e amizade. Muito obrigada por seus conselhos, apoio, ajuda, orações e por toda a torcida.

**Aos meus irmãos**

Aos meus queridos irmãos Leonardo e Lindemberg pelas orações, apoio, pela força, pelo carinho que sempre me deram em todos os momentos que precisei. Obrigada pela torcida mesmo de longe e por se alegrarem com minhas vitórias. Amo vocês.

**Aos meus avós**

A minha avó Rachel por todo carinho, amor, apoio, orações em todo momento, sempre se emocionando nas minhas conquistas, sempre fazendo dos meus sonhos, os seus sonhos, me ensinando sempre a importância do amor, do respeito. Ao meu avô Jacintho (*in memorian*) que sempre vibrou com as minhas vitórias derramando lágrimas de alegria fazendo eu me sentir a mais querida das netas; obrigada por ter me ensinado a ser uma pessoa honrada não importando os sacrifícios a serem feitos. A minha avó Zélia (*in memorian*) que, mesmo de longe, sempre torceu e me apoiou em meus sonhos. Ao meu avô Adalberto (*in memorian*) por ter me ensinado a importância da união da família e a nunca deixar de lado os meus sonhos, me ensinou que após uma queda temos o dever de nos levantarmos e seguir em frente.

**A minha família**

A toda a minha família que amo tanto, em especial aos meus tios Fábio, Sílvia, Marcelo, Maura e Roseli por todas as orações, carinho, conselhos, pelo apoio que sempre me deram, me incentivando a buscar meus sonhos não importando as dificuldades que estivessem a minha frente. Por todo amor e pela torcida incondicional. Não tenho palavras para agradecer toda a ajuda que sempre me deram. Tenho muito respeito e admiração por vocês.



**A minha orientadora Giselle Maria Marchi Baron**

“Muito obrigada pela sua orientação, amizade, dedicação, disponibilidade, paciência e apoio em todos os momentos, tanto no Mestrado quanto no Doutorado. Obrigada pela confiança em mim depositada e pelo incentivo ao meu crescimento profissional. A você, que muito mais do que uma orientadora se tornou uma conselheira, amiga e mãe nos momentos que mais precisei. Agradeço a Deus por ter recebido a benção de ter uma orientadora tão especial! Pra mim você é um exemplo de docente, clínica, pesquisadora e pessoa! A você, todo o meu carinho, admiração e gratidão!”

**Ao Prof. Dr. Paulo Henrique dos Santos**

“Agradeço pela disponibilidade, ensinamentos, atenção e pelo exemplo de docência, responsabilidade, competência e honestidade que levarei sem dúvida por toda minha vida. Expresso os meus maiores agradecimentos e o meu mais profundo respeito, que sempre serão poucos diante do muito que me foi oferecido.”

**A Profa. Dra. Ana Karina Bedran- Russo**

“Agradeço pela orientação inteligente, pelo exemplo de comprometimento com a pesquisa e pela excelente colaboração com meu trabalho de pesquisa. Pelo carinho e conselhos de sabedoria o meu muito obrigada!”

## ***AGRADECIMENTOS ESPECIAIS***

---

### **Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar**

“Pela insubstituível contribuição para meu aprendizado durante todo o curso de Mestrado e Doutorado, por todo conhecimento transmitido e por estar sempre disposto a ajudar, aconselhar e principalmente ensinar. Os meus mais sinceros agradecimentos por todo respeito e disponibilidade.”

### **Ao Prof. Dr. Renato Herman Sundfeld**

“Agradeço seu apoio e disponibilidade durante todo o último ano da minha graduação quando foi meu orientador de iniciação científica. Gostaria que soubesse que o vejo como um exemplo de docente, orientador, um exemplo de pessoa. Obrigada por todo conhecimento compartilhado e por contribuir de maneira expressiva para a realização do meu objetivo.”

### **A amiga Cintia**

“Cintia, você é uma pessoa muito especial, uma amiga e “mãe” dedicada, de coração imenso e insubstituível. Você sempre poderá contar comigo! PARA SEMPRE. Obrigada pelos ensinamentos, pelo exemplo de responsabilidade, inteligência diante de momentos difíceis por todos os momentos de descontração e pelo seu carinho. Por onde passa você ilumina, com sua simplicidade e simpatia.”

## ***AGRADECIMENTOS ESPECIAIS***

---

### **A amiga Milena**

“Mi, só o convívio pode dizer quão grande é uma amizade. Obrigada por estar do meu lado em todos os momentos e SEMPRE. Eu tenho certeza de que mestrado e doutorado não seriam os mesmos se não fosse a sua companhia e lealdade. Obrigada por tudo.”

### **A FAPESP**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Bolsa de Estudo que me foi concedida durante grande parte do curso de Mestrado. Agradeço pela Bolsa de Doutorado no Brasil e pela Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior. O seu incentivo foi essencial para a realização dessas pesquisas e para minha manutenção em Piracicaba para concluir minha pós-graduação.

---

---

## ***AGRADECIMENTOS***

---

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba- Unicamp, nas pessoas do Diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior e do Diretor Associado Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, pela oportunidade de realização do Curso de Pós- Graduação nesta tão conceituada Universidade.

A Profa. Dra. Cínthia Pereira Machado Tabchoury, Coordenadora Geral do Curso de Pós- Graduação e a Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz, Coordenadora do Curso de Pós- Graduação em Clínica Odontológica, pela seriedade com que conduzem seus trabalhos.

Aos Professores que participaram do meu exame de qualificação Prof. Dr. Anderson Catelan, Profa. Dra. Eloisa de Paula e Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar.

Aos Professores da Área de Dentística da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Prof. Dr. Luís Roberto Marcondes Martins, Profa. Dra Giselle Maria Marchi Baron, Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar, Prof. Dr. Luís Alexandre M. S. Paulillo, Prof. Dr. José Roberto Lovadino, Prof. Dr. Marcelo Giannini e Profa. Dra. Débora Alves Nunes Leite Lima por terem contribuído para o aprimoramento dos meus conhecimentos, por todos os conselhos e ensinamentos.

## ***AGRADECIMENTOS***

---

Ao Adriano, pela competência, disponibilidade e apoio, tornando- se essencial na realização das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Confocal. Muito obrigada!

A Profa. Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano desta Faculdade pela realização da análise estatística deste trabalho e por toda sua dedicação quando mais precisei.

A Fernanda, ao Adriano e a Claudinha por todo apoio e carinho que me deram quando cheguei a Piracicaba e por me ajudarem sempre que precisei.

A Mônica pelo bom humor, apoio e disponibilidade nos ajudando durante todo esse processo mesmo enquanto eu estava fora do país. Muito obrigada por tudo!!!

A todos os Funcionários desta Faculdade, que de alguma forma possibilitaram a realização do curso de Doutorado.

A todos os meus amigos, em especial Joyce, Letícia, Audrey, Lela, Amanda, Juliana, Fernanda, Patrícia e Marcela pela força que me deram, pelo carinho e por estarem sempre presentes.

## **AGRADECIMENTOS**

---

A todos os meus professores da UNESP de Araçatuba que muito contribuíram para a minha formação profissional. De modo especial ao Prof. Dr. Alício Rosalino Garcia, Prof. Dr. Paulo Renato Junqueira Zuim, Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso, Profa. Dra. Sandra Rahal Mestreiner e Prof. Dr. Ricardo Coelho Okida e Prof. Dr. Michel Saad Neto, Prof. Dr. Renato Herman Sundfeld e Prof. Dr. Paulo Henrique dos Santos que sempre estiveram envolvidos de alguma forma na minha busca pelas realizações de meus sonhos. São verdadeiros exemplos de inteligência na docência a serem seguidos. Os meus mais sinceros agradecimentos pela grande influência que tiveram no meu modo de pensar em Odontologia.

A Faculdade Leão Sampaio e aos professores da Casa pela compreensão e pelo incentivo nos dias que precisei que me ausentar de minhas atividades como docente para concluir meu Doutorado, muito obrigada.

A todos os meus amigos, em especial Joyce, Letícia, Audrey, Lela, Amanda, Juliana, Fernanda, Patrícia e Marcela pela força que me deram, pelo carinho e por estarem sempre presentes.

Aos meus sogrinhos queridos por todas as orações, apoio, carinho e por sempre me falarem palavras que acalmam meu coração. Amo vocês.

## ***AGRADECIMENTOS***

---

Aos colegas de Mestrado e Doutorado Natália, Giovana, Milena, Lívia, Mayra, Bia, Kadu, Diogo, Lucinha, Paulo, Boniek, Eduardo e Robson pela amizade e aprendizados compartilhados durante todo o curso.

Aos amigos de Piracicaba, Anderson, Jéssica, Renato, Dayse pela amizade e apoio em momentos que mais precisei.

A todos que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho os meus mais sinceros agradecimentos.



*“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.”*

**(Albert Einstein)**



## Introdução

A infiltração do adesivo na dentina desmineralizada permite a formação da camada híbrida, e representa o mecanismo essencial de adesão à dentina (De Munck *et al.*, 2005; Nakabayashi *et al.*, 1998). Nesse contexto, é de extrema importância a evolução de técnicas e/ou manobras clínicas com o objetivo de se alcançar alta qualidade no processo de hibridização por meio da infiltração satisfatória de monômeros resinosos no substrato desmineralizado.

Se por um lado, a água no interior da matriz de colágeno deve ser completamente substituída pelo adesivo para se evitar a degradação da interface de união dente/ restauração; por outro lado, a completa secagem da dentina se tornaria inviável, o que causaria o colapso das fibrilas de colágeno comprometendo a formação da camada híbrida de adesão (De Munck *et al.*, 2005).

Para uma união eficaz, portanto, a estabilidade e a manutenção de fibrilas de colágeno da dentina é de extrema importância constituindo uma etapa crítica (Bedran- Russo *et al.*, 2007) quando da realização de restaurações. O colágeno em tecidos biológicos é reforçado pela formação de ligações cruzadas nativas, o que aumenta a sua resistência fibrilar contra a degradação enzimática, bem como fornece um aumento de suas propriedades mecânicas (Bedran- Russo *et al.*, 2007).

Nesse contexto, uma abordagem que vem sendo extensivamente estudada atualmente é a aplicação de extrato de sementes de uva, uma substância natural que possui a capacidade de aumentar o número dessas ligações cruzadas covalentes inter e intramoleculares de colágeno quando aplicada sobre a dentina desmineralizada (Han *et al.*, 2003) de modo a fornecer, portanto, maior resistência a camada híbrida por serem, possivelmente, ligações mais resistentes a colagenases endógenas (Bedran- Russo *et al.*, 2007).

Além da água residual (Tay *et al.*, 2003), alguns fatores como os solventes orgânicos presentes em sistemas adesivos (Holmes *et al.*, 2007) devem receber uma adequada volatilização ou podem interferir sobre a ocorrência do processo de hibridização de qualidade

(De Munck *et al.*, 2005). Logo, também é importante buscar manobras clínicas que visem melhorar a volatilização de solventes presentes nos sistemas adesivos.

Baseado nisso, a utilização de ar quente para volatilização do sistema adesivo tem sido investigada, sendo apresentados resultados promissores devido à elevação da temperatura do material (Alexandre *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2009) o que pode elevar consideravelmente a evaporação dos solventes resultando em uma camada adesiva mais homogênea e resistente. Dessa forma, podemos alcançar maior estabilidade e durabilidade da interface resina/dentina (Reis *et al.*, 2004).

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi examinar o módulo de elasticidade e a alteração de massa a longo prazo de um macro modelo de camada híbrida fazendo uso de extrato de uva, de adesivos dentinários com diferentes tipos de solventes e de diferentes temperaturas de volatilização de sistemas adesivos. Além disso, foi avaliado o grau de conversão Inicial e a resistência de união a longo prazo de adesivos contendo diferentes tipos de solventes volatilizados em diferentes temperaturas quando aplicados em dentina saturada por água ou por etanol.

# ***Capítulo 1***

## **Dental adhesives and strategies for displacement of water/ solvents from collagen fibrils.**

Larissa Sgarbosa Napoleão de Araújo<sup>1</sup>, \*Giselle Maria Marchi <sup>1</sup>, Thaiane Rodrigues Aguiar<sup>2</sup>, Ariene Arcas Leme<sup>2</sup>, Gláucia M. B. Ambrosano<sup>3</sup>, Ana Karina Bedran Russo<sup>2</sup>

1 Department of Restorative Dentistry Piracicaba Dental School - University of Campinas, 13414-903, Campinas – São Paulo, Brazil.

2 Department of Restorative Dentistry, University of Illinois at Chicago, 60612, Chicago – IL, USA.

3 Department of Community Dentistry Piracicaba Dental School - University of Campinas, 13414-903, Campinas - São Paulo, Brazil.

\*Author to whom correspondence should be addressed. Present address:

Profa. Dra. Giselle Maria Marchi

Departamento de Odontologia Restauradora - área Dentística

Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP

Av. Limeira, 901- Areião. CEP- 13414-903, Piracicaba- SP, Brasil.

Tel: +55-19-2106-5200. Fax: +55-19- 3421-0144

e-mail: [gimarchi@fop.unicamp.br](mailto:gimarchi@fop.unicamp.br)

## Abstract

**Objectives:** To evaluate the influence of the volatilization temperature on the stiffness and the mass change of hybrid layers dentin matrix modified by proanthocyanidins (PACs).

**Methods:** Adhesive resin (A) beams (n=12) created by Single Bond Plus (SB), Excite (EX) and One Step Plus (OS) were prepared after solvent volatilization under 23 °C or 40 °C. The macro-hybrid layer (M) (n= 12) was prepared using demineralized dentin beams sectioned from human third molars. To create M, the dentin beams were demineralized and, in groups where PA was applied, the PA it treated the dentin for 10 min, followed by adhesive infiltration under 23 °C or 40 °C. The modulus of elasticity (E) and mass change ( $W_{mc}$  %) of A and M were assessed in dry and wet conditions after immersion in water (24 h, 1, 3 and 6 months). Data from E of A and M were statistically analyzed by Tukey-Kramer test and the  $W_{mc}$  % by Kruskal Wallis, and Dunn ( $\alpha=0.05$ ).

**Results:** Volatilization at 40 °C resulted in higher E values for A in each adhesive and for all storage conditions ( $p < 0.05$ ). The combination of dentin modification with PACs along with volatilization at 40 °C increased the E and decreased the  $W_{mc}$  % for adhesives evaluated overtime ( $p < 0.05$ ).

**Clinical Significance:** The warm temperature of volatilization associated with the dentin biomodification positively modulated the E and the mass change of macro hybrid layers likely due to the higher solvent volatilization and changes in collagen biochemistry.

**Keywords:** cross-linkers; collagen; dental adhesive; temperature volatilization; stiffness; mass

## Introduction

The clinical success and longevity of dental adhesive restorations depend on the stability of their interfacial components. The infiltration of resin monomers in a mineral depleted dentin matrix, results in the formation of a hybrid layer. Thus, the presence and the quality of the hybrid layer are believed to be the essential mechanisms of adhesion to the dentin (De Munck *et al.*, 2005; Nakabayashi *et al.*, 1998). However, there is no evidence that, the water in the intra-and interfibrillar compartments of the collagen matrix is completely replaced by the resin (Bertassoni *et al.*, 2012; Takahashi *et al.* 2013). The remaining water could increase the hydrophilic based resins' water absorption (Yiu *et al.* 2006), plasticize polymers, and accelerate degradation of the adhesive interface (Chersoni *et al.*, 2004).

The resin co-monomers are dissolved in organic solvent that facilitates resin diffusion within the collagen fibrils and assist with the removal of water during solvent volatilization (Reis *et al.*, 2003; Giannini *et al.*, 2008). Therefore, the residual water in the dentin (Tay *et al.*, 2003) and the organic solvents present within adhesive systems (Holmes *et al.*, 2007) should be adequately volatilized as they interfere in the quality of the hybrid layer (De Munck *et al.*, 2005). Clinical techniques using heating for volatilization of solvents results in higher mechanical properties (Klein-Júnior *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2009; Alexandre *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2010; Ogura *et al.*, 2012) and reduction in interfacial micropermeability (Reis *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2010). However, despite the fact that these techniques have significantly increased the evaporation of the solvents, not enough promising long-term results have been determined. According to Reis *et al.* 2009, in spite of the heat driven volatilization promote a better cross-linked resin polymer, the hydrophilic nature of the monomer remains the same, the water absorption in the long run could break the polymer chains and degrade the adhesive interface.

An approach that has been extensively studied is the modification of dentin by plant-derived cross-linkers. Proanthocyanidins (PACs) have the ability to modify the structure of collagen by increasing the number of inter-and intramolecular cross-links (Han *et al.*, 2003) enhancing the mechanical properties of the hybrid layer (Bedran-Russo *et al.*, 2007). This improvement in mechanical properties has been linked to a possible dewatering

of the hybrid layer due to interactions of PACs with components of demineralized dentin (Bedran- Russo *et al.*, 2012), which could reduce the degradation of the adhesive interface by long-term water absorption. In this context, flexural tests of macro hybrid layer models can provide valuable information regarding the quantification of matrix shrinkage and resin uptake, as well as mechanical properties of the hybrid layer after infiltration of the adhesive (Chiaraput *et al.*, 2008; Agee *et al.*, 2006; Becker *et al.*, 2007; Pashley *et al.*, 2007).

Therefore, this study evaluated the modulus of elasticity and mass change of macro hybrid layer, which were subjected to different strategies to eliminate solvents and water in the adhesive system and dentin, respectively. For this purpose, the dentin matrix was treated with PACs for tissue biomodification, and adhesives with different types of solvents were subjected to different temperature of volatilization in order to assess the stability of the adhesive interface. The null hypothesis tested was that the biomodification of dentin matrix associated to warm temperature of volatilization (40°C) would not affect the mass change and modulus of elasticity of the macro hybrid layer created by different adhesives systems.



## **2 Materials and methods**

### **Adhesive systems**

Commercially available etch-and-rinse adhesive systems with different solvents were selected: Single Bond Plus [SB-ethanol and water based], 3M/ESPE, St. Paul, MN, USA and One Step Plus [OS- acetone based], Bisco, Schaumburg, IL, USA, Excite F [EX-ethanol based], Ivoclar Vivadent AG, Bendererstrasse, Schaan, Liechtenstein.

### **2.1 Adhesive specimen preparation**

One mL of each adhesive system was dispensed in a circular-plate and their initial mass was measured using an analytical balance (XP 504DR, Mettler Toledo Inc., Columbus, OH, USA). Each circular-plate with the adhesive system was repeatedly weighed after 15, 30, 45 and 60 min until weight stabilized. No changes in mass were observed after 45 min. To keep traces of solvent in the adhesive (pilot study), the time of volatilization was set at 30 min. The adhesive systems were kept in the dark for 30 min in an oven at  $40 \pm 1$  °C or at room temperature ( $23 \pm 1$  °C). After time elapsed, the adhesive systems were placed in polyvinyl siloxane molds (0.28 mm x 1.5 mm x 7.0 mm) and were immediately light-cured for 60 seconds on each side. Photo-activation was performed using a halogen-based unit (Optilux 501, Kerr Corp., Orange, CA, USA) with light intensity of 800 mW/cm<sup>2</sup>. Then, all adhesive resin beams (0.28 x 1.5 x 7 mm) were polished with 600-grit silicon carbide paper with a silicone oil emulsion (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [Hosaka *et al.*, 2010]. The polishing procedure was performed by hand and without weight.

### **2.2 Macro hybrid layer model**

#### **2.2.1 Dentin specimen preparation**

Twenty-five extracted human third molars were used following review and approval by Institutional Review Board committee from Piracicaba Dental School-University of Campinas (protocol 068/2014). The teeth were stored in thymol solution 0.1%,

at a temperature of 4 ° C and then they were cleaned with periodontal curettes in order to remove any organic and inorganic debris. Afterwards, the root and crown enamel were removed from the teeth, and dentin disks were obtained from mid-coronal dentin using a diamond, wafering blade (Buehler-Series 15LC Diamond, Buehler, Lake Bluff, IL), under constant water irrigation. Then, serial sections in the mesio-distal orientation were performed resulting in dentin beams with 0.28 mm thickness (n = 6 per tooth). Thus, 144 beams were obtained to a final rectangular dimension of 0.28 mm thickness x 1.5 mm width x 7.0 mm length and a dimple was made at the margin of the beam for all measurements to be performed on the same surface [Bedran- Russo *et al.*, 2007].

#### **2.2.2 Dentin beams demineralization**

The dentin beams were immersed in 10% phosphoric acid solution (Ricca Chemical Company, Arlington, TX, USA) for 5 hours to fully demineralize the dentin specimen (Bedran-Russo *et al.*, 2012.). For all groups, demineralized dentin specimens were rinsed 5 times with distilled water.

#### **2.2.3 Dentin matrix biomodification treatment**

The dentin beams were randomly divided into twelve groups (n = 12) according to dentin treatment: distilled water (control) or 6.5% PACs [95% proanthocyanidin-rich *Vitis vinifera* (MegaNatural™ gold grape seed extract, California, USA)] [Bedran- Russo *et al.*, 2012]. The pH of the cross-linker was adjusted to 7.2 and the demineralized dentin beams were immersed into the respective solutions for 10 min and rinsed.

#### **2.2.4 Dentin beams dehydration**

Since the macro hybrid layers are much thicker than the hybrid layer clinically obtained (Chiaraputt *et al.*, 2008), the dehydration process was performed with increasing exchanges of ethanol (Sadek *et al.*, 2010) or acetone according to the type of solvent present in each adhesive evaluated, in order to optimize the infiltration of the adhesive. Then, the dentin beams were dehydrated with acetone (OS) or ethanol (SB and EX) prior to resin

infiltration by adhesives. The dehydration process was started by applying a series of increasing solvent concentrations (50%, 70%, 80%, 90% and 2 x 100%) [Sadek *et al.*, 2010].

### **2.2.5 Volatilization temperature and resin infiltration**

The dehydration process was followed by dentin beams immersion in 50% solvent in the darkness (according to the solvent present in each adhesive)/ 50% adhesive system solution at room temperature for 30 min and then two immersions in 100% adhesive system, for 30 min each. In the third immersion in 100% adhesive system, the beams were kept in the dark for 30 min at room temperature ( $23 \pm 1$  °C) or in an oven (Isotemp, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) at  $40 \pm 1$  °C to enable solvent volatilization. The macro-hybrid layers are much thicker than the hybrid layers created in clinical procedures [Chiaraputt *et al.*, 2008], therefore, for this study, a passive volatilization of solvents was done (without the use of air jet) for 30 min but with the vial (containing the infiltrated beam) semi open to allow evaporation of solvents.

The resin-infiltrated dentin beams were later placed between two mylar strips and were immediately light curing as described above to the adhesive resin beams. The excess of adhesive around the dentin beams was removed using a scalpel blade and the margins and surface were polished using 600-grit silicon carbide grinding paper with a silicone oil emulsion (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [Hosaka *et al.*, 2010]. The polishing procedure was performed by hand and without any weight.

### **2.3 Mass changes evaluation**

Resin-infiltrated specimens were weighed ( $M_0$ ) after demineralization of the dentin beams, ( $M_1$ ) immediately following resin-infiltration, and ( $M_2$ ) after specimens were kept in distilled water for 24 h, 1 month, 3 months, or 6 months.

Dry mass ( $M_0$  and  $M_1$ ) was assessed after specimens were individually stored in a desiccator containing anhydrous calcium sulfate at 37 °C for 24 h. These specimens were then immersed in distilled water [Parthasarathy *et al.*, 2012] for 24 h, 1 month, 3 months and 6 months in order to assess  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$ ,  $M_5$ , respectively. The excess water was wiped from the specimen surface using absorbent paper in order to weight the beams, and immediately

weighed [Hosaka *et al.*, 2010] by an analytical balance (XP 504DR, Mettler Toledo Inc., Columbus, OH, USA).

The resin/dentin matrix ratio (R) was assessed using the following formula [Chiaraputt *et al.*, 2008]:  $R (\%) = 100 - ((M_0 \times 100) / M_1)$ , where  $M_0$  is the dentin matrix mass after demineralization and  $M_1$  is the dentin beam after the resin-infiltration. In addition, the percent mass change ( $W_{mc} \%$ ): was calculated according to the percentage mass gain of the adhesive resin beam or the resin-infiltrated dentin beam after immersion in 24 h of water storage using the following formula [Parthasarathy *et al.*, 2012]:  $W_{mc} (\%) = (M_2 - M_1) / M_1$

## **2.4 Apparent modulus of elasticity – 3-point flexural method**

The modulus of elasticity (E) of adhesive resin beams and resin-infiltrated dentin beams were assessed using EZ Graph machine (Shimadzu, Kyoto, Japan) with 1 N load cell and at crosshead speed of 0.5 mm/min, using the non-destructive three-point bending flexural test at a 2% strain [Chiaraputt *et al.*, 2008]. The modulus of elasticity (E) were obtained in dry condition, and after immersion in distilled water (wet conditions- after 24 h, 1 month, 3 months and 6 months). The E was obtained in MPa (Mega Pascal) and calculated using the following formula (Nielsen):  $E = PL^3 / 4DbT$ , according to previous study by Bedran Russo *et al* 2008.

## **3 Statistical Analysis**

### **3.1 Stiffness**

After the stiffness's exploratory data analysis, the methodology of mixed models for repeated measures was applied by PROC MIXED of SAS statistical program (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, Release 9.2, 2010). Multiple comparisons were performed by Tukey-Kramer test ( $\alpha = 0.05$ ).

### **3.2 Mass Change- $W_{mc} (\%)$**

The mass change's exploratory data analysis indicated that the data did not meet the assumptions of parametric analysis even after applying a transformation. Therefore, the

mass change percentage was analyzed using Kruskal Wallis test followed by a Dunn's post hoc test ( $\alpha = 0.05$ ).

### **3.3 Resin-dentin matrix Ratio**

After exploratory data analysis for Resin/dentin matrix ratio, the 3-way ANOVA was carried out using SAS statistical program ( $\alpha = 0.05$ ).

### **3.4 Pearson Correlation**

The effects of percent mass change on modulus of elasticity were evaluated with the Pearson correlation test ( $\alpha = 0.05$ )

## **4 Results**

### **4.1 Adhesive Resin beams**

#### **4.1.1 Stiffness**

The mean values and standard deviations obtained from three different etch and rinse adhesive beams at 40°C and 23°C in different storage conditions, are presented in Table 1. Volatilization at 40° C resulted in higher E values for OS, EX and SB for all storage conditions ( $p < 0.05$ ). EX and SB presented higher E than OS in the different experimental conditions after 1 month of water storage regardless of the temperature evaluated ( $p < 0.05$ ). When the storage conditions were compared for OS, the lower E was observed after 3 months of immersion in distilled water, regardless of the temperature of volatilization ( $p < 0.05$ ). All adhesives evaluated in this study have shown a decrease in its E after 24 h water storage. However, for both EX and SB, the E increased and no statistically significant difference were noted between the storage conditions of 24 h Dry and of 6 months of water storage, regardless of temperatures of volatilization ( $p > 0.05$ ).

Table1 - Means/standard deviations of stiffness (MPa) obtained from different adhesive resin beams according to the experimental conditions.

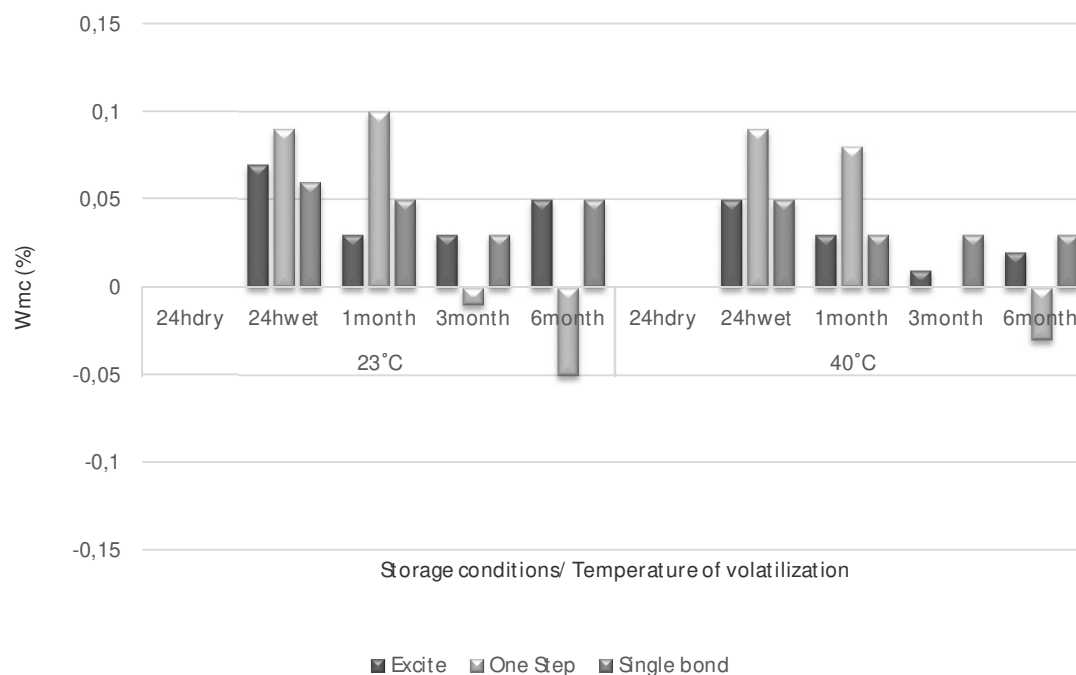
| Temperature<br>(°C) | Storage<br>Condition | Adhesive         |                  |                  |
|---------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|
|                     |                      | One Step         | Single Bond      | Excite           |
| 23                  | 24 h Dry             | *660.9 (44.69)Aa | *600.6 (38.69)Aa | *570.7 (39.71)Aa |
|                     | 24 h Wet             | *484.2 (50.04)Ab | *496.9 (46.46)Ab | *517.8 (25.68)Ab |
|                     | 1 month              | *467.4 (44.15)Bb | *557.0 (58.79)Aa | *580.6 (39.41)Aa |
|                     | 3 month              | *362.6 (61.16)Bc | *556.7 (45.53)Aa | *574.7 (32.76)Aa |
|                     | 6 month              | *390.4 (50.00)Bc | *561.8 (49.87)Aa | *570.0 (36.58)Aa |
| 40                  | 24 h Dry             | 691.8 (29.96)Aa  | 696.1 (23.95)Aa  | 676.4 (30.64)Aa  |
|                     | 24 hWet              | 522.1 (51.62)Bb  | 617.2 (48.30)Ac  | 600.1 (66.31)Ab  |
|                     | 1 month              | 498.3 (35.76)Bb  | 628.1 (55.22)Abc | 642.9 (30.35)Aab |
|                     | 3 month              | 387.9 (48.04)Bc  | 666.9 (29.99)Aab | 619.2 (38.97)Ab  |
|                     | 6 month              | 428.6 (37.00)Bc  | 683.2 (35.38)Aa  | 643.2 (39.51)Aab |

Means followed by distinct letters represent statistically significant differences. Upper-case letters compare adhesives in the same row, and lower-case letters compare storage conditions in the same column ( $p \leq 0.05$ ). \* Denotes significant differences between volatilization temperatures ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.1.2 Mass Change- $W_{mc}$ (%)

The times of storage tested did not significantly affect the EX and SB' mass change (Fig 1). In contrast, OS presented a higher  $W_{mc}$  (%) than SB and EX after 3 months and 6 months of water storage ( $p < 0.05$ ). There was no difference between the temperatures, regardless of the adhesive and storage conditions.

Figure 1- Percent mass change (Wmc %) obtained from different adhesive resin beams according to the experimental conditions.



The first measurement was in the baseline condition (24hdry) followed by the measurements in the wet condition after the immersion of the adhesive resin beam in water. Increased Mass Loss (23 °C- 3 month: -0.01%; 6 month: -0.05%) was observed in the adhesive resin beams produced by One Step ( $p \leq 0.05$ ).

## 4.2 Resin-infiltrated dentin beams

### 4.2.1 Stiffness

In this study, adhesive, treatment, temperature and storage condition ( $p < 0.0001$ ) significantly affected the stiffness of the resin- infiltrated dentin beams. The interactions treatment & adhesive ( $p = 0.0163$ ), treatment & storage condition ( $p < 0.0001$ ), temperature & storage condition ( $p < 0.0001$ ), adhesive & storage condition ( $p < 0.0001$ ), adhesive & temperature & storage condition ( $p = 0.1120$ ), adhesive & treatment & storage condition

( $p < 0.0001$ ) and treatment & temperature & storage condition ( $p < 0.0001$ ) were significant. In the control group, solvent volatilization at 40°C resulted in increased E values for both macro hybrid layers produced by OS and EX when tested in dry conditions ( $p < 0.05$ ). The resin infiltrated dentin beams produced by SB presented increased E values only until after 24 h of water storage (Table 2). In contrast, the combination of both strategies, pre-treatment of the dentin with PACs rich extract and increased volatilization temperature of the solvents present in adhesive systems had the highest modulus of elasticity values when compared with the control groups for all adhesives evaluated from the third month until the sixth month of aging in water ( $p < 0.0001$ ). However, this effect was not seen when demineralized dentin was treated with PACs and infiltrated by the adhesives volatilized at room temperature. The poor durability of resin-infiltrated dentin beams seemed to be eliminated when both strategies (PACs and heating) were associated ( $p < 0.0001$ ). The dentin Infiltrated by acetone-based adhesive (OS) showed greater decrease in the values of E when the samples did not receive treatment with grape seed extract ( $p = 0.0163$ ). All adhesives evaluated in this study have shown a decrease in its E after 24 h of water storage ( $p < 0.0001$ ). However, EX and SB groups immersed in water remained stable overtime when the demineralized dentin was previously treated with PACs.



Table 2. Means/standard deviations of stiffness (MPa) obtained from different macro hybrid layers according to the experimental conditions.

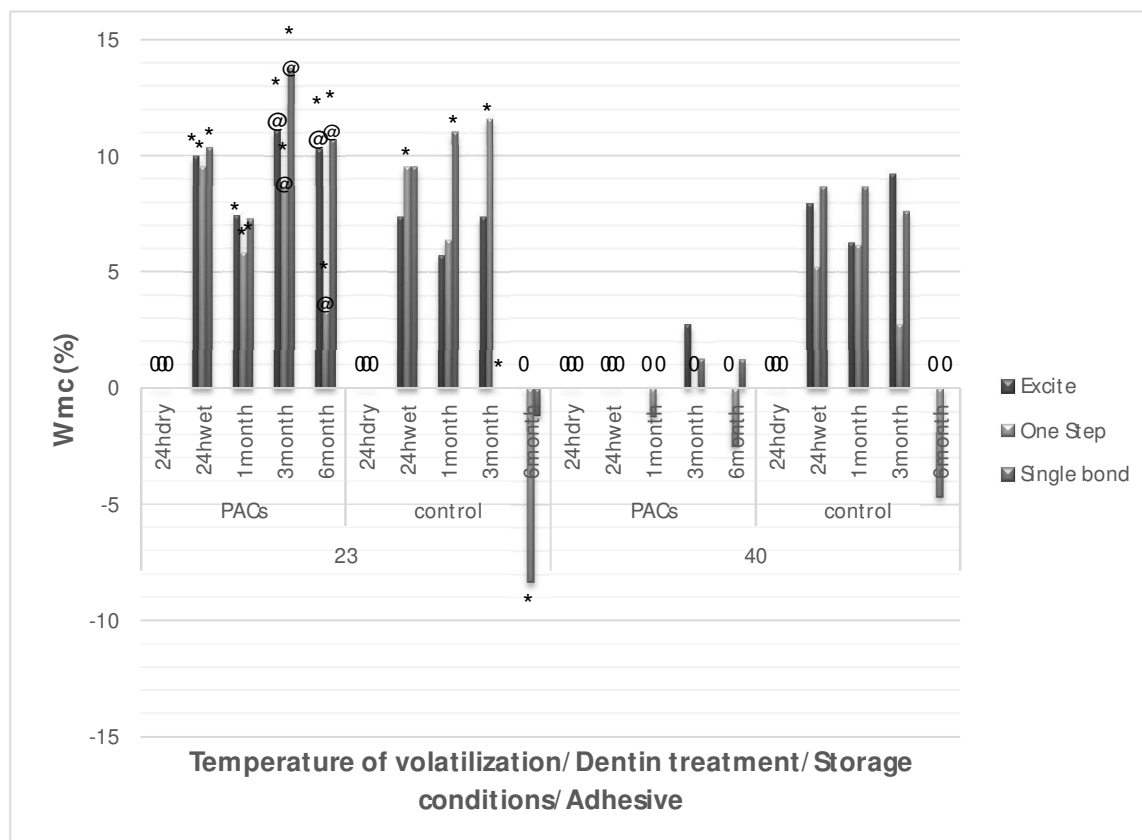
| Treatment | Temperature | Storage Condition | Adhesive                      |                               |                               |
|-----------|-------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|           |             |                   | One Step                      | Single Bond                   | Excite                        |
| PACs      | 23          | 24 h Dry          | 733.1 (59.70)Aa               | 715.5 (48.55)Aa               | 695.6 (79.36)Aa               |
|           |             | 24 h Wet          | 478.6 (49.96)Ab               | 497.6 (50.65)Ab               | 514.5 (62.44)Ab               |
|           |             | 1 month           | 413.1 (56.50)Abc              | 461.4 (29.69)ABb              | 482.4 (56.39)Ab               |
|           |             | 3 month           | 361.2 (43.01)Bc               | <sup>\$</sup> 506.9 (38.85)Ab | 490.9 (74.97)Ab               |
|           |             | 6 month           | 346.2 (45.17)Bc               | 500.8 (36.47)Ab               | 481.9 (59.60)Ab               |
|           | 40          | 24 h Dry          | 792.6 (52.79)Aa               | 778.5 (42.75)Aa               | 782.6 (51.84)Aa               |
|           |             | 24 h Wet          | 538.2 (35.33)Ab               | 564.5 (56.51)Ab               | 559.9 (40.50)Ab               |
|           |             | 1 month           | 479.4 (65.41)Bbc              | 537.5 (49.61)ABb              | 568.7 (49.41)Ab               |
|           |             | 3 month           | <sup>\$</sup> 444.6 (67.96)Bc | <sup>\$</sup> 600.7 (69.65)Ab | <sup>\$</sup> 596.9 (71.57)Ab |
|           |             | 6 month           | <sup>\$</sup> 435.2 (52.69)Bc | <sup>\$</sup> 600.6 (46.18)Ab | <sup>\$</sup> 587.0 (57.93)Ab |
| Control   | 23          | 24 h Dry          | *722.4 (65.38)Aa              | *667.3 (46.14)Aa              | *710.4 (41.86)Aa              |
|           |             | 24 h Wet          | 521.2 (38.18)Ab               | *412.7 (61.00)Bb              | 537.0 (59.44)Ab               |
|           |             | 1 month           | 385.7 (96.35)Bc               | 375.1 (68.55)Bb               | 492.4 (51.77)Ab               |
|           |             | 3 month           | 254.1 (57.18)Bd               | 359.5 (57.63)Ab               | 407.0 (76.81)Ac               |
|           |             | 6 month           | 234.9 (59.39)Bd               | 394.4 (41.77)Ab               | 382.2 (95.15)Ac               |
|           | 40          | 24 h Dry          | 857.5 (58.45)Aa               | 798.0 (65.66)Aa               | 816.0 (63.36)Aa               |
|           |             | 24 h Wet          | 598.6 (59.57)Ab               | 536.4 (78.25)Bb               | 624.3 (71.02)Ab               |
|           |             | 1 month           | 418.8 (98.55)Bc               | 471.3 (90.99)Bbc              | 599.7 (77.90)Ab               |
|           |             | 3 month           | 282.8 (70.77)Bd               | 453.1 (96.21)Ac               | 456.4 (87.76)Ac               |
|           |             | 6 month           | 234.8 (78.56)Bd               | 431.7 (97.95)Ac               | 445.7 (76.90)Ac               |

Means followed by distinct letters represent statistically significant differences. Upper-case letters compare adhesives in the same row, and lower-case letters compare storage conditions in the same column ( $p \leq 0.05$ ). \* Differs significantly from the temperature of 40°C ( $p \leq 0.05$ ). <sup>\$</sup> Depicts statistically significant differences between PACs and Control in the same temperature and storage condition ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.2.2 Mass Change

Macro hybrids treated with PACs and volatilized at 40°C presented less mass change (% Mass loss/ gain) (Fig 2-  $p < 0.05$ ). Similarly to what happened in the groups volatilized at 23°C for the  $W_{mc}$  (%), the dentin infiltrated by OS presented a greater  $W_{mc}$  (%-Mass loss) than those infiltrated by EX and SB after 6 months of water storage. However, this difference disappeared ( $p > 0.05$ ) when the dentin was treated with PACs and volatilized at 40°C. Mass change (loss or gain) of the resin- infiltrated dentin beams was varied from 13.79% mass gain and -8.33% mass loss. The lowest mass change values (-2.5 and 2.75%) were observed in the dentin beams which were treated with PACs and infiltrated by adhesive volatilized at 40 ° C. Increased Mass Loss (23 °C: -8.33%; 40 ° C: -4.68%) was observed in the dentin beams that were not treated with PACs.

Figure 2. Mass change (Wmc %) obtained from different macro hybrid layers groups according to the experimental conditions.



Measurements taken at 1 month, 3 months and 6 months immersion in storage media. \* Differs significantly from the temperature of 40°C in the same treatment, adhesive and storage condition ( $p \leq 0.05$ ). @ Depicts statistically significant differences between Control and PACs in the same temperature and storage condition ( $p \leq 0.05$ ). PACs: proanthocyanidins; 23°C and 40°C are volatilization temperature.

#### 4.3 Resin-dentin matrix Ratio

No significant differences in resin/dentin ratio were found for the demineralized dentin beams immediately following resin-infiltration, regardless of adhesive systems ( $p=0.1483$ ; Table 3), temperature of volatilization ( $p = 0.1790$ ), and dentin matrix treatments ( $p = 0.8098$ ; Table 3).

Table 3- Means/standard deviations of Resin/dentin matrix ratio (%) obtained from different resin-infiltrated dentin beams according to the experimental conditions.

| Treatment | Adhesive   | Temperature (°C) |                   |
|-----------|------------|------------------|-------------------|
|           |            | 23               | 40                |
| PACs      | Onestep    | 67.9/ 32.1 (3.5) | 70.4/ 29.6 (3.5)  |
|           | Singlebond | 67.6/ 32.4 (4.6) | 68.7/ 31.3 (5.8)  |
|           | Excite     | 66.7/ 33.3 (3.3) | 68.4 / 31.6 (3.6) |
| Control   | Onestep    | 69.2/ 30.8 (3.8) | 69.5/ 30.5 (3.6)  |
|           | Singlebond | 68.0/ 32.0 (4.1) | 68.8/ 31.2 (4.5)  |
|           | Excite     | 68.0/ 32.0 (4.3) | 67.2/ 32.8 (4.4)  |

There was no significant difference between the different experimental conditions: Treatment ( $p = 0.8098$ ), Adhesive ( $p=0.1483$ ) and Temperature ( $p = 0.1790$ ).

#### 4.4 Pearson Correlation

A positive correlation was observed between the  $W_{mc}$  (%) and E values ( $r = -0.2047$ ,  $p < 0.001$ ) for the macro resin-infiltrated dentin. In contrast a negative correlation was observed between  $W_{mc}$  (%) and E ( $r = 0.0512$ ,  $p = 0.3326$ ) for adhesive resin. The mass change affected the stiffness to the macro hybrid layers model.

#### Discussion

The association of 6.5% PACs dentin biomodification and warm temperature of volatilization increased the properties of the hybrid layer when compared to the control groups. Moreover, when associated with the temperature of 40°C, PACs rich extract also positively influenced the mass change of hybrid layer for the beams exposed to water degradation. Therefore, the null hypothesis of the present study was rejected.

Adhesive beams were prepared to verify the influence of the temperature on

different types of solvents present in the tested adhesives. The adhesive resin beams volatilized at 40°C showed higher modulus of elasticity compared to those volatilized at 23°C for all timepoints (Table 1). However the same did not occur between the resin-infiltrated dentin beams (except when associated to PACs pre-treatment- Table 2). These findings suggest that, the degradation of the dentin matrix, and not only the resin monomers degradation, was crucial for stability of the macro hybrid layer when subjected to warm volatilization temperature.

In contrast to what was seen in the modulus of elasticity (Table 1), there was no difference in the mass change of the adhesive resin beams between the temperatures (Fig 1). This was confirmed by the lack of correlation between mass change and modulus of elasticity for the adhesive resin beams. In addition, it was shown that the pre-treatment of dentin with PACs associated with 40°C solvent volatilization reduced changes to the specimens' mass (Fig 2) and a positive correlation ( $r = -0.2047$ ,  $p < 0.001$ ) was noted with the mechanical properties (Table 2).

Water sorption within resin-dentin interfaces and elution of unpolymerizable monomers are the most cited causes of degradation processes at the adhesive interface (Tanaka *et al.*, 1999; Shono *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Tay *et al.*, 2003). It is well known that the presence of water in the dentin substrate during the restorative procedure is a challenge for clinicians and researchers, once the dentin is a moist substrate that requires hybridization with more hydrophilic monomers. Furthermore, an inadequate process of volatilization of solvent and residual water causes both to remain retained in the adhesive, hindering the interaction of monomers during the polymerization process.

Thus, one can assume that the warm temperature of volatilization improved the evaporation of solvents by facilitating the formation of a better cross-linked polymer immediately after polymerization. Moreover, the pre-treatment of the dentin with PACs appeared to suppress the damaging effect of water on resin-infiltrated dentin. In contrast, resin/dentin matrix ratio (%) showed no statistically significant differences in the macro hybrid layer composition (average of composition per group: 68.3% adhesive/ 31.7% dentin) regardless of the adhesive composition, temperature of volatilization, and dentin matrix biomodification (Table 3).

The macro hybrid layer model is much thicker than the hybrid layer clinically obtained (Chiaraputt *et al.*, 2008). Thus, it is assumed that the formation of macro hybrid layers is not subjected to variations in resin infiltration and is an acceptable representation to the degradation that occurs in the hybrid layer (Ryou *et al.*, 2013). Considering that all macro hybrid layers formed in our study were composed of similar percentage of resin/dentin matrix, the positive influences of warm temperature and PACs rich extract on the formation of a hybrid layer of better quality, had no direct relation to the resin infiltration rate.

The adhesive infiltration in the dentin matrix occurs by replacing water by solvated liquid monomers (Takahashi *et al.*, 2013), among type I collagen fibrils in a complex network of glycosaminoglycans (GAGs), proteoglycans and phosphorylated proteins (Mazzoni *et al.*, 2008; Breschi *et al.*, 2002; Marshal *et al.*, 1997). It is known that, even though the warm temperature may significantly increase the volatilization of the solvents due to the presence of hydrophilic monomers, the water absorption could still continue to degrade the adhesive interface over time (Reis *et al.* 2009). Clearly, since the nature of the monomer could not be changed by heating it (Reis *et al.*, 2010), there is a need to use a technique that acts directly on the replacement of collagen water from dentin matrix to minimize the effects of long-term degradation.

The ability of the hybrid layer to behave as a permeable membrane by allowing water movement in the hybrid layer (Chersoni *et al.*, 2004), has been associated with the propulsion actuation of GAGs as sponges, binding and organizing water molecules among the demineralized collagen fibrils (Mazzoni *et al.*, 2008). Bedran- Russo *et al.*, 2012 presented evidences of interactions between PACs and proteoglycans. These authors observed an inverse relationship between concentration of PACs and collagen solubilization. The dentin treated with grape seed extract showed a decrease GAG content. Thus, the authors speculated that the decrease in GAGs may have positively influenced the mechanical properties by reducing the effects of the degradation of dentin matrix and therefore changing the hydration rates.

It is believed that the PACs acted as dentin matrix stabilizers, resulting in a stronger hybrid layer. One of the most probable causes for the formation of this stable macro hybrid layer, is the fact that a sufficient amount of GAGs might have been removed from the

dentin matrix due to the treatment of demineralized dentin with GSE. Thus, with a smaller amount of GAGs, a stronger and more stable dentin matrix decreased the ability to bind water, and impaired breakdown of the more cross-linked adhesive polymers promoted by the volatilization at 40°C.

Comparing the three adhesives tested, the modulus of elasticity as well as the mass change of OS were generally worse than those of SB and EX, for both adhesive resin beams (Table 1 and Fig 1) and resin infiltrated dentin beams (Table 2 and Fig 2). A higher susceptibility of OS to the degradation in water can be explained by the presence of polar/hydrophilic functional groups in BPDM (carboxylic group) and the high concentration of HEMA, a polymerizable solvent with hydrophilic nature that acts as a hydrogel in its composition (Emamieh *et al.*, 2013; Ikeda *et al.*, 2008; Van Landuyt *et al.*, 2007). Moreover, OS presents in its composition acetone as solvent, which features high vapor pressure than the solvent ethanol present in both EX and SB, interfering, therefore, with solvent evaporation.

As mentioned earlier, the remaining water/solvent associated with the hydrophilic nature of the adhesives could increase water absorption (Yiu *et al.* 2006) after water storage. However, as PACs appeared to remove GAGs from dentin matrix (Bedran-Russo *et al.*, 2012) reducing the presence of bound water in the dentin matrix, even the dentin infiltrated by OS (PACs rich extract associated 40°C volatilization), might be less affected by water storage. This can be seen, by noting the difference in the modulus of elasticity between the treated group (PACs + 40°C) and the control group for OS after 3 months of water immersion (Table 2).

The mass change process was initiated immediately after immersion of the beams in distilled water (24h wet) and increased with time (Fig 1 and 2). In a broader view, after 3 months of water storage, the percentage mass gain of the adhesive resin beams and resin-infiltrated dentin beams decreased, progressing to stability (percentage values next of zero) produced by EX and SB. Weight loss is observed in OS groups around the 6 month of water storage. It is important to clarify that, the macro hybrid layers and the adhesive resin beams created had their surfaces exposed to water in all its extension, making them much more susceptible to the effects of degradation than if they had been manipulated in a clinical

restoration.

In conclusion, it is suggested that a solvent volatilization of better quality at 40°C may have increased the interaction between the monomers (by decreasing the space between molecules). Thus, greater cohesion among the polymer chains with lower formation of water channels in this adhesive interface could be obtained immediately after polymerization. Allied to this, the dentin biomodification with PACs may be one of the reasons why water could be more easily displaced from the dentin matrix, resulting in lower water sorption and degradation of the hybrid layer over time. The real implications of the association of these treatments on the effectiveness of the bonding interface in actual restorations, remains to be determined. In order to expand the boundaries of this study, these same treatments but with clinically relevant times and volatilization with air jet are needed to confirm the findings.

### **Clinical Relevance**

Since the increased in temperature of volatilization associated with the pre-treatment of the dentin substrate with proanthocyanidins can positively modulate the modulus of elasticity and the mass change of macro hybrid layers, the procedures probably can improve the stability of the hybrid layer to the effects of the degradation.

### **Acknowledgments**

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP (Grant: 2012/08944-5) and NIH/NIDCR DE0214040.

### **References**

- 1- De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M & VanMeerbeeck B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: Methods and results. *J Dent Res.* 2005; 84(2): 118- 32.
- 2- Nakabayashi N, Pashley DH. Hybridization of dental hard tissues. Tokyo: Quintess. 1998; p 129.
- 3- Takahashi M., Nakajima M., Tagami J., Scheffel D.L.S., Carvalho R.M., Mazzoni A., et al. The importance of size-exclusion characteristics of type I collagen in bonding to dentin



matrices. *Acta Biomater.* 2013; Dec; 9(12): 9522-8.

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

5- Yiu CK, King NM, Carrilho MR, Sauro S, Rueggeberg FA, Prati C, et al. Effect of resin hydrophilicity and temperature on water sorption of dental adhesive resins. *Biomater.* 2006; 27:1695–703.

6- Chersoni S, Suppa P, Breschi L, Ferrari M, Tay FR, Pashley DH, Prati C. Water movement in the hybrid layer after different dentin treatments. *Dent Mater.* 2004; 20, 796–803.

7- Reis AF, Oliveira MT, Giannini M, De Goes MF, Rueggeberg FA. The effect of organic solvents on one bottle adhesives' bond strength to enamel and dentin. *Oper Dent.* 2003a; 28(6):700-6.

8- Giannini M, Arrais CAG, Vermelho PM, Reis RS, Santos LPS, Leite ER. Effects of the solvent evaporation technique on the degree of conversion of one- bottle adhesive systems. *Oper Dent.* 2008; 33 (2): 149- 54.

9- Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc.* 2003; 69: 724-31.

10- Holmes RG, Rueggeberg FA, Callan RS, Caughman F, Chan DCN, Pashley DH, Looney SW. Effect of solvent type and content on monomer conversion of a model resin system as a thin .lm *Dent Mater.* 2007; 23: 1506–12.

11- Klein- Júnior CA, Zander- Grande C, Amaral R, Stanislawczuk R, Garcia EJ, Baumhardt- Neto R, et al. Evaporating solvents with a warm air stream: effects on adhesive layer properties and resin- dentin bond strengths. *J Dent.* 2008; 36: 618- 25.

12- Reis A, Klein-Júnior CA, Accorinte MLR, Grande RHM, dos Santos CB, Loguercio AD. Effects of adhesive temperature on the early and 6-month dentin bonding. *J Dent.* 2009; 37: 791 – 98.

13- Alexandre RS, Sundfeld RH, Giannini M, Lovadino JR. The influence of temperature of three adhesive systems on bonding to ground enamel. *Oper Dent* 2008; 33:272–81.

14- Reis A, Klein-Junior CA, Coelho de Souza FH, Stanislawczuk R, Loguercio AD. The Use of Warm Air Stream for Solvent Evaporation: Effects on the Durability of Resin-dentin Bonds. *Oper Dent.* 2010; 35(1), 29-36.

- 15- Ogura Y, Shimizu Y, SHiratsuchi K, Tsujimoto A, Takamizawa T, Ando S and Miyazaki M. Effect of warm air-drying on dentin bond strength of single-step self-etch adhesives. *Dent Mat J*. 2012; 31(4): 507–13.
- 16- Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Apr; 65(1): 118–24.
- 17- Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater*. 2007 Jan; 80(1): 268–72.
- 18- Chiaraput S, Mai S, Huffman BP, Kapur R, Agee KA, Yu CKY, Chan DCN, Hamirattisai C, Arolla DD, Rueggeberg FA, Pashley DH and Tay FR. Changes in resin- infiltrated dentin stiffness after water Storage. *J Dent Res*. 2008; 87 (7): 655-60.
- 19- Agee KA, Becker TD, Joyce AJ, Rueggeberg FA, Borke JL, Waller JL, et al. Net expansion of dried demineralized dentin matrix produced by monomer/alcohol saturation and solvent evaporation. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 79(2):349-58.
- 20- Becker TD, Agee KA, Joyce AP, Rueggeberg FA, Borke JL, Waller JL, et al. Infiltration/evaporation-induced shrinkage of demineralized dentin by solvated model adhesives. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007; 80(1):156-65.
- 21- Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent*. 2007 Feb; 20(1):7-20.
- 22- Hosaka K, Nakajima M, Takahashi M, Itoh S, Ikeda M, Tagami J, et al. Relationship between mechanical properties of one-step self-etch adhesives and water sorption. *Dent Mater*. 2010; 26: 360-7.
- 23- Bedran-Russo AK, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. *Acta Biomater*. 2012; 7(4): 1735-41.
- 24- Sadek FT, Castellan CS, Braga RR, Mai S, Tjaderhane L, Pashley DH, et al. One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dent Mater*. 2010; 26: 380-6.

- 25- Parthasarathy R, Misra A, Park J, Ye Q, Spencer P. Diffusion coefficients of water and leachables in methacrylate-based crosslinked polymers using absorption experiments. *J Mater Sci Mater Med*. 2012; 23: 1157-72.
- 26- Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008; 86B: 330-4.
- 27- Mazzoni A, Pashley D., Ruggeri A, Vita F, Falconi M, Lenarda R, Breschi L. Adhesion to chondroitinase ABC treated dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 July; 86(1): 228-36..
- 28- Dhanpal P, Yiu CKY, King NM, Tay FR, Hiraishi N. Effect of temperature on water sorption and solubility of dental adhesive resins. *J Dent*. 2009; 37: 122– 32.
- 29- Torzilli PA, Arduino JM, Gregory JD, Bansal M. Effect of proteoglycan removal on solute mobility in articular cartilage. *J Biomech*. 1997; 30: 895–902.
- 30- Emamieh S, Sadr A, Ghasemi A, Torabzadeh H, Akhavanzanjani V, Tagami J. Effects of solvent drying time on mass change of three adhesives. *J Conserv Dent*. 2013; Sep-Oct; 16(5): 418–422.
- 31- Ikeda T, Munck JD, Shirai K, Hikita K, Inoue S, Sano H, et al. Effect of air-drying and solvent evaporation on the strength of HEMA-rich versus HEMA-Free one-step adhesives. *Dent Mater*. 2008; 24: 1316–23.
- 32- Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munk J, Coutinha E, Poitevin A, Yoshida Y, et al. Origin of interfacial droplets with one-step adhesives. *J Dent Res*. 2007; 86: 739– 44.
- 33- Tanaka J, Ishikawa K, Yatani H, Yamashita A, Suzuki K. Correlation of dentin bond durability with water absorption of bonding layer. *Dent Mater J*. 1999; 18: 11-18.
- 34- Shono Y, Terashita M, Shimada J, Kozono Y, Carvalho RM, Russell CM, et al. Durability of resin-dentin bonds. *J Adhes Dent*. 1999; 1: 211–218.
- 35- Li HP, Burrow MF, Tyas MJ. The effect of long-term storage on nanoleakage. *Oper Dent*. 2001; 26: 609– 616.
- 36- Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single- step adhesives are permeable membranes. *J Dent*. 2002a; 30 (7- 8): 371- 82.
- 37- Breschi L, Lopes M, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Perdigao J. Dentin proteoglycans:

an immunocytochemical FEISEM study. *J Biomed Mater Res.* 2002; 61: 40–46.

38- Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997; 25:441–458.

## ***Capítulo 2***

### **Efeito de diferentes temperaturas de volatilização de sistemas adesivos sobre o seu grau de conversão e de diferentes técnicas de união sobre a estabilidade da interface adesiva**

Larissa Sgarbosa Napoleão de Araújo<sup>1</sup>, Flávio Henrique Baggio Aguiar<sup>1</sup>, Gláucia M. B. Ambrosano<sup>2</sup>, Giselle Maria Marchi\*

1 Departamento de Odontologia Restauradora- Faculdade de Odontologia de Piracicaba- Universidade de Campinas, 13414-903, Campinas – São Paulo, Brazil.

2 Departamento de Odontologia Social- Faculdade de Odontologia de Piracicaba- Universidade de Campinas, 13414-903, Campinas - São Paulo, Brazil.

\*Autor para quem a correspondência deve ser enviada:

Profa. Dra. Giselle Maria Marchi

Departamento de Odontologia Restauradora - área Dentística

Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP

Av. Limeira, 901- Areião. CEP- 13414-903, Piracicaba- SP, Brasil.

Tel: +55-19-2106-5200. Fax: +55-19- 3421-0144

e-mail: [gimarchi@fop.unicamp.br](mailto:gimarchi@fop.unicamp.br)

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes temperaturas para volatilização de solventes sobre o grau de conversão (GC) dos sistemas adesivos e a resistência de união (RU) da interface adesiva submetida à técnica de união úmida (TU) ou à técnica de união alcoólica (TA), bem como avaliar a degradação da interface adesiva após 12 meses e 30 meses. Cento e oito terceiros molares humanos foram divididos em 12 grupos para RU, de acordo com o tipo de adesivo utilizado [One-Step (O), Excite (E) e Single Bond 2 (S)], técnica de união úmida (álcool; água) e temperatura de volatilização (23°C; 40° C). Para mensuração do GC (n=5), 6 grupos foram avaliados, de acordo com o tipo de adesivo utilizado (OS, EX, SB) e temperatura de volatilização (23°; 40° C). Após volatilização dos solventes, o grau de conversão foi avaliado através da espectroscopia de transmissão infravermelha transformada de Fourier (FTIR) na faixa de 1665 a 1580 cm<sup>-1</sup>. Os dentes a serem utilizados neste estudo tiveram suas raízes e o esmalte coronário removidos em cortadeira metalográfica de precisão. A dentina exposta foi condicionada com ácido fosfórico a 37% e, após, enxaguada com água. Nos grupos onde a técnica alcoólica foi aplicada, a água presente na dentina foi substituída por etanol 100%. Os sistemas adesivos foram aplicados de acordo com o grupo em questão. A resina composta Filtek Z350 foi utilizada para confecção das restaurações (4x4x8mm) em incrementos de 2 mm, fotoativados através da fonte de luz LED – Elipar FreeLight 2 pelo tempo recomendado pelos fabricantes. Para o teste de RU (n= 6), os dentes foram seccionados para obtenção de palitos (área de união de 1,0mm<sup>2</sup>). Foram obtidos 15 palitos de cada dente, sendo 5 para análise de RU imediata, 5 para envelhecimento em água destilada após 12 meses e outros 5 para envelhecimento em

água destilada após 30 meses em estufa a 35°C. Para o teste, os palitos foram acoplados ao dispositivo de microtração em máquina de ensaio universal (0,5 mm/min). Três terceiros molares adicionais para cada grupo experimental foram utilizados para análise qualitativa da interface adesiva em microscopia de varredura confocal laser (MVLC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados quantitativos (RU e GC) foram analisados por ANOVA e teste de Tukey. Os corpos de prova volatilizados a 40° C apresentaram maior GC em todos os adesivos avaliados comparativamente a 23° C. Maiores valores de RU foram obtidos após volatilização a 40° para todos os grupos. Não foi observada diferença estatística entre TA e TU. Foram observadas reduções significativas na RU para os adesivos a partir de 12 meses de armazenamento. Menores características de degradação e nanoinfiltração (MVCL e MEV) foram observadas nos grupos que associaram TA com volatilização a 40°C. OS apresentou pior desempenho em GC, RU (30 meses) além de maior nanoinfiltração.

**PALAVRAS-CHAVE:** resistência de união, grau de conversão, degradação, sistemas adesivos dentinários, técnicas de união, etanol, camada híbrida, temperatura, ar quente, solventes.

## 1 Introdução

Para que ocorra a infiltração satisfatória de monômeros resinosos no substrato dentinário, resultando na formação da camada híbrida (De Munck *et al.*, 2005; Nakabayashi *et al.*, 1998), é necessário que seja feita a adequada volatilização da água residual e de solventes orgânicos, previamente polimerização o que pode influenciar positivamente ou negativamente as propriedades dos sistemas adesivos (Gianinni *et al.*, 2008; De Munck *et al.*, 2005) e consequentemente da camada híbrida formada. Dessa forma, podemos alcançar uma camada adesiva mais homogênea e resistente, além de maior estabilidade e durabilidade da interface resina/dentina.

Em teoria, a degradação da interface não deve ocorrer quando a água no interior dos compartimentos intra e interfibrilares da matriz de colágeno são completamente substituídos pela resina. Porém, a isenção de água no substrato dentinário no momento da adesão torna-se um desafio, já que se trata de um substrato úmido e necessita de hibridização com monômeros hidrófilos (Kanca 1992). Assim, a completa secagem da dentina é inviável, o que causaria o colapso das fibrilas de colágeno comprometendo a formação da camada híbrida de adesão (De Munck *et al.*, 2005).

Muitas pesquisas têm sido feitas substituindo a água pelo etanol apresentando resultados encorajadores (Sadek *et al.*, 2010a; Sadek *et al.*, 2010b; Sadek *et al.*, 2010c; Hosaka *et al.*, 2009; Pashley *et al.*, 2007; Tay *et al.*, 2007). Essa nova abordagem filosófica engloba o conceito da lenta substituição da água nos espaços inter e intrafibrilares por ascendentes concentrações de etanol (Sadek *et al.*, 2010a; Hosaka *et al.*, 2009).

A dentina saturada com etanol é menos hidrófila, permitindo que a matriz de colágeno desmineralizada e saturada por etanol possa ser infiltrada mais facilmente por monômeros resinosos hidrófobos (Nishitani *et al.*, 2006; Pashley *et al.*, 2007; Tay *et al.*, 2007; Sadek *et al.*, 2010). O procedimento também se propõe a impedir a separação das fases de monômeros de resina hidrófoba na presença de água (Tay *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2008) desde que a mesma seja completamente substituída pelo etanol, antes da aplicação destes monômeros solúveis no substrato (Becker *et al.*, 2007; Sauro *et al.*, 2009).



Além da água residual (Tay *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005), os solventes orgânicos (Holmes *et al.*, 2007) podem afetar a conversão dos monômeros em polímeros, a manipulação (Tay *et al.*, 1998), a performance (Carvalho *et al.*, 2003) dos sistemas adesivos, podendo interferir sobre a ocorrência do processo de hibridização de qualidade (Gianinni *et al.*, 2008; De Munck *et al.*, 2005). Logo, também é importante buscar manobras clínicas que visem melhorar a volatilização de solventes presentes nos sistemas adesivos. A utilização de ar quente para volatilização do sistema adesivo tem sido investigada, sendo apresentados resultados promissores devido à elevação da temperatura do material (Alexandre *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2011) o que pode elevar consideravelmente a evaporação dos solventes (Klein- Junior *et al.*, 2008) resultando em uma camada adesiva mais homogênea e resistente (Araújo *et al.*, 2011).

De acordo com algumas pesquisas, a efetividade adesiva de alguns adesivos tem caído drasticamente (De Munck *et al.*, 2005; Van Meerbeek *et al.*, 2003), e tem sido observado declínio no comportamento clínico a longo prazo (Tay *et al.*, 2003). A durabilidade da união é crítica para a longevidade das restaurações, porque a degradação pode enfraquecer a união e levar a falhas na interface dente/restauração (Amaral *et al.*, 2007) relacionadas principalmente a perda de retenção e desadaptação marginal (Mjör and Gordan, 2002).

Assim, este estudo se propôs a avaliar se a elevação da temperatura de volatilização seria capaz de: 1-elevar o grau de conversão de sistemas adesivos; 2- e se, como resultado do aumento na temperatura de volatilização, os sistemas adesivos aplicados em dentina saturada com etanol seriam capazes de formar uma camada híbrida com maior resistência de união a longo prazo; 3- apresentando menor quantidade de nanoinfiltração. Para isso as camadas híbridas foram formadas com sistemas adesivos simplificados apresentando diferentes tipos de solventes, para avaliar a sua influência no processo de evaporação proporcionado pelo jato de ar aquecido, e apresentando tanto monômeros hidrófilos quanto hidrófobos para verificar a eficácia de se saturar a dentina com etanol.

## **2 Materiais e métodos**

### **2.1 Coleta, armazenamento e preparo inicial dos dentes**

O projeto foi enviado para análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp (Protocolo- 074/2011). Cento e oito terceiros molares humanos foram obtidos e armazenados em solução de timol a 0,1%, em temperatura de 4°C. Os dentes foram limpos com curetas periodontais para remoção de debris orgânicos e inorgânicos, recebendo, em seguida, polimento com taça de borracha e mistura de pedra-pomes e água, em baixa rotação (Kavo do Brasil S.A. Ind. E Com., Joinville, SC, Brasil).

### **2.2 Preparo da superfície dentinária**

Os dentes tiveram suas raízes e o esmalte coronário oclusal removidos em cortadeira metalográfica de precisão (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos) sob constante irrigação à água, sendo obtidos discos de dentina da região central da coroa.

Após este procedimento, todas as superfícies dentinárias foram inspecionadas em microscópio de luz com aumento de 20 vezes (Meiji Techno América, San Jose, CA, Estados Unidos), com a finalidade de encontrar áreas de esmalte remanescente. Os dentes que ainda apresentavam superfícies de esmalte foram submetidos novamente ao desgaste com lixa de granulação 600 Politriz APL- 4 (Arotec) sob constante irrigação. Para a padronização da *smear layer* na dentina exposta foi utilizada também a lixa de granulação 600 em politriz e sob constante irrigação, sendo realizado o polimento da área por 1 minuto.

## **3 Procedimentos adesivos**

O condicionamento ácido das superfícies dentinárias foi realizado com ácido fosfórico 35% Adper Scotchbond Multi- Purpose (3M ESPE Dental Products, St Paul, MN, EUA), durante 15 segundos. Para todos os grupos, a dentina condicionada foi enxaguada com jato de água por 15 segundos e seca com papel absorvente seguindo as recomendações do fabricante.

Nos grupos experimentais que receberam a técnica de união úmida (TU), após lavagem e secagem da dentina com papel absorvente, a dentina permaneceu saturada com água. Já os grupos que receberam a técnica alcoólica- TA (Sadek *et al.*, 2010a; Sadek *et al.*, 2010b; Sadek *et al.*, 2010c; Hosaka *et al.*, 2009; Pashley *et al.*, 2007; Tay *et al.*, 2007), após condicionamento ácido e lavagem, a superfície dentinária condicionada foi saturada com uma série de concentrações crescentes de etanol: 50%, 70%, 80%, 95% e três aplicações de etanol 100%, sendo cada aplicação de 30 segundos. Dessa forma, o tempo total de aplicação foi de 210 segundos. Os protocolos de aplicação de etanol foram meticulosamente executados para garantir que a superfície dentinária estivesse sempre em contato com uma fase líquida, mantendo-a visivelmente úmida antes da aplicação da solução seguinte de etanol mais concentrada.

### **3.1 Sistemas adesivos**

Para a realização deste estudo três diferentes sistemas adesivos foram utilizados: One-Step (O- Bisco Inc, Schaumburg, IL, USA), Excite (E- Ivoclar Vivadent AG, Bänderstrasse, Schaan, Liechtenstein) e Single Bond 2 (S- 3M ESPE, Brasi).

### **3.2 Tempo de volatilização**

Para o GC, 6 µl do sistema adesivo foram aplicados cuidadosamente em um microtubo Safe- Lock 2ml (Eppendorf North America) cuja base é maior para favorecer a evaporação de solvente em toda a extensão do adesivo. Após a aplicação, foi feita a volatilização do solvente por um tempo de 20s (Araújo, LSN, 2011) para todos os adesivos avaliados.

Para RU e análises qualitativas (MEV e MVCL), o sistema adesivo foi aplicado diretamente sobre a superfície dentinária, cuidadosamente durante 10 segundos, de acordo com as recomendações do fabricante. Após o tempo de aplicação, foi feita a volatilização do solvente para cada adesivo por 20 segundos (Araújo, LSN, 2011).

### **3.3 Temperatura de volatilização**

Os sistemas adesivos em microtubos (GC) e as superfícies dentinárias com sistema adesivo (RU e análises qualitativas) receberam jato de ar através do equipamento de

aquecimento de ar (dispositivo portátil) desenvolvido pelo laboratório de Dentística da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (patente requerida), com pressão (5 psi) e vazão de ar ( $15 \text{ m}^3/\text{s}$ ) ejetadas controladas e constantes na saída do dispositivo, sendo padronizada a distância de 2cm entre a ponta da cânula aplicadora e a superfície do dente (RU e análises qualitativas)/ base do microtubo (GC). O jato de ar foi aplicado à temperatura ambiente ( $23^\circ\text{C}$ ) ou com jato de ar aquecido ( $40^\circ\text{C}$ ) de acordo com o grupo em questão. Além disso, sua potência era controlada em 148,5 Watts, a fim de fornecer jato de ar à temperatura constante. A temperatura foi confirmada através de termômetro digital Powerpack ET- 11 plus medindo a temperatura do jato de ar após a saída da cânula aplicadora a cada grupo experimental.

### **3.4 Tempo de fotoativação**

Todos os adesivos foram fotoativados através do aparelho Elipar Freelight 2 (3M- Espe) a uma distância de 1mm entre a ponta fotoativadora e a superfície dental (RU e análises qualitativas)/ amostra (GC), com tempo de fotoativação de 10 segundos de acordo com as recomendações de cada fabricante para cada adesivo. A intensidade da luz emitida foi acompanhada através de radiômetro para verificar se esta permaneceu constante ( $1100 \text{ mW}/\text{cm}^2$ ).

## **4 Procedimento Restaurador**

A resina composta Filtek Z350 (3M ESPE Dental Products, St Paul, MN, EUA-lote: N519144), foi inserida em 2 incrementos com o auxílio de matriz de silicone confeccionada com as dimensões do bloco de compósito, ou seja, 4mm de largura, 8mm de comprimento e 4mm de altura. A resina foi inserida em 2 incrementos de aproximadamente 2mm de espessura. Cada incremento foi fotoativado por 20 segundos, constituindo um bloco de compósito de 4mm de altura e totalizando 40 segundos de fotoativação.

## **5 Preparo dos espécimes para o ensaio de microtração**

Os dentes restaurados foram fixados com cera pegajosa (KOTA Ind. e Com. LTDA, São Paulo, SP, Brasil) em placas de acrílico, para serem adaptados à cortadeira

metalográfica de precisão (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos). Em seguida, foram realizados seis cortes seriados, com espessuras de, aproximadamente, 1,0mm, no sentido mesio-distal e 3 cortes no sentido vestibulo-lingual, através de disco de alta concentração de diamante (Extex Corp., Enfield, CT, Estados Unidos), em baixa velocidade, sob irrigação constante. Dessa forma, foram obtidos quinze palitos de cada dente restaurado.

### **5.1 Avaliação da Resistência de União:**

Do total de quinze palitos que foram obtidos de cada dente para cada grupo pertencente a um sistema adesivo e condição experimental, cinco foram submetidos ao teste de microtração 24 horas após a sua fotoativação (inicial). Para a avaliação da resistência de união um paquímetro digital foi utilizado para averiguação da área de secção transversal (altura e espessura) da interface dente-restauração e os palitos foram fixados ao dispositivo de microtração em Máquina de Ensaio Universal (EMIC Ltda., São José dos Pinhais, SP, Brasil) com adesivo à base de cianoacrilato (Super Bonder Gel, Loctite, Henkel Ltda., Itapevi, SP, Brasil) pelas suas extremidades, de modo a posicionar a área de união perpendicularmente ao longo eixo da força de tração. Os testes foram realizados com velocidade constante de 0,5 mm/min até a ruptura do palito.

Dos quinze palitos obtidos os outros dez foram armazenados em água destilada (2ml). Os palitos foram armazenados em microtubos Safe-Lock, ao abrigo da luz, em estufa a 37°C, pelo período de 12 meses (5 palitos) ou 30 meses (5 palitos) (armazenamento), sendo que, semanalmente, as soluções contidas em cada recipiente onde os palitos estavam armazenados eram trocadas. Passado este tempo, os palitos foram submetidos ao teste de resistência de união, semelhante ao realizado pelo grupo inicial. Os resultados finais de armazenamento foram tabulados e comparados aos resultados iniciais.

## **6 Análise da Interface adesiva em Microscopia de Varredura Confocal Laser (MVLC) e Microscopia Eletrônica de Varredura**

### **6.1 Preparação dos adesivos e análise da Interface adesiva em MVLC**

Um terceiro molar para cada grupo foi preparado e restaurado de maneira semelhante aos procedimentos realizados para o ensaio de microtração. Para observação no microscópio da interface de união dos três sistemas adesivos selecionados para este estudo, foi necessária a incorporação em cada adesivo de um marcador fluorescente de coloração vermelha (Rodamina B, Sigma, St Louis, MO, USA), capaz de responder ao estímulo gerado pelo laser do microscópio. O corante foi pesado em balança de precisão (AND- HR-200- Japão) (6.4 µg/ml) e adicionado diretamente a eppendorfs de 2ml separados para cada sistema adesivo avaliado neste estudo. Em seguida, os eppendorfs contendo a Rodamina incorporada ao sistema adesivo foram posicionados em um agitador de tubos de ensaio (Vortex Machine, Scientific Industries, Inc., New York, NY, EUA- AP-22) durante duas horas para promover a dissolução completa dos corantes. Após a preparação dos sistemas adesivos, os mesmos foram aplicados em cada dente para cada grupo pertencente a um sistema adesivo e condição experimental. Ao término do procedimento restaurador e realização dos cortes seriados semelhante ao que foi descrito anteriormente para o teste de microtração, foram obtidas oito fatias de cada dente restaurado para cada grupo. As fatias foram armazenadas durante 24 horas e em seguida foram imersas em 1% em peso de solução aquosa de fluoresceína (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstr, Alemanha), um marcador fluorescente de coloração verde durante 3 horas. Os espécimes foram enxaguados com água recebendo banhos em cuba ultrasônica durante 2 minutos, e a seguir, foram polidos utilizando lixas de granulação decrescente (# 1200 a # 4000) em um dispositivo de polimento refrigerado a água (Buehler-MetaDi, Buehler Ltd. Lake Bluff, IL, EUA). Um tratamento final em ultra-som durante cinco minutos concluiu a preparação de amostras.

Cada fatia pertencente a cada grupo foi destinada à análise qualitativa (inicial) da interface adesiva em Microscopia de Varredura Confocal Laser (Leica SP5, Heidelberg, Alemanha) (MVCL). Um laser de argônio a 543 nm foi utilizado para produzir a energia de excitação. A intensidade da luz de excitação e amplificação do fotomultiplicador foram

mantidas constantes durante o período de análise. As imagens em MVCL foram gravadas em modo fluorescente. A interface de visualização foi selecionada cerca de 10  $\mu\text{m}$  abaixo da superfície da amostra e as imagens foram gravadas com a objetiva de imersão em óleo (60X, abertura numérica 1.3). Cinco imagens ampliadas foram gravadas na interface de união de cada fatia e micrografias que representam as características mais comuns de nanoinfiltração observadas ao longo da interface de união foram capturadas. Esse processo foi realizado por dois avaliadores treinados para escolha da imagem mais representativa de cada grupo.

Não foi realizada a análise em MVCL após armazenagem pelo fato de que após esse tempo de 6 meses provavelmente o corante inserido nos sistemas adesivos poderia ter sido eliminado.

## **6.2 Análise qualitativa da Interface adesiva em MEV**

Dois terceiros molares adicionais para cada grupo foram preparados, restaurados e seccionados de maneira semelhante aos procedimentos realizados para o ensaio de microtração, sendo obtidos quinze palitos de cada dente restaurado para cada grupo. Os mesmos foram armazenados durante 24 horas em algodão umedecido.

Os quinze palitos obtidos foram utilizados para análise qualitativa da interface adesiva em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). De modo semelhante a RU, do total de quinze palitos para análise qualitativa em MEV, cinco palitos foram avaliados 24 horas após a fotoativação (inicial); outros cinco foram armazenados em água destilada por 12 meses (5ml), enquanto os cinco restantes foram armazenados em água destilada por 30 meses (5ml) para posterior análise.

Para a avaliação, foi preparada a solução de nitrato de prata, utilizando para isso, 10ml de água deionizada juntamente com 10g de nitrato de prata. Hidróxido de amônio foi adicionado à solução, até que esta tivesse sua cor alterada para o escuro e voltasse a ficar transparente. Os palitos foram inseridos na solução, e armazenados em ambiente escuro, por 24h a 37°C. Decorrido este tempo, foi preparada então a solução reveladora, misturando 100ml de água destilada morna (50-55°C) com 10,9g de pó revelador (D-76 – Kodak). Os palitos foram removidos da solução de nitrato de prata, lavados em água destilada corrente por 2min, e imersos na solução reveladora pelo período de 8h, sendo localizada abaixo de

luminária fluorescente. Os palitos foram novamente lavados em água destilada por 2 min, e incluídas em resina de poliestireno, sendo que para isso, os mesmos foram colocados em cera 7, vedados, e colocados em um tubo de PVC de modo que os palitos ficassem centralizados no interior do tubo que foi preenchido com resina de poliestireno autopolimerizável. Após a presa, os palitos foram umedecidos e foi realizado o polimento com lixas de granulação decrescente (600- 2000) recebendo banhos em cuba ultrassônica após cada lixa para remover resíduos da lixa antecessora. Posteriormente os palitos foram polidos em discos de feltro (TOP-RAM-SUPRA) com pasta de alumina. Após o polimento, foram realizadas a limpeza e desidratação dos palitos seguindo a sequência: 1. Lavagem dos palitos com solução de ácido fosfórico a 50% por 10 segundos e enxague com água destilada; 2. Lavagem com hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos; 3. Os palitos serão lavados por 10 minutos no ultrassom. Para finalização da preparação das amostras, foi feita a desidratação dos palitos, com álcool etílico (25%, 50%, 75%, 90% e 100%), sendo todas as concentrações aplicadas por 10min. Realizado o processo, todos os palitos foram cobertos com carbono, para posterior avaliação em microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, JEOL – USA Inc., Peabody, MA, USA).

## **7 Determinação do Grau de Conversão**

O grau de conversão (GC) dos sistemas adesivos foi avaliado por meio da espectroscopia infravermelho transformada de Fourier (FTIR) (FTIR Spectrometer, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), equipado com cristal de reflectância total atenuada (ATR) (Universal ATR Sampling Accessory, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). Para a mensuração, 6µl do sistema adesivo foram inseridos em um microtubo Safe-Lock 2ml, sendo aplicado sobre ele jato de ar variando temperatura de acordo com os grupos experimentais (n=5) mencionados anteriormente (2.5 e 2.6). Após a volatilização, o adesivo foi coletado e dispensado sobre o cristal (3µl) através do uso de micropipeta de precisão (Microman Classic, modelo M25, Gilson, FRA). Com o adesivo posicionado sobre o cristal, a fonte de luz foi aplicada por 10s seguindo as recomendações do fabricante de cada adesivo. Para a fotoativação, a ponta fotoativadora foi acomodada diretamente acima da superfície do adesivo (1mm).



O ensaio foi conduzido a partir da leitura inicial de cada sistema adesivo não fotoativado. Esta leitura foi considerada o controle para cada tipo de adesivo, pois fornece os valores das áreas correspondentes às bandas dos anéis aromáticos e alifáticas previamente à polimerização do material em estudo (leitura do monômero). Durante cada leitura, foram obtidos espectros infravermelhos com auxílio do programa Spectrum (PerkinElmer) presente em microcomputador ligado ao espectrômetro. O programa foi utilizado no modo de monitoramento da varredura, usando a apodização Happ-Genzel, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e os espectros sendo coletados no intervalo de 1665 a 1580 cm<sup>-1</sup>.

O cálculo do grau de conversão foi feito baseado na proporção entre as duplas ligações de carbono alifáticas (C = C) e aromáticas, sendo estas últimas usadas como controle interno por ser considerada inerente à composição do material, nos estados polimerizados e não polimerizados (Ferracane & Greener, 1984). Durante a reação de polimerização, a absorvância das duplas ligações de carbono aromáticas permanece constante, enquanto que há redução da quantidade de duplas ligações alifáticas. A dupla ligação de carbono alifática absorve a energia no comprimento de onda de 1638 cm<sup>-1</sup>, enquanto que a aromática no comprimento de 1608 cm<sup>-1</sup>.

Para o cálculo, foi utilizada a técnica de baseline (Rueggeberg et al., 1990), traçado pelo próprio programa Spectrum. A partir desta, foram mensurados alguns parâmetros pelo próprio programa. A intensidade corrigida dos picos observados nos comprimentos de onda 1638 e 1608 cm<sup>-1</sup> foi utilizada na seguinte fórmula: R = intensidade em 1638cm<sup>-1</sup> / intensidade em 1608cm<sup>-1</sup>.

Desta forma, a %GC foi determinada usando a seguinte equação:

$$GC (\%) = \left[ 1 - \frac{\frac{1638 \text{ cm}^{-1} \text{ polimerizado}}{1608 \text{ cm}^{-1}}}{\frac{1638 \text{ cm}^{-1} \text{ não polimerizado}}{1608 \text{ cm}^{-1}}} \right] \times 100$$

## **8 Análise Estatística**

Os dados de resistência de união e grau de conversão para cada adesivo, técnica e temperatura avaliados referentes a cada tempo de armazenamento, foram tabulados e avaliados da seguinte maneira:

- ***Grau de Conversão:***

Após a análise exploratória dos dados foi utilizado análise de variância 2 fatores (adesivo x temperatura) e teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5%. Para a análise dos dados foi utilizado o Programa SAS na versão 9.2, 2008 (SAS versão Institute Inc., Cary, NC, USA).

- ***Resistência de união:***

Após a análise exploratória dos dados foi utilizado análise de variância múltiplos fatores (adesivo x técnica x temperatura x tempo) e as comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey Kramer considerando o nível de significância de 5%. Os dados foram analisados por modelo misto para medidas repetidas pelo procedimento PROC MIXED do programa SAS.

## **9 Resultados**

### **9.1 Análises quantitativas:**

#### ***9.1.1 Grau de Conversão:***

De acordo com a Tabela 1, os corpos de prova submetidos à volatilização com temperatura de 40° C apresentaram maior GC em todos os adesivos avaliados comparativamente à temperatura de 23° C ( $p < 0,05$ ). Quando comparados os sistemas adesivos dentro de cada temperatura, os maiores valores de GC foram observados no sistema

adesivo à base de etanol (Excite) ( $p < 0,05$ ), independente da temperatura de volatilização estudada. Dentre as amostras volatilizadas com ar à temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C}$ ), foram observados valores de grau de conversão intermediários para One Step e Single Bond 2, os quais não diferiram estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ); já entre as amostras que receberam ar aquecido ( $40^{\circ}\text{C}$ ), Single Bond apresentou maiores valores de Grau de conversão quando comparados ao adesivo a base de acetona (One Step) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1.** Médias e desvios-padrão dos valores de Grau de Conversão (%) dos diferentes sistemas adesivos em função das temperaturas ( $23^{\circ}\text{C}$  e  $40^{\circ}\text{C}$ ) avaliadas.

| Sistemas Adesivos | Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) |                |
|-------------------|------------------------------------|----------------|
|                   | 23                                 | 40             |
| One Step          | 38,07 (0,73)Bb                     | 43,35 (0,66)Ac |
| Excite            | 82,05 (0,42)Ba                     | 84,92 (0,77)Aa |
| Single Bond       | 36,42 (2,39)Bb                     | 46,88 (1,57)Ab |

Os valores estão expressos em %,  $n = 5$ . Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) diferem entre si ( $p \leq 0,05$ ).

### **9.1.2 Resistência de união:**

A Tabela 2 apresenta as médias de resistência de união e os desvios-padrão dos grupos experimentais.

Os fatores: adesivo, temperatura e tempo ( $p < 0,0001$ ) afetaram significativamente a resistência de união. As interações adesivo & técnica, temperatura & técnica, adesivo & temperatura & técnica, temperatura & tempo, adesivo & temperatura & tempo e adesivo & técnica & tempo foram significativas.

De acordo com a Tabela 2 não houve diferença significativa entre as técnicas avaliadas ( $p = 0,3611$ ), de maneira que cada adesivo, volatilizado à temperatura ambiente ou a 40° C, sobre dentina mantida úmida com água (TU) ou com álcool (TA), para cada tempo estudado, apresentou comportamento semelhante. Inversamente, os três adesivos avaliados neste estudo aplicados sobre dentina mantida úmida com água ou com álcool, volatilizados a 40° C, imediatamente após a confecção da restauração ou após armazenamento em água destilada em ambos os tempos de armazenamento, apresentaram maiores valores de resistência de união ( $p < 0,05$ ) quando comparados aqueles adesivos volatilizados à temperatura ambiente.

No tempo Inicial (24 horas após a confecção das restaurações), não houve diferença estatisticamente significativa entre os sistemas adesivos avaliados nesse estudo que foram aplicados sobre a dentina úmida com água, independente da temperatura de volatilização ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, na técnica alcoólica, achados semelhantes só foram observados para os adesivos volatilizados a 23° C. O sistema adesivo Excite apresentou os maiores valores de resistência de união quando comparado aos adesivos Single Bond e One Step, quando os mesmos foram aplicados sobre dentina mantida úmida com álcool e quando volatilizados a 40° C.

Após 12 meses de armazenamento em água destilada não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as amostras de cada um dos adesivos testados independente da temperatura de volatilização e em cada técnica avaliada ( $p > 0,05$ ). Quando submetidos ao envelhecimento em água destilada por 30 meses, as amostras realizadas com

o sistema adesivo One Step aplicado sobre a dentina tratada pela técnica de união alcoólica mostraram menor desempenho ( $p < 0,05$ ), independente da temperatura de volatilização, sendo observados os maiores valores para Single Bond e Excite, os quais não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ( $p > 0,05$ ). A semelhança do que foi observado para TA, após 30 meses de armazenamento, foram observados menores valores de resistência de união para o adesivo One Step, o qual não apresentou diferença estatisticamente significativa para o adesivo Single Bond quando volatilizados a 23° C ( $p > 0,05$ ) e para o adesivo Excite quando foram volatilizados a 40° C ( $p > 0,05$ ).

Na comparação entre os tempos de armazenamento, as amostras do sistema adesivo Excite (volatilizado a 23° C) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os tempos estudados independente da técnica avaliada ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, quando E foi volatilizado a 40° C, percebeu-se queda nos valores de RU logo após 12 meses de armazenamento em água destilada, sem diferença significativa para 30 meses de armazenamento, para cada técnica avaliada. Já as amostras de dentina que receberam o adesivo Single Bond volatilizado a 40° C não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os tempos avaliados, para ambas as técnicas estudadas ( $p > 0,05$ ). A temperatura ambiente (23° C), resultados semelhantes foram observados apenas para o adesivo Single Bond quando aderido à dentina úmida através da TA. Inversamente, quando foi utilizada TU foi observada queda da RU dos palitos realizados com este adesivo (SB) logo após 12 meses de armazenamento em água destilada. A RU das amostras do sistema adesivo One Step manteve-se estável até 12 meses, sendo observada menor RU após 30 meses de armazenamento em água destilada, independente da temperatura e da técnica realizada.

**Tabela 2.** Médias e desvios- padrão dos valores de Resistência de União dos diferentes sistemas adesivos em função das temperaturas, técnicas e tempo de armazenamento avaliados.

| Técnica | Temperatura | Adesivo     | Tempo            |                   |                   |
|---------|-------------|-------------|------------------|-------------------|-------------------|
|         |             |             | Inicial          | 12 meses          | 30 meses          |
| TU      | 23          | Single Bond | *34,68 (4,07) Aa | *30,68 (3,58) ABa | *24,39 (2,01) Bab |
|         |             | Excite      | *32,54 (4,46) Aa | *27,30 (4,06) Aa  | *27,98 (2,11) Aa  |
|         |             | One Step    | *30,97 (4,00) Aa | *27,22 (3,02) Aa  | *16,71 (5,16) Bb  |
|         | 40          | Single Bond | 45,04 (6,61) Aa  | 39,21 (6,11) Aa   | 38,70 (6,07) Aa   |
|         |             | Excite      | 41,64 (5,09) Aa  | 35,04 (2,16) ABa  | 29,05 (3,66) Bab  |
|         |             | One Step    | 42,25 (3,38) Aa  | 35,04 (2,60) Aa   | 23,54 (5,89) Bb   |
| TA      | 23          | Single Bond | *29,14 (5,82) Aa | *25,98 (6,70) Aa  | *26,74 (3,84) Aa  |
|         |             | Excite      | *31,08 (4,47) Aa | *29,66 (2,34) Aa  | *28,43 (3,98) Aa  |
|         |             | One Step    | *31,27 (2,58) Aa | *27,28 (1,83) Aa  | *14,32 (6,24) Bb  |
|         | 40          | Single Bond | 41,79 (6,84) Ab  | 37,90 (4,39) Aa   | 39,68 (6,68) Aa   |
|         |             | Excite      | 54,07 (6,39) Aa  | 41,87 (3,93) Ba   | 38,14 (3,85) Ba   |
|         |             | One Step    | 42,51 (4,38) Ab  | 36,89 (5,29) Aa   | 17,14 (1,47) Bb   |

Os valores estão expressos em Mpa, n= 6. Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical comparando adesivo dentro de cada técnica e temperatura) diferem entre si ( $p \leq 0,05$ ).

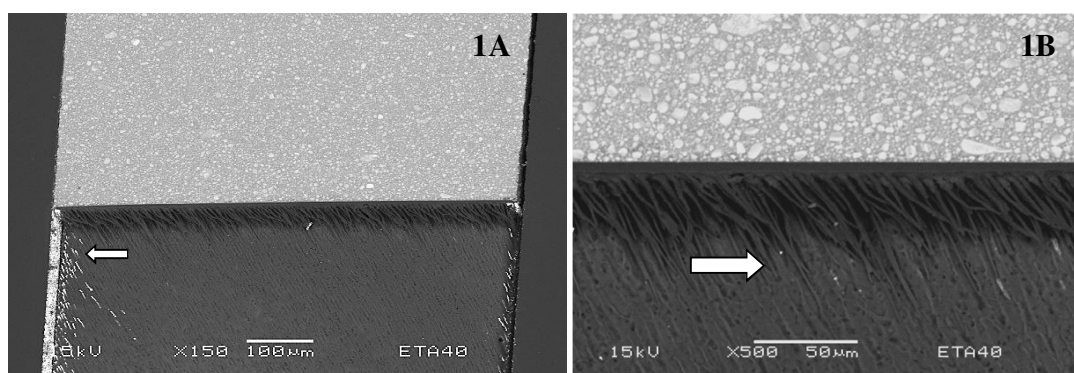
\*Difere da temperatura 40 para o mesmo adesivo, tempo e técnica ( $p \leq 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre as técnicas ( $p=0,3611$ ). TU: Técnica de união úmida- dentina saturada com água; TA: Técnica de união alcoólica- dentina saturada com etanol.

## 9.2 Análises qualitativas:

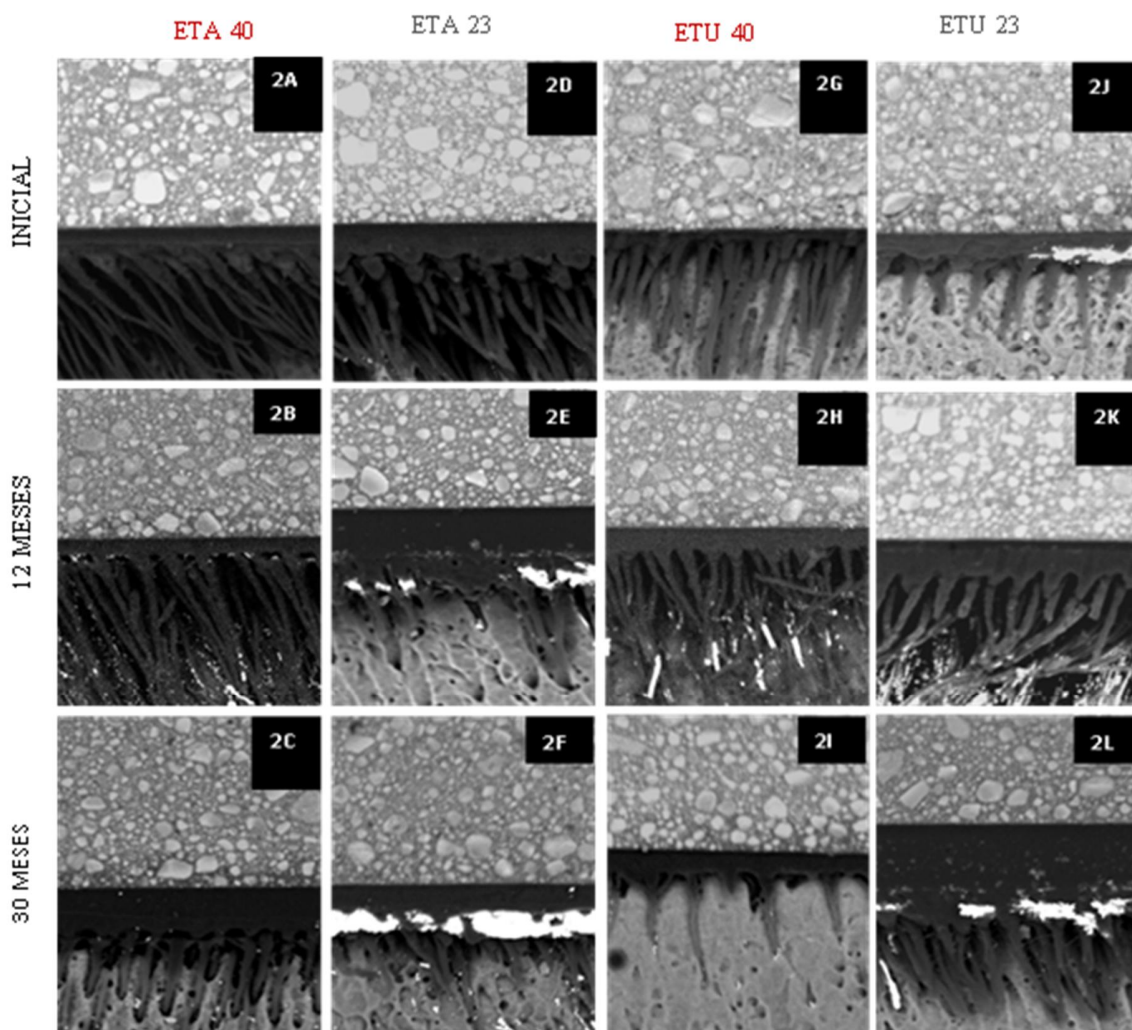
### 9.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV foi operado no modo de elétrons retroespalhados, de forma que a prata se apresentasse branca na imagem (Figura 1). Para que as imagens apresentassem aumento adequado para verificação das áreas de impregnação da prata, e para que fosse feita a escolha da melhor imagem representativa (aumento de 1000 vezes) para cada grupo, foram capturadas imagens de cada palito com 150 vezes de aumento (Figura 1-a). Além disso,

foram feitas 3 imagens em 500 vezes de aumento (Figura 1-b), sendo uma localizada ao centro e outras duas localizadas nas extremidades direita e esquerda. Imagens de MEV representativas de cada interface resina-dentina para as condições experimentais avaliadas neste estudo estão contempladas nas Figuras 2, 3 e 4. Absorção de nitrato de prata foi visto dentro da camada híbrida (CH) e/ou entre os túbulos dentinários (TD) na maioria dos grupos mas, principalmente, após 12 meses de armazenamento em água. A 23° C foi mais comum a observação da deposição de prata dentro da CH e camada adesiva (CA) além de sinais de degradação como a presença de uma CH mais inconsistente apresentando “GAPs” e descontinuidade de TD. Esses achados para esta temperatura foram mais vistos no grupo controle onde foi realizada a técnica de união úmida (TU). A temperatura de 40° C pareceu reduzir a deposição de prata, porém tais observações foram mais frequentemente vistas quando foi realizada a técnica alcoólica (TA). O sistema adesivo Single Bond (S) mostrou menor aumento na absorção de nitrato de prata acompanhadas de menores sinais de degradação da CH e tags após 12 e 30 meses de armazenamento em água independente das condições experimentais do estudo. No entanto, não foi possível a observação do mesmo padrão de degradação da interface para o grupo STU23 (Single Bond +Técnica úmida + 23° C), o qual apresentou mais deposição de prata dentro da CH após 30 meses de armazenamento.



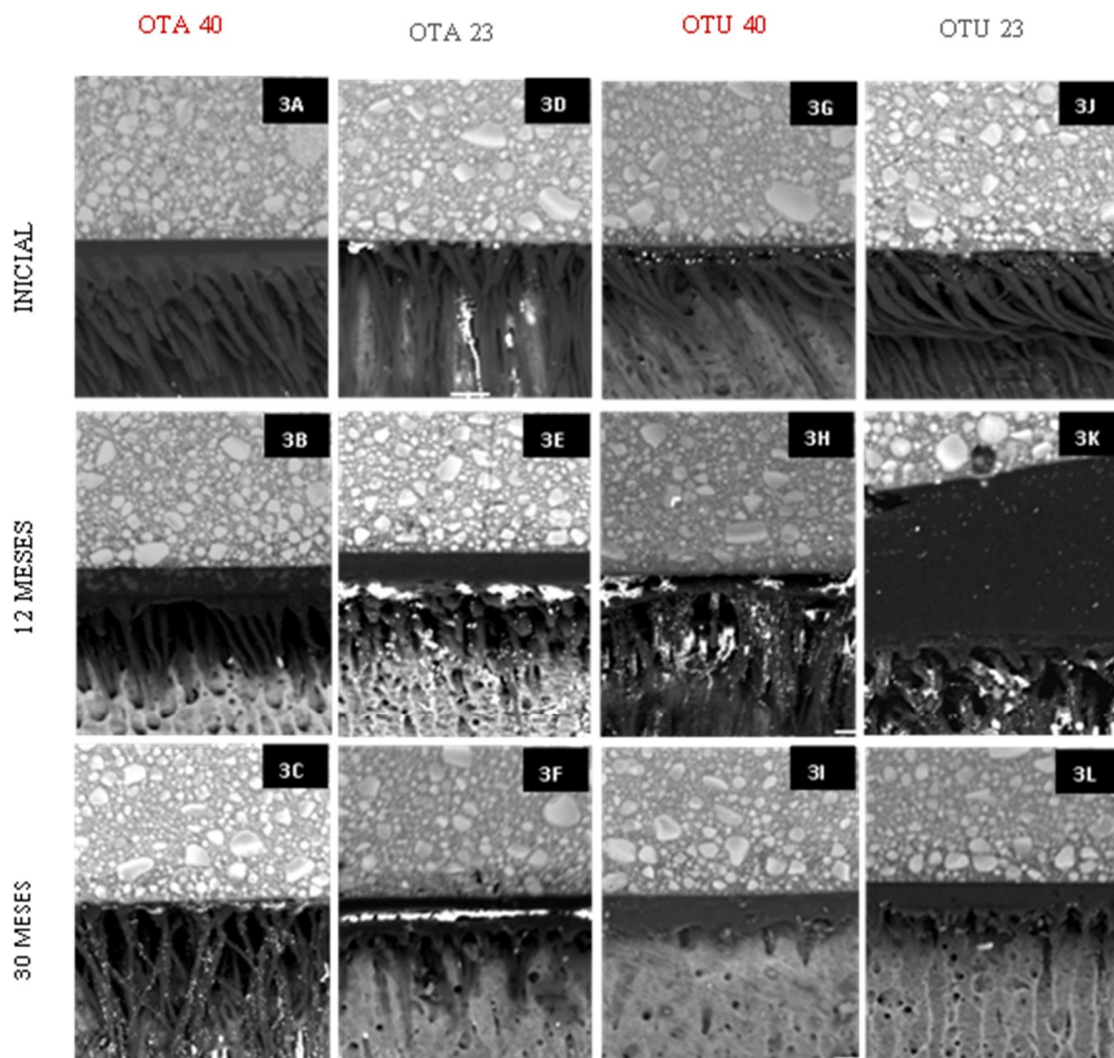
**Figura 1:** a- Espécime do grupo ETA 40 (Excite a 40° C- técnica alcoólica- tempo Inicial) com aumento de 150 x. b- Espécime do grupo ETA 40 (Excite a 40° C- técnica alcoólica- tempo Inicial) em maior aumento (500 x) evidenciando padrão baixo de infiltração de nitrato de prata entre os tags.



**Figura 2:** Imagens representativas de MEV (1000x aumento) mostrando áreas de impregnação da prata em espécimes de dentina aderidos ao sistema adesivo Excite a base de etanol nos tempos Inicial (A; D; G e J), após 12 meses (B; E; H e K), e após 30 meses (C; F; I e L), para cada técnica (TA=A- C e D-F; TU= G-I e J-L) e cada temperatura de volatilização (40=A- C e G-I; 23= D-F e J-L). A quantidade de penetração de prata no tempo Inicial foi menor ou imperceptível nas figuras A, D e G (ETA40, ETA23 e ETU40, respectivamente), sendo observado padrão médio de infiltração de prata dentro da camada híbrida (CH) na figura J (ETU23). CH mais consistente com presença de *tags* mais longos foram observados nas figuras A e D onde foi realizada a TA. A partir de 12 meses de armazenamento a deposição de nitrato de prata aumentou consideravelmente em todos os grupos de E. Sinais nítidos de degradação da CH e dos *tags* foram observados em todos os grupos após 30 meses de armazenamento, sendo observada maior quantidade de penetração de prata logo abaixo da CH, nas figuras F e L (ETA23 e ETU23, respectivamente) onde foi realizada a volatilização a 23° C. (E= Adesivo Excite

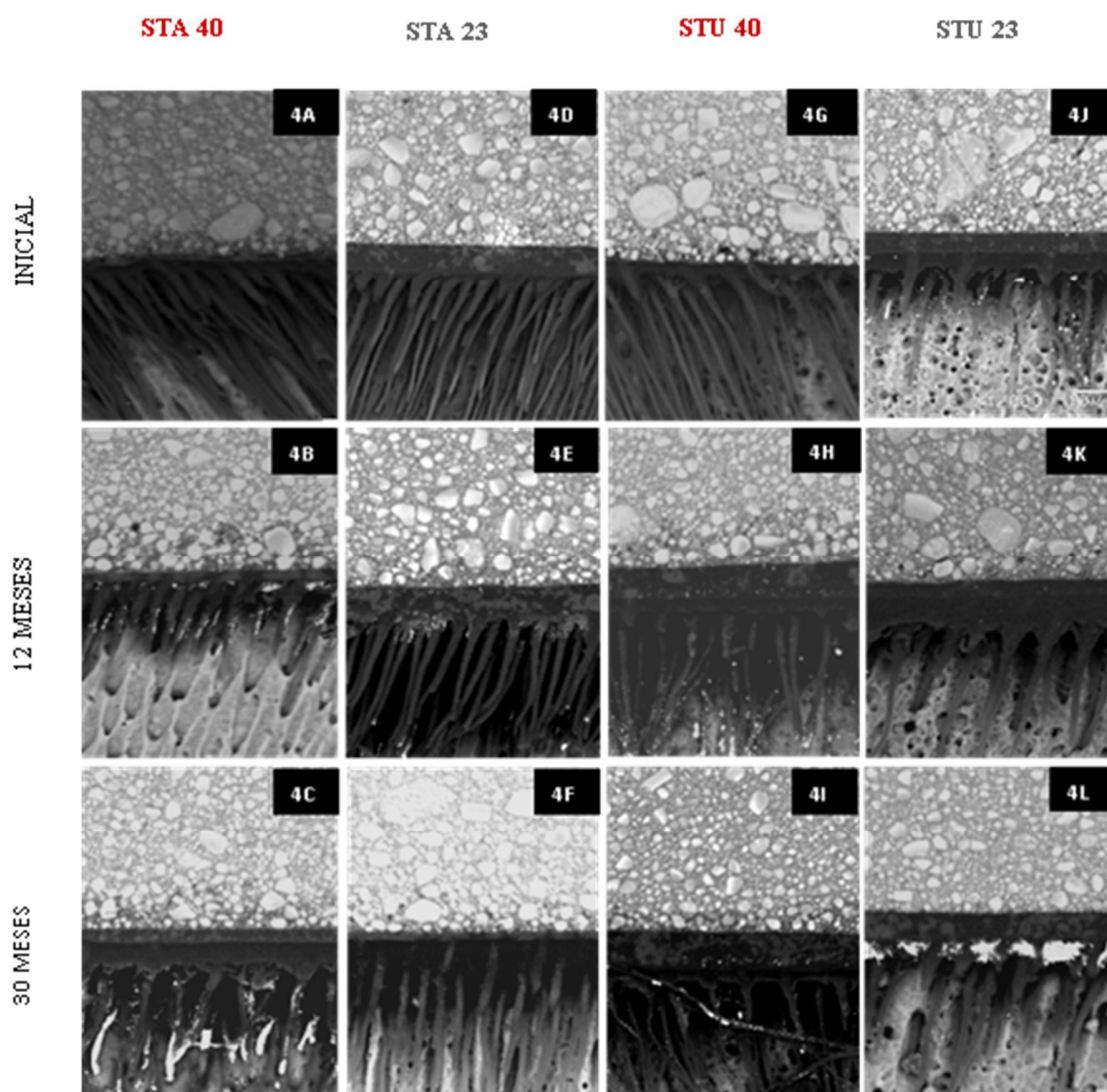


a base de etanol; TA= Técnica de união alcoólica; TU= Técnica de união úmida; 40= Volatilização a 40° C; 23= Volatilização a 23° C).



**Figura 3:** Imagens representativas de MEV (1000x aumento) mostrando áreas de impregnação da prata em espécimes de dentina aderidos ao sistema adesivo One Step a base de acetona nos tempos Inicial (A; D; G e J), após 12 meses (B; E; H e K), e após 30 meses (C; F; I e L), para cada técnica (TA=A- C e D-F; TU= G-I e J-L) e cada temperatura de volatilização (40=A- C e G-I; 23= D-F e J-L). A quantidade de penetração de prata no tempo Inicial dentro da camada híbrida (CH) foi maior nas figuras D, G e J (Grupos OTA23, OTU40, OTU23, respectivamente), sendo observada infiltração de prata também entre os tags na figura D. Foi observada a presença do longos tags em todos os grupos no tempo Inicial com CH mais consistente e de maior espessura no grupo OTA40 (figura A) onde foi realizada a TA e volatilização a 40 ° C. Um aumento significativo na deposição de nitrato de prata logo abaixo da CH e entre os tags foi percebido após 12 meses de armazenamento

nas figuras E, H e K (OTA23, OTU40, OTU23, respectivamente), além de ser observada a penetração de prata também dentro da CA nas figuras E e K onde foi realizada a volatilização a 23° C. Sinais nítidos de degradação da CH e dos *tags* foram observados em todos os grupos após 30 meses de armazenamento (C; F; I e L). Degradação mais expressiva foi observada nas figuras I e L (OTU40 e OTU23) onde foi realizada a TU, sendo notável a descontinuidade da CH e dos *tags*. A figura C (OTA40) onde foi realizada a TA e volatilização a 40° C apresentou menos sinais de degradação dos *tags* e menor quantidade de infiltração de prata abaixo da CH comparativamente a figura F do grupo OTA23. (O= Adesivo One Step a base de acetona; TA= Técnica de união alcoólica; TU= Técnica de união úmida; 40= Volatilização a 40° C; 23= Volatilização a 23° C).



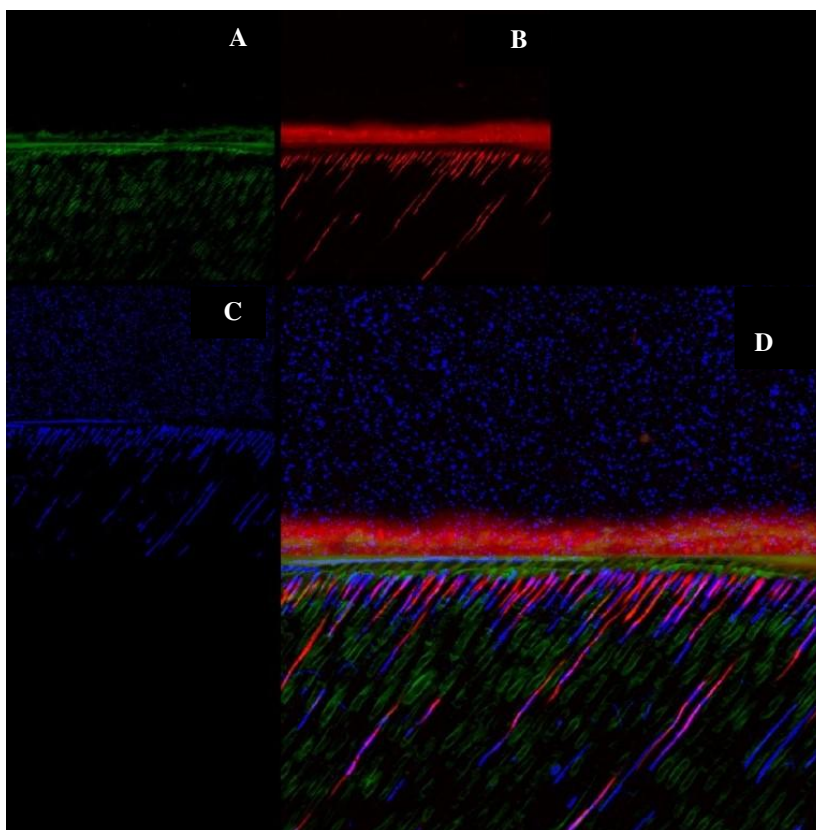
**Figura 4:** Imagens representativas de MEV (1000x aumento) mostrando áreas de impregnação da prata em espécimes de dentina aderidos ao sistema adesivo Single Bond a base de etanol e água nos tempos Inicial (A;

D; G e J), após 12 meses (B; E; H e K), e após 30 meses (C; F; I e L), para cada técnica (TA=A- C e D-F; TU= G-I e J-L) e cada temperatura de volatilização (40=A- C e G-I; 23= D-F e J-L). A quantidade de penetração de prata no tempo Inicial (A; D, G e J) foi pequena, sendo observados longos tags com exceção do grupo STU23 (Figura J), que apresentou CH menos consistente e com tags em menor quantidade e de menor profundidade em todos os tempos de armazenamento. Um pequeno aumento na deposição de nitrato de prata logo abaixo da CH, na espessura da CA e entre os *tags* foi percebido após 12 meses de armazenamento nos grupos STA40, STA23 e STU40 (Figuras B, E e H, respectivamente). A maior deposição de prata abaixo da CH ocorreu no grupo STU23 após 30 meses de armazenamento (Figura L). (E= Adesivo Single Bond a base de etanol e água; TA= Técnica de união alcoólica; TU= Técnica de união úmida; 40= Volatilização a 40° C; 23= Volatilização a 23° C).

### 9.2.2 Microscopia de Varredura Confocal a Laser (MVCL)

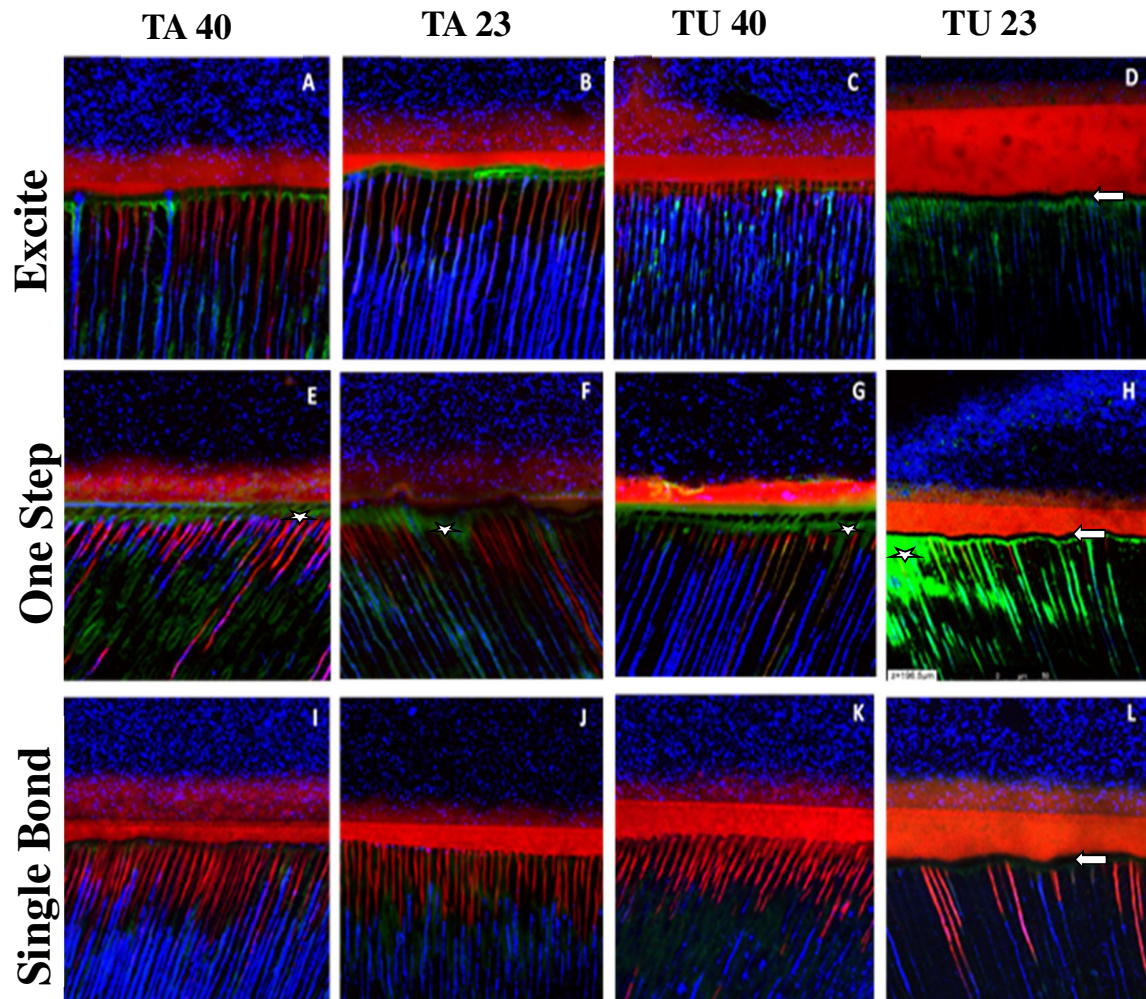
Após a confecção das amostras as mesmas foram imersas em uma solução aquosa de 0.1% de fluoresceína que é um corante de coloração verde. Acredita-se que onde tem corante verde pode ter a presença de água, que pode levar a degradação hidrolítica da interface de união dente/ restauração. Para que fosse feita a escolha da melhor imagem representativa para cada condição experimental avaliada neste estudo, foram capturadas 5 imagens de cada interface de união com a sobreposição de três imagens onde a fluoresceína é representada pela coloração verde (Figura 5A); a rodamina é representada pela coloração vermelha (Figura 5B); e o azul representa a reflectância do dente (Figura 5C). As imagens de MVCL das interfaces de união a dentina apresentaram informações relevantes com relação a morfologia da CH, CA e tags formados além de observações valiosas com relação a presença de nanoinfiltração para todos os grupos. Observou-se que todos os adesivos (*tags* de coloração vermelha) testados foram capazes de infiltrar no interior da dentina desmineralizada (projeções na dentina de cor azul- TD), criando uma camada híbrida 5-10 µm de espessura, com maior quantidade de tags de resina penetrantes nos túbulos dentinários nos grupos onde foi realizada a técnica alcoólica, os quais também apresentaram menor quantidade de água na CH (áreas nebulosas na CH de coloração verde- Figuras A-B; E-F; I-J) apesar de também terem suas interfaces afetadas pela penetração da fluoresceína. A maior nanoinfiltração foi observada através dos TD nos grupos correspondentes aos adesivos One Step seguido do adesivo Excite sugerindo a presença de uma CH mais porosa (Figuras A-

H). No grupo OTA23 (Figura E) foi observada a formação de uma CH mais inconsistente, apresentando porosidades na interface de união. Diferenças significativas foram observadas para o sistema adesivo Single Bond que apresentou menor padrão de nanoinfiltração (menor penetração de fluoresceína) independente da técnica de união e temperatura. No entanto, a semelhança do que foi observado nas imagens correspondentes as interfaces de união formadas com os adesivos Excite e One Step, quando foi realizada a técnica de união úmida (TU) e volatilização a 23° C, foi possível a observação de lacunas em toda a extensão da interface de união (sugerindo a presença de colágeno exposto e não infiltrado por adesivo), além de porosidades na CA, CH e descontinuidade dos *tags* (Figuras D, H e L).



**Figura 5:** Espécime do grupo OTA 40 (One Step a 40° C- técnica alcoólica). A figura mostra três tipos de imagens superpostas (**D**), além de três imagens independentes onde a fluoresceína que corresponde a hidrofiliabilidade é representado pela coloração verde (**A**); a rodamina apresenta coloração avermelhada correspondente a camada híbrida, camada adesiva e tags resinosos (**B**); e o azul representa a reflectância do dente, ou seja, a auto fluorescência do dente (**C**).





**Figura 6:** Imagens representativas de MVCL (1000x aumento) mostrando caracterização da interface e nanoinfiltração (áreas de coloração verde- corante fluoresceína) em espécimes de dentina aderidos aos sistemas adesivos EX (Figuras A-D), OS (Figuras E-H) e SB (Figuras I-L) para cada temperatura de volatilização na técnica de união úmida alcoólica (TA40= Figuras A, E e I; TA23= Figuras B, J e F) e para cada temperatura de volatilização na técnica de união úmida em água (TU40= Figuras C, G e K; TU23= Figuras D, H e L). A figura 10 mostra três projeções de imagens superpostas, nas quais a fluoresceína que corresponde a coloração verde (nanoinfiltração); a rodamina apresenta coloração avermelhada correspondente a infiltração do sistema adesivo na dentina desmineralizada (CA, CH e tags); e o azul representa a reflectância natural do dente, ou seja, a auto fluorescência do dente (TD desmineralizados). Em todas as imagens é possível se perceber a presença do corante fluoresceína, sendo mais intensa a sua absorção nos adesivos E e OS. (A- D) Imagens de MVCL mostrando as características da interface de união para EX. É possível observar uma CH de coloração mais

alaranjada nas imagens B e D onde foi realizada volatilização a 23° C (possível mistura dos corantes vermelho e verde). Os tags foram observados em maior quantidade e profundidade nas imagens A e B onde foi realizada TA apesar de também apresentar absorção de fluoresceína dentro da interface resina-dentina. O grupo ETU23 (D) apresentou CA mais espessa apresentando porosidades além de um espaço em toda a espessura da interface de união sugerindo a presença de colágeno exposto não infiltrado pela CH. **(E- H)** Imagens das características da interface de união para OS. Estas imagens apresentam elevada absorção de corante (nanoinfiltração ao longo de toda a interface resina-dentina, bem como da camada adesiva) evidenciados por estrela. A semelhança de ETU23 (D), o grupo OTU23 (H) também apresentou uma fenda logo abaixo da CA (evidenciado pela seta) com absorção extrema de fluoresceína na CH e nos *tags*. No grupo OTA23 (F) pôde-se perceber a presença de CH e CA menos consistentes e presença de espaços em áreas da interface de união (evidenciado pela seta). **(I- L)** Imagens da interface de união para o sistema adesivo SB a base de etanol e água. As imagens para este adesivo mostram padrões de absorção de fluoresceína bem semelhantes com pouca nanoinfiltração (áreas de coloração verde) na CH. A semelhança dos adesivos OS e EX, na técnica de união úmida com água (TU), e após volatilização a 23° C de temperatura, o grupo STU23 também apresentou um espaço entre CA e CH evidenciado pela seta, além de coloração alaranjada e porosidades ao longo de toda espessura da CA e CH o que pode ter ocasionado a diminuição na quantidade e profundidade de tags abaixo da CH. (E= Adesivo Excite a base de etanol; OS= Adesivo One Step a base de acetona; S= Adesivo Single Bond a base de etanol e água; TA= Técnica de união úmida com etanol; TU= Técnica de união úmida com água; 40= Volatilização a 40° C; 23= Volatilização a 23° C; CH= Camada híbrida; CA= Camada Adesiva; TB= Túbulos Dentinários).

## 8 Discussão

Foi observado neste estudo que o grau de conversão dos adesivos a base de etanol e água (Single Bond), etanol (Excite) e a base de acetona (One Step) foram maiores quando estes foram volatilizados a 40° C (Tabela 1), sendo a primeira hipótese aceita. O jato de ar aquecido a esta temperatura foi também capaz de elevar a resistência de união destes adesivos para todos os tempos de armazenamento e independente da técnica de união úmida utilizada (Tabela 2). Tal observação tornou a segunda hipótese parcialmente aceita pelo fato de que a RU dos grupos volatilizados a 40° C não permaneceu estável frente ao armazenamento em água, a semelhança com o que ocorreu para os grupos volatilizados a 23° C. Nas imagens qualitativas de MEV e MVCL, só foi evidente a redução de nanoinfiltração e de sinais morfológicos de degradação da camada híbrida, dos *tags* e da camada adesiva em alguns

grupos onde os sistemas adesivos foram volatilizados a 40° C e a dentina foi saturada com etanol, o que resultou no aceite parcial da terceira hipótese.

O grau de conversão é uma medida do percentual de duplas ligações de carbono que foram convertidas em ligações simples de carbono para formar uma cadeia polimérica. Neste estudo, as amostras que receberam volatilização a 23° C apresentaram menores valores de GC. O que pode ser explicado pelo fato de o solvente residual, que não foi evaporado adequadamente, ter se interposto entre os monômeros dificultando sua interação no momento da fotoativação. Esse solvente em excesso liga-se aos grupamentos polares do polímero em formação comprometendo a criação de ligações cruzadas, alterando assim a coesão do polímero resultante (Hashimoto *et al.*, em 2006).

Por outro lado, sugere-se que a volatilização através do jato de ar aquecido foi mais eficaz na evaporação dos solventes, tornando-se responsável por uma diminuição na viscosidade dos sistemas adesivos, elevando não só o seu GC, como também a sua RU quando aplicados sobre a matriz dentinária desmineralizada. Estes achados podem ser explicados pelo fato de que a diminuição da viscosidade dos sistemas adesivos pode favorecer tanto na infiltração do sistema adesivo no substrato, quanto resultar na reação das cadeias poliméricas numa extensão maior (Reis *et al.*, 2009), permitindo a formação de uma camada adesiva mais coesa, com maior quantidade de ligações cruzadas logo após a polimerização (Araújo LSN, 2011).

Assim, supõe-se que nos grupos onde foi realizada a volatilização a 40° C a água/ etanol presente na dentina desmineralizada foi mais eficazmente substituída pelos monômeros devido a uma possível melhora no padrão de evaporação dos solventes; resultando na formação de uma interface de união dente/ restauração mais homogênea e resistente logo após a polimerização. Entretanto, esse aumento da resistência de união promovido pelo jato de ar aquecido não foi capaz de impedir a degradação da camada híbrida após 30 meses de armazenamento em água de modo semelhante ao observado nos grupos controle onde foi feita a volatilização a 23° C. Dessa forma, apesar de ser observado uma estabilidade na resistência de união de alguns grupos onde foi realizada a volatilização a 40° C (STU40 e o STA40) ou a volatilização a temperatura ambiente (STA23, ETU23 e ETA23),

todos os demais grupos tiveram uma queda nos valores de resistência de união a partir de 12 meses de armazenamento (Tabela 2).

Apesar de sinais da degradação da camada adesiva, camada híbrida e *tags* poderem ser facilmente percebidos nas imagens de MEV representativas de cada grupo a partir de 12 meses de armazenamento (Figuras 6, 7 e 8), não se pode afirmar que todos os grupos que apresentaram maiores valores de resistência de união apresentaram menor quantidade de deposição de prata, corroborando com achados de estudos anteriores (Pereira *et al.*, 2001; Guzman *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2009). De acordo com Reis *et al.*, 2009 uma maior resistência de união pode estar mais relacionada a uma maior infiltração do sistema adesivo na dentina desmineralizada do que a um melhor selamento da interface de união dente/ restauração.

Esse comportamento pode também ser facilmente explicado pela mobilidade do sistema e pela viscosidade dos sistemas adesivos. O movimento térmico de uma molécula de líquido deve ser suficiente para vencer a sua tensão superficial e evaporar, isto é, sua energia cinética deve exceder o trabalho de coesão aplicado pela tensão superficial à superfície do líquido. Pode-se sugerir, portanto, que o calor a que os sistemas adesivos foram submetidos fez as moléculas do solvente se movimentarem mais depressa, diminuindo a sua viscosidade. Essa menor viscosidade pode quebrar ligações de hidrogênio presentes nos solventes facilitando a sua evaporação, além de deixar o sistema adesivo mais fluido para penetrar mais em profundidade na dentina desmineralizada (Araújo LSN, 2011).

A observação das imagens qualitativas de MEV (Figuras 2, 3 e 4) e das imagens de MVCL (Figura 6) podem confirmar tal comportamento dos sistemas adesivos na presença do calor. Nessas imagens pode-se perceber claramente a maior profundidade e quantidade dos *tags* preenchendo os túbulos dentinários, principalmente nos grupos onde o sistema adesivo volatilizado a 40° C foi aplicado em dentina desmineralizada saturada com etanol (Figuras 6A, E e I) independente do tempo de armazenamento (Figuras 2A-C; 3A-C; 4A-C). Essas observações sinalizam para a influência da técnica de união nos achados deste estudo, apesar dos resultados quantitativos de resistência de união não mostrarem diferença entre as técnicas de união avaliadas.



Sabe-se que a dentina saturada em etanol é menos hidrófila, o que pode impedir a separação de fases de monômeros hidrófobos na presença de água, facilitando a sua infiltração na dentina úmida e desmineralizada (Wang *et al*, 2006; Ye *et al*, 2008). No entanto, para que isso ocorra, a água no interior da matriz dentinária deve ser completamente substituída pelo etanol, antes da aplicação do sistema adesivo (Becker *et al*, 2007; Sauro *et al*, 2009). Porém, alguns estudos mostraram que, quando a dentina é saturada com etanol (a semelhança do que ocorre quando a dentina é saturada com água), a água no interior dos compartimentos entre as fibras colágenas não é completamente substituída pelo etanol, principalmente em profundidade nos túbulos dentinários, o que pode levar a diluição de monômeros hidrófobos reduzindo a resistência de união da interface adesiva formada a partir desses monômeros (Sadek *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2006). Estes achados podem explicar a ausência de diferença entre as técnicas com relação a RU.

Por outro lado, a análise exploratória dos dados de RU indicou que houve interação entre adesivo & temperatura & técnica, consolidando a influência da saturação (água/ etanol) da dentina nos resultados deste estudo. A influência pontual da técnica na resistência de união pôde ser observada nos grupos onde o sistema adesivo a base de etanol e água (Single Bond) foi aplicado a dentina desmineralizada. Assim, quando Single Bond foi aplicado na dentina saturada com etanol a interface de união manteve sua estabilidade mesmo após 30 meses de armazenamento em água, independente da temperatura de volatilização a que o adesivo foi submetido. Diferentemente, quando a dentina foi saturada com água, essa estabilidade só foi observada para este adesivo quando foi realizada volatilização através de jato de ar aquecido.

Alterações na técnica adesiva visam basicamente a obtenção de melhor desempenho a longo prazo. Assim, este estudo teve por objetivo associar a volatilização com jato de ar aquecido a técnica alcoólica para verificar não só elevação da resistência de união em um momento Inicial, mas também sua manutenção com o tempo de armazenamento, fatores que são de extrema importância para a escolha da técnica na prática clínica. Pode-se associar a baixa durabilidade da interface de união com a formação de polímeros apresentando características hidrófilas, o que pode resultar em sorção de água e consequente plastificação da cadeia polimérica (Malacarne *et al.*, 2006). Além disso, a infiltração dos

monômeros na matriz dentinária desmineralizada muitas vezes é incompleta, deixando colágeno exposto à ação de collagenases endógenas que podem levar a decomposição da matriz dentinária (Bedran- Russo *et al.*, 2007).

Assim, já que a infiltração adequada dos monômeros no interior dos arcabouços entre as fibras de colágeno dependerá da completa substituição da água (Takahashi *et al.*, 2013) / etanol (Sauro *et al.*, 2009) pelo sistema adesivo no momento de sua aplicação; e já que não há evidências de que isso realmente ocorra, sugere-se que a infiltração mais adequada de Single Bond pode estar mais relacionada a sua composição. Este sistema adesivo apresenta na sua composição a água e o etanol como solventes, e os monômeros HEMA e BisGMA. Se por um lado o etanol e o Bis GMA criariam um ambiente mais hidrófobo por outro lado a água e o HEMA, que possuem características hidrófilas, seriam capazes de diminuir a influência da possível presença de água residual na matriz dentinária em profundidade, quando a dentina estava saturada com etanol dificultando a contaminação do polímero em formação (Ye *et al.*, 2008).

Outra sinalização importante para a influência da técnica nos resultados deste estudo pode ser percebida comparando-se as imagens representativas de MEV e MVCL dos grupos onde foi realizada a saturação da dentina com etanol e volatilização dos sistemas adesivos a 40° C com as imagens dos grupos onde a dentina foi saturada com água e recebeu volatilização a 23° C. As imagens de microscopia confocal (tempo Inicial) dos grupos ETU23, OTU23 E STU23 (Figuras 6-D, H e L, respectivamente) indicam a presença de camadas adesivas mais espessas de coloração alaranjada (possível mistura de corantes vermelho e verde, o que sugere a contaminação da cadeia polimérica pela presença de água residual), apresentando uma lacuna em toda a espessura da camada adesiva/ camada híbrida, sugerindo a presença de colágeno exposto não infiltrado adequadamente pelo sistema adesivo. Além disso, pode-se perceber ainda a reduzida quantidade de túbulos dentinários e, nos grupos ETU23 e OTU23, a presença intensa de fluoresceína (corante verde-nanoinfiltração) na camada híbrida e entre os túbulos dentinários.

Essas características observadas nas imagens de confocal podem ajudar a explicar as características morfológicas das imagens de MEV (Figuras 2, 3 e 4- J-K-L) após 12 meses e 30 meses de armazenamento, as quais mostram sinais nítidos de degradação da

camada híbrida e dos *tags* nesses grupos ETU23, OTU23 e STU23, principalmente após 30 meses de armazenamento. O aumento da permeabilidade da camada híbrida pode ser o resultado da incompleta infiltração do sistema adesivo na dentina desmineralizada (Sano *et al.*, 1995). Este tipo de nanoinfiltração observada nas imagens de confocal para estes grupos controle sugerem que a estabilidade a degradação desses grupos foi comprometida tanto pela degradação hidrolítica de uma camada adesiva e camada híbrida menos coesas e menos resistentes a sorção de água (volatilização a temperatura ambiente), quanto pela presença de colágeno não infiltrado que, por estar exposto, pode ter sido degradado mais facilmente.

Na comparação entre os sistemas adesivos avaliados neste estudo, foi possível observar claramente a superioridade dos sistemas adesivos a base de etanol e água (Single Bond) e a base de etanol apenas (Excite), comparativamente ao One Step, um sistema adesivo apresentando acetona como solvente. A inferioridade do sistema adesivo a base de acetona pode estar relacionada ao processo que ocorre em um momento imediatamente após a sua fotoativação, o que foi confirmado pelas imagens de confocal (Figura 6- E-H) e pelos dados de grau de conversão. Entretanto, este processo foi capaz de influenciar na sua resistência de união apenas após 30 meses de armazenamento, momento em que foram observados os mais baixos valores de RU comparativamente aos adesivos Single Bond e Excite, independente da temperatura de volatilização avaliada (Tabela 2).

Estes resultados corroboram com achados anteriores de Hass *et al.*, 2013 que relatam a existência de uma correlação positiva entre o aumento do grau de conversão e da resistência de união e diminuição da nanoinfiltração. Isto sugere que a presença de nanoporosidades na camada adesiva e camada híbrida, que podem influenciar na qualidade e estabilidade da interface de união dente/ restauração, podem estar relacionadas a um processo deficiente de polimerização, excesso de solvente dos sistemas adesivos que não foram adequadamente volatilizados, e presença de água residual na dentina desmineralizada, que não foi completamente substituída pelos monômeros resinosos, respectivamente (Tay *et al.*, 2005, Dickens *et al.*, 2005; Hass *et al.*, 2013).

Diante disso, podemos sugerir que um processo de polimerização deficiente pode ter sido a causa da pior performance do sistema adesivo One Step, comparativamente aos adesivos a base de etanol. Por apresentar em sua composição a acetona como solvente, que

possui menor temperatura de ebulição e maior pressão de vapor do que os solventes presentes em Single Bond e Excite, o que facilita sua rápida evaporação, as recomendações do fabricante estabelecem que seja feita a aplicação de duas camadas desse sistema adesivo na dentina desmineralizada. Dessa maneira, alguns autores especulam que, mesmo que seja realizada a etapa de volatilização nos sistemas adesivos, aqueles que apresentam acetona em sua composição podem permanecer com quantidade suficiente de solvente residual no momento da polimerização levando ao aparecimento de porosidades nessa camada adesiva (Cho *et al.*, 2004) o que foi representado pela maior absorção de fluoresceína ao longo da interface de união nestes grupos (Figuras 6 E-H) aliado a presença de lacunas entre a camada adesiva e a camada híbrida (Figuras 6 F-H) e a presença de camada adesiva de coloração alaranjada (Figuras G e H) sugerindo a contaminação por água também na camada adesiva que fica em contato direto com a resina composta.

Neste estudo, portanto, foi nítida a maior abrangência da superioridade da volatilização a 40° C de cada sistema adesivo avaliado e para cada técnica de união testada. Também foi observada a formação de uma camada híbrida mais homogênea, apresentando maior infiltração quando os sistemas adesivos volatilizados a 40° C foram aplicados em dentina saturada com etanol. Os sinais quantitativos (RU) de degradação que podem ser relacionados aos resultados Iniciais de grau de conversão e microscopia confocal puderam ser observados mais fielmente após 30 meses de armazenamento.

Assim, os resultados deste estudo mostraram a importância da escolha dos sistemas adesivos e da técnica de volatilização dos solventes presentes nos mesmos, para que estes possam formar cadeias poliméricas mais homogêneas e resistentes imediatamente após a polimerização, além de infiltrar de maneira mais adequada na dentina desmineralizada melhorando a estabilidade da camada híbrida formada.

## 9 Referências

1- Alexandre RS, Sundfeld RH, Giannini M, Lovadino JR. The Influence of temperature of three adhesive systems on bonding to ground enamel. Oper Dent. 2008, 33-3, 272- 81.

- 2- Amaral FL, Colucci V, Palma-Dibb RG, Corona SA. Assessment of in vitro methods used to promote adhesive interface degradation: a critical review. *J Esthet Restor Dent*. 2007; 19: 340-353.
- 3- Araújo, Larissa Sgarbosa Napoleão. Efeito de diferentes tempos e temperaturas de volatilização de solventes sobre o grau de conversão e propriedades mecânicas de sistemas adesivos dentinários. Piracicaba: FOP, 2011, 78 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Clínica Odontológica, área de concentração em Dentística, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2011.
- 4- Armstrong SR, Vargas MA, Fang Q, Laffoon JE. Microtensile bond strength of a total-etch 3-step, total-etch 2-step, self-etch 2-step, and a self-etch 1-step dentin bonding system through 15-month water storage. *J Adhes Dent*, 2003; 5:47-56.
- 5- Arrais CAG, Pontes FM, Santos LPS, Leite ER, Gianinni M. Degree of Conversion of Adhesive Systems Light- Cured By LED and Halogen Light. *Braz Dent J*. 2007; 18(1): 54-59.
- 6- Becker TD, Agee KA, Joyce AP, Rueggeberg FA, Borke JL, Waller JL. Infiltration/evaporation-induced shrinkage of demineralized dentin by solvated model adhesives. *J Biomed Mater Res B Appl Biom*. 2007; 80: 156-165.
- 7- Cardoso PE, Placido E, Moura SK. Micro-leakage of four simplified adhesive systems under thermal and mechanical stresses. *Am J Dent*. 2002; 15:164-168.
- 8- Carrilho MRO, Carvalho RM, Goes MF, Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjaderhane L. Chlorhexidine Preserves Dentin Bond in vitro. *J Dent Res*. 2007; 1: 90- 94.
- 9- Carvalho RM, Mendonca 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; 82:597-601.
- 10- De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*. 2003; 82: 136-140.
- 11- De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M & Van Meerbeek B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: Methods and results. *J Dent Res*. 2005; 84(2): 118- 132.

- 12- Frankenberger R, Krämer N, Petschelt A. Long-term effect of dentin primers on enamel bond strength and marginal adaptation. *Oper Dent.* 2000; 25:11-19.
- 13- Gianinni M, Arrais CAG, Vermelho PM, Reis RS, Santos LPS, Leite ER. Effects of the Solvent Evaporation Technique on the Degree of Conversion of One- Bottle Adhesive Systems. *Oper Dent.* 2008; 33(2): 149- 154.
- 14- Kanca J. Resin bondind to wet substrate. I- Bonding to dentin. *Quintess Int.* 1992; 23(1): 39-41.
- 15- Kirsten L. Van Landuyt, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomater.* 2007; 28: 3757- 3785.
- 16- Holmes RG, Rueggeberg FA, Callan RS, Caughman F, Chan DCN, Pashley DH, Looney SW. Effect of solvent type and content on monomer conversion of a model resin system as a thin .lm *Dent Mater.* 2007; 23: 1506–1512.
- 17- Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, Tay FR, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. *J Dent Res.* 2009; 88 (2)-146- 151.
- 18- Klein- Júnior CA, Zander- Grande C, Amaral R, Stanislawczuk R, Garcia EJ, Baumhardt- Neto R, et al. Evaporating solvents with a warm air stream: effects on adhesive layer properties and resin- dentin Bond strengths. *J Dent.* 2008; 36: 618- 25.
- 19- Magne P, Douglas WH. Additive contour of porcelain veneers: a key element in enamel preservation, adhesion, and esthetics for aging dentition. *J Adhes Dent.* 1999; 1(1):81-92.
- 20- Mjör IA, Gordan VV. Failure, repair, refurbishing and longevity of restorations. *Oper Dent.* 2002; 27: 528-534.
- 21- Nakabayashi N, Pashley DH. Hybridization of dental hard tissues. Tokyo: Quintess. 1998; p 129.
- 22- Navarra CO, Cadenaro M, Armstrong SR, Jessop J, Antonioli F, Sergo V, Lenarda RD, Breschi L. Degree of conversion of filtek silorane adhesive aystem and Clearfil SE Bond

within the hybrid and adhesive layer: An in situ Raman analysis. *Dent Mat.* 2009; 25: 1178–1185.

23- Nishitani Y, Yoshiyama M, Donnelly AM, Agee KA, Sword J, Tay FR, et al. Effects of resin hydrophilicity on dentin bond strength. *J Dent Res.* 2006; 85: 1016-1021.

24- Pashley DH, Tay FR, Yu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host- derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004; 8: 216-221.

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

26- Reis A, Klein-Júnior C A, Accorinte M L R, Grande R H M, dos Santos C B, Loguercio A D. Effects of adhesive temperature on the early and 6-month dentin bonding. *J Dent.* 2009; 37: 791 – 98.

27- Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol wet-bonding challenges current anti-degradation strategy. *J Dent Res.* 2010a; X(X): 1- 6.

28- Sadek FT, Mazzoni A, Breschi L, Tay FR, Braga RR. Six-month evaluation of adhesives interface created by a hydrophobic adhesive to acid-etched ethanol-wet bonded dentine with simplified dehydration protocols. *J Dent.* 2010b; 38: 276 – 283.

29- Sadek FT, Castellan CS, Braga RR, Tjäderhane SML, Pashley DH, Tay FR. One-year stability of resin–dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dent Mater.* 2010c; 26: 380–386.

30- Sauro S, Watson TF, Mannocci F, Miyake K, Huffman BP, Tay FR, et al. (). Two-photon laser confocal microscopy of micropermeability of resin-dentin bonds made with water or ethanol wet bonding. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 90:327-337.

31- Tay FR, Gwinnett JA, Wei SH. Micromorphological spectrum from overdrying to overwetting acid-conditioned dentin in water-free acetone based, single-bottle primer/adhesives. *Dent Mater.* 1996; 12: 236-244.

32- Tay FR, Gwinnett JA, Wei SH. Relation between water content in acetone/alcohol-based primer and interfacial ultrastructure. *J Dent.* 1998; 26:147-156.

- 33- Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? J Can Dent Assoc. 2003; 69: 724-731.
- 34- Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, et al. Bonding BisGMA to dentina proof of concept for hydrophobic dentin bonding. J Dent Res. 2007; 86: 1034-1039.
- 35- Tjan AHL, Castelnuovo J, Liu P. Bond strength of multi-step and simplified-step systems. Am J Dent. 1996; 9:269-272.
- 36- Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. Oper Dent. 2003; 28: 215- 235.
- 37- Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. J Biomed Mater Res. 2002; 59: 46–55.
- 38- Wang Y, Spencer P. Continuing etching of an all-in-one adhesive in wet dentin tubules. J Dent Res. 2005; 84: 350- 354.
- 39- Wang Y, Spencer P, Hager C, Bohaty B. Comparison of interfacial characteristics of adhesive bonding to superficial versus deep dentine using SEM and staining techniques. J Dent. 2006; 34:26-34.
- 40- Ye Q, Park JG, Topp E, Wang Y, Misra A, Spencer P. In vitro performance of nano-heterogeneous dentin adhesive. J Dent Res. 2008; 87:829-833.
- 41- Yiu CK, Pashley EL, Hiraishi N, King NM, Goracci C, Ferrari M, et al. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. Biomater. 2005; 26(34): 6863-6872.
- 42- Xie B, Dickens SH, Giuseppetti AA. Microtensile bond strength of thermally stressed composite-dentin bonds mediated by one-bottle adhesives. Am J Dent, 2002; 12:177- 184.
- 43- Zou Y, Armstrong SR, Jessop JLP. Apparent conversion of adhesive resin in the hybrid layer. Part 2. In situ studies of the resin–dentin bond. J Biomed Mater Res. 2009A; 89: 355–62.



- 44- 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; 14:100–4.
- 45- Guzman-Armstrong S, Armstrong SR, Qian F. Relationship between nanoleakage and microtensile bond strength at the resin–dentin interface. *Oper Dent* 2003; 28:60–6.
- 46- Ding PG, Wolff D, Pioch T, Staehle HJ, Dannewitz B. Relationship between microtensile bond strength and nanoleakage at the composite–dentin interface. *Dent Mater*. 2009; 25:135–41.
- 47- Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, Tay FR. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jan; 84(1):19-29.
- 48- Lopes GC, Perdigao J, de Lopes MF, Vieira LC, Baratieri LN, Monteiro S Jr. Dentin bond strengths of simplified adhesives: effect of dentin depth. *Compend Contin Educ Dent*. 2006; 27:340–345.
- 49- Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, Yiu CK, Carrilho MR. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater*. 2006 Oct; 22(10):973-80.
- 50- Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater*. 2007 Jan; 80(1): 268–72.
- 51- H. Sano, T. Takatsu, B. Ciucchi, J.A. Horner, W.G. Matthews, D.H. Pashley, Nanoleakage: leakage within the hybrid layer, *Oper Dent*. 20 (1995) 18–25
- 52- Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Hiraishi N, Yiu CK. Water treeing in simplified dentin adhesives – déjà vu? *Oper Dent*. 2005; 30: 561–79.
- 53- Dickens SH, Cho BH. Interpretation of bond failure through conversion and residual solvent measurements and Weibull analyses of flexural and microtensile bond strengths of bonding agents. *Dent Mater*. 2005; 21:354–64.
- 54- Hass V, Dobrovolski M, Zander-Grande C, Martins GC, Gordillo LAA, Accorinte MLR, et al. Correlation between degree of conversion, resin–dentin bond strength and nanoleakage of simplified etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2013; 29: 921-928.



## Considerações Gerais

Apesar dos avanços nas pesquisas com relação a qualidade dos sistemas adesivos e da busca pela aplicação correta da técnica adesiva e restauradora, é comum a ocorrência de infiltração marginal nas restaurações realizadas em dentina desmineralizada (Hashimoto et al, 2000). O insucesso da técnica pode levar a necessidade de substituição da restauração, resultando em novo desgaste da estrutura dentária o que, consequentemente, leva ao desconforto físico e psicológico do paciente.

Os capítulos 1 e 2 tiveram como objetivo principal investigar este processo de degradação que ocorre na camada híbrida em uma visão mais minimalista e específica do que ocorre nos 10 µm de dentina desmineralizada (por isso a completa desmineralização do espécime de dentina no capítulo 1- simulando a avaliação da camada híbrida apenas) que é infiltrada pelos sistemas adesivos. Esta visão mais singular foi proporcionada no Capítulo 1 pela criação de macro modelos de camada híbrida e foi estudada a associação da técnica de volatilização dos adesivos através de jato de ar aquecido com a aplicação do extrato de sementes de uva na dentina. A primeira técnica foi realizada para viabilizar a evaporação dos solventes presentes em sistemas adesivos, e da água residual que permanece retida na matriz dentinária desmineralizada. Através dessa técnica haveria uma diminuição da viscosidade dos sistemas adesivos o que poderia fazê-lo infiltrar em maior profundidade. Além disso, esse aumento na evaporação dos solventes proporcionado pelo jato de ar quente poderia proporcionar a formação de camada adesiva e camada híbrida mais homogênea (Araújo et al., 2011), com maior número de ligações cruzadas (Reis et al, 2009), o que se proporia a minimizar a degradação hidrolítica. A segunda estratégia utilizada consistiu no tratamento da dentina com a aplicação do extrato de uva que teria sua função estabelecida em elevar a quantidade de ligações cruzadas entre as fibras colágenas deixando-as mais resistentes ao processo de degradação enzimático. Associando então as duas técnicas teríamos como resultado tanto camada adesiva como substrato dentinário apresentando maior resistência ao processo degradativo.

Para testar a hipótese acima foram realizados espécimes de sistema adesivo para simular a camada adesiva, além de macro- modelos de camada híbrida simulando a dentina

desmineralizada e infiltrada por adesivo (camada híbrida). A comprovação do sucesso da associação das duas técnicas residiu no fato de que apenas os grupos dos macro-modelos de camada híbrida que receberam o pré-tratamento da dentina com extrato de uva, associados à volatilização de solventes a 40°C, mostraram menor alteração de massa e maior módulo de elasticidade em todos os adesivos avaliados. O fato de que a camada adesiva pode ter sido formada com maior homogeneidade está suportada pelos resultados dos espécimes de sistema adesivo que, quando volatilizados a 40°C mostraram maior módulo de elasticidade do que aqueles que foram volatilizados a 23°C em todos os tempos avaliados. No entanto, nos macro modelos de camada híbrida, foi necessário o tratamento da dentina com o extrato de uva associado a volatilização a 40°C para promover a formação de uma camada híbrida mais homogênea e resistente ao processo de degradação, o que sugere a forte influência do processo degradativo na dentina, que foi essencial para os resultados deste estudo.

O Capítulo 2 teve por objetivo estudar a degradação de uma camada híbrida “comum” (semelhante àquela criada clinicamente), realizada de acordo com as recomendações do fabricante. No entanto, a semelhança do Capítulo 1, foram associadas técnicas durante os procedimentos adesivos com o objetivo de criar uma camada híbrida mais resistente ao processo de degradação. Como resultado da criação de uma camada híbrida em uma dentina saturada com etanol, onde foi realizada a aplicação de sistemas adesivos volatilizados com jato de ar aquecido, foi observado uma melhora significativa com relação ao processo de nanoinfiltração. Além disso, o jato de ar quente foi capaz de elevar a resistência de união de todos os adesivos testados em todos os tempos de armazenamento comparativamente ao jato de ar a temperatura ambiente, o que sinaliza para a influência positiva do jato de ar quente na formação de uma interface de união dente- restauração mais resistente.

A dentina saturada com etanol cria um ambiente menos hidrófilo, permitindo assim, que a matriz de colágeno desmineralizada e saturada por etanol possa ser infiltrada mais facilmente por monômeros resinosos hidrófobos, o que é um desafio na Odontologia Restauradora Atual (Nishitani *et al*, 2006; Pashley *et al*, 2007; Tay *et al*, 2007; Sadek *et al*, 2010). O procedimento se propõe a impedir a separação das fases de monômeros de resina

hidrófoba na presença de água (Tay *et al*, 1996; Wang *et al*, 2006; Ye *et al*, 2008) desde que a mesma seja completamente substituída pelo etanol.

Além disso, os resultados deste Capítulo mostraram que o jato de ar aquecido pode ainda levar a um aumento do grau de conversão dos sistemas adesivos possivelmente por possibilitar a formação de um polímero mais reticulado e com maior quantidade de ligações cruzadas. A polimerização inadequada dos adesivos pode criar defeitos de adesão. Essa polimerização deficiente, pode criar uma discrepância entre a profundidade da desmineralização dentinária e a profundidade da infiltração do adesivo, o que foi visto claramente nas imagens de Microscopia Confocal dos grupos onde os sistemas adesivos foram volatilizados a 23 °C logo após sua aplicação em dentina saturada com água.

Esses resultados sugerem que o grau de conversão dos sistemas adesivos pode estar relacionado a quantidade de nanoinfiltração na interface de união, e que prejuízos no momento da polimerização dos sistemas adesivos podem elevar o processo de degradação da camada híbrida, o que foi visto principalmente no adesivo One Step que apresentava mais monômeros hidrófilos em sua composição.

A denominada “camada híbrida de adesão” é decorrente de um processo de adesão entre resina e tecido dentinário pautado pela união micro-mecânica de monômeros hidrófobos, hidrófilos e fibrilas colágenas (Nakabayashi, 1982). Essa força de adesão dos sistemas adesivos à dentina pode estar sujeita a nanoinfiltração, que ocorre entre a camada híbrida e a dentina mineralizada, e é responsável pela degradação da interface de união resina- dentina ao longo do tempo (Hashimoto *et al*, 2000).

Do exposto, pode-se inferir que a degradação da interface de união deve-se, primeiramente, à remoção incompleta da água residual na dentina desmineralizada. Tal fato associado ao processo inadequado de evaporação dos solventes presentes nos sistemas adesivos (Giannini *et al*, 2008) pode levar a uma polimerização incompleta, gerando áreas na camada adesiva e camada híbrida instáveis e não homogêneas passíveis de sofrer hidrólise. Além disso, já foi comprovado que nem toda dentina desmineralizada é coberta pelo sistema adesivo (Bertassoni *et al*, 2012) originando áreas de fibrilas colágenas expostas que podem ser degradadas por collagenases endógenas (Bedran- Russo *et al*., 2012).

As metaloproteínases estão presentes naturalmente na estrutura do complexo dentino pulpar, e podem ser ativadas pela diminuição do pH na matriz dentinária, fato que pode estar relacionado ao simples tratamento da superfície dentinária desmineralizada com primer e adesivo (Nishitani *et al*, 2006), levando a uma maior degradação das fibrilas colágenas (Bedran-Russo *et al*, 2012) e a um maior risco de nanoinfiltração (Pashley *et al*, 2004).

Nesse contexto, a aplicação de extrato de sementes de uva, uma substância natural que possui a capacidade de aumentar o número de ligações cruzadas covalentes inter e intramoleculares de colágeno quando aplicada sobre a dentina desmineralizada (Han *et al*, 2003) tem se proposto a aumentar a resistência da camada híbrida por serem, possivelmente, ligações mais resistentes a collagenases endógenas (Bedran- Russo *et al*, 2007).

Por fim, os resultados contidos nos Capítulos 1 e 2 demonstraram que o uso da volatilização a 40°C dos solventes presentes em sistemas adesivos convencionais como parte de um protocolo clínico restaurador pode elevar a homogeneidade e a resistência da camada adesiva formada. Essa técnica associada a biomodificação da dentina desmineralizada pode ser capaz de interferir na qualidade da camada híbrida formada por conferir ao substrato dentinário maior resistência e rigidez podendo ser indicado para aumentar a sobrevida das restaurações.

## **Conclusão**

De acordo com as condições experimentais, e com base nos resultados obtidos nos Capítulos 1 e 2, foi possível concluir que:

### **- Capítulo 1:**

- Os espécimes de adesivo (A) volatilizados a 40°C mostraram maior módulo de elasticidade do que aqueles que foram volatilizados a 23°C em todos os tempos avaliados; porém, o mesmo não ocorreu para os espécimes de macro-modelos de camada híbrida (M).
- Apenas os grupos dos macro-modelos de camada híbrida (M) que receberam o pré-tratamento da dentina com extrato de uva, associados à volatilização de solventes a 40°C, mostraram menor alteração de massa e maior módulo de elasticidade em todos os adesivos avaliados.
- No geral, quando comparados os três adesivos testados, One Step apresentou os mais baixos valores de módulo de elasticidade, além de maior alteração de massa do que Single Bond e Excite nas diferentes condições deste estudo.

### **- Capítulo 2:**

- Os sistemas adesivos volatilizados a 40°C mostraram maior grau de conversão do que aqueles que foram volatilizados a 23°C.
- As camadas híbridas formadas em dentina saturada com etanol na qual os sistemas adesivos foram volatilizados a 40°C apresentaram, no geral, menor nanoinfiltração (MEV e MVCL), sinalizando para a formação de camada híbrida e camada adesivas mais homogêneas e de melhor qualidade em todos os adesivos avaliados.
- No geral, quando comparados os três adesivos testados, One Step apresentou os mais baixos valores de grau de conversão e de resistência de união (após 30 meses), além de maior presença de nanoinfiltração (MVCL) e sinais da formação de camada adesiva e camada híbrida menos homogêneas.





## REFERÊNCIAS\*

1. Alexandre RS, Sundfeld RH, Giannini M, Lovadino JR. The influence of temperature of three adhesive systems on bonding to ground enamel. *Oper Dent* 2008; 33:272–81.
2. Araújo, Larissa Sgarbosa Napoleão. Efeito de diferentes tempos e temperaturas de volatilização de solventes sobre o grau de conversão e propriedades mecânicas de sistemas adesivos dentinários. Piracicaba: FOP, 2011, 78 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Clínica Odontológica, área de concentração em Dentística, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2011.
3. Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater*. 2007 Jan; 80(1): 268–72.
4. Bedran-Russo AK, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. *Acta Biomater*. 2012; 7(4): 1735-41.
5. Bertassoni LE, Orgel JP, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix – limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta Biomater*. 2012; 8:2419–33.
6. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M & VanMeerbeeck B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: Methods and results. *J Dent Res*. 2005; 84(2): 118- 32.

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

7. Giannini M, Arrais CAG, Vermelho PM, Reis RS, Santos LPS, Leite ER. Effects of the Solvent Evaporation Technique on the Degree of Conversion of One- Bottle Adhesive Systems. *Oper Dent*. 2008; 33 (2): 149- 54.
8. Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Apr; 65(1): 118–24.
9. Hashimoto, M. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res*. 2000 Jun; 79(6): 1385-1391.
10. Holmes RG, Rueggeberg FA, Callan RS, Caughman F, Chan DCN, Pashley DH, Looney SW. Effect of solvent type and content on monomer conversion of a model resin system as a thin film. *J Dent Mater*. 2007; 23: 1506–12
11. Nakabayashi N, Pashley DH. Hybridization of dental hard tissues. Tokyo: Quintess. 1998; p 129.
12. Nishitani Y, Yoshiyama M, Donnelly AM, Agee KA, Sword J, Tay FR, et al. Effects of resin hydrophilicity on dentin bond strength. *J Dent Res*. 2006; 85: 1016-1021.
13. Pashley DH, Tay FR, Yu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host- derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004; 8: 216-221.
14. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent*. 2007; 20:7-20.
15. Reis A, Klein-Júnior CA, Accorinte MLR, Grande RHM, dos Santos CB, Loguercio AD. Effects of adhesive temperature on the early and 6-month dentin bonding. *J Dent*. 2009;

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

37: 791 – 98.

16. Sadek FT, Castellan CS, Braga RR, Mai S, Tjaderhane L, Pashley DH, et al. One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dent Mater.* 2010; 26: 380-6.
17. Tay FR, Gwinnett JA, Wei SH. Micromorphological spectrum from overdrying to overwetting acid-conditioned dentin in water-free acetone based, single-bottle primer/adhesives. *Dent Mater.* 1996; 12: 236-244.
18. Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc.* 2003; 69: 724-31.
19. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, *et al.* Bonding BisGMA to dentina proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res.* 2007; 86: 1034-1039.
20. Wang Y, Spencer P, Hager C, Bohaty B. Comparison of interfacial characteristics of adhesive bonding to superficial versus deep dentine using SEM and staining techniques. *J Dent.* 2006; 34:26-34.
21. Ye Q, Park JG, Topp E, Wang Y, Misra A, Spencer P. In vitro performance of nano-heterogeneous dentin adhesive. *J Dent Res.* 2008; 87:829-833.

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline



## ANEXOS

- Certificado de Comitê de Ética- Capítulo 1

Comitê de Ética em Pesquisa - Certificado

<http://www.fop.unicamp.br/cep/sistema/certificado.php?Protocolo=068/2014&Id=1833&Passo=2&D...>



**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 **"Efeito da proantocianidina e de diferentes temperaturas de volatilização de sistemas adesivos sobre a estabilidade da camada híbrida"**, protocolo nº 068/2014, dos pesquisadores Giselle Maria Marchi Baron e Larissa Sgarbosa Napoleão de Araújo, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 10/09/2014.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project **"Effect of the association of proanthocyanidins and adhesives volatilization in the stability of the hybrid layer"**, register number 068/2014, of Giselle Maria Marchi Baron and Larissa Sgarbosa Napoleão de Araújo, 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 on Sep 10, 2014.

**Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado**  
Secretário  
CEP/FOP/UNICAMP

**Prof. Dra. Lívia Maria Andaló Tenuta**  
Coordenadora  
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.

- Certificado de Comitê de Ética- Capítulo 2



**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 **"Efeito de diferentes temperaturas de volatilização de solventes de sistemas adesivos sobre o seu grau de conversão e de diferentes técnicas de união úmida sobre a estabilidade da interface adesiva"**, protocolo nº 074/2011, dos pesquisadores Giselle Maria Marchi Baron e Larissa Sgarbosa Napoleão de Araújo, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 12/08/2011.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project **"Effect of different temperatures of volatilization of solvents in adhesive systems on their degree of conversion and different wet bonding techniques on the stability of adhesive interface"**, register number 074/2011, of Giselle Maria Marchi Baron and Larissa Sgarbosa Napoleão de Araújo, 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 on Aug 12, 2011.

*Livia M A Tenuta*  
**Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta**  
 Secretária  
 CEP/FOP/UNICAMP

*Ms. J. Jacks*

**Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**  
 Coordenador  
 CEP/FOP/UNICAMP

## Confirmação de submissão do trabalho- Capítulo 1

Mensagem de Impressão do Outlook.com

<https://col127.mail.live.com/ol/mail.mvc/PrintMessages?mkt=pt-br>

[Imprimir](#)

[Fechar](#)

### Submission Confirmation for your paper

De: **Dental Materials** (ees.dema.0.2f8809.e6cd442a@eesmail.elsevier.com)

Enviada: quarta-feira, 25 de fevereiro de 2015 15:43:05

Para: larissa\_sna@yahoo.com.br; larissasgarbosa@hotmail.com

Full Length Article

Dear Ms. Larissa Sgarbosa Napoleão de Araújo,

Your submission entitled "Dental adhesives and strategies for displacement of water/ solvents from collagen fibrils." has been received by Dental Materials

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/dema/>.

Your username is: larissa\_sna@yahoo.com.br

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/dema/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/dema/automail_query.asp)

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System