CYNTHIA SOARES DE AZEVEDO

Avaliação do tratamento de superfície com laser de Er:YAG de pulso super curto sobre a adesão em dentina hígida e afetada por cárie: estudo longitudinal

São Paulo

2015

CYNTHIA SOARES DE AZEVEDO

Avaliação do tratamento de superfície com laser de Er:YAG de pulso super curto sobre a adesão em dentina hígida e afetada por cárie: estudo longitudinal

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Adriana Bona Matos

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Azevedo, Cynthia Soares de.

Avaliação do tratamento de superfície com laser de Er:YAG de pulso super curto sobre a adesão em dentina hígida e afetada por cárie: estudo longitudinal / Cynthia Soares de Azevedo ; orientadora Adriana Bona Matos. -- São Paulo, 2015. 105p. : fig., tab., quadro; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Dentina. 2. Resistência de união - odontologia. 3. Microscopia eletrônica de varredura. I. Matos, Adriana Bona. II. Título.

Azevedo CS. Avaliação do tratamento de superfície com laser de Er:YAG de pulso super curto sobre a adesão em dentina hígida e afetada por cárie: estudo longitudinal. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Ao meu pai **Antônio**, meu anjo, que está nos meus pensamentos diários e em muitas lembranças. Termino esse Doutorado feliz em ter cumprido o que tínhamos combinado, imagino sua alegria e orgulho com essa conquista. Muitas saudades da sua filha que te ama tanto...

À minha mãe **Tânia**, pelo incentivo em continuar essa jornada. Sei que posso contar com você em todos os momentos, agradeço todo apoio e esforço dedicados a mim. Te amo!

À minha irmã **Tatiana**, por todas as conversas, conselhos e amizade. Junto ao meu cunhado Rafael, me deram de presente os sobrinhos mais lindos, Theodoro e Olga, que enchem meu coração de amor e alegram nossas vidas. Amo vocês.

Ao meu namorado **Sandro**, meu companheiro de vida. Obrigada por estar presente em todos os momentos, pela cumplicidade e paciência nessa fase final. Que tenhamos muitos outros motivos para comemorar juntos, te amo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha querida orientadora, Prof^a Dr^a Adriana Bona Matos, são mais de oito anos de parceria e só tenho que agradecer por todos os seus ensinamentos nesse período. Te tenho como inspiração de mulher, esposa, profissional e mãe. Que sorte eu tive em ter uma orientadora tão presente e dedicada, que não mediu esforços para me ajudar. Vou sentir muita falta do nosso convívio diário, das nossas conversas e dos seus conselhos. Mil vezes obrigada!

AGRADECIMENTO

A todos os professores da Área de Dentística, Ana Cecília Aranha, Antonio Alberto de Cara, Carlos de Paula Eduardo, Eliza Maria Agueda Russo, Glauco Fioranelli Vieira, Luciana Fávaro Francisconi dos Rios, Márcia Martins Marques, Maria Aparecida A. de C. Luz, Maria Angela Pita Sobral, Margareth Oda, Michel Nicolau Youssef, Miriam Lacalle Turbino, Narciso Garone Neto, Patrícia Moreira de Freitas, Rubens Corte Real de Carvalho e Taís Scaramucci agradeço por terem, em diferentes fases, participado da minha formação.

À Profª Drª Maria Regina Lorenzetti Simionato, do Departamento de Microbiologia Oral do ICB/USP por me receber tão bem em seu laboratório em um ambiente acolhedor junto a seus alunos de pós-graduação e pelos conhecimentos passados que possibilitaram a execução deste trabalho.

À Profª Drª Luciana Kfourir Siriani pela ajuda essencial no laboratório de microbiologia.

À Elizabeth S. R. Somessari e Carlos Gaia da Silveira, do Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN/USP, pela esterilização das amostras.

À técnica do nosso laboratório Soninha, que sempre com sorriso no rosto me recebeu e me ajudou em tudo que precisei, muito obrigada.

Aos funcionários do Departamento de Dentística, obrigado pela convivência nestes anos.

A todos os colegas de pós-graduação. Desejo um caminho de sucesso para todos vocês.

Bia e Lívia, dividindo a mesma orientadora acompanho de perto todo o esforço de vocês, saibam que estarei presente no que precisarem, muita sorte para vocês.

Um carinho especial às minhas amigas Anely, Mayra e Tati que estão comigo desde o mestrado, e sem dúvidas fizeram com que esses anos fossem ainda mais especiais. Vocês são amigas para toda vida.

À minha amiga Thayanne, minha vizinha, companheira de muitas idas e vindas para a USP, almoços e jantares, momentos bons e ruins. Sinto sua falta e do George todos os dias aqui em São Paulo, estarei te aplaudindo de pé na sua defesa, sei o quanto trabalhou! Nos aguardem em muitas visitas em Aracaju.

À minha afilhada Thaysa, e minha amiga/irmã Bruna que sempre se mostraram preocupadas com o andamento da minha tese e que tenho um carinho enorme.

Aos meus amigos de graduação da FOU SP, Carla, Julia, Laura e Leandro, meus queridos.

À minha família Soares de Azevedo, pelo carinho e torcida.

A todos que de forma direta e indireta contribuíram para a execução desse trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

A direção da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, na pessoa do Diretor Prof. Dr. Waldyr Antônio Jorge.

A Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia e à Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Dentística da FOUSP na pessoa da Profª Drª Márcia Martins Marques.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de Doutorado (2012/15089-4) e Auxílio Pesquisa (2012/15141-6).

*“Ele te cobrirá com as suas pernas,
e debaixo das suas asas te confiarás;
a sua verdade será o teu escudo e broquel”.*

Salmo 91 – Bíblia Sagrada

RESUMO

Azevedo CS. Avaliação do tratamento de superfície com laser de Er:YAG de pulso super curto sobre a adesão em dentina hígida e afetada por cárie: estudo longitudinal, [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Este estudo longitudinal investigou a influência de tratamentos de superfície com o laser de Er:YAG com 50 μ s de largura de pulso sobre a adesão de dois sistemas adesivos autocondicionantes (SA) em dentina hígida (DH) e dentina afetada por cárie (DAC) através dos teste de resistência de união (RU) de microcisalhamento (μ SBS), teste de ultramicrodureza da camada de adesivo (NdA) e da camada híbrida (NdCH), além de análise da interface adesiva com microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise qualitativa dos tratamentos de superfície realizados foi executada através de MEV e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A dentina oclusal planificada de 215 molares humanos foi protegida com verniz ácido resistente, exceto em janela de 4x5mm para produção de DAC artificial após 7 dias de desafio cariogênico com biofilme de *S. mutans*, permitindo dados pareados por substrato. Os espécimes foram divididos nos grupos experimentais de acordo com: tratamento de superfície [controle-sem tratamento-(G1); Laser 80-80mJ, 2 Hz, 12.58J/cm²-(G2); Laser 50-50mJ, 10 Hz, 9.4J/cm²-(G3)]; sistema adesivo [Clearfil SE Bond(CF) e Single Bond Universal(SB)]; substrato [DH(h) ou DAC(a)] e tempo de armazenamento em saliva artificial [24 horas (24) ou 1 ano (1)], compondo 24 grupos experimentais: CFG1h24; CFG1h1; CFG1a24; CFG1a1; CFG2h24; CFG2h1; CFG2a24; CFG2a1; CFG3h24; CFG3h1; CFG3a24; CFG3a1; SBG1h24; SBG1h1; SBG1a24; SBG1a1; SBG2h24; SBG2h1; SBG2a24; SBG2a1; SBG3h24; SBG3h1; SBG3a24; SBG3a1. Nos grupos tratados com laser a largura temporal de pulso foi ajustada em 50 μ s. A resina composta Z350XT foi utilizada para a confecção dos corpos de prova. Os sistemas adesivos foram aplicados de acordo com as instruções do fabricante. As análises de MEV e MET de superfície avaliaram somente o efeito dos tratamentos em ambos os substratos testados. Os valores de RU e de nanodureza foram analisados através do teste de ANOVA (três fatores) e do teste de comparações múltiplas de Tukey ($\alpha=0,05$). Para o teste de μ SBS, para

ambos os SA, e todos tratamentos de superfície, a DAC apresentou valores de RU menores comparados à DH; a influência do armazenamento em saliva artificial foi substrato dependente: corpos de prova obtidos com DAC apresentaram queda nos valores de RU após 1 ano de armazenamento, enquanto nenhuma diferença entre os grupos experimentais foi observada em dentina hígida. NdA revelou que apenas os corpos de prova construídos com CF apresentaram redução dos valores após 1 ano. A NdCH obtida com CF e SB, resultou em menores valores em DAC comparada à DH, após 1 ano de armazenamento ambos os substratos apresentaram redução da NdCH, para todos tratamentos de superfície. A MEV revelou que todas as interfaces adesivas, especialmente aquelas obtidas em DAC, sofreram degradação intensa após 1 ano. Os tratamentos com Laser 80 e Laser 50 promovem alteração superficial característica de ablação em DAC e DH, conforme observado em MEV de superfície, e alterações de fibrilas colágenas observadas em MET. Independentemente dos SA, a adesão e nanodureza em DAC é menor que em DH. Todas as interfaces adesivas obtidas foram sensíveis ao armazenamento em saliva artificial por 1 ano. A adesão não foi influenciada pelo tratamento com o laser Er:YAG com 50 μ s de largura de pulso.

Palavras-chave: Dentina. Dentina afetada por cárie. Laser de Er:YAG. Adesão. Resistência de união. Teste de dureza. Microscopia eletrônica de varredura. Microscopia eletrônica de transmissão.

ABSTRACT

Azevedo CS Evaluation of Super Short Pulse Er:YAG laser treatment on adhesion of sound and caries affected dentin: longitudinal study, [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

This longitudinal study investigated the influence of super short pulse Er:YAG laser treatment on microshear bond strength (μ SBS), adhesive and hybrid layer nanohardness test and qualitative interface scanning electron microscopy (SEM) of two self-etch adhesive systems to sound (SD) and caries-affected like dentin (CAD). Additionally, qualitative investigation of surface treatments by SEM and transmission electron microscopy (TEM) were performed. CAD lesions (4x5mm) were produced by 7 days *S. mutans* biofilm cariogenic challenge in 215 human ground flat human dentin specimens, enabling paired data by substrate. Specimen were divided in groups according to surface treatment [control-no treatment-(G1); Laser 80-80mJ, 2Hz, 12.58J/cm²-(G2); Laser 50-50mJ, 10Hz, 9.4J/cm²-(G3)]; self-etching adhesive system [Clearfil SE Bond(CF) and Single Bond Universal(SB)]; substrate [SD(h) or CAD(a)] and artificial saliva storage [24 hours(24) or 1 year(1)]: CFG1h24; CFG1h1; CFG1a24; CFG1a1; CFG2h24; CFG2h1; CFG2a24; CFG2a1; CFG3h24; CFG3h1; CFG3a24; CFG3a1; SBG1h24; SBG1h1; SBG1a24; SBG1a1; SBG2h24; SBG2h1; SBG2a24; SBG2a1; SBG3h24; SBG3h1; SBG3a24; SBG3a1. Pulse duration was set in 50 μ s for laser groups. μ SBS, nanohardness and interface SEM specimen preparation was constructed with Z350XT composite resin. Adhesive systems were applied according to manufacturer's instructions. Surface SEM and TEM specimen only evaluated treatment effects on distinct substrates. The μ SBS and nanohardness means were analysed using three-way ANOVA and Tukey's multiples comparisons test ($\alpha=0.05$). For μ SBS test, for both adhesive systems, and all surface treatments, CAD revealed lower μ SBS values compared to SD; the influence of artificial saliva storage was substrate dependent. CAD specimens resulted in lower μ SBS values after 1 year, while no difference among experimental groups was observed in SD. The adhesive layer (AL) nanohardness statistical evaluation revealed that only CF specimens decreased the AL nanohardness after 1 year of storage. The hybrid layer (HL) produced with CF and SB, resulted in lower nanohardness values for CAD than

SD, which reduces after 1 year storage, for all surface treatments. Interface SEM analysis revealed that all adhesive interfaces, especially those in CAD, have experienced degradation after 1 year of storage. Laser 80 and Laser 50 promotes surface ablation characteristics in CAD and SD, as noted in surface SEM and collagen fibrils alterations observed in TEM. Despite of adhesive systems, bonding and nanohardness to CAD is lower than to SD. All tested adhesive interfaces were sensitive to saliva storage. Surface treatment with 50 μ s Er:YAG laser did not influence on bonding.

Keywords: Dentin. Caries affected dentin. Er:YAG laser. Adhesion. Bond Strength. Hardness test. Scanning electron microcopy. Transmission electron microscopy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
3 PROPOSIÇÃO	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
5 RESULTADOS.....	44
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXOS	103

1 INTRODUÇÃO

O conceito de mínima intervenção na Odontologia preconiza tratamento das lesões de cárie, com eliminação apenas do tecido infectado e irreversivelmente desmineralizado, com manutenção da dentina afetada por cárie nas paredes cavitárias de fundo. Este tecido é desmineralizado, porém passível de remineralização, quando em condições adequadas.

Nesta circunstância, o correto vedamento da restauração na cavidade é de fundamental importância, pois possibilitará a interrupção do desafio desmineralizante, com consequente remineralização da dentina afetada, prevenindo remoção excessiva de tecidos duros do dente quando da reabertura das cavidades e geração de calor com maior tempo clínico. Contudo, a literatura mostra que adesão à dentina afetada por cárie é reduzida (Arrais et al., 2004; Pereira et al., 2006; Wang et al., 2006; Ergucu et al., 2009; Komori et al., 2009; Mobarak et al., 2010a; Mobarak et al., 2010b; Scholtanus et al., 2010; Mobarak e El-Badrawy 2011; Alves et al., 2013; Lenzi et al., 2015; Peixoto et al., 2015). Assim, torna-se fundamental que novas estratégias sejam propostas para modificar este cenário.

Antes disso, alguns paradigmas precisam ser rompidos, entre eles: profissionais não devem remover todo o tecido amolecido das cavidades antes de realizar as restaurações; e devem aplicar adesivos sobre substrato desmineralizado. Pergunta-se, portanto, como estes materiais interagem com um tecido desmineralizado? Qual a durabilidade das camadas híbridas formadas nestas circunstâncias?

Torna-se fundamental pensar em procedimentos que possam modificar a dentina afetada por cárie sem removê-la, de forma que sistemas adesivos possam interagir com este tecido de maneira semelhante à que ocorre com os tecidos hígidos circundantes presentes nas demais paredes cavitárias. O desenvolvimento de novos materiais, com princípios ativos diferentes, que funcionem com outra lógica, agora em dentina amolecida passível de remineralização; bem como, o uso de novas tecnologias sobre estes tecidos poderia modificar este cenário?

Neste contexto, os sistemas adesivos autocondicionantes universais possuem papel de destaque, tendo sido constantemente aperfeiçoados. Os profissionais apreciam sua praticidade de uso, pois possuem ampla gama de indicações clínicas

e menor sensibilidade técnica, uma vez que dispensam a utilização da técnica de adesão úmida (Jiang et al., 2013). Porém, quando se trata de adesivos recém inseridos no mercado, há escassez de pesquisas que atestem sobre seu desempenho. Sabe-se que dados provenientes de ensaios clínicos randomizados podem afirmar categoricamente como estes adesivos se comportam em meio bucal, mas estes ensaios possuem longo tempo de duração. Assim, acredita-se que quando ensaios longitudinais em substratos clinicamente relevantes são realizados, fortes indícios do seu efeito podem ser detectados.

No que se refere ao uso de tecnologia como estratégia para modificar a dentina afetada por cárie, o laser precisa ter seu potencial explorado na interrupção deste processo e melhoria na qualidade da adesão.

Descrito como seguro e efetivo na remoção dos tecidos duros dentais através da ablação termomecânica, o laser de Er:YAG (Erbium:yttrium-aluminium-garnet) é indicado também para realizar tratamento prévio das superfícies dentais previamente aos procedimentos adesivos. Além disso, a utilização desse aparelho é bem aceita pelos pacientes uma vez que gera ruídos minimizados modificados, ausência de pressão e vibração, podendo em alguns casos, não necessitar de anestesia local, características interessantes e diferenciais dos métodos convencionais.

O uso do laser de Er:YAG para o tratamento da dentina produz uma superfície com menor contagem bacteriana, o que poderia se expressar como uma vantagem adicional quando a dentina afetada é irradiada, uma vez que este tecido possui algumas bactérias no seu interior.

Além disso, quando a dentina é irradiada com laser de Er:YAG, a ablação dos tecidos gera uma superfície com túbulos dentinários abertos, teoricamente, favorável a adesão. Será que a mesma característica morfológica pode ser observada quando a dentina afetada por cárie é irradiada? Seria este laser capaz de promover modificações na dentina afetada tornando-a mais receptiva a ação dos sistemas adesivos, sem causar aumento de temperatura?

Alguns equipamentos de laser de Er:YAG permitem a regulação da largura temporal de pulso, parâmetro diretamente relacionado com os efeitos termomecânicos gerados durante a irradiação. Pulsos super curtos (50µs) alcançam uma energia mais rápida, diminuindo o tempo efetivo de irradiação e gerando menos

calor. A energia emitida é totalmente transferida para o tecido minimizando a instalação de calor residual, como ocorre com pulsos longos.

Dessa forma, este trabalho longitudinal se propôs a investigar a adesão de dois sistemas autocondicionantes, utilizados em dentina hígida e dentina afetada por cárie produzida artificialmente, tratadas previamente ou não com o laser de Er:YAG com largura temporal de pulso ajustada em 50 μ s (pulso super curto).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Com avanços no conhecimento na área de Cariologia, a Odontologia moderna preconiza uma nova abordagem no tratamento da cárie, com enfoque em programas de prevenção. No entanto, quando ações preventivas são insuficientes e há perda de estrutura dental com lesões cavitadas, procedimentos restauradores são necessários (Sattabanasuk et al., 2005), com máxima preservação da estrutura dental através da utilização de técnica minimamente invasiva (Melo et al., 2015), que surgiu através do desenvolvimento dos materiais restauradores adesivos.

Para que essa técnica fosse desenvolvida, o conhecimento estrutural de uma lesão de cárie ativa teve que ser aprofundado. Autores em 1972 (Fusayama e Terachima 1972) foram os pioneiros no estudo e na diferenciação em duas camadas da dentina cariada. Posteriormente, novos estudos propiciaram uma subdivisão mais contemporânea do tecido cariado: zona de camada turva ou descolorida, zona translúcida e subtranslúcida. É na zona de descoloração que situa-se a dentina cariada externa, infectada, não remineralizável, necrótica e desvitalizada, ou seja, a dentina infectada, que apresenta características clínicas de descoloração amarelo-acastanhada de tecido amolecido devido à degradação colágena. A zona translúcida ocupa a maior parte do tecido e é nesta região que encontra-se a dentina cariada interna não infectada, remineralizável, viva e sensível, também denominada dentina afetada por cárie. Abaixo da zona translúcida está a zona subtranslúcida, próxima da dentina sadia, onde podem ser encontrados depósitos ácido-resistentes de minerais ocluindo os túbulos dentinários, o que caracteriza uma reação do órgão dentinopulpar frente à ação bacteriana (Fejerskov e Kidd 2011).

Frente ao exposto, a filosofia da mínima intervenção na odontologia restauradora propõe que o tecido cariado seja parcialmente removido, ou seja, somente a dentina infectada por cárie, que é danificada irreversivelmente, deve ser removida (Fejerskov e Kidd 2011). A dentina afetada por cárie, se presente, deve ser mantida no assoalho da cavidade, mesmo com sua redução de conteúdo mineral (Nakajima et al., 2005), e quando a cavidade for bem selada, permitirá que a dentina afetada se remineralize e endureça, uma vez que há uma degradação colágena limitada no tecido (Bjorndal e Kidd 2005). Desta forma, o sucesso do tratamento minimamente invasivo se dá pela habilidade do material restaurador em promover

um selamento apropriado da dentina, mantendo-o intacto e aderido à superfície dental ao longo do tempo (Samad-Zadeh et al., 2011).

Analizando a literatura referente a adesão em dentina, mesmo com o conceito claro da mínima intervenção já instalado, pesquisadores ainda realizam estudos de durabilidade e qualidade da adesão em substrato hígido (Erhardt et al., 2008a), no entanto, os Cirurgiões-Dentistas geralmente realizam suas restaurações adesivas em substratos dentinários alterados, como a dentina afetada por cárie.

Assim, por ser considerado um substrato de estudo com alta relevância clínica, estudos de adesão, que utilizam adesivo dentinário e resina composta como material restaurador, em dentina afetada, já vêm sendo realizados e demonstraram menor resistência de união quando comparados à adesão em dentina hígida (Arrais et al., 2004; Pereira et al., 2006; Wang et al., 2006; Ergucu et al., 2009; Komori et al., 2009; Mobarak et al., 2010a; Mobarak et al., 2010b; Scholtanus et al., 2010; Mobarak e El-Badrawy 2011; Alves et al., 2013; Peixoto et al., 2015).

Os resultados encontrados podem ser justificados pois a redução de cálcio, fosfato e magnésio no conteúdo mineral causado pela desmineralização do processo de cárie torna a dentina afetada hipomineralizada, mais porosa e com propriedades mecânicas menos favoráveis (Marshall et al., 2001). Essas propriedades mecânicas puderam ser observadas através do ensaio de nanodureza, teste que permite a análise das propriedades e comportamento de pequenos volumes de tecido (Marshall et al., 2001), comprovando que a dentina afetada por cárie tem valores de nanodureza significativamente menores comparados à dentina hígida (Inoue et al., 2006).

Durante a progressão da cárie, a dissolução da fase mineral da dentina leva a exposição de parte da matriz orgânica que pode então ser degradada por enzimas bacterianas e enzimas proteolíticas próprias da dentina, as denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs) (Pashley et al., 2004; Carrilho et al., 2007a; Carrilho et al., 2007b). A ação das MMPs é amplamente estudada na Odontologia, e fato interessante foi encontrado quando se observou maior abundância dessas enzimas em dentina afetada por cárie, apesar de também serem encontradas em dentina hígida (Vidal et al., 2014).

A presença de fibrilas colágenas parcialmente alteradas e expostas podem resultar em uma camada híbrida inconsistente (Hsu et al., 2008), uma vez que a profundidade de desmineralização da dentina exposta ao processo carioso é maior

do que a infiltração do monômero resinoso, assim ocorre uma infiltração incompleta do sistema adesivo (Sattabanasuk et al., 2005). Desta forma, a durabilidade da interface adesiva obtida em dentina afetada por cárie é mais susceptível à degradação ocasionada pela água em função do tempo (Erhardt et al., 2008b), muito provavelmente também pela maior disponibilidade das MMPs. No entanto, vale ressaltar nesse momento que a dentina hígida também sofre o processo de degradação descrito anteriormente, devido também à incompleta incorporação do adesivo na trama colágena exposta (Breschi et al., 2008; Breschi et al., 2010). Desta forma, a produção de uma adesão satisfatória dentina-resina continua sendo um desafio.

Neste sentido, entendemos que esforços devem ser empreendidos para aumentar a resistência de união de materiais adesivos tanto em dentina hígida como em dentina afetada por cárie, para o emprego da filosofia de mínima intervenção. Como a durabilidade da adesão é um fator crítico para a determinação do sucesso das restaurações em resina composta (Altunsoy et al., 2014), sabe-se que a resistência de união dos materiais restauradores resinosos é afetada por diversos fatores como o tipo de sistema adesivo e o método de preparo e tratamento da cavidade (Bakry et al., 2009; da Silva et al., 2011; Ali et al., 2013).

O mecanismo de adesão dos sistemas adesivos envolve basicamente a reposição dos minerais removidos do tecido dental duro por monômeros resinosos, de tal forma que este polímero fique micro mecanicamente interligado ao substrato dental (Nakabayashi et al., 1982).

Os sistemas adesivos presentes no mercado odontológico podem ser classificados em Condicione e Lave ou Autocondicionante. Na tentativa de sanar as dificuldades encontradas no sistema Condicione e Lave em dentina (Armstrong et al., 2003), o sistema Autocondicionante foi desenvolvido. Este sistema não apresenta a aplicação de condicionamento ácido prévio, desta forma, a desmineralização do substrato e a ação do *primer* ocorrem simultaneamente (Ikeda et al., 2005). A hidroxiapatita dissolvida e a camada de esfregaço residual são incorporadas à camada híbrida, e toda a extensão da dentina desmineralizada é impregnada pelos monômeros resinosos. Desta forma, a Odontologia Restauradora contemporânea considera que a utilização de Sistemas Adesivos autocondicionantes em dentina são menos sensíveis à técnica em relação aos Condicione e Lave pois sua aplicação independe do grau de umidade da dentina e

diminui a responsabilidade do operador quanto a aplicação do sistema adesivo (Jiang et al., 2013; Hamama et al., 2014).

Os sistemas adesivos autocondicionantes são subdivididos em duas categorias, de acordo com o número de passos operatórios: de dois passos ou de passo único.

No sistema de dois passos o *primer* hidrofílico (primeiro passo), apresenta-se associado ao ácido, no caso ésteres fosfatados que são adicionados aos grupamentos carboxílicos dos monômeros resinosos, possibilitando a desmineralização da estrutura dental e infiltração dos componentes na dentina, uma vez que é um material com fluidez suficiente e responsável pela formação da camada híbrida. O segundo passo apresenta-se como o *bond* hidrofóbico, que nada mais é que uma resina de baixa viscosidade aplicada posteriormente ao primer ácido.

Apesar de os sistemas autocondicionantes de dois passos já permitirem a realização de uma técnica menos sensível, e apresentarem resultados satisfatórios na literatura (Toledano et al., 2007; Feitosa et al., 2012), um grande esforço tem sido direcionado para a simplificação dos procedimentos adesivos. Recentemente, adesivos de “passo único” foram criados, em que todos os componentes, como o ácido, primer e bond apresentam –se em uma só solução, sendo assim, teoricamente, condicionam e infiltram a dentina simultaneamente (Van Meerbeek et al., 2011).

Geralmente, os estudos que testaram os dois diferentes tipos sistemas adesivos autocondicionantes mostram que o sistema de dois passos apresenta valores de resistência de união maiores em comparação aos sistemas de passo único (Yoshida et al., 2012; Munoz et al., 2013). Tal fato se justifica pela presença de água nos adesivos de passo único, uma vez que ela é necessária para dissociar os metacrilatos ácidos e permite que o adesivo permeie a camada de esfregaço e a dentina mineralizada subjacente (Van Meerbeek et al., 2003). Assim, a natureza intrínseca hidrofílica destes adesivos de passo único leva a degradação hidrolítica, (Breschi et al., 2008) polimerização insuficiente (Cadenaro et al., 2005) e a separação de fases (Ye et al., 2008), características que tornam a camada desses adesivos semi-permeável (Tay et al., 2004). No entanto, a simplificação dos passos operatórios, tempo de aplicação menor e técnica ainda menos sensível são características muito atraentes (Jiang et al., 2013), o que faz com que sejam

desenvolvidos constantemente novos materiais que visam melhorar os valores de resistência de união e a durabilidade destes sistemas adesivos de passo único.

A fim de contornar as desvantagens citadas a respeito dos sistemas de passo único, sistemas adesivos denominados universais, ou multimodo, foram recentemente lançados (Hanabusa et al., 2012; Perdigao et al., 2012).

Os sistemas adesivos universais são semelhantes aos autocondicionantes de passo único, mas podem ser aplicados nas estratégias condicione e lave ou autocondicionante (Perdigao et al., 2014a), ou seja, com ou sem condicionamento ácido prévio dos substratos dentais, no entanto, o fabricante sugere que o condicionamento ácido prévio deve ser realizado seletivamente em esmalte, mantendo a técnica autocondicionante em dentina (Luque-Martinez et al., 2014).

Vale ressaltar que pouco foi explorado quanto ao conceito desse tipo de sistema adesivo, e a literatura carece tanto de estudos clínicos como laboratoriais longitudinais (Mena-Serrano et al., 2013; Perdigao et al., 2014b). Ressalta-se que a maioria dos trabalhos fizeram análises em 24 horas (Hanabusa et al., 2012; Perdigao et al., 2012; Munoz et al., 2013; Luque-Martinez et al., 2014). Além disso, somente um artigo publicado utilizou substratos clinicamente relevantes, como a dentina afetada por cárie (Lenzi et al., 2015), fato que expõe a necessidade e utilidade da condução de estudos que comprovem, ou não, a eficácia destes novos sistemas adesivos em condições de diferentes tipos de substratos.

Os sistemas adesivos disponíveis no mercado foram desenvolvidos primeiramente para utilização em cavidades preparadas com instrumentos rotatórios convencionais, que produzem a conhecida camada de esfregaço na cavidade. O desenvolvimento de novos métodos de preparo requerem avaliação da eficiência destes adesivos nas novas superfícies produzidas (Baraba et al., 2013b).

Assim, para a remoção de tecido infectado e tratamento do tecido afetado, além da utilização de instrumentos rotatórios convencionais, outras opções estão disponíveis, tais como: microabrasão a ar (Hegde e Khatavkar 2010), uso de ultrassom (Yazici et al., 2012) e irradiação com laser de Érbio (Raucci-Neto et al., 2010; Jacobsen et al., 2011; Bohari et al., 2012; Raucci-Neto et al., 2012), sendo a última uma tecnologia promissora e atualmente bastante estudada.

A palavra laser é originada do inglês, Light Amplification by Stimulate Emission of Radiation (amplificação da luz por emissão estimulada da radiação), e dentre os diversos tipos de lasers existentes, o laser de Er: YAG é um dos mais

recomendados para ser utilizado no tecido dental duro, que é classificado como um laser de meio ativo sólido, onde os átomos excitados são introduzidos em uma matriz de cristal, neste caso, a granada.

Este laser possui comprimento de onda de 2.94 μ m, que coincide com a banda de absorção da água (principalmente), colágeno e hidroxiapatita, componentes amplamente encontrados na dentina. A interação entre o laser de Er:YAG e o tecido depende das características da radiação incidente, das propriedades ópticas e composição do tecido irradiado (Esteves-Oliveira et al., 2007). A maioria dos pesquisadores concorda que esta alta eficiência de ablação em dentina resulta de microexplosões da água sobreaquecida do tecido, em que a radiação é predominantemente absorvida (Hibst e Keller 1989). O acúmulo de pressão resultante excede a resistência mecânica do tecido, e a rede de suporte da fibra é dilacerada. Na ablação dos tecidos duros dentais, fragmentos relativamente grandes do componente sólido de tecido inorgânico são ejetados do local de interação (Peiz et al., 1994).

A utilização dos lasers de Er:YAG propicia a realização do procedimento operatório sem pressão, calor, vibração e o barulho associado ao método convencional (Keller et al., 1998; Bahrami et al., 2011), sendo estes os incômodos mais comuns relatados pelos pacientes a respeito da técnica com instrumentos rotatórios convencionais. Com parâmetros específicos pode-se remover tecido duro dental realizando preparos cavitários, bem como apresentar uma seletividade relativa na remoção do tecido cariado, promover redução microbiana e realizar o tratamento da superfície dental. Sabe-se que o laser de Er:YAG age diferentemente em dentina hígida e cariada, sendo que no segundo, a ablação gerada por este laser é maior devido ao aumento do conteúdo de água (Raucci-Neto et al., 2007). A ação dos lasers de alta potência em dentina afetada por cárie é pouco estudada, desta forma, torna-se fundamental estudar a interação deste tecido irradiado com sistemas adesivos (Tachibana et al., 2008; Koyuturk et al., 2014).

Estudos que avaliam a ação dos lasers de Er:YAG na dentina hígida mostram uma dentina irregular, sem a presença de *smear layer*, com túbulos dentinários abertos e dentina peritubular proeminente (Aranha et al., 2007; Esteves-Oliveira et al., 2007), com um padrão morfológico micro retentivo supostamente favorável aos procedimentos adesivos. No entanto, estudos de adesão realizados sobre substrato dental irradiado são bastante controversos (Kameyama et al., 2009; Ramos et al.,

2010). Enquanto alguns autores observaram valores de resistência de união mais altos (Visuri et al., 1996; Bertrand et al., 2008; Chousterman et al., 2010; Ferreira et al., 2010; Shahabi et al., 2012; de Oliveira et al., 2013) ou iguais (Celik et al., 2006; Staninec et al., 2006; Amaral et al., 2008; Akin et al., 2012) aos valores obtidos pelos métodos convencionais, outros (Ceballo et al., 2002; Ishizaka et al., 2002; Sassi et al., 2004; Barceleiro et al., 2011; Ramos et al., 2013) observam menores valores de resistência de união. Essa grande variabilidade nos resultados pode ser justificada pela grande gama de parâmetros utilizados e também pelos diferentes tipos de sistemas adesivos testados (Lopes et al., 2015), dificultando uma análise comparativa e mostrando não haver ainda um parâmetro considerado ideal que interaja de forma satisfatória com os sistemas adesivos disponíveis.

A maioria dos trabalhos que utilizam lasers para preparo cavitário e consequente remoção de tecido utiliza parâmetros muito altos que promovem remoção excessiva de tecido, o que não condiz com a filosofia da mínima intervenção (Akin et al., 2012; Koliniotou-Koumpia et al., 2012; Shahabi et al., 2012).

A literatura que mostrou resultados negativos para a utilização do laser de Er:YAG, justifica que, dependendo dos parâmetros de irradiação utilizados, os efeitos termomecânicos do laser, mesmo com irrigação, podem ocasionar a desnaturação das fibrilas colágenas na dentina sub superficial, formar uma superfície ácido-resistente com estruturas granulares, carbonizada ou coberta com produtos de derretimento da dentina, prejudicando a infiltração do sistema adesivo, a formação da camada híbrida e a resistência adesiva (Ceballo et al., 2002; De Moor e Delme 2010). Estas alterações de temperatura podem estar relacionadas ao calor residual acumulado no interior dos tecidos irradiados, fato diretamente relacionado à largura temporal de pulso empregada no aparelho (Fried et al., 2001).

Desta forma, com base na filosofia da Odontologia Restauradora moderna, esforços estão sendo empreendidos para melhorar a qualidade da adesão principalmente em dentina, surgindo assim, a possibilidade da utilização dos lasers de Er:YAG com parâmetros menores aos utilizados anteriormente, gerando assim, somente, um tratamento da superfície. Este tratamento se refere a modificação da estrutura dental, clínica e microscopicamente, através da irradiação de baixa fluência, na expectativa de obter um substrato mais receptivo aos procedimentos adesivos e melhorando a durabilidade das restaurações.

Com a evolução e maior conhecimento da ação dos lasers de Er:YAG na superfície dentinária e com a busca de melhores resultados com a utilização dessa tecnologia, aparelhos surgiram com características interessantes e promissoras, possibilitando a avaliação de diferentes parâmetros de irradiação e sua ação no substrato dentinário. Alguns equipamentos de laser de Er:YAG permitem o ajuste dos diferentes parâmetros disponíveis, tais como a energia por pulso (mJ), frequência pulsante (Hz), proporção e temperatura água e ar, apresentando largura de pulso na faixa de 150 e 250 μ s.

Outras versões desses aparelhos são capazes de promover larguras temporais de pulso muito menores que os anteriores, denominados pulsos super curtos (SSP). Como a energia a ser alcançada é obtida de forma mais rápida, o tempo efetivo de irradiação é diminuído (50 μ s), com consequente menor geração de calor (Bahrami et al., 2011). Menores larguras de pulso são mais eficientes no processo de ablação, porque a energia emitida é totalmente transferida para o tecido não havendo perda condutora de calor por meio da interação com o tecido, como ocorre com pulsos longos (Majaron et al., 1998; Staninec et al., 2006). Consequentemente, ocorre menor produção de calor, redução de microfissuras e maior rugosidade superficial, provavelmente favorecendo a adesão dos materiais restauradores à superfície irradiada (Bahrami et al., 2011; Lukac et al., 2012). Essas características são bastante atrativas quando objetiva-se utilizar este equipamento para o tratamento da superfície dentinária previamente a procedimentos adesivos.

Por se tratar de uma tecnologia relativamente nova, poucos estudos observados na literatura relatam a utilização de lasers de Er:YAG com SSP (Bahrami et al., 2011; Firat et al., 2012; Baraba et al., 2013a; Trevelin et al., 2015). O trabalho desenvolvido por Bahrami et al. (2011) utilizaram diferentes parâmetros de tratamento da dentina hígida com largura temporal de pulso de 50 μ s e com variação de energia de 80 a 120 mJ. Para os autores, o fato de o laser utilizado não permitir diminuição ainda maior da energia foi um fator limitante e que deve ser avaliado em estudos posteriores, uma vez que o melhor resultado de resistência de união foi obtido quando utilizado 80mJ. Já Firat et al. (2012) utilizaram diferentes durações de pulso tanto em esmalte (120mJ/10Hz) como em dentina (80mJ/10Hz) (hígida) para avaliação da resistência adesiva. Os autores concluíram que a largura temporal de pulso tem relação direta com a ablação ocasionada pelo laser e a morfologia superficial. Não foi identificado na literatura a utilização de laser de Er:YAG com

largura temporal de pulso super curta em dentina afetada por cárie, e nem estudos longitudinais.

Faz-se necessário apontar que grande parte dos artigos sobre adesão com lasers de Er:YAG convencionais relatam o uso de dentina hígida. Observou-se na literatura consultada três trabalhos onde foi utilizada dentina afetada por cárie (Sattabanasuk et al., 2006; Tachibana et al., 2008; Koyuturk et al., 2014), no entanto, em um parâmetro muito alto, com excessiva remoção de tecido, não objetivando o tratamento da superfície. Acredita-se atualmente que a dentina afetada por cárie remanescente deva apenas ser tratada e não removida, utilizando parâmetros mais baixos associados a largura temporal de pulso menor, possibilitando a ocorrência de redução microbiana e promoção de uma superfície mais propícia para o recebimento do material restaurador adesivo. Além disso, como exposto anteriormente, os sistemas adesivos utilizados na Odontologia estão em constante mudança e evolução, sendo necessário seu estudo e avaliação para garantir sua aplicabilidade clínica. Por ser uma promissora alternativa para o uso no tratamento da dentina, pouquíssima informação já foi publicada quando a irradiação do laser de Er:YAG é associada a sistemas adesivos mais modernos, como os autocondicionantes de passo único ou universais após procedimentos de envelhecimento para avaliação longitudinal (Akin et al., 2012).

Testes de resistência de união são bastante difundidos na literatura, uma vez que são metodologias relativamente fáceis de serem executadas e que fornecem resultados rápidos (Heintze e Zimmerli 2011). O teste de microcissalhamento se encaixa nesse grupo de testes, ele se baseia na confecção de pequenos corpos de prova no formato de microtubos, em que a análise da interface adesiva pode ser executada. A sua vantagem é a possibilidade de se realizar diversos corpos de prova em um único espécime, e além disso possibilitar a confecção deles exatamente nas regiões de interesse (Sano et al., 1994; Otani et al., 2015). Outra forma viável para análise da interface adesiva é a técnica de nanoindentação que, ao contrário do ensaio de microdureza convencional que se baseia diretamente na informação visual, o ensaio de nanoindentação utiliza uma curva de deslocamento de carga para calcular as propriedades mecânicas de um determinado material (Oliver e Pharr 1992; Mahoney et al., 2000). Uma vez que utiliza cargas baixas equivalente a Milli - Newtons (mN), este ensaio permite a avaliação das propriedades mecânicas

em regiões extremamente finas , tais como a interface dente – restauração (Abe et al., 2015), assim como a camada de adesivo e camada híbrida.

Assim, estudos que avaliem longitudinalmente, através de diferentes metodologias, a utilização do laser de Er:YAG com uma largura temporal de pulso reduzida (SSP) em substratos clinicamente relevantes, como dentina hígida e afetada por cárie, associados a sistemas adesivos indicados para este caso, como os consagrados autocondicionantes de dois passos ou os novos de um passo, devem ser realizados.

3 PROPOSIÇÃO

Neste trabalho pretendeu-se investigar o efeito longitudinal de diferentes tratamentos de superfície com o laser de Er:YAG com 50µs de largura de pulso sobre a adesão de dois sistemas adesivos autocondicionantes em dentina hígida e afetada por cárie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Atendimento às normas de bioética

Todos os elementos dentais utilizados no experimento proposto foram doados pelo Banco de Dentes Humanos da FOU SP, com consentimento do Comitê de Ética da FOU SP (Parecer 252.625) (Anexo A).

4.2 Seleção dos dentes e preparo da amostra

Molares hígidos humanos foram examinados com lupa para detectar defeitos de esmalte e/ou lesões de cárie, sendo que a presença destes determinou a exclusão do elemento da amostra. Os 215 dentes selecionados foram limpos com curetas periodontais e taça de borracha com pasta de pedra pomes-água e estocados em solução supersaturada de timol a 0,1% (Gilmour et al., 1990), em período máximo de 3 meses, à temperatura de 4°C até o momento do uso.

Em seguida, a porção radicular dos 215 elementos dentais foi removida com auxílio de disco diamantado de aço em baixa rotação e sob refrigeração. Para obtenção de discos de dentina com superfície oclusal plana, cada coroa foi então lixada com lixas de carbeto de silício (Buehler Ltd., Lake Buff, IL, EUA) de granulação decrescente #180, #320 e #400, com refrigeração abundante à água em politriz (Ecomet 3 machine, Buehler Ltd., Lake Bluff, EUA), acionada em baixa velocidade (100 RPM). Para impedir que os grãos das primeiras lixas interferissem na qualidade do desgaste, entre cada lixa, os espécimes foram levados a um aparelho de ultrassom, com água destilada por 5 minutos. Por fim, uma camada de esfregaço padronizada foi criada utilizando-se lixa de granulação #600 por 60 segundos.

4.3 Preparo e montagem dos fragmentos dentários para o desafio cariogênico e produção de dentina afetada por cárie

Após preparo da amostra, os espécimes foram totalmente protegidos com verniz ácido resistente, exceto em área delimitada de 4x5mm (determinada com auxílio de paquímetro digital), região em que foi produzida a lesão de cárie (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Superfície planificada de dentina oclusal protegida com verniz ácido resistente exceto em área delimitada de 4x5mm, região onde foi produzida artificialmente a dentina afetada por cárie.

Os fragmentos foram presos com fios de aço e resina acrílica de forma que a face oclusal ficasse livre. Desta forma, as estruturas denominadas “árvores” permitiram que todos os espécimes ficassem fixados à tampa dos recipientes de vidro e submersos no mesmo meio de cultura, numa altura similar, sem que entrassem em contato uns com os outros ou com a parede do recipiente.

As “árvores” ficaram presas nos recipientes de vidro que foram utilizados durante o desafio cariogênico, imersas em 200 ml de solução de timol para posterior esterilização.

4.4 Esterilização dos espécimes

No modelo experimental bacteriano, para a formação de lesões de cárie *in vitro*, é necessário que todos os espécimes estejam livres de contaminação. Os recipientes contendo as “árvores” foram embalados em envelopes para autoclave e todo este conjunto foi submetido à radiação gama (dose de 25 kGy), capaz de

esterilizar os espécimes sem prejudicar as propriedades físico-químicas dos tecidos dentais mineralizados sem desidratá-los (Rodrigues et al., 2004).

4.5 Fase microbiológica

Preparo e Armazenamento dos Meios de Cultura - O TSB (Tryptic Soy Broth / Caldo Triptico de Soja), meio de cultura líquido, foi preparado segundo as instruções do fabricante e enriquecido com 5% de sacarose. A esterilização deste meio foi realizada nos próprios recipientes de vidro que receberam as árvores, em autoclave, à temperatura de 119°C por 20min. O TSA (Tryptic Soy Agar / Agar Triptico de Soja), um meio sólido, foi preparado segundo as instruções do fabricante e esterilizado em autoclave a 121°C durante 15min. A seguir, dentro do fluxo laminar, foi transferido para placas de Petri (cerca de 20 ml por placa), que foram mantidas por 24h em temperatura ambiente, a fim de verificar ausência de contaminação durante a manipulação. Após esse período, nenhum crescimento de microorganismos foi verificado nas placas, sendo assim estocadas em geladeira até o momento do uso.

Preparo do Caldo Inoculo - Com o auxílio de uma micropipeta, 100 µl de uma cepa de *S. mutans* com cariogenicidade previamente conhecida (UA159) mantida congelada em glicerol foram transferidos para dois tubos de ensaio contendo 5 ml de TSB enriquecido com 5% de sacarose. Posteriormente, estes tubos foram incubados em estufa bacteriológica por 24h em temperatura de 37°C. Depois de decorrido este período, o crescimento bacteriano foi verificado pela turvação do caldo nos dois tubos e posteriormente o caldo dos dois tubos foi semeado em duas placas contendo TSA por meio da técnica de esgotamento com o auxílio de uma alça plástica estéril e descartável. As placas semeadas foram então incubadas por 48h em estufa de CO₂ criando uma atmosfera de microaerofilia, favorável ao desenvolvimento do *S. mutans*. Este procedimento confirmou que as colônias eram de *S. mutans* e que estavam livres de contaminantes.

Determinação da quantidade de bactéria/ml - Através da turvação do caldo foi possível estimar a quantidade de bactérias presentes em 1ml de caldo inoculo. Isto é realizado através da medição da absorbância em espectrofotômetro no comprimento

de onda de 600nm. O meio de cultura sem o inóculo foi considerado o parâmetro zero (Gama-Teixeira et al., 2007; Espejo et al., 2010; Azevedo et al., 2011). O valor obtido foi de 1,233.

Desafio cariogênico – Ao final deste período e após a certificação de que não houve contaminação, o tubo que apresentou o meio com maior turvação foi escolhido para ser o caldo inóculo. A seguir, 2 ml deste material foi transferido para cada recipiente de vidro contendo 200 ml de TSB, que também receberam as “árvores” previamente esterilizadas. Os espécimes foram inoculados e mantidos em estufa bacteriológica a 37°C por 7 dias (Azevedo et al., 2011; Azevedo et al., 2014). As trocas foram realizadas periodicamente para um novo meio de cultura, transferindo-se também uma alíquota do caldo crescido. Este procedimento foi realizado em fluxo laminar. Durante este período foram realizados testes para verificar a ausência de contaminação. O caldo foi semeado utilizando-se a técnica de esgotamento em uma placa contendo TSA, que permaneceu incubada a 37°C por 48h (Figura 4.2). Finalizado o período de desafio cariogênico, a placa aderida à superfície foi removida cuidadosamente com gaze e os espécimes foram lavados com água deionizada. O verniz presente na metade da face oclusal dos espécimes, que protegeu a dentina hígida (tecido controle), foi removido para início dos métodos de avaliação.

Figura 4.2 – Placa contendo TSA, em que caldo inóculo foi semeado, confirmando ausência de contaminação

4.6 Delineamento experimental e grupos

Neste estudo longitudinal, o tratamento de superfície dos diferentes substratos obtidos foi analisado quantitativamente na sua resistência de união, padrão de

fratura e nanodureza. Análise longitudinal qualitativa foi realizada utilizando MEV de interface adesiva (Tabela 4.1).

Com o intuito de demonstrar o efeito dos diferentes tratamentos sobre a morfologia e a ultraestrutura das superfícies tratadas provenientes dos diferentes substratos obtidos, os ensaios qualitativos de MEV e MET de superfície foram realizados somente após 24 horas de armazenamento (Tabela 4.1).

Assim, 24 grupos experimentais foram montados conforme os fatores de variação (Tabela 4.1), para cada um dos sistemas adesivos testados (sistema autocondicionante de dois passos - Clearfil SE Bond (CF) (Kuraray Medical, Tóquio, Japão) - e sistema autocondicionante de um passo – Single Bond Universal (SB) (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) (Tabela 4.2), não os considerando um fator de variação.

4.7 Parâmetros laser de Er:YAG para tratamento da superfície

Para realizar as irradiações dos espécimes utilizamos o laser Er:YAG (Fidelis 3, Fotona, Slovenia) (Processo FAPESP 2012/15141-6), que possui comprimento de onda de 2940µm, largura do pulso regulável entre 50 e 1000µs, taxa de repetição de 2 a 50 Hz, com potência média de 20 W e diâmetro do spot de 0.9mm. A irradiação foi realizada em diferentes parâmetros, ajustada a largura temporal de pulso em 50µs, conforme Tabela 4.1 e com o auxílio de um translador motorizado de alta precisão (ESP301, Newport Corporation, Irvine, CA, EUA) (Processo FAPESP 2012/15141-6) a fim de evitar irregularidades na irradiação. A energia emitida pelo laser foi verificada por um medidor de potência (Coherent Field Master GS = Deletor LM45; Coherent CA, EUA) a cada três amostras irradiadas. A área irradiada foi padronizada com dimensão de 5x4mm.

Tabela 4.1 - Delineamento experimental para cada tipo de sistema adesivo utilizado

Fatores de Variação	Tratamento de Superfície (Dados independentes) 3 Níveis	- Sem tratamento
		- Laser Er,YAG: 80mJ; 2Hz; 50µs; 12,6J/cm ² - (Laser 80)
		- Laser Er,YAG: 50mJ; 10Hz; 50µs; 9,4J/cm ² - (Laser 50)
	Tipo de Substrato (Dados pareados) 2 níveis	- Dentina Hígida
		- Dentina Afetada por Cárie
	Tempo de armazenamento (Dados pareados) 2 níveis	- 24 Horas
		- Armazenamento em saliva artificial por 1 ano
Unidade Experimental	Dentina oclusal de terceiros molares humanos	
Variável Resposta	<p>1.Avaliação morfológica da superfície de dentina – Microscopia Eletrônica de Varredura (n=5 dentes/grupo)</p> <p>2.Avaliação ultraestrutural da superfície - Microscopia Eletrônica de Transmissão (n=2 dentes/grupo)</p> <p>3.Avaliação morfológica da interface adesiva – Microscopia Eletrônica de Varredura (n=5 dentes/grupo) em 24 horas e 1 ano</p> <p>4.Ensaio de ultramicrodureza (n=10 dentes/grupo) em 24 horas e 1 ano</p> <p>5.Resistência de união por microcisalhamento (n=15 dentes/grupo), em 24 horas e 1 ano, com avaliação do padrão de fratura, em 24 horas e 1 ano</p>	

Tabela 4.2 - Identificação dos Grupos Experimentais para cada sistema adesivo utilizado

Adesivo	Tratamento	Dentina Hígida		Substrato Afetado por cárie	
		24h	1 ano	24h	1 ano
CF	Controle	CFG1h24	CFG1h1	CFG1a24	CFG1a1
	Laser 80	CFG2h24	CFG2h1	CFG2a24	CFG2a1
	Laser 50	CFG3h24	CFG3h1	CFG3a24	CFG3a1
SB	Controle	SBG1h24	SBG1h1	SBG1a24	SBG1a1
	Laser 80	SBG2h24	SBG2h1	SBG2a24	SBG2a1
	Laser 50	SBG3h24	SBG3h1	SBG3a24	SBG3a1

4.8 Avaliação morfológica da superfície de dentina – Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica do efeito dos 3 diferentes tratamentos realizados - controle (sem tratamento), Laser 80 e Laser 50 - sobre os 2 substratos de teste - dentina hígida e afetada por cárie - foi conduzida somente no tempo de armazenamento de 24 horas. Como o pareamento do estudo foi feito pelo substrato, em 15 discos de dentina foram realizadas 30 leituras (n=5).

Os espécimes foram imersos individualmente em solução de Glutaraldeído 2,5% por 24h. Findo este tempo, eles foram lavados com solução tampão de fosfato de sódio (PBS) por 15min, sendo realizada a troca desta solução por três vezes, totalizando um tempo total de 1h, após o qual os espécimes foram lavados com água destilada por 1min. Em seguida, todos os espécimes foram desidratados em série decrescente de etanol: Álcool 30% por 10min (duas imersões de 5min); Álcool 50% por 10min (duas imersões de 5min); Álcool 70% por 10min (duas imersões de 5min); Álcool 90% por 10min (duas imersões de 5min); Álcool 96% por 10min (duas imersões de 5min); Álcool Absoluto por 20min (quatro imersões de 5min). Para secagem dos espécimes foi utilizado hexadimetil disilazona (HMDS – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 20min e papel absorvente. Após o preparo para microscopia, cada espécime foi colado com fita dupla-face em stubs de alumínio e coberto com fina película de ouro; logo após foram observados num microscópio eletrônico de varredura (JEOL 6460 – LV, Jeol Ltd. Tokio, Japão – Processo FAPESP 00/08231-1) pertencente ao Laboratório de Filmes Finos do IFUSP, em

aumento padronizado. Foi escolhido aumento padronizado de 500X para aquisição das imagens.

4.9 Avaliação ultraestrutural da superfície - Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise ultraestrutural do efeito dos 3 diferentes tratamentos realizados - controle (sem tratamento), Laser 80 e Laser 50 - sobre os 2 substratos de teste - dentina hígida e afetada por cárie - foi conduzida somente no tempo de armazenamento de 24 horas. Como o pareamento do estudo foi feito pelo substrato, em 6 discos de dentina foram realizadas 12 leituras (n=2).

Os discos de dentina irradiados ou não foram cortados em fragmentos com aproximadamente 1mm de espessura, além disso, todo o esmalte que os envolvia foi cuidadosamente removido com auxílio de pontas diamantadas em alta rotação.

Posteriormente, os corpos de prova foram descalcificados através da imersão em ácido fórmico 85% durante 4 dias. O tempo de descalcificação e concentração do ácido fórmico foram determinados através de estudo piloto. Finalizada a descalcificação, os espécimes foram submetidos a 3 lavagens de 10 minutos cada com soro fisiológico, a fim de possibilitar posterior fixação com glutaraldeído 2% por duas horas, seguida novamente de 3 lavagens de 10 minutos com soro fisiológico.

Os espécimes foram levados ao Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da USP para continuidade no processamento. No procedimento de pós-fixação, os corpos de prova ficaram em solução de Tetróxido de ósmio a 1% por 1h em capela, seguido de 3 lavagens com solução de cloreto de sódio mais sacarose, seguidas de imersão em acetato de uranila 1% por 12 horas.

Na fase de desidratação, todos os espécimes foram armazenados individualmente e passaram pela seguinte sequência: Acetona 30° por 10 minutos; Acetona 70° por 10 minutos; Acetona 95° por 15 minutos; Acetona 100° por 30 minutos (duas imersões de 15 minutos).

Para o procedimento de infiltração, foi acrescentada uma mistura de acetona mais resina (1/2:1/2) no girador por 3 horas; em seguida, todo o excesso foi

removido e acrescentou-se resina pura, que ficou por 1 hora em estufa a 37°C. Para a inclusão, os espécimes infiltrados na resina foram vertidos em moldes de silicone individualmente em cada casulo e posteriormente armazenados em estufa seca a 60°C por 3 dias para completa polimerização da resina.

Os blocos já polimerizados foram cortados com auxílio de um ultramicrotomo em cortes mais grossos para o preparo das lâminas, as quais foram coradas com azur 2 azul de metileno. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico para definição das áreas de leitura. Nestas áreas foram obtidas secções ultrafinas de aproximadamente 300nm de espessura, com o auxílio de uma navalha de diamante montada em ultramicrotomo, as quais foram contrastadas em citrato de chumbo por 10 minutos e examinadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL, Jem-1010 Electron Microscope, Japão) pertencentes a este mesmo laboratório, para obtenção das imagens.

4.10 Aplicação dos sistemas adesivos

Para as metodologias de MEV de interface, Ultramicrodureza, Microcisolhamento, dois tipos de sistema adesivo foram utilizados: sistema adesivo do tipo autocondicionante CF de dois passos e SB de um passo. A aplicação sobre os discos de dentina hígida e afetada por cárie foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Composição e protocolo de utilização dos sistemas adesivos testados

Sistema adesivo autocondicionante	Componentes Principais	Protocolo de utilização
Clearfil SE Bond (CF) Nº de lote: 306805	Primer: MDP, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, dl-canforquinona, N, N-diethanol-p-toluidina, água. Bond: MDP, bis-GMA, HEMA, dimetacrilato hidrofóbico, dl-canforquinona, N, N-diethanol-p-toluidina, sílica coloidal silanizada	1. Aplicação do primer por 20s; 2. Evaporação do solvente com suave jato de ar por 5s; 3. Aplicação de uma camada de bond e uniformização da camada com suave jato de ar; 4. Fotopolimerizar por 10s.
Single Bond Universal (SB) Nº de lote: 1322100154	Monômero fosfato MDP, resinas de dimetacrilato, HEMA, metacrilato modificado com copolímero do ácido polialcenóico, etanol, água, iniciadores, silano	1. Aplicação do adesivo por 20s; 2. Evaporação do solvente com suave jato de ar por 5s; 3. Fotopolimerizar por 10s.

4.11 Preparo dos espécimes para MEV de interface

Trinta discos de dentina contendo substratos hígido e afetado por cárie foram seccionados no sentido méso-distal em metades iguais, de forma que ambos os tecidos estivessem presentes nos dois hemi discos. Cada um dos 60 espécimes foi devidamente tratado - controle, Laser 80 e Laser 50 - (n=5), e estabeleceu-se novo pareamento por tempo de armazenamento. Ou seja, enquanto um hemi disco foi avaliado após 24 horas, a sua metade correspondente foi armazenada por 1 ano. Este protocolo consistiu no armazenamento em saliva artificial a 37°C por 1 ano (Pashley et al., 2004; Mobarak 2011).

Para a montagem destes espécimes foram utilizados dois sistemas adesivos do tipo autocondicionante CF e SB, de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 4.3).

Após aplicação do sistema adesivo e de fina camada de resina flow Z350XT A3B (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), a resina composta nanotecnologia Z350XT (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi aplicada em três incrementos de 1mm, polimerizados individualmente por 20s com aparelho de fotopolimerização com intensidade de 410mW/cm^2 , perfazendo um corpo de prova de resina composta com 3mm de altura, que foi armazenado em água destilada por 24h em estufa a 37°C . Findo este tempo, metade dos espécimes foi processada para análise em MEV e a outra metade foi armazenada por 1 ano em saliva artificial.

Cada corpo de prova foi imerso individualmente em solução de Glutaraldeído 2,5% por 24h. Findo este tempo, os espécimes foram lavados com solução de tampão fosfato por 15min, sendo realizada a troca desta solução por três vezes, totalizando um tempo total de 1h, após o qual, os espécimes foram lavados com água destilada por 1min.

A superfície em que foi realizado o corte mésio-distal foi lixada com o auxílio da politriz automática (Ecomet 6/Automet 2 – Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) com a seguinte sequência: lixas d'água #600 por 20s, #1200 por 20s, #4000 por 20s (enxaguando os espécimes em água entre cada lixa). Para limpeza de resíduos do processo de polimento, os espécimes foram imersos em água destilada e levados à cuba ultrassônica por 10min, havendo uma troca de água na metade do período.

De posse dos espécimes devidamente limpos, foi realizado o condicionamento da superfície polida com ácido fosfórico 37% por 20s, para exposição dos tags de resina. A lavagem com água da seringa triplice ocorreu por 30s. Os espécimes foram imersos individualmente em solução de Hipoclorito de Sódio 1% por 30min e então lavados com água por 30s.

Após estas etapas, os espécimes foram imersos em solução de glutaraldeído 2,5% (SPI – CHEN – Spi supplies, PA, EUA) por 2h para fixação e depois lavados com solução de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) com três lavagens de 5min cada, sendo que a solução foi descartada após o contato com os espécimes.

Na fase de desidratação, todos os espécimes foram armazenados individualmente, passando pela seguinte sequência: Álcool 30% por 10min (duas

imersões de 5min); Álcool 50% por 10min (duas imersões de 5min); Álcool 70% por 10min (duas imersões de 5min); Álcool 90% por 10 min (duas imersões de 5min); Álcool 96% por 10min (duas imersões de 5min); Álcool Absoluto por 20 min (quatro imersões de 5min).

Para secagem dos espécimes foi utilizado hexadimetil disilazona (HMDS – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 10min e posteriormente secos com papel absorvente.

Após o preparo para microscopia, cada espécime foi colado com fita dupla-face em stubs de alumínio, coberto com fina película de ouro e então observado num microscópio eletrônico de varredura (JEOL 6460 – LV, Jeol Ltd. Tokio, Japão – Processo FAPESP 00/08231-1) pertencente ao Laboratório de Filmes Finos do IFUSP, em aumento padronizado de 500X, sempre no centro de cada espécime, focalizando a camada híbrida logo acima da câmara pulpar. Após 1 ano de armazenamento, o mesmo processamento foi realizado nos corpos de prova.

4.12 Análise da ultramicrodureza

Sessenta discos de dentina (n=10/grupo) contendo ambos os substratos foram trabalhados de acordo com os tratamentos propostos. O sistema adesivo do tipo autocondicionante CF e SB foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 4.3) aplicado sobre toda a superfície. Uma matriz circular bipartida foi posicionada de forma que a restauração a ser realizada estivesse posicionada tanto em substrato hígido quanto em afetado por cárie. A resina composta nanotecnologia Z350XT (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi aplicada após o procedimento adesivo em três incrementos de 1mm, polimerizados individualmente por 20s, com aparelho de fotopolimerização com intensidade de 410mW/cm², perfazendo um corpo de prova de resina composta com 3mm de altura. Após a remoção da matriz, os corpos de prova foram armazenados em água destilada por 24h, em estufa a 37°C.

Os espécimes foram incluídos em resina epóxi e posteriormente seccionados no sentido méso-distal para que fosse realizado o polimento das amostras na região

da interface adesiva. Metade de cada um dos espécimes foi analisada imediatamente, enquanto a outra metade foi armazenada em saliva artificial por 1 ano.

Imediatamente antes da leitura da nanodureza, as amostras foram polidas com lixa d'água de carboneto de silício de granulação decrescente (1200, 2500, 4000) (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), sob refrigeração, adaptadas à politriz. Após o polimento, os espécimes foram posicionados em uma máquina de teste dinâmico de ultramicrodureza (DUH-W211S, Shimadzu Co., Toquio, Japão) (mN). O ciclo aplicado foi de 10mN e a taxa de aplicação de força de 0,01mN/μs (Abe et al., 2015). Antes da realização da nanoindentação, o indentador foi posicionado precisamente na região de interesse por meio de um microscópio óptico (aumento de 100X) acoplado ao equipamento.

Foram realizadas dez medições em cada substrato, distribuídas em duas linhas, uma delas localizada na camada híbrida e a outra na camada de adesivo (Figura 4.3). As indentações estavam distantes 10μm entre si tanto horizontal, quanto verticalmente. A média das 5 indentações em cada substrato foi calculada para posterior análise estatística. O equipamento foi utilizado sobre uma mesa antivibratória, no interior de uma caixa acrílica, com temperatura ambiente controlada em 21°C, no intuito de reduzir a influência de condições ambientais. Após 1 ano armazenamento, o mesmo procedimento foi realizado nos corpos de prova armazenados para obtenção dos resultados.

Figura 4.3 – Esquema de indentações realizadas nos corpos de prova para avaliação da camada de adesivo e da camada híbrida formada após os tratamentos, em dentina hígida e afetada por cárie.

4.13 Ensaio de microcisalhamento

Noventa discos de dentina foram incluídos em tubos de PVC com resina acrílica autopolimerizável para ser acoplado no dispositivo do ensaio. Cada um dos

90 espécimes (n=15/grupo) recebeu tratamentos de superfície propostos. Em seguida, foi realizada a delimitação da área utilizando uma fita adesiva dupla face ácido resistente de 0,05mm de espessura (Tectaoe, Manaus, AM, BR) com quatro perfurações (diâmetro de 1mm) para cada substrato, feitas por um perfurador de lençol de borracha (modelo Ainsworth, Wilcos do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, BR).

Sobre esta fita delimitadora foram realizados os procedimentos de aplicação dos sistemas adesivos (Tabela 4.3). Em seguida, foram posicionados oito microtubos de silicone com dimensões de 1,0mm de diâmetro interno e 0,5mm de altura, utilizados como matriz para a construção dos corpos de prova, posicionando o tubo de forma que seu diâmetro interno fosse coincidente com a perfuração da fita. Em seguida, a resina composta foi inserida na luz dos microtubos com o auxílio de uma sonda ballpoint, também conhecida como sonda CPI (Trinity® Periodontia, São Paulo, SP, BR).

Os corpos de prova foram então imersos em água destilada a 37°C durante 24h. Após esse período, as matrizes de silicone foram removidas com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº15 (Embramed, Jurubatuba, SP, BR) e em seguida os corpos de prova foram observados em lupa estereoscópica com um aumento de 40x para verificação da ausência de defeitos na interface adesiva.

Dos 8 corpos-de-provas confeccionados (Figura 4.4), 4 (2 em dentina hígida e 2 em dentina afetada por cárie) foram analisados após as 24 horas de armazenamento. Os outros 4 foram avaliados após 1 ano de armazenamento em saliva artificial.

Figura 4.4 - Espécime de microcisalhamento com os 8 corpos de prova confeccionados, 4 em dentina hígida (lado esquerdo) e 4 em dentina afetada por cárie (lado direito, retângulo vermelho).

Os espécimes foram adaptados ao dispositivo para execução do teste de microcisalhamento em máquina de ensaio universal (Instron 5942, Canton, MA, EUA) (Figura 4.5). Um fio metálico de 0,2mm de diâmetro em contato com o semicírculo inferior dos cilindros laçou simultaneamente esse cilindro e o prolongamento da célula de carga, sendo então realizado o ensaio de microcisalhamento com velocidade de 1mm/min. Os valores de carga máxima suportada pela interface dentina/material restaurador foram obtidos em Newton e posteriormente convertidos em MegaPascal, dividindo-se a força máxima atingida no momento da fratura (N) pela área da interface adesiva (mm²).

Figura 4.5 - Espécime adaptado em dispositivo para execução do teste de microcisalhamento.

4.14 Avaliação do padrão de fratura

Após a realização do teste de microcisalhamento, o padrão de fratura de cada espécime foi avaliado com o auxílio de lupa estereoscópica, com aumento de 50 vezes. As fraturas foram classificadas por escores em: 1- adesivas (75% ou mais da área analisada interfacial entre substrato e material restaurador); 2 - coesivas em dentina (75% ou mais da área analisada com presença de tecido dentinário); 3 - coesivas em resina composta (75% ou mais da área analisada com presença de material restaurador) e 4 - mistas (combinação de adesivas e coesivas).

Terminada a fase experimental os dentes foram descartados corretamente.

5 RESULTADOS

Para a análise dos resultados, tanto para a avaliação do teste de microcisalhamento, quanto para avaliação da nanodureza, foi utilizado um modelo de Análise de Variância (ANOVA), com 3 fatores, sendo o fator tratamento fixo com 3 níveis (controle, Laser 80 e Laser 50) e 2 fatores de medidas repetidas, cada um deles com 2 níveis: substrato (hígido e afetado por cárie) e tempo de armazenamento (24h e 1 ano). Como o objetivo deste trabalho não foi comparar os sistemas adesivos, as análises foram realizadas separadamente por adesivo CF e SB. Comparações múltiplas utilizaram o método de Tukey, com o software estatístico Minitab, versão 16.1 ($p < 0,05$).

5.1 Ensaio de resistência adesiva (microcisalhamento)

5.1.1 Adesivo CF

As medidas resumo para os grupos experimentais (ANOVA, média e desvio padrão) estão apresentadas nas Tabelas 5.1 e 5.2.

Tabela 5.1 - Análise de variância (ANOVA) para os valores de RU para o sistema adesivo CF

Fatores de variação	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tratamento	2	42,44	42,44	21,22	1,61	0,212
Tempo	1	856,97	856,97	856,97	65,09	0,000
Tratamento*Tempo	2	11,85	11,85	5,93	0,45	0,641
Substrato	1	13552,92	13552,92	13552,92	1029,41	0,000
Tratamento*Substrato	2	92,27	92,27	46,13	3,50	0,039
Tempo*Substrato	1	199,05	199,05	199,05	15,12	0,000
Tratamento*Tempo*Substrato	2	30,92	30,92	15,46	1,17	0,319
Erro	42	552,96	552,96	13,17		
Total	179	17972,09				

Tabela 5.2 - Medidas resumo (média±desvio padrão) para valores de resistência de união (RU) em MPa, com uso do adesivo CF

Tratamento	Dentina Hígida		Dentina Afetada por Cárie	
	24 horas	1 ano	24 horas	1 ano
Controle	30,97±5,85 ^a	27,19±6,47 ^{a,b}	12,68±2,81 ^c	6,96±2,67 ^d
Laser 80	27,94±4,07 ^{a,b}	25,72±4,54 ^b	13,54±3,42 ^c	6,29±1,50 ^d
Laser 50	26,77±5,58 ^{a,b}	25,98±6,3 ^b	13,75±3,34 ^c	7,27±1,86 ^d

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes

Analisando-se o efeito do tempo de armazenamento, observa-se que os valores de RU obtidos em 24h são semelhantes aos obtidos após armazenamento por 1 ano, para o substrato hígido com todos os tratamentos testados. Contudo, após 1 ano de armazenamento, em substrato afetado por cárie para todos os tratamentos, os valores de RU diminuem de maneira significativa.

Ao comparar o desempenho do sistema adesivo CF em diferentes substratos, observa-se diferença estatisticamente significativa em que os valores de RU obtidos

em substrato hígido são sempre maiores do que os obtidos em substrato afetado por cárie, independente de tratamento e de tempo de armazenamento.

Observa-se ainda, não haver diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos realizados - Laser 80, Laser 50 ou controle (sem tratamento) - com RU semelhante para todos os grupos experimentais, independentemente do tempo de armazenamento e substrato.

A análise do padrão de fratura em substrato hígido para os corpos de provas confeccionados com o sistema adesivo CF mostraram uma predominância de fratura do tipo mista, seguida de fraturas adesivas. Fraturas coesivas em dentina hígida somente foram observadas, em pequena porcentagem, em 24h. Para o substrato afetado por cárie, a maior predominância encontrada foi do tipo de fratura adesiva, seguida de fraturas mistas. Ressalta-se que neste substrato observa-se a incidência de corpos de prova perdidos após 1 ano de armazenamento (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 - Análise do padrão de fratura dos corpos de prova confeccionados com o sistema adesivo Clearfil SE Bond (CF)

5.1.2. Adesivo SB

As medidas resumo para todos os grupos experimentais (ANOVA, média e desvio padrão) estão apresentadas nas Tabelas 5.3 e 5.4.

Tabela 5.3 - Análise de variância (ANOVA) para os valores de RU para o sistema adesivo SB

Fatores de variação	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tratamento	2	149,85	149,85	74,93	4,32	0,020
Tempo	1	667,76	667,76	667,76	38,47	0,000
Tratamento*Tempo	2	373,34	373,34	186,67	10,75	0,000
Substrato	1	14857,04	14857,04	14957,04	855,85	0,000
Tratamento*Substrato	2	85,01	85,01	42,51	2,45	0,099
Tempo*Substrato	1	139,78	139,78	139,78	8,05	0,007
Tratamento*Tempo*Substrato	2	15,60	15,60	7,80	0,45	0,641
Erro	42	729,09	729,09	17,36		
Total	179	19888,22				

Tabela 5.4 - Medidas resumo (média±desvio padrão) para valores de resistência de união (RU) em MPa, com uso do adesivo SB

Tratamento	Dentina Hígida		Dentina Afetada por Cárie	
	24 horas	1 ano	24 horas	1 ano
Controle	26,92±6,07 ^{a,b}	29,15±5,73 ^{a,b}	9,30±2,51 ^{d,e}	6,95±1,31 ^e
Laser 80	31,64±3,69 ^a	25,55±4,81 ^b	16,02±5,62 ^c	8,05±2,67 ^e
Laser 50	29,52±5,6 ^{a,b}	27,11±5,94 ^{a,b}	13,53±5,78 ^{c,d}	7,00±1,99 ^e

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes

Através do teste de comparações múltiplas de Tukey, o tempo de armazenamento não afetou os valores de RU do grupo controle, tanto em substrato hígido como em substrato afetado por cárie, sendo os valores obtidos em 24h semelhantes aos obtidos em 1 ano. O armazenamento também não teve efeito para o grupo tratado com Laser 50 em substrato hígido. Contudo, quando o Laser 50 foi utilizado em substrato afetado por cárie, há redução dos valores de RU após 1 ano de armazenamento. Esta mesma redução foi observada quando os espécimes foram tratados com Laser 80, em ambos substratos hígido e afetado por cárie.

Quando o sistema adesivo SB foi utilizado em diferentes substratos, observa-se valores de RU estatisticamente maiores em substrato hígido do que em substrato afetado por cárie, independente de tratamento e de tempo de armazenamento.

Diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos realizados só foi observada nos espécimes afetados por cárie avaliados em 24h, onde o tratamento com Laser 80 apresentou maiores valores de RU comparados ao controle, ao mesmo tempo em que apresentou adesão semelhante ao Laser 50. Nas demais comparações pertinentes, os diferentes tratamentos não geram valores de RU estatisticamente diferentes em substrato hígido, em 24h e após armazenamento por 1 ano, bem como em substrato afetado por carie, após 1 ano de armazenamento.

A análise do padrão de fratura para os corpos de prova confeccionados com o sistema adesivo SB em dentina hígida mostrou uma predominância de fratura do tipo mista, seguida de adesivas, em 24h. No entanto, ao mesmo tempo que em 24h encontravam-se também fraturas do tipo coesiva em dentina, essas não foram mais observadas após 1 ano de armazenamento. No tecido afetado por cárie, a maior predominância de fratura encontrada foi do tipo adesiva, sendo observados após 1 ano maior incidência de corpos de prova perdidos (Gráfico 5.2).

Gráfico 5.2 - Análise do padrão de fratura dos corpos de prova confeccionados com o sistema adesivo Single Bond Universal (SB)

5.2 Avaliação da nanodureza da camada de adesivo (NdA) e da camada híbrida (NdCH)

5.2.1 Camada do Adesivo CF

As medidas resumo para todos os grupos experimentais (ANOVA, média e desvio padrão) estão apresentadas na Tabelas 5.5 e 5.6.

Tabela 5.5 - Análise de variância (ANOVA) para os valores de nanodureza para o sistema adesivo CF

Fatores de variação	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tratamento	2	521,73	521,73	260,86	11,63	0,000
Tempo	1	1011,99	1011,99	1011,99	45,12	0,000
Tratamento*Tempo	2	210,11	210,11	105,06	4,68	0,018
Substrato	1	858,35	858,35	858,35	38,27	0,000
Tratamento*Substrato	2	224,16	224,16	112,08	5,00	0,014
Tempo*Substrato	1	329,94	329,94	329,94	14,71	0,001
Tratamento*Tempo*Substrato	2	33,34	33,34	16,67	0,74	0,485
Erro	27	605,55	605,55	22,43		
Total	119	6750,54				

Tabela 5.6 - Medidas resumo para valores da nanodureza da camada de adesivo (NdA) em mN, com uso do sistema adesivo CF (média±desvio padrão)

Tratamento	Dentina Hígida		Dentina Afetada por Cárie	
	24 horas	1 ano	24 horas	1 ano
Controle	22,72±4,31 ^{a,b}	23,18±8,33 ^{a,b}	19,28±3,51 ^{a,b,c}	11,99±6,69 ^{c,d,e}
Laser 80	23,5±5,67 ^a	15,84±7,65 ^{b,c,d}	18,09±5,58 ^{a,b,c}	6,75±2,97 ^e
Laser 50	15,13±2,91 ^{c,d}	14,86±7,83 ^{c,d}	17,88±5,51 ^{a,b,c}	9,14±4,47 ^{d,e}

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes

Analisando o efeito do tempo de armazenamento, em dentina hígida, observa-se que somente os espécimes tratados com Laser 80 apresentaram os valores de NdA reduzidos após 1 ano de armazenamento. Ao analisarmos os resultados de NdA em substrato afetado por cárie, observamos que apenas para o grupo controle, os valores não reduziram significativamente com o armazenamento. Contudo, para os grupos tratados com Laser 80 e Laser 50 os valores de NdA reduziram de forma significativa após armazenamento por 1 ano.

Quanto ao tipo de substrato, em 24h de armazenamento, independentemente do tipo de tratamento, a camada de adesivo em substrato hígido tem valores de NdA

iguais a obtida em substrato afetado por cárie. Após armazenamento por 1 ano, o tratamento com Laser 50 mantém semelhantes os valores de NdA obtidos tanto em substrato hígido como em substrato afetado por cárie. Porém, quando aplicados os tratamentos com Laser 80 e controle após 1 ano de armazenamento, os valores de NdA apresentam-se menores em substrato afetado por cárie comparados ao substrato hígido.

Avaliando os tratamentos testados em substrato afetado por cárie, tanto em 24h como após 1 ano de armazenamento, não há diferença estatisticamente significativa nos valores de NdA da camada de adesivo CF. Porém, em substrato hígido em 24h, os espécimes controle geraram valores de NdA semelhantes aos obtidos com o Laser 80, sendo esses valores estatisticamente maiores do que os obtidos com o Laser 50. Após 1 ano de armazenamento dos espécimes com substrato hígido, a maior NdA foi observada para o grupo controle, quando comparada com o Laser 50. Entretanto, a dureza da camada de adesivo dos espécimes tratados com Laser 80 possui resultados intermediários, pois ao mesmo tempo em que são semelhantes ao controle, também são semelhantes ao Laser 50.

5.2.2 Camada híbrida CF

As medidas resumo para todos os grupos experimentais (ANOVA, média e desvio padrão) estão apresentadas nas Tabelas 5.7 e 5.8.

Tabela 5.7 - Análise de variância (ANOVA) para os valores de nanodureza da camada híbrida para o sistema adesivo CF

Fatores de variação	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tratamento	2	915,64	915,64	457,82	5,39	0,011
Tempo	1	8587,24	8587,24	8587,24	101,15	0,000
Tratamento*Tempo	2	104,65	104,65	52,33	0,62	0,548
Substrato	1	24469,07	24469,07	24469,07	287,94	0,000
Tratamento*Substrato	2	1714,42	1714,42	857,21	10,09	0,001
Tempo*Substrato	1	609,93	609,93	609,93	7,18	0,012
Tratamento*Tempo*Substrato	2	1310,89	1310,89	655,44	7,71	0,002
Erro	27	2294,47	2294,47	84,89		
Total	119	46746,17				

Tabela 5.8 - medidas resumo para valores da nanodureza da camada híbrida (NdCH) em mN, com uso do sistema adesivo CF (média±desvio padrão)

Tratamento	Dentina Hígida		Dentina Afetada por Cárie	
	24 horas	1 ano	24 horas	1 ano
Controle	67,06±13,38 ^a	38,1±11,80 ^{b,c}	15,08±6,51 ^{e,f}	13,58±7,25 ^{e,f}
Laser 80	49,48±6,66 ^b	31,41±9,94 ^{c,d}	31,13±11,84 ^{c,d}	10,16±6,52 ^{e,f}
Laser 50	49,15±12,04 ^b	31,90±8,75 ^{c,d}	20,28±5,89 ^{d,e}	5,52±2,95 ^f

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes

Ao avaliar o efeito do tempo em substrato hígido, observa-se que o armazenamento por 1 ano reduziu a NdCH formada pelo adesivo CF, independentemente do tipo de tratamento testado. Para o substrato afetado por cárie, o mesmo resultado foi observado quando os espécimes foram tratados com Laser 80 e Laser 50. Contudo, para o grupo controle em substrato afetado por cárie não houve redução significativa dos valores de NdCH após 1 ano de armazenamento.

Avaliando o fator substrato, para todos os tratamentos testados e os tempos de armazenamento, a NdCH formada pelo adesivo CF é significativamente maior nos espécimes de substrato hígido do que nos de substrato afetado por cárie.

Para todos os tratamentos testados, após 1 ano de armazenamento em ambos os substratos, os valores da NdCH são semelhantes entre si. Enquanto que em 24h, no substrato hígido, o grupo controle apresentou maiores valores de NdCH do que os tratados com Laser 80 e Laser 50, semelhantes entre si. Já no substrato afetado por cárie, os maiores valores de NdCH foram obtidos para os tratamentos com Laser 80 e Laser 50. No entanto, apesar dos valores de NdCH do tratamento Laser 80 serem superiores ao controle (sem tratamento), este é estatisticamente similar ao tratamento com Laser 50.

5.2.3. Camada de adesivo SB

As medidas resumo para todos os grupos experimentais (ANOVA, média e desvio padrão) estão apresentadas nas Tabelas 5.9 e 5.10.

Tabela 5.9 - Análise de variância (ANOVA) para os valores de NdA para o sistema adesivo SB

Fatores de variação	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tratamento	2	722,33	72,33	361,16	7,23	0,003
Tempo	27	726,24	726,24	726,24	14,54	0,001
Tratamento*Tempo	1	55,84	55,84	27,92	0,56	0,578
Substrato	2	435,44	435,44	435,44	8,72	0,006
Tratamento*Substrato	27	2,14	2,14	1,07	0,02	0,979
Tempo*Substrato	1	25,73	25,73	25,73	0,52	0,479
Tratamento*Tempo*Substrato	2	7,75	7,75	3,88	0,08	0,926
Erro	27	1348,48	1348,48	49,94		
Total	119	7587,48				

Tabela 5.10 - Medidas resumo para valores da nanodureza da camada de adesivo (NdA) em mN, com uso do sistema adesivo SB (média±desvio padrão)

Tratamento	Dentina Hígida		Dentina Afetada por Cárie	
	24 horas	1 ano	24 horas	1 ano
Controle	24,30±7,55 ^a	17,85±8,99 ^{a,b,c}	20,7±7,75 ^{a,b}	13,8±11,24 ^{a,b,c}
Laser 80	18,92±6,47 ^{a,b,c}	15,31±7,93 ^{a,b,c}	15,93±5,41 ^{a,b,c}	10,05±7,84 ^{b,c}
Laser 50	16,01±3,93 ^{a,b,c}	14,08±6,37 ^{a,b,c}	13,95±2,15 ^{a,b,c}	9,19±6,56 ^c

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes

Considerando o efeito do tempo, para todos os tratamentos, independente do tipo de substrato, os valores de NdA após 1 ano de armazenamento são estatisticamente semelhante aos obtidos em 24h.

Os valores de NdA são semelhantes tanto em substrato hígido como no substrato afetado por cárie, considerando todos os tratamentos e os tempos de armazenamento analisados.

Avaliando o efeito dos tratamentos, para ambos os tipos de substrato e tempos de armazenamento testados, os valores de NdA são semelhantes entre os grupos sem tratamento, Laser 80 e Laser 50.

5.2.4. Camada híbrida SB

As medidas resumo para todos os grupos experimentais (ANOVA, média e desvio padrão) estão apresentadas nas Tabelas 5.11 e 5.12.

Tabela 5.11 - Análise de variância (ANOVA) para os valores de nanodureza da camada híbrida para o sistema adesivo SB

Fatores de variação	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tratamento	2	5161,75	5161,75	2580,87	51,23	0,000
Tempo	1	7153,66	7153,66	7153,66	142,00	0,000
Tratamento*Tempo	2	618,13	618,13	309,06	6,14	0,006
Substrato	1	18116,94	18116,94	18116,94	359,63	0,000
Tratamento*Substrato	2	197,06	197,06	98,53	1,96	0,161
Tempo*Substrato	1	677,73	677,73	677,73	13,45	0,001
Tratamento*Tempo*Substrato	2	136,72	136,72	68,36	1,36	0,274
Erro	27	1360,16	1360,16	50,38		
Total	119	48707,78				

Tabela 5.12 - Medidas resumo para valores da nanodureza da camada híbrida (NdCH) em mN, com uso do sistema adesivo CF (média±desvio padrão)

Tratamento	Dentina Hígida		Dentina Afetada por Cárie	
	24 horas	1 ano	24 horas	1 ano
Controle	65,87±11,69 ^a	38,49±13,16 ^{b,c}	31,55±12,54 ^{c,d}	16,71±11,77 ^{e,f,g}
Laser 80	44,54±14,47 ^b	27,59±11,91 ^{c,d,e}	19,08±9,7 ^{e,f}	5,59±2,20 ^g
Laser 50	43,38±22,14 ^b	27,12±14,54 ^{d,e}	15,18±4,36 ^{f,g}	11,44±8,54 ^{f,g}

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes

Avaliando o efeito do tempo, em substrato hígido, observa-se que os valores de NdCH obtidos após 1 ano de armazenamento são menores do que os obtidos em 24h, independentemente do tipo de tratamento realizado. Em substrato afetado por cárie, ocorre redução da NdCH do adesivo SB após 1 ano de armazenamento para os grupos tratados com Laser 80 e controle. Já para o grupo tratado com Laser 50 observa-se a manutenção dos valores de NdCH após 1 ano de armazenamento.

Avaliando o fator substrato, para todos os tratamentos testados e os diferentes tempos de armazenamento, a NdCH é significativamente maior nos espécimes de substrato hígido do que os de substrato afetado por cárie.

Quanto aos tratamentos testados, após 24h de armazenamento, tanto em substrato hígido quanto no substrato afetado por cárie, o tratamento controle apresentou maiores valores de NdCH do que os tratamentos com Laser 80 e Laser 50, que são semelhantes entre si. Após 1 ano de armazenamento, enquanto que no substrato afetado todos os tratamentos são semelhantes entre si, no substrato hígido, os valores de NdCH são superiores no grupo controle e no tratamento com Laser 80. Observa-se ainda que o Laser 80 possui uma NdCH intermediária, pois ao mesmo tempo em que é igual ao grupo controle, é também igual ao Laser 50. No entanto, o tratamento com Laser 50 é significativamente inferior ao grupo controle.

5.3 Análise morfológica superficial em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A eletromicrografia 5.1A representa o tratamento controle realizado em dentina hígida. Observa-se a presença de camada de esfregaço padronizada de pequena espessura, obliterando parcialmente a abertura dos túbulos dentinários. Trata-se de uma superfície plana, regular e marcada por ranhuras, produto da utilização de lixas em dentina hígida.

Em dentina afetada por cárie obtida artificialmente onde foi realizado o tratamento de superfície controle (eletromicrografia 5.1B) identificamos uma superfície com características heterogêneas causada pela desmineralização dos produtos ácidos bacterianos. Foram também observados a presença de resíduos de biofilme (setas vermelhas); túbulos dentinários abertos (setas azuis) em toda extensão da imagem, além de possuírem maior diâmetro, quando comparados com os da dentina hígida.

Na eletromicrografia 5.1C, que representa o tratamento superficial realizado com o parâmetro do laser de 80mJ e 2Hz em dentina hígida, a análise morfológica revela um padrão microrretentivo característico de ablação, com uma superfície irregular, sem desmineralização, ausência de smear layer expondo a abertura dos túbulos dentinários (setas azuis) e dentina peritubular evidente (círculos vermelhos). No entanto, com o mesmo parâmetro em dentina afetada por cárie (5.1D), o padrão superficial é completamente distinto, observando-se uma superfície ainda mais irregular, com a abertura dos túbulos dentinários com diâmetro aumentado (setas azuis), dentina peritubular também proeminente (círculos vermelhos) e presença de trincas ao longo da superfície (seta amarela).

O outro parâmetro de tratamento de superfície com o laser de Er:YAG, utilizado com 50mJ e 10Hz em dentina hígida (5.1E), apresentou um padrão superficial bastante similar ao outro parâmetro de laser utilizado anteriormente. Observa-se um padrão microrretentivo característico de ablação, com uma superfície irregular, sem desmineralização, ausência de smear layer expondo a abertura dos túbulos dentinários (setas azuis) e dentina peritubular evidente (círculos vermelhos). Em dentina afetada por cárie (5.1F), observa-se uma superfície com grande número de túbulos dentinários com aberturas expostas e de maior diâmetro (setas azuis), dando a impressão de se tratar de um tecido desmineralizado. Ainda que se observe dentina peritubular proeminente (círculos vermelhos), esta é menos evidente do que

a observada na eletromicrografia 5.1D. Também foram identificadas trincas ao longo da superfície (seta amarela).

- Figura 5.1 – Eletromicrografias ilustrativas de MEV da superfície dos substratos tratados utilizados (Aumento de 500X).
- A – Substrato hígido com tratamento controle - camada de esfregaço padronizada de pequena espessura, túbulos dentinários parcialmente obliterados. Superfície plana, regular e marcada por ranhuras;
- B – Substrato afetado por cárie com tratamento controle - superfície com características heterogêneas (desmineralização dos produtos ácidos bacterianos), resíduos de biofilme (setas vermelhas), túbulos dentinários abertos em maior diâmetro (setas azuis);
- C – Substrato hígido tratado com Laser 80 - padrão microrretentivo característico de ablação, superfície irregular, ausência de smear layer, túbulos dentinários (setas azuis) e dentina peritubular evidente (círculos vermelhos);
- D – Substrato afetado por cárie tratado com Laser 80 - superfície bastante irregular, túbulos dentinários abertos com diâmetro aumentado (setas azuis), dentina peritubular proeminente (círculos vermelhos) e trincas ao longo da superfície (seta amarela);
- E – Substrato hígido tratado com Laser 50 - padrão microrretentivo característico de ablação, superfície irregular, ausência de smear layer, túbulos dentinários (setas azuis) e dentina peritubular evidente (círculos vermelhos);
- F – Substrato afetado por cárie tratado com Laser 50 - superfície bastante irregular, túbulos dentinários abertos com diâmetro aumentado e ainda maior que o obtido com Laser 80 (setas azuis), dentina peritubular proeminente (círculos vermelhos) e trincas ao longo da superfície (seta amarela).

5.4 Análise morfológica da interface em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica longitudinal foi realizada através da obtenção de 4 pranchas contendo eletromicrografias da interface adesiva obtida nos substratos hígido e afetado por cárie, tratados com controle, Laser 80 e Laser 50 para os sistemas adesivos CF e SB (Figuras 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5). O aumento padronizado foi de 500 vezes. Para facilitar a leitura dos resultados, as legendas das figuras detalham os achados morfológicos.

Análise em 24 horas

A aplicação dos sistemas adesivos CF e do SB em dentina hígida controle (sem tratamento) (5.2A e 5.3A) gerou camadas híbridas consistentes, com formação uniforme de prolongamentos resinosos (setas vermelhas) observados tanto nos túbulos dentinários, como nos canais acessórios (círculos azuis), em toda a extensão de ambas as camadas híbridas formadas. As camadas de adesivos apresentam-se uniformes (AD). Identifica-se diferença no padrão de densidade de tags entre os dois adesivos. O adesivo CF possui tags resinosos mais delicados e em menor número, quando comparado ao adesivo SB, que apresenta tags robustos e em maior quantidade.

Já na dentina afetada por cárie (Figuras 5.2B e 5.3B), identifica-se a formação de prolongamentos resinosos (setas vermelhas) por toda a extensão da interface adesiva, produzida com ambos os adesivos testados. Porém, não se observa a localização exata das camadas híbridas formadas. Supõe-se que o processamento do corpo de prova pode ter removido a dentina afetada por cárie, impedindo a visualização precisa das camadas híbridas.

Para o parâmetro de tratamento com Laser 80, observa-se maior densidade de tags resinosos para o adesivo SB do que para o adesivo CF. Para ambos, o padrão da camada híbrida mostrou-se bastante distinto dos seus respectivos controles. Na camada híbrida formada por ambos os adesivos em dentina hígida (figura 5.2C e

5.3C) irradiada com Laser 80, os prolongamentos resinosos estão dispostos de forma bastante irregular. A camada de adesivo está presente, no entanto, não está disposta de forma reta, como no grupo controle. Credita-se este fato a ação do laser que gera uma superfície irregular pelo fato da energia ser pulsada. Ao redor dos prolongamentos resinosos, mais próximos da camada híbrida, é possível observar um padrão com diversos anéis (setas laranjas). Acredita-se que a irradiação cause micro trincas dentro dos túbulos dentinários, sendo estes anéis a impressão negativa destas trincas. Na dentina afetada por cárie (Figuras 5.2D e 5.3D) identifica-se a formação de camada híbrida e de tags resinosos, porém em menor tamanho quando comparado com a dentina hígida tratada com Laser 80. Observa-se ainda a presença de um gap na base da camada híbrida, provavelmente causado pelo processamento para microscopia que remove a dentina desmineralizada.

Quando utilizado o Laser 50, as características morfológicas encontradas se assemelham bastante ao tratamento com Laser 80 em dentina hígida (Figuras 5.2E e 5.3E). Em dentina afetada por cárie (Figuras 5.2F e 5.3F), para ambos os adesivos testados, observa-se formação de camada híbrida e de tags resinosos mais longos do que os formados quando a dentina foi irradiada com Laser 80. Especula-se que a menor rigidez do substrato afetado por cárie permita infiltração de monômeros em maior profundidade. Ainda neste substrato, observa-se a perda de estrutura expressa no gap formado na base das camadas híbridas.

- Figura 5.2 – Eletromicrografias ilustrativas de MEV da interface obtida com os substratos tratados, com o sistema adesivo CF após 24 horas de armazenamento (Aumento de 500X). (Resina composta – RC, camada de adesivo – AD, dentina – D)
- A – Substrato hígido com tratamento controle (CFG1h24) – camada de adesivo uniforme (AD), camada híbrida consistente, formação uniforme de prolongamentos resinosos (mais delicados e em menor número que SBG1h24) nos túbulos dentinários (setas vermelhas), e canais acessórios (círculos azuis);
- B – Substrato afetado por cárie com tratamento controle (CFG1a24) – camada de adesivo (AD) e camada híbrida não observadas, formação de prolongamentos resinosos (setas vermelhas);
- C – Substrato hígido tratado com Laser 80 (CFG2h24) – camada de adesivo (AD) não reta, prolongamentos resinosos (setas vermelhas) dispostos de forma irregular e ao redor deles padrão com diversos anéis (setas laranjas);
- D – Substrato afetado por cárie tratado com Laser 80 (CFG2a24) – camada de adesivo (AD) presente, formação de camada híbrida e de tags resinosos em menor quantidade que CFG2h24, gap na base da camada híbrida;
- E – Substrato hígido tratado com Laser 50 (CFG3h24) – camada de adesivo (AD) não reta, prolongamentos resinosos (setas vermelhas) dispostos de forma irregular e ao redor deles padrão com diversos anéis (setas laranjas);
- F – Substrato afetado por cárie tratado com Laser 50 (CFG3a24) – camada de adesivo (AD) presente, formação de camada híbrida e de tags resinosos mais longos que CFG2a24, gap na base da camada híbrida.

- Figura 5.3 – Eletromicrografias ilustrativas de MEV da interface obtida com os substratos tratados, com o sistema adesivo SB após 24 horas de armazenamento (Aumento de 500X). (Resina composta – RC, camada de adesivo – AD, dentina – D)
- A – Substrato hígido com tratamento controle (SBG1h24) – camada de adesivo uniforme (AD), camada híbrida consistente, formação uniforme de prolongamentos resinosos (robustos e em maior quantidade que CFG1h24) nos túbulos dentinários (setas vermelhas), e canais acessórios (círculos azuis);
- B – Substrato afetado por cárie com tratamento controle (SBG1a24) – camada de adesivo (AD) e camada híbrida não observadas, formação de prolongamentos resinosos (setas vermelhas);
- C – Substrato hígido tratado com Laser 80 (SBG2h24) – camada de adesivo (AD) não reta, prolongamentos resinosos (setas vermelhas) dispostos de forma irregular (maior densidade que CFG2h24) e ao redor deles padrão com diversos anéis (setas laranjas);
- D – Substrato afetado por cárie tratado com Laser 80 (SBG2a24) – camada de adesivo (AD) presente, formação de camada híbrida e de tags resinosos em menor quantidade que SBG2h24, gap na base da camada híbrida;
- E – Substrato hígido tratado com Laser 50 (SBG3h24) – camada de adesivo (AD) não reta, prolongamentos resinosos (setas vermelhas) dispostos de forma irregular e ao redor deles padrão com diversos anéis (setas laranjas);
- F – Substrato afetado por cárie tratado com Laser 50 (SBG3a24) – camada de adesivo (AD) presente, formação de camada híbrida e de tags resinosos mais longos que SBG2a24, gap na base da camada híbrida.

Análise em 1 ano

Após 1 ano de armazenamento em saliva artificial, as eletromicrografias obtidas apresentam características distintas das observadas em 24h, em que se identifica, de uma maneira geral, o efeito do tempo de armazenamento sobre a integridade das camadas híbridas formadas com CF e SB. Este efeito se expressa de forma ainda mais acentuada em substrato afetado por cárie.

Para ambos os adesivos, no tecido controle hígido (Figuras 5.4A e 5.5A) observa-se camada híbrida, porém uma diminuição considerável na quantidade, espessura e extensão dos prolongamentos de resina (setas azuis). Já em dentina afetada por cárie (Figuras 5.4B e 5.5B), sinais da degradação pelo tempo são evidentes, uma vez que se observa diminuição considerável na quantidade de prolongamentos resinosos, que além disso, encontram-se fraturados na região do topo da camada híbrida (setas azuis), havendo um desprendimento da resina com a dentina.

Em dentina hígida, para CF e SB, dos grupos tratados com Laser 80 (Figuras 5.4C e 5.5C) e Laser 50 (Figuras 5.4E e 5.5E), as eletromicrografias mostram um desprendimento total dos prolongamentos resinosos (setas azuis) da dentina irradiada. A camada de adesivo mantém-se presente, no entanto aderida à resina composta. Ao redor dos prolongamentos resinosos, mais próximo à camada híbrida, ainda é possível observar o padrão de anéis descrito anteriormente (setas laranjas).

Na dentina afetada por cárie, tratada com o Laser 80 (figuras 5.4D e 5.5D) e Laser 50 (figuras 5.4F e 5.5F), observa-se uma diminuição considerável na quantidade de prolongamentos resinosos, e os poucos ainda presentes, encontram-se fraturados. Ressalta-se ainda o sinal evidente de degradação pela presença de um grande gap formado entre o substrato afetado por cárie irradiado e a camada híbrida.

- Figura 5.4 – Eletromicrografias ilustrativas de MEV da interface obtida com os substratos tratados, com o sistema adesivo CF após 1 ano de armazenamento (Aumento de 500X). (Resina composta – RC, camada de adesivo – AD, dentina – D)
- A – Substrato hígido com tratamento controle (CFG1h1) – camada de adesivo uniforme (AD), camada híbrida com diminuição na quantidade, espessura e extensão dos prolongamentos resinosos (setas azuis);
- B – Substrato afetado por cárie com tratamento controle (CFG1a1) – camada de adesivo (AD) e camada híbrida não observadas, grande diminuição na quantidade dos prolongamentos resinosos (fraturados no topo da camada híbrida - setas azuis), desprendimento da resina com a dentina;
- C – Substrato hígido tratado com Laser 80 (CFG2h1) – camada de adesivo (AD) aderida à resina composta (RC), desprendimento total dos prolongamentos resinosos (setas azuis) e mais próximo à camada híbrida observa-se padrão de anéis (setas laranjas);
- D – Substrato afetado por cárie tratado com Laser 80 (CFG2a1) – camada de adesivo (AD) aderida à resina composta (RC), grande diminuição na quantidade dos prolongamentos resinosos (fraturados no topo da camada híbrida - setas azuis), desprendimento da resina com a dentina;
- E – Substrato hígido tratado com Laser 50 (CFG3h1) - camada de adesivo (AD) aderida à resina composta (RC), desprendimento total dos prolongamentos resinosos (setas azuis) e mais próximo à camada híbrida observa-se padrão de anéis (setas laranjas);
- F – Substrato afetado por cárie tratado com Laser 50 (CFG3a1) – camada de adesivo (AD) aderida à resina composta (RC), grande diminuição na quantidade dos prolongamentos resinosos (fraturados no topo da camada híbrida - setas azuis), desprendimento da resina com a dentina.

- Figura 5.5 – Eletromicrografias ilustrativas de MEV da interface obtida com os substratos tratados, com o sistema adesivo SB após 1 ano de armazenamento (Aumento de 500X). (Resina composta – RC, camada de adesivo – AD, dentina – D)
- A – Substrato hígido com tratamento controle (SBG1h1) – camada de adesivo uniforme (AD), camada híbrida com diminuição na quantidade, espessura e extensão dos prolongamentos resinosos (setas azuis);
- B – Substrato afetado por cárie com tratamento controle (SBG1a1) – camada de adesivo (AD) e camada híbrida não observadas, grande diminuição na quantidade dos prolongamentos resinosos (fraturados no topo da camada híbrida - setas azuis), desprendimento da resina com a dentina;
- C – Substrato hígido tratado com Laser 80 (SBG2h1) – camada de adesivo (AD) aderida à resina composta (RC), desprendimento total dos prolongamentos resinosos (setas azuis) e mais próximo à camada híbrida observa-se padrão de anéis (setas laranjas);
- D – Substrato afetado por cárie tratado com Laser 80 (SBG2a1) – camada de adesivo (AD) aderida à resina composta (RC), grande diminuição na quantidade dos prolongamentos resinosos (fraturados no topo da camada híbrida - setas azuis), desprendimento da resina com a dentina;
- E – Substrato hígido tratado com Laser 50 (SBG3h1) - camada de adesivo (AD) não reta, prolongamentos resinosos (setas vermelhas) dispostos de forma irregular e ao redor deles padrão com diversos anéis (setas laranjas);
- F – Substrato afetado por cárie tratado com Laser 50 (SBG3a1) – camada de adesivo (AD) aderida à resina composta (RC), grande diminuição na quantidade dos prolongamentos resinosos (fraturados no topo da camada híbrida - setas azuis), desprendimento da resina com a dentina.

5.5 Análise ultraestrutural superficial em microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A eletromicrografia 5.6A representa o tratamento controle realizado em dentina hígida. Através da imagem obtida através de MET observa-se superfície plana e regular, com a arquitetura das fibrilas colágenas íntegra desde a superfície.

Em dentina afetada por cárie obtida artificialmente onde foi realizado o tratamento de superfície controle (eletromicrografia 5.6B) identificamos uma camada superficial irregular e as fibrilas colágenas encontram-se íntegras, no entanto, não da mesma forma que na dentina hígida, possibilitando-nos afirmar que houve uma desorganização das fibrilas em decorrência do processo de cárie.

Na eletromicrografia 5.6C, que representa o tratamento superficial realizado com o Laser 80 em dentina hígida, a análise ultraestrutural revela a presença de uma camada alterada da dentina irradiada de aproximadamente 2 μm (traçado verde). Superficialmente esta camada apresenta placas de material derretido e carbonizado, separados por microfissuras, onde não são observadas as fibrilas colágenas. Na subsuperfície, verifica-se fusão das fibrilas colágenas, caracterizadas pela perda da estrutura fibrilar. Abaixo da subsuperfície as fibrilas colágenas estão mais organizadas, com preservação de suas estruturas.

Em dentina afetada por cárie, o mesmo tratamento com Laser 80 (eletromicrografia 5.6D) também gerou essa mesma camada alterada em dentina devido à desnaturação decorrente do calor gerado pela irradiação, no entanto, não é possível mensurar a extensão dessa alteração.

Para as eletromicrografias obtidas tanto em dentina hígida como afetada por cárie tratadas com laser 50 (5.6E e 5.6F, respectivamente) também se observa carbonização superficial com presença de placas de material derretido e vaporizado de aspecto granular, seguido de uma zona fusionada com ausência de espaço interfibrilar. As imagens não permitem observar abaixo dessa camada as regiões que apresentavam as fibrilas colágenas íntegras.

Figura 5.6 – Eletromicrografias ilustrativas de MET da superfície dos substratos tratados utilizados (Aumento de 30000X).

A – Substrato hígido com tratamento controle - superfície plana e regular com fibrilas colágenas íntegras em toda superfície;

B – Substrato afetado por cárie com tratamento controle - camada superficial irregular com fibrilas colágenas íntegras, no entanto, menos organizadas que em dentina hígida controle;

C – Substrato hígido tratado com Laser 80 - camada alterada da dentina irradiada com 2 μm (traçado verde). Abaixo da subsuperfície há fibrilas colágenas organizadas;

D – Substrato afetado por cárie tratado com Laser 80 - camada alterada da dentina irradiada com placas de material derretido e carbonizado e ausência de fibrilas colágenas organizadas;

E – Substrato hígido tratado com Laser 50 - camada alterada da dentina irradiada com placas de material derretido e carbonizado e ausência de fibrilas colágenas organizadas;

F – Substrato hígido tratado com Laser 50 - camada alterada da dentina irradiada com placas de material derretido e carbonizado e ausência de fibrilas colágenas organizadas;

6 DISCUSSÃO

Considerando a filosofia de mínima intervenção presente na Odontologia Restauradora, torna-se essencial obter uma adesão duradoura dos materiais restauradores aos diferentes substratos, entre eles, a dentina afetada por cárie. Neste trabalho, a adesão, a nanodureza e a qualidade da interface adesiva foram dependentes do tipo de substrato testado e do tempo de armazenamento dos corpos de prova; no entanto, não foram influenciados pelo tipo de tratamento realizado.

A análise do desempenho de sistemas adesivos autocondicionantes em dentina afetada por cárie é fundamental. Por se tratar de um tecido já desmineralizado, o condicionamento com ácido fosfórico, necessário nos sistemas adesivos condicione e lave, desmineraliza excessivamente a dentina afetada por cárie, impossibilitando a infiltração de monômeros resinosos em profundidade, deixando fibrilas de colágeno expostas e desprotegidas na base da camada híbrida (Fusayama 1991).

Neste trabalho foram selecionados dois sistemas adesivos autocondicionantes CF e SB, que possuem pH 2.7 e 2.0, respectivamente. Estes adesivos desmineralizam parcialmente a dentina, permanecendo uma considerável quantidade de cristais de hidroxiapatita ao redor das fibrilas colágenas (Tay e Pashley 2001). Ambos possuem em sua composição o monômero 10-Metacriloiloxidecil dihidrogênio fosfato (10-MDP), que interage quimicamente com a hidroxiapatita formando uma nano-camada estável, que é melhorada pela deposição do sal formado entre o MDP e o Cálcio favorecendo a estabilidade da adesão (Yoshida et al., 2012). O SB possui ainda na sua composição o copolímero do ácido polialcenóico, conhecido por Copolímero Vitrebond (VCP) e silano, que, teoricamente, em conjunto poderiam melhorar ainda mais a efetividade da adesão em dentina (Perdigao et al., 2014a). Assim, as peculiaridades de composição de tais adesivos foram determinantes na escolha dos mesmos para ensaio longitudinal em dentina afetada por cárie (Tay e Pashley 2001).

Independente do sistema adesivo utilizado - CF ou SB - ou dos tipos de tratamento realizados - controle, Laser 80 e Laser 50 - a adesão da dentina afetada por cárie foi menor comparada à dentina hígida. Ressalta-se que esta adesão foi ainda menor após o armazenamento em saliva artificial por 1 ano, para os dois

sistemas adesivos e para os tratamentos testados, exceto no tratamento controle com o SB, porém não consideramos esse resultado vantajoso, uma vez que os valores de RU encontrados inicialmente foram muito baixos. Contudo, a adesão à dentina hígida se manteve estável após armazenamento por 1 ano nas mesmas condições experimentais.

Estes achados estão de acordo com grande parte da literatura que avaliou a resistência de união em dentina afetada por cárie natural ou obtida artificialmente (Arrais et al., 2004; Pereira et al., 2006; Wang et al., 2006; Ergucu et al., 2009; Komori et al., 2009; Mobarak et al., 2010a; Mobarak et al., 2010b; Scholtanus et al., 2010; Mobarak e El-Badrawy 2011; Alves et al., 2013; Lenzi et al., 2015; Peixoto et al., 2015).

As lesões de cárie apresentam diferenças ultraestruturais entre as suas diferentes zonas e há grande subjetividade no critério comumente utilizado para guiar a remoção do tecido infectado, mantendo assim a dentina afetada por cárie. O uso de metodologias *in vitro* que produzam dentina afetada por cárie padronizada pode ser mais apropriado quando a adesão de materiais restauradores é avaliada através de estudos laboratoriais (Zanchi et al., 2010). O diferencial deste estudo foi utilizar um modelo *in vitro* de obtenção de dentina afetada por cárie através de uma monocultura bacteriana (Azevedo et al., 2011; Azevedo et al., 2014; Diniz et al., 2015). Apesar das respostas biológicas, tais como a oclusão dos túbulos dentinários (Marquezan et al., 2009), não serem reproduzíveis nessa metodologia, a literatura mostrou que os resultados obtidos em dentina afetada natural são semelhantes aos obtidos na dentina afetada por cárie artificial, validando assim a utilização desse modelo (Joves et al., 2013).

As características da dentina afetada por cárie justificam estes achados: maior quantidade de água presente no tecido (Ito et al., 2005); conteúdo de cálcio, fosfato e magnésio reduzidos (Nakajima et al., 2005), devido a sucessivos ciclos de desmineralização; elevado grau de porosidade na dentina intertubular (Sattabanasuk et al., 2005) e propriedades mecânicas reduzidas, tais como metade da dureza quando comparado à dentina hígida (Marshall et al., 2001; Nishitani et al., 2002; Joves et al., 2014). Consequentemente, esses fatores podem prejudicar a adesão química (Ito et al., 2005) a este tecido.

A constante presença de fluidos no interior dos túbulos dentinários e a perfusão destes pela dentina intertubular porosa na dentina afetada por cárie tornam

desafiadora a adesão a este tecido, já intrinsicamente úmido. Esse cenário favorece a degradação hidrolítica dos componentes resinosos dessa estrutura (polímeros e polipeptídeos do sistema adesivo) (Carrilho et al., 2004; Carrilho et al., 2005) e, ao mesmo tempo, é altamente propício à atuação de proteases (hidrolases) ligadas à matriz e/ou provenientes dos fluidos orais (Pashley et al., 2011). Assim, falhas das restaurações adesivas são resultado da deterioração combinada de parte da matriz orgânica da dentina e dos componentes resinosos.

Quanto maior a umidade do tecido, maior será a retenção de água e solventes no interior do adesivo, comprometendo seriamente a formação da camada híbrida (Yiu et al., 2005). Os monômeros hidrofílicos presentes nos sistemas adesivos são altamente propensos à sorção de água (Malacarne et al., 2006) e, mesmo com o passo de evaporação do solvente com leve jato de ar, água remanescente pode permanecer, interferindo na polimerização do sistema adesivo pela redução do grau de conversão, deixando monômeros residuais não reagidos, que são mais susceptíveis à lixiviação nessas regiões (Jacobsen e Soderholm 1995). Os adesivos parcialmente polimerizados ficam ainda mais permeáveis ao movimento dos fluidos, podendo acelerar a absorção de água e comprometer a integridade da união adesivo-resina ao longo do tempo (Cadenaro et al., 2005; Malacarne-Zanon et al., 2009).

A fácil movimentação da água no interior das camadas adesiva e híbrida enfraquece o polímero pela dilatação da rede, reduzindo as forças de fricção entre as cadeias poliméricas, possibilitando a saída dos monômeros não reativos. As moléculas de água absorvidas ficam presas na interface, formando as chamadas “árvores de água” (Tay e Pashley 2003), tanto na camada híbrida como na camada de adesivo, aumentando a porosidade da interface adesiva, com consequente redução da resistência adesiva e do módulo de elasticidade (Hashimoto et al., 2000). Estudos *in vivo* e *in vitro* revelaram que a camada híbrida criada em dentina é instável em ambientes aquosos decorrente do fenômeno de degradação hidrolítica tanto do adesivo, como da resina, conforme descrito anteriormente (Wang e Spencer 2003; Breschi et al., 2008; Tjaderhane et al., 2013).

A água oriunda de procedimentos operatórios interfere negativamente na formação da camada híbrida e durabilidade da restauração; mais que isso, quando a origem da água se dá a partir do tecido, acredita-se que sua influência seja ainda maior. Este trabalho confirma esta premissa, detectando degradação após 1 ano de

armazenamento das camadas híbridas formadas em dentina hígida e afetada por cárie, expressa através da redução dos valores de RU, da dentina afetada por cárie, e de nanodureza, em ambos os substratos.

Além da água, MMPs endógenas ligadas à matriz orgânica da dentina podem potencialmente degradar as fibrilas colágenas expostas na camada híbrida se desprotegidas pelos monômeros resinosos, fato ainda mais presente em dentina afetada por cárie. Uma vez que as MMPs também estão envolvidas na progressão das lesões de cárie através do desarranjo da matriz da dentina, considera-se que essas enzimas estão também diretamente envolvidas na desintegração das fibrilas colágenas não encapsuladas presentes na camada híbrida gerada pelos sistemas adesivos atuais (Carrilho et al., 2007b; Breschi et al., 2010; Tjaderhane et al., 2013).

Acidionalmente, os monômeros resinosos acídicos ativam formas latentes das MMPs pelo mecanismo de “cysteine-switch”, expondo os domínios catalíticos dessas enzimas que eram bloqueadas pelos propeptídeos. O baixo pH induzido pelos sistemas adesivos também proporciona excelentes condições para a ativação de cisteíno-catepsinas da dentina, também envolvidas no processo de degradação da camada híbrida ao longo do tempo e no aumento da atividade gelatinolítica da dentina (Tersariol et al., 2010).

A presença de fibrilas colágenas parcialmente desnaturadas em dentina afetada por cárie pelos produtos ácidos bacterianos e pelas metaloproteinases (MMPs) (Kuboki et al., 1977; Pashley et al., 2004) resulta em uma camada híbrida inconsistente e mais grossa (Hsu et al., 2008) contendo regiões de colágeno exposto sem infiltração adequada do sistema adesivo (Haj-Ali et al., 2006). Assim, a interface obtida em dentina afetada por cárie é ainda mais susceptível à degradação ao longo do tempo (Erhardt et al., 2008b).

Ambos os sistemas adesivos utilizados neste estudo promoveram a formação de camada híbrida em dentina afetada por cárie e hígida, sempre maior nesta última. A degradação ocorre em ambas, mas de forma mais contundente em dentina afetada do que em dentina hígida. As fotomicrografias obtidas em MEV das interfaces ilustram camadas híbridas irregularmente aderidas à dentina afetada por cárie em 24 horas. Após 1 ano de armazenamento detecta-se diminuição considerável na quantidade dos prolongamentos resinosos, com muitos deles fraturados e/ou destacados da dentina afetada por cárie. Na interface formada em

dentina hígida, observa-se redução na densidade dos prolongamentos resinosos, porém a camada híbrida permanece.

Atualmente, lesões de cárie secundária são consideradas a principal causa de troca de restaurações (Mazzoni et al., 2015), instalando-se o ciclo restaurador repetitivo. Dessa forma, para romper este processo, acredita-se que esforços devem ser empreendidos para melhorar a interação dos sistemas adesivos com a dentina, bem como a durabilidade das camadas híbridas formadas, atendendo aos pressupostos da filosofia de mínima intervenção.

A literatura mostra que a dentina afetada por cárie possui metade da dureza quando comparada à dentina hígida (Marshall et al., 2001; Nishitani et al., 2002; Joves et al., 2014). Neste trabalho, o teste de ultramicrodureza nos possibilitou reflexões interessantes no que concerne às camadas híbridas formadas nos substratos hígido e afetado por cárie, com os diferentes tratamentos utilizados ao longo do tempo. A dureza dos tecidos dentais é relacionada com o ganho ou a perda de minerais (Kodaka et al., 1992; Attin et al., 2007), e em estudos utilizando materiais resinosos, a dureza é utilizada para avaliação das propriedades relativas à composição, grau de polimerização (Chung 1990; Rode et al., 2007) e degradação superficial dos materiais (Yap et al., 2001).

O teste de ultramicrodureza foi introduzido como um método confiável para estudar as alterações nas propriedades mecânicas dos tecidos dentais mineralizados (Joves et al., 2014). Como a dentina, o sistema adesivo também não é um produto homogêneo, porque possui partículas inorgânicas imersas em toda sua matriz orgânica. Como um tecido biológico complexo, valores de nanoindentação de dentina são dependentes de vários fatores, incluindo a localização da indentação, a composição local do tecido, bem como os parâmetros utilizados (Marshall et al., 2001; Ryou et al., 2012). Neste trabalho, uma carga de 10mN foi usada para a avaliação da nanodureza do adesivo e da camada híbrida formada em dentina, a fim de não exceder a espessura destas camadas finas (Abe et al., 2015).

Os dados do nosso estudo nos permitem sugerir que a nanodureza das camadas híbridas produzidas com ambos os sistemas adesivos testados é menor em substrato afetado por cárie do que em substrato hígido. A explicação para esse achado está na diferença intrínseca de propriedades mecânicas das dentinas hígida e afetada por cárie (Joves et al., 2014). Como estes substratos apresentam

diferentes graus e qualidade de mineralização, sendo a dentina afetada por cárie hipomineralizada em relação à dentina hígida (Toledano et al., 2013), espera-se que a camada híbrida formada também seja diferente, acompanhando a característica do tecido.

Observamos também que os valores de NdCH reduziram muito com o armazenamento por 1 ano, para todos os tratamentos testados, em ambos os substratos. Acreditamos que a dentina afetada por cárie hipomineralizada gera uma camada híbrida inconsistente, que ao longo do tempo, sofre com a ativação das MMPs, já citadas anteriormente, que afetam ainda mais as propriedades mecânicas da matriz orgânica (Tjaderhane et al., 1998) havendo também aceleração da solubilização do cálcio (Scheffel et al., 2013). Além disso, os adesivos que penetraram nessa dentina ficam mais susceptíveis à degradação hidrolítica. Sabemos também que fatalmente a dentina hígida sofre com a degradação induzida pelas MMPs ao longo do tempo (Toledano et al., 2013), reduzindo assim, os valores de NdCH após 1 ano de armazenamento.

Avaliando a nanodureza das camadas de adesivos, pudemos observar que o sistema adesivo SB não sofre influência do tipo de substrato utilizado, do tratamento realizado e do tempo de armazenamento, ao passo que no sistema adesivo CF, somente foi observado efeito para o fator tempo de armazenamento, com redução dos valores de NdA após 1 ano. Acreditamos que essa redução de nanodureza do sistema adesivo CF se deu pelo fato deste sistema adesivo ser de dois passos, com um bond separado e de maior viscosidade, gerando uma camada de adesivo mais espessa e dividida em fases. Fatores tais como a composição química, o tipo de monômero utilizado, sua estrutura molecular (Van Meerbeek et al., 2011), o grau de polimerização atingido e as propriedades mecânicas da camada de bond podem ter influenciado nos resultados obtidos. Concordando com nossos resultados, autores (Anchieta et al., 2015) detectaram redução do módulo de elasticidade após 1 ano de armazenamento, através do ensaio de nanodureza do sistema adesivo CF.

Estudos longitudinais que utilizam o teste de ultramicrodureza em dentina afetada por cárie irradiada não foram localizados na literatura para que pudéssemos discutir diretamente nossos resultados. No entanto, a literatura mostra que para que haja redução das propriedades mecânicas do substrato irradiado, energias muito altas devem ser empregadas (Chinelatti et al., 2010). Assim, acreditamos que, por

termos utilizados parâmetros de tratamento com densidade de energia mais baixas, a irradiação não afetou a nanodureza das camadas híbridas formadas.

Diante do fato concreto da menor adesão à dentina afetada por cárie, nos propusemos a investigar o efeito da irradiação com laser de Er:YAG, com parâmetros de energias reduzidos sobre este tecido. Diversas características da dentina tratada com o laser de Er:YAG foram sugeridas como vantajosas para a adesão de materiais resinosos (Ceballo et al., 2002; Gurgan et al., 2009), tais como a formação de um substrato com superfície rugosa, não desmineralizada, com túbulos dentinários abertos, livre de camada de esfregaço, além da esterilização da superfície dental pela redução de contagem bacteriana (Ceballo et al., 2002). Os resultados de MEV de superfície confirmam as características morfológicas apontadas acima, concordando com diversos trabalhos na literatura (Sasaki et al., 2002; Armengol et al., 2003; Aranha et al., 2007; Freitas et al., 2007; Moretto et al., 2011; Baraba et al., 2013a).

Por outro lado, a irradiação dos tecidos dentais duros modifica a relação cálcio-fosfato, levando a formação de compostos mais estáveis e menos solúveis em ácido, expressos pela presença de dentina peritubular proeminente, reduzindo a susceptibilidade da ação dos monômeros ácidos, o que pode interferir na ação dos sistemas adesivos (Martinez-Insua et al., 2000; De Moor e Delme 2010). Quando em dentina afetada por cárie, já naturalmente menos mineralizada, supusemos que a modificação na relação cálcio-fosfato promovida pela irradiação poderia de alguma maneira rearranjar os cristais de hidroxiapatita, possibilitando melhor adesão a este tecido. Ressalta-se que o objetivo é apenas tratar superficialmente a dentina afetada por cárie, sem removê-la, com o benefício adicional e exclusivo da redução da microbiota existente no local (Lopes et al., 2015).

Neste trabalho, contudo, a RU, a NdA e a NdCH dos adesivos testados não foi influenciada pelos tratamentos de superfície com laser de Er:YAG, evidenciando que as alterações promovidas não são suficientes para comprometer nem melhorar a adesão aos substratos hígido e afetado por cárie. Ressalta-se que, sem considerar protocolo de irradiação, a adesão foi sempre menor em dentina afetada por cárie do que em dentina hígida, sendo este resultado observado em ambos os tempos de armazenamento.

Na literatura foi localizado apenas um trabalho (Koyuturk et al., 2014) que testa adesão em dentina afetada por cárie, utilizando laser de Er:YAG para remover a

dentina infectada. Contudo, diferenças fundamentais são observadas neste trabalho: experimento realizado em dentes decíduos naturalmente cariados, com inerente variabilidade; e, principalmente, a utilização de parâmetro de irradiação de preparo cavitário, removendo toda a dentina afetada, tornando-se impossível a comparação de resultados provenientes deste estudo. Assim, discutiremos a seguir outras abordagens do papel da irradiação na adesão à dentina.

Para uma avaliação aprofundada dos efeitos da irradiação com o laser de Er:YAG nos tecidos dentais duros, alguns fatores como a densidade de energia aplicada, distância focal, taxa de repetição, quantidade de irrigação durante irradiação e largura temporal de pulso devem ser levadas em consideração (Fried et al., 2002).

Um dos parâmetros mais influenciáveis no que diz respeito ao efeito ablativo e térmico dos lasers é a largura temporal de pulso (Staninec et al., 2006). A introdução da tecnologia de largura temporal de pulso variável para os lasers de Er:YAG (VSPT) possibilitou a geração de pulsos super curtos, com formato quadrangular e duração ajustável. O perfil dos pulsos é controlado e assegura que a potência entre os pulsos seja constante e que toda a energia emitida seja usada no processo de ablação (Baraba et al., 2013a). Autores (Trevelin et al., 2015) identificaram que a largura de pulso influencia na característica morfológica da dentina, observando maior irregularidade da dentina irradiada com largura de pulso de 50 μ s, sugerindo padrão micro retentivo mais apropriado para o sucesso da adesão. Por isso, este trabalho utilizou largura temporal de pulso de 50 μ s para os dois parâmetros de irradiação testados.

Ainda assim, estudos mostrando os efeitos sobre a adesão da aplicação do laser de Er:YAG com largura temporal de pulso curto são bastante variáveis e contraditórios (Majaron et al., 1998; Nishimoto et al., 2008; Firat et al., 2012; Baraba et al., 2013a). Mesmo quando a irrigação com água durante a aplicação do laser foi utilizada, sabe-se que larguras temporais de pulso maiores causaram maior dano térmico à superfície dental, tendo conseqüentemente um efeito adverso na resistência de união (Sarma et al., 2004). Desta forma, autores (Sheth et al., 2004) recomendaram a utilização de larguras temporais de pulso menores para preparo cavitário em dentina para se obter uma melhor adesão, permitindo uma ablação mais eficiente em comparação às larguras temporais de pulso maiores, onde o limiar

de ablação é aumentado devido a uma perda de condutividade do calor pela camada de interação.

Neste trabalho realizamos o tratamento dos substratos hígido e afetado por cárie com dois parâmetros, Laser 80 e Laser 50, ambos com largura temporal de pulso de 50 μ s. A escolha desses parâmetros se deu baseada em estudo piloto e na densidade de energia, uma vez que a literatura havia encontrado bons resultados utilizando 12,58J/cm² (Laser 80), sugerindo a necessidade de testar a utilização de densidades de energias ainda menores, dessa forma optamos em utilizar 9,4J/cm² (Laser 50) (Bahrami et al., 2011). O tratamento das superfícies com o laser de Er:YAG ajustado com largura temporal de pulso de 50 μ s, tanto no parâmetro Laser 80 como no parâmetro Laser 50 não exerceu influência na RU dos sistemas adesivos CF e SB, em ambos os substratos testados, ao longo do tempo.

As eletromicrografias de MET das superfícies tratadas irradiadas revelaram a prevalência de alterações nas camadas superficial - com derretimento e vaporização das fibrilas colágenas - e subsuperficial - desnaturação e fusão destas fibrilas (Ceballo et al., 2002; Moretto et al., 2011). Este resultado indica que, ao contrário do sugerido por autores (Baraba et al., 2013a), nem toda a energia transferida para o tecido foi utilizada no processo de ablação, havendo recondensação do produto de vaporização sobre a superfície, com dissipação de calor para o interior do tecido na forma de calor residual (Ceballo et al., 2002).

Autores (Ceballo et al., 2002) sugeriram que essas alterações podem comprometer a formação da interface adesiva. No entanto, observamos que as alterações ultraestruturais presentes em ensaio de MET, não afetaram negativamente os resultados obtidos de RU e nanodureza dos espécimes tratados com laser. Muito provavelmente, a pequena espessura desta camada alterada não foi suficiente para impedir a permeação dos monômeros resinosos dos sistemas adesivos testados, havendo formação de camada híbrida, detectada na MEV de interface para todos os grupos que, contudo, sofrem degradação significativa após armazenamento.

Através da MEV de interface, foi possível verificar ainda a presença de microfissuras horizontais propagadas na dentina peritubular de todos os espécimes de dentina hígida irradiados, diferente do padrão observado na dentina hígida não irradiada, que apresentou túbulos sem as microfissuras (Moretto et al., 2011). Estas alterações foram identificadas ao longo de toda a microscopia, com maior expressão

na porção superficial dos prolongamentos resinosos formados (Cardoso et al., 2008; Delme et al., 2009). De acordo com a física do processo de ablação, pode-se considerar que essas rachaduras são uma consequência do aumento de pressão na subsuperfície, através da vaporização da água e ejeção do material orgânico (Hibst e Keller 1989).

Durante o processo de hibridização das superfícies hígidas tratadas com laser, o adesivo penetrou nos túbulos dentinários, infiltrando nestas microfissuras, dando origem a um padrão característico para os prolongamentos resinosos, com a formação de anéis em torno das suas bases (de Oliveira et al., 2007), diferente dos prolongamentos visualizados no substrato hígido controle, resultante da penetração do adesivo nos canais acessórios. Vários estudos têm observado a presença desses prolongamentos resinosos modificados em dentina irradiada (Bertrand et al., 2004; Ramos et al., 2004; Aranha et al., 2007; de Oliveira et al., 2007; Moretto et al., 2011), não sendo, contudo, explicação para os resultados obtidos. Esperávamos encontrar menor quantidade de microfissuras utilizando largura temporal de pulso de 50 μ s (Bahrami et al., 2011; Lukac et al., 2012); no entanto, esses achados não prejudicaram nem beneficiaram a adesão dos materiais restauradores testados. Ressalta-se que estas formações não foram observadas em camada híbrida formada em dentina afetada por cárie.

Evidências recentes indicaram que a matriz colágena da dentina afetada por cárie durante sua desmineralização não fica tão intacta quanto se imaginou anteriormente (Vidal et al., 2014). No entanto, mesmo após perda de metade do seu conteúdo mineral (Mazzoni et al., 2015), alterações moleculares no colágeno ainda levam a crer na possibilidade de remineralização (Mazzoni et al., 2015). Uma verdadeira remineralização requer que cristais de apatita com tamanho nanométrico cresçam novamente nos espaços entre as fibrilas colágenas, o que foi provado ser uma tarefa difícil (Bertassoni et al., 2009). Neste trabalho, testamos uma estratégia para interferir neste processo utilizando o laser de Er:YAG de pulso super curto, porém sem sucesso. Assim, outras pesquisas são necessárias para propor novas estratégias para aumentar a adesão à dentina afetada por cárie de maneira mais efetiva e duradoura. Com base nestes resultados, ressalta-se ainda que, no momento, o efetivo selamento das margens das restaurações possui papel fundamental na manutenção da durabilidade da adesão.

7 CONCLUSÕES

1. Para ambos os sistemas adesivos testados e todos os tipos de tratamento realizados, a RU é menor em substrato afetado por cárie do que em dentina hígida, sendo estes dados quantitativos confirmados pelas imagens de MEV das interfaces adesivas.
2. O efeito do armazenamento por 1 ano se expressa de forma indiscutível reduzindo ainda mais os valores de RU e a integridade das camadas híbridas obtidas com os adesivos CF e SB, utilizados em dentina afetada por cárie tratada.
3. Os tratamentos realizados com Laser 80 e Laser 50 não exerceram influência na RU dos sistemas adesivos CF e SB, ao longo do tempo.
4. A nanodureza da camada de adesivo do CF foi igual para dentina hígida e afetada por cárie, quando avaliada após 24h. Contudo, após 1 ano de armazenamento, esta camada sofre degradação, com redução da NdA.
5. Para o sistema adesivo SB, a nanodureza da camada de adesivo não é influenciada por substratos, tratamentos e tempos de armazenamento.
6. A nanodureza das camadas híbridas produzidas com CF e SB é menor em substrato afetado por cárie do que em substrato hígido, que reduz muito com o armazenamento por 1 ano, para todos os tratamentos testados.
7. Ainda que os tratamentos com Laser 80 e Laser 50 promovam alteração superficial característica de ablação em ambas as dentinas estudadas, conforme observado em MEV de superfície, e alterações de fibrilas colágenas observadas em MET, há indicativos de que, nos parâmetros de irradiação utilizados, os sistemas adesivos autocondicionantes testados são capazes de interagir de forma semelhante com substratos irradiados ou não.

REFERÊNCIAS¹

Abe, AT, MN Youssef and ML Turbino. Effect of Bleaching Agents on the Nanohardness of Tooth Enamel, Composite Resin, and the Tooth-Restoration Interface. *Oper Dent*. 2015 Aug 12, 10.2341/14-153-L.

Akin, GE, S Herguner-Siso, M Ozcan, O Ozel-Bektas and H Akin. Bond strengths of one-step self-etch adhesives to laser-irradiated and bur-cut dentin after water storage and thermocycling. *Photomed Laser Surg*. 2012 Apr;30(4):214-221.

Ali, A, H El Deeb, O Badran and E Mobarak. Bond Durability of Self-etch Adhesive to Ethanol-Based Chlorhexidine Pretreated Dentin after Storage in Artificial Saliva and under Intrapulpal Pressure Simulation. *Oper Dent*. 2013 Jan 17, 10.2341/12-251-L.

Altunsoy, M, MS Botsali, T Sari and H Onat. Effect of different surface treatments on the microtensile bond strength of two self-adhesive flowable composites. *Lasers Med Sci*. 2014 Aug 14, 10.1007/s10103-014-1640-2.

Alves, FB, TL Lenzi, A Reis, AD Loguercio, TS Carvalho and DP Raggio. Bonding of Simplified Adhesive Systems to Caries-affected Dentin of Primary Teeth. *J Adhes Dent*. 2013 Jan 16, 10.3290/j.jad.a28880.

Amaral, R, M Ozcan, LF Valandro, I Balducci and MA Bottino. Effect of conditioning methods on the microtensile bond strength of phosphate monomer-based cement on zirconia ceramic in dry and aged conditions. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Apr;85(1):1-9.

Anchieta, RB, LS Machado, AP Martini, PH Santos, M Giannini, M Janal, N Tovar, RH Sundfeld, EP Rocha and PG Coelho. Effect of long-term storage on nanomechanical and morphological properties of dentin-adhesive interfaces. *Dent Mater*. 2015 Feb;31(2):141-153.

Aranha, AC, C De Paula Eduardo, N Gutknecht, MM Marques, KM Ramalho and C Apel. Analysis of the interfacial micromorphology of adhesive systems in cavities prepared with Er,Cr:YSGG, Er:YAG laser and bur. *Microscopy research and technique*. 2007 Aug;70(8):745-751.

Armengol, V, O Laboux, P Weiss, A Jean and H Hamel. Effects of Er:YAG and Nd:YAP laser irradiation on the surface roughness and free surface energy of enamel and dentin: an in vitro study. *Oper Dent*. 2003 Jan-Feb;28(1):67-74.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Armstrong, SR, MA Vargas, Q Fang and JE Laffoon. 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 Spring;5(1):47-56.

Arrais, CA, M Giannini, M Nakajima and J Tagami. Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine. *Eur J Oral Sci.* 2004 Oct;112(5):458-464.

Attin, T, H Betke, F Schippan and A Wiegand. Potential of fluoridated carbamide peroxide gels to support post-bleaching enamel re-hardening. *J Dent.* 2007 Sep;35(9):755-759.

Azevedo, CS, BU Garbui, CM Silva, MRS Lorenzetti, AZ de Freitas and AB Matos. Obtaining Artificially Caries-affected Dentin for in vitro Studies. *J Contemp Dent Pract.* 2014;15(1):12-19.

Azevedo, CS, LC Trung, MR Simionato, AZ Freitas and AB Matos. Evaluation of caries-affected dentin with optical coherence tomography. *Braz Oral Res.* 2011 Sep-Oct;25(5):407-413.

Bahrami, B, N Askari, M Tieleman, D Heysselaer, L Lamard, A Peremans, C Nyssen-Behets and S Nammour. Effect of low fluency dentin conditioning on tensile bond strength of composite bonded to Er:YAG laser-prepared dentin: a preliminary study. *Lasers Med Sci.* 2011 Mar;26(2):187-191.

Bakry, AS, M Nakajima, M Otsuki and J Tagami. Effect of Er:YAG laser on dentin bonding durability under simulated pulpal pressure. *J Adhes Dent.* 2009 Oct;11(5):361-368.

Baraba, A, W Dukic, N Chieffi, M Ferrari, I Anic and I Miletic. Influence of different pulse durations of Er:YAG laser based on variable square pulse technology on microtensile bond strength of a self-etch adhesive to dentin. *Photomed Laser Surg.* 2013a Mar;31(3):116-124.

Baraba, A, W Dukic, N Chieffi, M Ferrari, I Anic and I Miletic. Influence of Different Pulse Durations of Er:YAG Laser Based on Variable Square Pulse Technology on Microtensile Bond Strength of a Self-Etch Adhesive to Dentin. *Photomed Laser Surg.* 2013b Feb 19, 10.1089/pho.2012.3286.

Barceleiro, MO, JB de Mello, CL Porto, KR Dias and MS de Miranda. Hybrid layer thickness and morphology: Influence of cavity preparation with air abrasion. *Gen Dent*. 2011 Nov-Dec;59(6):e242-247.

Bertassoni, LE, S Habelitz, JH Kinney, SJ Marshall and GW Marshall, Jr. Biomechanical perspective on the remineralization of dentin. *Caries Res*. 2009;43(1):70-77.

Bertrand, MF, N Brulat, V Lazzarini, G Marcato, S Namour and JP Rocca. Er:YAG laser cavity preparation and semi-direct composite resin restoration: a microleakage study. *Photomed Laser Surg*. 2008 Oct;26(5):473-477.

Bertrand, MF, D Hessleyer, M Muller-Bolla, S Nammour and JP Rocca. Scanning electron microscopic evaluation of resin-dentin interface after Er:YAG laser preparation. *Lasers Surg Med*. 2004;35(1):51-57.

Bjorndal, L and EA Kidd. The treatment of deep dentine caries lesions. *Dental update*. 2005 Sep;32(7):402-404, 407-410, 413.

Bohari, MR, YK Chunawalla and BM Ahmed. Clinical evaluation of caries removal in primary teeth using conventional, chemomechanical and laser technique: an in vivo study. *J Contemp Dent Pract*. 2012;13(1):40-47.

Breschi, L, A Mazzoni, F Nato, M Carrilho, E Visintini, L Tjaderhane, A Ruggeri, Jr., FR Tay, S Dorigo Ede and DH Pashley. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater*. 2010 Apr;26(4):320-325.

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

Cadenaro, M, F Antonioli, S Sauro, FR Tay, R Di Lenarda, C Prati, M Biasotto, L Contardo and L Breschi. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci*. 2005 Dec;113(6):525-530.

Cardoso, MV, E Coutinho, RB Ermis, A Poitevin, K Van Landuyt, J De Munck, RC Carvalho, P Lambrechts and B Van Meerbeek. Influence of Er,Cr:YSGG laser treatment on the microtensile bond strength of adhesives to dentin. *J Adhes Dent*. 2008 Feb;10(1):25-33.

Carrilho, MR, RM Carvalho, MF de Goes, V di Hipolito, S Geraldeli, FR Tay, DH Pashley and L Tjaderhane. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. J Dent Res. 2007a Jan;86(1):90-94.

Carrilho, MR, RM Carvalho, FR Tay and DH Pashley. Effects of storage media on mechanical properties of adhesive systems. Am J Dent. 2004 Apr;17(2):104-108.

Carrilho, MR, RM Carvalho, FR Tay, C Yiu and DH Pashley. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. Am J Dent. 2005 Dec;18(6):315-319.

Carrilho, MR, S Geraldeli, F Tay, MF de Goes, RM Carvalho, L Tjaderhane, AF Reis, J Hebling, A Mazzoni, L Breschi and D Pashley. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. J Dent Res. 2007b Jun;86(6):529-533.

Ceballo, L, M Toledano, R Osorio, FR Tay and GW Marshall. Bonding to Er-YAG-laser-treated dentin. J Dent Res. 2002 Feb;81(2):119-122.

Celik, EU, Z Ergucu, LS Turkun and M Turkun. Shear bond strength of different adhesives to Er:YAG laser-prepared dentin. J Adhes Dent. 2006 Oct;8(5):319-325.

Chinelatti, MA, W Raucci-Neto, SA Corona and RG Palma-Dibb. Effect of erbium:yttrium-aluminum-garnet laser energies on superficial and deep dentin microhardness. Lasers Med Sci. 2010 May;25(3):317-324.

Chousterman, M, D Heysselaer, SM Dridi, F Bayet, B Misset, L Lamard, A Peremans, C Nyssen-Behets and S Nammour. Effect of acid etching duration on tensile bond strength of composite resin bonded to erbium:yttrium-aluminium-garnet laser-prepared dentine. Preliminary study. Lasers Med Sci. 2010 Nov;25(6):855-859.

Chung, KH. The relationship between composition and properties of posterior resin composites. J Dent Res. 1990 Mar;69(3):852-856.

da Silva, MP, MO Barceleiro, KR Dias and F Zanin. Shear bond strength of two adhesive systems bonded to Er:YAG laser-prepared dentin. Gen Dent. 2011 May-Jun;59(3):e96-100.

De Moor, RJ and KI Delme. Laser-assisted cavity preparation and adhesion to erbium-lased tooth structure: part 2. present-day adhesion to erbium-lased tooth structure in permanent teeth. J Adhes Dent. 2010 Apr;12(2):91-102.

de Oliveira, MT, PM de Freitas, C de Paula Eduardo, GM Ambrosano and M Giannini. Influence of Diamond Sono-Abrasion, Air-Abrasion and Er:YAG Laser Irradiation on Bonding of Different Adhesive Systems to Dentin. *Eur J Dent.* 2007 Jul;1(3):158-166.

de Oliveira, MT, AF Reis, CA Arrais, AN Cavalcanti, AC Aranha, C de Paula Eduardo and M Giannini. Analysis of the interfacial micromorphology and bond strength of adhesive systems to Er:YAG laser-irradiated dentin. *Lasers Med Sci.* 2013 Jul;28(4):1069-1076.

Delme, KI, MV Cardoso, A Mine, RJ De Moor and B Van Meerbeek. Transmission electron microscopic examination of the interface between a resin-modified glass-ionomer and Er:YAG laser-irradiated dentin. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr;27(2):317-323.

Diniz, IM, ID Horta, CS Azevedo, TR Elmadjian, AB Matos, MR Simionato and MM Marques. Antimicrobial Photodynamic Therapy: a promise candidate for caries lesions treatment. *Photodiagnosis and photodynamic therapy.* 2015 May 19, 10.1016/j.pdpdt.2015.04.006.

Ergucu, Z, EU Celik, N Unlu, M Turkun and F Ozer. Effect of Er,Cr:YSGG laser on the microtensile bond strength of two different adhesives to the sound and caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2009 Jul-Aug;34(4):460-466.

Erhardt, MC, JA Rodrigues, TA Valentino, AV Ritter and LA Pimenta. In vitro microTBS of one-bottle adhesive systems: sound versus artificially-created caries-affected dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008a Jul;86(1):181-187.

Erhardt, MC, M Toledano, R Osorio and LA Pimenta. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: effects of long-term water exposure. *Dent Mater.* 2008b Jun;24(6):786-798.

Espejo, LC, MR Simionato, LP Barroso, NG Netto and MA Luz. Evaluation of three different adhesive systems using a bacterial method to develop secondary caries in vitro. *Am J Dent.* 2010 Apr;23(2):93-97.

Esteves-Oliveira, M, DM Zezell, C Apel, ML Turbino, AC Aranha, P Eduardo Cde and N Gutknecht. Bond strength of self-etching primer to bur cut, Er,Cr:YSGG, and Er:YAG lased dental surfaces. *Photomed Laser Surg.* 2007 Oct;25(5):373-380.

Feitosa, VP, AA Leme, S Sauro, L Correr-Sobrinho, TF Watson, MA Sinhoreti and AB Correr. Hydrolytic degradation of the resin-dentine interface induced by the simulated pulpal pressure, direct and indirect water ageing. J Dent. 2012 Dec;40(12):1134-1143.

Fejerskov O, KE (2011). Cárie Dentária: A doença e seu tratamento clínico. São Paulo, Editora Santos.

Ferreira, LS, C Apel, C Francci, A Simoes, CP Eduardo and N Gutknecht. Influence of etching time on bond strength in dentin irradiated with erbium lasers. Lasers Med Sci. 2010 Nov;25(6):849-854.

Firat, E, S Gurgan and N Gutknecht. Microtensile bond strength of an etch-and-rinse adhesive to enamel and dentin after Er:YAG laser pretreatment with different pulse durations. Lasers Med Sci. 2012 Jan;27(1):15-21.

Freitas, PM, RS Navarro, JA Barros and C de Paula Eduardo. The use of Er:YAG laser for cavity preparation: an SEM evaluation. Microscopy research and technique. 2007 Sep;70(9):803-808.

Fried, D, N Ashouri, T Breunig and R Shori. Mechanism of water augmentation during IR laser ablation of dental enamel. Laser Surg Med. 2002;31(3):186-193.

Fried, D, J Ragadio and A Champion. Residual heat deposition in dental enamel during IR laser ablation at 2.79, 2.94, 9.6, and 10.6 microm. Lasers Surg Med. 2001;29(3):221-229.

Fusayama, T. Intratubular crystal deposition and remineralization of carious dentin. Journal de biologie buccale. 1991 Sep;19(3):255-262.

Fusayama, T and S Terachima. Differentiation of two layers of carious dentin by staining. J Dent Res. 1972 May-Jun;51(3):866.

Gama-Teixeira, A, MR Simionato, SN Elian, MA Sobral and MA Luz. Streptococcus mutans-induced secondary caries adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations in vitro. Braz Oral Res. 2007 Oct-Dec;21(4):368-374.

Gilmour, SM, DH Edmunds and PM Dummer. The production of secondary caries-like lesions on cavity walls and the assessment of microleakage using an in vitro microbial caries system. *J Oral Rehabil.* 1990 Nov;17(6):573-578.

Gurgan, S, A Kiremitci, FY Cakir, E Yazici, J Gorucu and N Gutknecht. Shear bond strength of composite bonded to erbium:yttrium-aluminum-garnet laser-prepared dentin. *Lasers Med Sci.* 2009 Jan;24(1):117-122.

Haj-Ali, R, M Walker, K Williams, Y Wang and P Spencer. Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. *J Prosthodont.* 2006 Mar-Apr;15(2):82-88.

Hamama, HH, CK Yiu and MF Burrow. Effect of chemomechanical caries removal on bonding of self-etching adhesives to caries-affected dentin. *J Adhes Dent.* 2014 Dec;16(6):507-516.

Hanabusa, M, A Mine, T Kuboki, Y Momoi, A Van Ende, B Van Meerbeek and J De Munck. Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. *J Dent.* 2012 Jun;40(6):475-484.

Hashimoto, M, H Ohno, M Kaga, K Endo, H Sano and H Oguchi. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *Journal of Dental Research.* 2000 Jun;79(6):1385-1391.

Hegde, VS and RA Khatavkar. A new dimension to conservative dentistry: Air abrasion. *J Conserv Dent.* 2010 Jan;13(1):4-8.

Heintze, SD and B Zimmerli. Relevance of in vitro tests of adhesive and composite dental materials. A review in 3 parts. Part 3: in vitro tests of adhesive systems. *Schweizer Monatsschrift fur Zahnmedizin = Revue mensuelle suisse d'odontostomatologie = Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia / SSO.* 2011;121(11):1024-1040.

Hibst, R and U Keller. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. *Lasers Surg Med.* 1989;9(4):338-344.

Hsu, KW, SJ Marshall, LM Pinzon, L Watanabe, E Saiz and GW Marshall. SEM evaluation of resin-cariou dentin interfaces formed by two dentin adhesive systems. *Dent Mater.* 2008 Jul;24(7):880-887.

Ikeda, T, J De Munck, K Shirai, K Hikita, S Inoue, H Sano, P Lambrechts and B Van Meerbeek. Effect of evaporation of primer components on ultimate tensile strengths of primer-adhesive mixture. *Dent Mater*. 2005 Nov;21(11):1051-1058.

Inoue, G, S Tsuchiya, T Nikaido, RM Foxton and J Tagami. Morphological and mechanical characterization of the acid-base resistant zone at the adhesive-dentin interface of intact and caries-affected dentin. *Oper Dent*. 2006 Jul-Aug;31(4):466-472.

Ishizaka, Y, T Eguro, T Maeda and H Tanaka. Effects of Er:YAG laser irradiation on human dentin: polarizing microscopic, light microscopic and microradiographic observations, and FT-IR analysis. *Lasers Surg Med*. 2002;31(3):171-176.

Ito, S, T Saito, FR Tay, RM Carvalho, M Yoshiyama and DH Pashley. Water content and apparent stiffness of non-caries versus caries-affected human dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Jan 15;72(1):109-116.

Jacobsen, T, A Norlund, GS Englund and S Tranaeus. Application of laser technology for removal of caries: a systematic review of controlled clinical trials. *Acta Odontol Scand*. 2011 Mar;69(2):65-74.

Jacobsen, T and KJ Soderholm. Some effects of water on dentin bonding. *Dent Mater*. 1995 Mar;11(2):132-136.

Jiang, Q, M Chen and J Ding. Comparison of tensile bond strengths of four one-bottle self-etching adhesive systems with Er:YAG laser-irradiated dentin. *Molecular biology reports*. 2013 Dec;40(12):7053-7059.

Joves, GJ, G Inoue, S Nakashima, A Sadr, T Nikaido and J Tagami. Mineral density, morphology and bond strength of natural versus artificial caries-affected dentin. *Dent Mater J*. 2013;32(1):138-143.

Joves, GJ, G Inoue, A Sadr, T Nikaido and J Tagami. Nanoindentation hardness of intertubular dentin in sound, demineralized and natural caries-affected dentin. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014 Apr;32:39-45.

Kameyama, A, K Aizawa, J Kato and Y Hirai. Tensile bond strength of single-step self-etch adhesives to Er:YAG laser-irradiated dentin. *Photomed Laser Surg*. 2009 Feb;27(1):3-10.

Keller, U, R Hibst, W Geurtsen, R Schilke, D Heidemann, B Klaiber and WH Raab. Erbium:YAG laser application in caries therapy. Evaluation of patient perception and acceptance. *J Dent.* 1998 Nov;26(8):649-656.

Kodaka, T, K Debari, M Yamada and M Kuroiwa. Correlation between microhardness and mineral content in sound human enamel (short communication). *Caries Res.* 1992;26(2):139-141.

Koliniotou-Koumpia, E, P Kouros, L Zafiriadis, E Koumpia, P Dionysopoulos and V Karagiannis. Bonding of adhesives to Er:YAG laser-treated dentin. *Eur J Dent.* 2012 Jan;6(1):16-23.

Komori, PC, DH Pashley, L Tjaderhane, L Breschi, A Mazzoni, MF de Goes, L Wang and MR Carrilho. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2009 Mar-Apr;34(2):157-165.

Koyuturk, AE, B Ozmen, M Cortcu, U Tokay, G Tosun and M Erhan Sari. Effects of Er:YAG laser on bond strength of self-etching adhesives to caries-affected dentin. *Microscopy research and technique.* 2014 Apr;77(4):282-288.

Kuboki, Y, K Ohgushi and T Fusayama. Collagen biochemistry of the two layers of carious dentin. *J Dent Res.* 1977 Oct;56(10):1233-1237.

Lenzi, TL, DP Raggio, FZ Soares and O Rocha Rde. Bonding Performance of a Multimode Adhesive to Artificially-induced Caries-affected Primary Dentin. *J Adhes Dent.* 2015 Apr;17(2):125-131.

Lopes, RM, LT Trevelin, SR da Cunha, RF de Oliveira, DM de Andrade Salgado, PM de Freitas, C de Paula Eduardo and AC Aranha. Dental Adhesion to Erbium-Lased Tooth Structure: A Review of the Literature. *Photomed Laser Surg.* 2015 Aug;33(8):393-403.

Lukac, M, NM Primc and S Pirnat. Quantum Square Pulse Er:YAG Lasers for Fast and Precise Hard Dental Tissue Preparation. *Journal of the Laser and Health Academy.* 2012, (1):14-21.

Luque-Martinez, IV, J Perdigao, MA Munoz, A Sezinando, A Reis and AD Loguercio. Effects of solvent evaporation time on immediate adhesive properties of universal adhesives to dentin. *Dent Mater.* 2014 Oct;30(10):1126-1135.

Mahoney, E, A Holt, M Swain and N Kilpatrick. The hardness and modulus of elasticity of primary molar teeth: an ultra-micro-indentation study. *J Dent*. 2000 Nov;28(8):589-594.

Majaron, B, D Sustercic, M Lukac, U Skaleric and N Funduk. Heat diffusion and debris screening in Er : YAG laser ablation of hard biological tissues. *Appl Phys B-Lasers O*. 1998 Apr;66(4):479-487.

Malacarne-Zanon, J, DH Pashley, KA Agee, S Foulger, MC Alves, L Breschi, M Cadenaro, FP Garcia and MR Carrilho. Effects of ethanol addition on the water sorption/solubility and percent conversion of comonomers in model dental adhesives. *Dent Mater*. 2009 Oct;25(10):1275-1284.

Malacarne, J, RM Carvalho, MF de Goes, N Svizero, DH Pashley, FR Tay, CK Yiu and MRD Carrilho. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dental Materials*. 2006 Oct;22(10):973-980.

Marquezan, M, FNP Correa, ME Sanabe, LE Rodrigues, J Hebling, AC Guedes-Pinto and FM Mendes. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Archives of Oral Biology*. 2009 Dec;54(12):1111-1117.

Marshall, GW, S Habelitz, R Gallagher, M Balooch, G Balooch and SJ Marshall. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentin. *J Dent Res*. 2001 Aug;80(8):1768-1771.

Martinez-Insua, A, L Da Silva Dominguez, FG Rivera and UA Santana-Penin. Differences in bonding to acid-etched or Er:YAG-laser-treated enamel and dentin surfaces. *J Prosthet Dent*. 2000 Sep;84(3):280-288.

Mazzoni, A, L Tjaderhane, V Checchi, R Di Lenarda, T Salo, FR Tay, DH Pashley and L Breschi. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015 Feb;94(2):241-251.

Melo, MA, JP Lima, VF Passos and LK Rodrigues. The influence of dentin demineralization on morphological features of cavities using Er:YAG laser. *Photomed Laser Surg*. 2015 Jan;33(1):22-28.

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

Mobarak, EH. Effect of chlorhexidine pretreatment on bond strength durability of caries-affected dentin over 2-year aging in artificial saliva and under simulated intrapulpal pressure. *Oper Dent*. 2011 Nov-Dec;36(6):649-660.

Mobarak, EH, W El-Badrawy, DH Pashley and H Jamjoom. Effect of pretest storage conditions of extracted teeth on their dentin bond strengths. *J Prosthet Dent*. 2010a Aug;104(2):92-97.

Mobarak, EH and WH El-Badrawy. Microshear Bond Strength of Self-etching Adhesives to Caries-affected Dentin Identified Using the Dye Permeability Test. *J Adhes Dent*. 2011 Nov 24, 10.3290/j.jad.a2242022420 [pii].

Mobarak, EH, DI El-Korashy and DH Pashley. Effect of chlorhexidine concentrations on micro-shear bond strength of self-etch adhesive to normal and caries-affected dentin. *Am J Dent*. 2010b Aug;23(4):217-222.

Moretto, SG, N Azambuja, Jr., VE Arana-Chavez, AF Reis, M Giannini, P Eduardo Cde and PM De Freitas. Effects of ultramorphological changes on adhesion to lased dentin-Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy analysis. *Microscopy research and technique*. 2011 Aug;74(8):720-726.

Munoz, MA, I Luque, V Hass, A Reis, AD Loguercio and NH Bombarda. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent*. 2013 May;41(5):404-411.

Nakabayashi, N, K Kojima and E Masuhara. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *Journal of biomedical materials research*. 1982 May;16(3):265-273.

Nakajima, M, Y Kitasako, M Okuda, RM Foxton and J Tagami. Elemental distributions and microtensile bond strength of the adhesive interface to normal and caries-affected dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Feb 15;72(2):268-275.

Nishimoto, Y, M Otsuki, M Yamauti, T Eguchi, Y Sato, RM Foxton and J Tagami. Effect of pulse duration of Er: YAG laser on dentin ablation. *Dent Mater J*. 2008 May;27(3):433-439.

Nishitani, Y, T Yamada, T Itota, H Shimizu, M Yoshiyama and DH Pashley. Resin adhesion to caries-affected and caries-infected dentin. *Journal of Dental Research*. 2002 Mar;81:A70-A70.

Oliver, WC and GM Pharr. An Improved Technique for Determining Hardness and Elastic-Modulus Using Load and Displacement Sensing Indentation Experiments. *J Mater Res*. 1992 Jun;7(6):1564-1583.

Otani, A, M Amaral, LG May, PF Cesar and LF Valandro. A critical evaluation of bond strength tests for the assessment of bonding to Y-TZP. *Dent Mater*. 2015 Jun;31(6):648-656.

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

Pashley, DH, FR Tay, C Yiu, M Hashimoto, L Breschi, RM Carvalho and S Ito. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *Journal of Dental Research*. 2004 Mar;83(3):216-221.

Peixoto, AC, AA Bicalho, CP Isolan, TT Maske, RR Moraes, MS Cenci, CJ Soares and AL Faria-e-Silva. Bonding of Adhesive Luting Agents to Caries-affected Dentin Induced by a Microcosm Biofilm Model. *Oper Dent*. 2015 May-Jun;40(3):E102-111.

Peiz, B, MK Schott and MH Niemz. Electro-optic mode locking of an erbium:YAG laser with a rf resonance transformer. *Appl Opt*. 1994 Jan 20;33(3):364-367.

Perdigao, J, C Kose, AP Mena-Serrano, EA De Paula, LY Tay, A Reis and AD Loguercio. A new universal simplified adhesive: 18-month clinical evaluation. *Oper Dent*. 2014a Mar-Apr;39(2):113-127.

Perdigao, J, MA Munoz, A Sezinando, IV Luque-Martinez, R Staichak, A Reis and AD Loguercio. Immediate adhesive properties to dentin and enamel of a universal adhesive associated with a hydrophobic resin coat. *Oper Dent*. 2014b Sep-Oct;39(5):489-499.

Perdigao, J, A Sezinando and PC Monteiro. Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. *Am J Dent*. 2012 Jun;25(3):153-158.

Pereira, PN, MF Nunes, PA Miguez and EJ Swift, Jr. Bond strengths of a 1-step self-etching system to caries-affected and normal dentin. *Oper Dent*. 2006 Nov-Dec;31(6):677-681.

Ramos, AC, M Esteves-Oliveira, VE Arana-Chavez and C de Paula Eduardo. Adhesives bonded to erbium:yttrium-aluminum-garnet laser-irradiated dentin: transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and tensile bond strength analyses. *Lasers Med Sci*. 2010 Mar;25(2):181-189.

Ramos, RP, MA Chinelatti, DT Chimello, MC Borsatto, JD Pecora and RG Palma-Dibb. Bonding of self-etching and total-etch systems to Er:YAG laser-irradiated dentin. Tensile bond strength and scanning electron microscopy. *Braz Dent J*. 2004;15 Spec No:S19-20.

Ramos, TM, TM Ramos-Oliveira, SG Moretto, PM de Freitas, M Esteves-Oliveira and C de Paula Eduardo. Microtensile bond strength analysis of adhesive systems to Er:YAG and Er,Cr:YSGG laser-treated dentin. *Lasers Med Sci*. 2013 Jan 26, 10.1007/s10103-012-1261-6.

Raucci-Neto, W, MA Chinelatti, IY Ito, JD Pecora and RG Palma-Dibb. Influence of Er:YAG laser frequency on dentin caries removal capacity. *Microsc Res Tech*. 2010 Jul 9;74(3):281-286.

Raucci-Neto, W, LM De Castro, AM Correa-Afonso, RS Da Silva, JD Pecora and RG Palma-Dibb. Assessment of thermal alteration during class V cavity preparation using the Er:YAG laser. *Photomed Laser Surg*. 2007 Aug;25(4):281-286.

Raucci-Neto, W, JD Pecora and RG Palma-Dibb. Thermal effects and morphological aspects of human dentin surface irradiated with different frequencies of Er:YAG laser. *Microscopy research and technique*. 2012 May 31, 10.1002/jemt.22076.

Rode, KM, Y Kawano and ML Turbino. Evaluation of curing light distance on resin composite microhardness and polymerization. *Oper Dent*. 2007 Nov-Dec;32(6):571-578.

Rodrigues, LK, JA Cury and M Nobre dos Santos. The effect of gamma radiation on enamel hardness and its resistance to demineralization in vitro. *Journal of oral science*. 2004 Dec;46(4):215-220.

Ryou, H, E Romberg, DH Pashley, FR Tay and D Arola. Nanoscopic dynamic mechanical properties of intertubular and peritubular dentin. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012 Mar;7:3-16.

Samad-Zadeh, A, M Harsono, A Belikov, KV Shatilova, A Skripnik, P Stark, C Egles and G Kugel. The influence of laser-textured dentinal surface on bond strength. *Dent Mater.* 2011 Oct;27(10):1038-1044.

Sano, H, T Shono, H Sonoda, T Takatsu, B Ciucchi, R Carvalho and DH Pashley. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater.* 1994 Jul;10(4):236-240.

Sarma, AV, M Staninec, CQ Le and D Fried. Infrared laser irradiation of dental enamel using sub-microsecond laser pulses with and without an applied water layer: Effect on bond strength to restorative materials. *P Soc Photo-Opt Ins.* 2004;5313:61-67.

Sasaki, KM, A Aoki, S Ichinose and I Ishikawa. Morphological analysis of cementum and root dentin after Er:YAG laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2002;31(2):79-85.

Sassi, JF, DT Chimello, MC Borsatto, SA Corona, JD Pecora and RG Palma-Dibb. Comparative study of the dentin/adhesive systems interface after treatment with Er:YAG laser and acid etching using scanning electron microscope. *Lasers Surg Med.* 2004;34(5):385-390.

Sattabanasuk, V, MF Burrow, Y Shimada and J Tagami. Resin adhesion to caries-affected dentine after different removal methods. *Aust Dent J.* 2006 Jun;51(2):162-169.

Sattabanasuk, V, Y Shimada and J Tagami. Bonding of resin to artificially carious dentin. *J Adhes Dent.* 2005 Autumn;7(3):183-192.

Scheffel, D, J Hebling, R Scheffel, K Agee, G Turco, C de Souza Costa and D Pashley. Inactivation of Matrix-bound Matrix Metalloproteinases by Cross-linking Agents in Acid-etched Dentin. *Oper Dent.* 2013 Jun 20, 10.2341/12-425-L.

Scholtanus, JD, K Purwanta, N Dogan, CJ Kleverlaan and AJ Feilzer. Microtensile bond strength of three simplified adhesive systems to caries-affected dentin. *J Adhes Dent.* 2010 Aug;12(4):273-278.

Shahabi, S, N Chiniforush, H Bahramian, A Monzavi, A Baghalian and MJ Kharazifard. The effect of erbium family laser on tensile bond strength of composite to dentin in comparison with conventional method. *Lasers Med Sci.* 2012 Apr 11, 10.1007/s10103-012-1086-3.

Sheth, KK, M Staninec, AV Sarma and D Fried. Selective targeting of protein, water and mineral in dentin using UV and IR pulse lasers: The effect on the bond strength to composite restorative materials. *P Soc Photo-Opt Ins.* 2004;5313:125-132.

Staninec, M, AK Gardner, CQ Le, AV Sarma and D Fried. Adhesion of composite to enamel and dentin surfaces irradiated by IR laser pulses of 0.5-35 micros duration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006 Oct;79(1):193-201.

Tachibana, A, MM Marques, JM Soler and AB Matos. Erbium, chromium:yttrium scandium gallium garnet laser for caries removal: influence on bonding of a self-etching adhesive system. *Lasers Med Sci.* 2008 Oct;23(4):435-441.

Tay, FR, R Frankenberger, I Krejci, S Bouillaguet, DH Pashley, RM Carvalho and CN Lai. Single-bottle adhesives behave as permeable membranes after polymerization. I. In vivo evidence. *J Dent.* 2004 Nov;32(8):611-621.

Tay, FR and DH Pashley. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater.* 2001 Jul;17(4):296-308.

Tay, FR and DH Pashley. Water treeing--a potential mechanism for degradation of dentin adhesives. *Am J Dent.* 2003 Feb;16(1):6-12.

Tersariol, IL, S Geraldeli, CL Minciotti, FD Nascimento, V Paakkonen, MT Martins, MR Carrilho, DH Pashley, FR Tay, T Salo and L Tjaderhane. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod.* 2010 Mar;36(3):475-481.

Tjaderhane, L, H Larjava, T Sorsa, VJ Uitto, M Larmas and T Salo. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998 Aug;77(8):1622-1629.

Tjaderhane, L, FD Nascimento, L Breschi, A Mazzoni, IL Tersariol, S Geraldeli, A Tezvergil-Mutluay, M Carrilho, RM Carvalho, FR Tay and DH Pashley. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. *Dent Mater.* 2013 Oct;29(10):999-1011.

Toledano, M, R Osorio, E Osorio, FS Aguilera, M Yamauti, DH Pashley and F Tay. Durability of resin-dentin bonds: effects of direct/indirect exposure and storage media. *Dent Mater.* 2007 Jul;23(7):885-892.

Toledano, M, S Sauro, I Cabello, T Watson and R Osorio. A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dent Mater.* 2013 Aug;29(8):e142-152.

Trevelin, LT, MM Marques, AC Aranha, VE Arana-Chavez and AB Matos. Effect of super short pulse Er:YAG laser on human dentin--Scanning electron microscopy analysis. *Microscopy research and technique.* 2015 Jun;78(6):472-478.

Van Meerbeek, B, J De Munck, Y Yoshida, S Inoue, M Vargas, P Vijay, K Van Landuyt, P Lambrechts and G Vanherle. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent.* 2003 May-Jun;28(3):215-235.

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

Vidal, CM, L Tjaderhane, PM Scaffa, IL Tersariol, D Pashley, HB Nader, FD Nascimento and MR Carrilho. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. *J Dent Res.* 2014 Mar;93(3):269-274.

Visuri, SR, JL Gilbert, DD Wright, HA Wigdor and JT Walsh, Jr. Shear strength of composite bonded to Er:YAG laser-prepared dentin. *J Dent Res.* 1996 Jan;75(1):599-605.

Wang, S, C Huang, TL Zheng, ZX Zhang, YN Wang and XR Cheng. [Microtensile bond strength and morphological evaluations of total-etch and self-etch adhesives to caries-affected dentin]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2006 Jun;41(6):323-326.

Wang, Y and P Spencer. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res.* 2003 Feb;82(2):141-145.

Yap, AU, SH Tan, SS Wee, CW Lee, EL Lim and KY Zeng. Chemical degradation of composite restoratives. *J Oral Rehabil.* 2001 Nov;28(11):1015-1021.

Yazici, AR, Z Yildirim, SA Antonson, E Kilinc, D Koch, DE Antonson, B Dayangac and G Ozgunaltay. Comparison of the Er,Cr:YSGG laser with a chemical vapour deposition bur and conventional techniques for cavity preparation: a microleakage study. *Lasers Med Sci.* 2012 Jan;27(1):23-29.

Ye, Q, JG Park, E Topp, Y Wang, A Misra and P Spencer. In vitro performance of nano-heterogeneous dentin adhesive. *J Dent Res.* 2008 Sep;87(9):829-833.

Yiu, CK, EL Pashley, N Hiraishi, NM King, C Goracci, M Ferrari, RM Carvalho, DH Pashley and FR Tay. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. *Biomaterials.* 2005 Dec;26(34):6863-6872.

Yoshida, Y, K Yoshihara, N Nagaoka, S Hayakawa, Y Torii, T Ogawa, A Osaka and BV Meerbeek. Self-assembled Nano-layering at the Adhesive interface. *J Dent Res.* 2012 Apr;91(4):376-381.

Zanchi, CH, RG Lund, LR Perrone, GA Ribeiro, FA del Pino, MB Pinto and FF Demarco. Microtensile bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems on sound and artificial caries-affected dentin. *Am J Dent.* 2010 Jun;23(3):152-156.

ANEXO A

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de parâmetros do laser de Er:YAG (SSP) para aumentar a adesão à dentina afetada por cárie: estudo longitudinal

Pesquisador: Cynthia Soares de Azevedo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12598913.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 252.625

Data da Relatoria: 20/03/2013

Apresentação do Projeto:

O objetivo deste trabalho é investigar a ação de diferentes parâmetros de irradiação com o laser de Er:YAG (Super Short Pulse-SSP) em diferentes tipos de dentina -hígida e afetada por cárie produzida artificialmente. A dentina oclusal planificada de 225 molares humanos inclusos será protegida com verniz ácido resistente na metade da face oclusal (dentina hígida: superfície controle) e na outra metade será produzida a lesão de cárie através do método microbiológico por 7 dias. Posteriormente, os diferentes parâmetros de condicionamento de superfície com o laser de Er:YAG (SSP) (Lightwalker AT, Fotona, Eslovenia) serão aplicados (G1 - sem condicionamento; G2 - 80mJ, 2Hz, 50us; G3 - 70mJ, 2Hz, 50us; G4 - 60mJ, 2Hz, 50us; G5 - 50mJ, 2Hz, 50us). A avaliação dos espécimes será realizada através de diferentes métodos: microscopia de superfície (MEV) (n=5),

avaliação morfológica da interface adesiva em MEV (n=5), microscopia eletrônica de transmissão (n=5), ensaio de ultramicrodureza (n=10) e ensaio de Resistência de União por microcissalhamento (n=20). Uma análise longitudinal será realizada para todos os ensaios após 6 meses de armazenamento, sendo esses dados comparados com os obtidos em 24 horas. Para montagem dos corpos de prova será utilizado um sistema autocondicionante (Clearfil SE Bond, Kuraray, Japão) em conjunto a uma resina composta (Z350 XT, 3M ESPE, EUA). Assim, pretende-se determinar um parâmetro de condicionamento com o Laser de Er:YAG (SSP) em dentina hígida e afetada por cárie com objetivo de melhorar a adesão e a durabilidade

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

das restaurações adesivas.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho é investigar a ação de diferentes parâmetros de irradiação com o laser de Er:YAG (Super Short Pulse-SSP) em diferentes tipos de dentina - hígida e afetada por cárie produzida artificialmente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para os sujeitos da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Através deste estudo pretende-se melhorar a adesão de materiais restauradores à dentina.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos obrigatórios, folha de rosto e carta de doação do banco de dentes, foram apresentados de maneira adequada.

Recomendações:

A Pesquisadora deve alterar o item riscos, pois o mesmo deve se referir ao paciente e não ao operador. Além disso, a pesquisadora citou que "Terminada a fase experimental os dentes serão descartados corretamente", com isto, pede-se que a pesquisadora acrescente que será seguida as normas adequadas para o descarte do material biológico.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado. Observar as normas de adequado descarte dos dentes.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

SAO PAULO, 23 de Abril de 2013

Assinador por:
Maria Gabriela Haye Blazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br