UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Odair Bim Júnior

**ESTRATÉGIAS PARA A ADIÇÃO DE RODAMINA B EM SISTEMAS
ADESIVOS**

Bauru
2013

Odair Bim Júnior

ESTRATÉGIAS PARA A ADIÇÃO DE RODMAINA B EM SISTEMAS ADESIVOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de concentração Dentística.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Linda Wang

Versão corrigida

Bauru
2013

Bim Júnior, Odair
B51e
Estratégias para a adição de rodamina B em
sistemas adesivos / Odair Bim Júnior -- Bauru, 2013.
138 p. : il. ; 30cm.

Dissertação. (Mestrado) -- Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Linda Wang

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Autorizo, exclusivamente, para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e/ou outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data: 27/05/2013

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP (Processo nº 118/2011) em reunião datada de 31 de agosto de 2011, conforme consta no anexo A.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Valéria e Odair, que merecem a partilha de todas as minhas realizações e conquistas, porque elas também são frutos de seus esforços, credibilidade e amor em mim depositados. Qualquer dádiva em minha vida é mais bem celebrada com o conforto bem intencionado do apoio de pai e mãe.

A meus avós, Myrtes e Eurico, pela devoção com que cuidaram (e cuidam) de mim a vida toda, torcendo para ver seu neto feliz e bem sucedido em suas escolhas.

Aos tios mais queridos, Mitze e Ladislau, pelo imenso carinho e pela participação efetiva na minha formação profissional.

A meu irmão, Felipe, um dos meus maiores admiradores e torcedores.

E ao Lucas Pessoa, quem me presenteou diariamente com sua companhia e, por meio de inúmeras conversas sinceras, ajudou-me a conquistar uma postura mais madura e equilibrada, para lidar com minhas responsabilidades (“Apenas tente não perder a sua razão”).

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Linda Wang, pela competência e por não ter medido esforços, para que eu tivesse excelentes recursos e oportunidades. Obrigado pelo incentivo, pela credibilidade e por ter compartilhado, com desprendimento, seus conhecimentos e experiências. Agradeço, também, a atenção especial concedida a este trabalho, permitindo que cada etapa fosse cumprida com mais qualidade.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Cebim, por ter se disposto a contribuir com o desenvolvimento desse trabalho, concedendo-me a oportunidade de ampliar as perspectivas de minha formação profissional. Agradeço, principalmente, pela serenidade e entusiasmo com que você compartilha seus conhecimentos!

À Prof.^a Dr.^a Maria Teresa Atta, por ser um referencial de verdadeira educadora. Além de ensinar com competência, você sabe participar da vida de seus alunos! Agradeço a sua disponibilidade e os esclarecimentos cedidos sempre com boa vontade. Você faz a gente se sentir em casa, Teresa!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”. (Cora Carolina)

AGRADECIMENTOS

À turma de mestrado, em primeiro lugar, pelo espírito de equipe e pela consideração que desenvolvemos uns pelos outros. Ana Flávia, Carla (loiríssima!), Carlos, Damaris, Diana, Juan, Marina, Rafael e Rapha, foi um prazer conviver com pessoas tão diferentes e que, justamente por isso, compartilharam preferências, costumes e alegrias de forma tão proveitosa. Obrigado a todos vocês pelo conforto que trouxeram a nossa convivência!

Carla Muller, dei sorte! Obrigado pela parceria e valiosa amizade! Sempre com um sorriso no rosto e algo bom a dizer, você é a companhia certa, pra hora do cafezinho à tarde, pra trocar ideias ao telefone, falar de planos... Muito obrigado!

Kiki, Diana, Carla, Rafael... Perdi a conta de quantas vezes foram solícitos comigo. Agradeço imensamente a atenção e a amizade!

À Leslie Casas, por ter sido muito prestativa e gentil em todas as vezes que precisei.

À Lu Francisconi, pelas conversas e materiais compartilhados. A qualidade de sua produção é referência para a minha!

À Camila Machado e Adriana Cruz, pela força que me deram no laboratório.

À Andreza Cristina Souza Silva e a Sérgio Luis Scarpari, por todas as vezes em que se prontificaram, gentilmente, a me ajudar com a realização dos testes e interpretação dos resultados. Muito obrigado e parabéns pela competência!

À Marcia Graeff, pelo profissionalismo na realização da análise microscópica e pela forma agradável de trabalhar.

À Larissa Tercilia Grizzo e Carlos Eduardo Repeke por terem viabilizado, constantemente, meu acesso aos departamentos de Bioquímica e Histologia.

Aos docentes do Departamento de Dentística, pelos ensinamentos transmitidos e pelas oportunidades que têm viabilizado com muito mérito a seus estudantes:

Prof. Dr. Áquira Ishikiriama

Prof. Dr. José Carlos Pereira

Prof. Dr. Carlos Eduardo Francischone

Prof. Dr. Eduardo Batista Franco

Prof. Dr. José Mondelli

Prof.^a Dr.^a Maria Fidela de Lima Navarro

Prof.^a Dr.^a Maria Teresa Atta

Prof.^a Dr.^a Linda Wang

Prof. Dr. Rafael Francisco Lia Mondelli

Prof. Dr. Sérgio Kiyoshi Ishikiriama

Ao Prof. Eduardo, especialmente, pela seriedade e pelo senso crítico com que nos incentivou a alcançar mais qualidade em nossas produções.

Aos professores do Departamento de Materiais Odontológicos Paulo Afonso Silveira Francisconi e Ana Flávia Sanches Borges, pelo caminhar compartilhado que agrega benefícios a nossa formação profissional.

Aos funcionários do Departamento de Dentística, Rita, Nelson, Natália, Audria, Charlene, Elizio, Zuleica e Lígia. Vocês tornam a convivência mais gostosa!

Aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos, Sandrinha e Alcides, pelas prosas descontraídas e pela colaboração.

Às funcionárias da clínica de pós-graduação, Cleusa e Hebe, pela consideração e colaboração.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação e à Maristela Ferrari, pela disposição em lidar com nossos processos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Prof. Dr. João Grandino Rodas, digníssimo Reitor da Universidade de São Paulo;

Ao Prof. Dr. Rubens Beçak, Secretário Geral da Universidade de São Paulo;

Ao Prof. Dr. José Carlos Pereira, Diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru;

Ao Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti, Presidente da Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo nº 2011/14971-2);

Ao Instituto de Química de Araraquara (IQ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Obrigado por terem colaborado direta, ou indiretamente com a realização deste trabalho, e por viabilizarem minha formação profissional com excelentes recursos.

Felicidade é quando o que você pensa,
o que você diz e o que você faz estão
em harmonia. (Mahatma Gandhi)

RESUMO

A rodamina B e outros marcadores fluorescentes vêm sendo empregados na avaliação morfológica da interface de adesão com o auxílio de microscopia confocal de varredura a laser. Acrescentando-se rodamina B a sistemas adesivos, é possível observar as características de espessura da camada de adesivo, micromorfologia da camada híbrida, extensão e quantidade de *tags*, bem como diagnosticar defeitos ou alterações na interface de adesão. A literatura revela, entretanto, uma falta de precedentes sobre as quantidades de marcadores nos componentes resinosos. Além disso, ainda não se avaliou o efeito da concentração de rodamina B sobre a qualidade da análise da interface de adesão, bem como sobre o comportamento fotofísico dos marcadores nos sistemas adesivos. Este estudo foi realizado com o propósito de sistematizar um método de adição de rodamina B a sistemas adesivos, incluindo-se estratégias para a determinação de concentrações mínimas de rodamina nos componentes resinosos, porém, ainda viáveis para a realização da análise morfológica da interface de adesão através de microscopia confocal de varredura a laser. Para tal, os sistemas adesivos não simplificados – e considerados padrão-ouro em suas categorias – Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose (convencional de três passos) e Clearfil™ SE Bond (auto-condicionante de dois passos) foram modificados com rodamina B em cinco diferentes concentrações: C₁ (0,5 mg/mL), C₂ (0,10 mg/mL), C₃ (0,02 mg/mL), C₄ (0,004 mg/mL) e C₅ (0,0008 mg/mL) e o comportamento fluorescente da rodamina nos adesivos foi avaliado tanto no âmbito espectroscópico (espectroscopia de fotoluminescência), como no âmbito microscópico (microscopia confocal de varredura a laser). Para a modificação dos adesivos, utilizou-se uma técnica precisa de proporcionamento na qual o marcador fluorescente foi incorporado às resinas fluidas a partir de soluções de rodamina B em etanol. Os espectros de fluorescência mostraram diferenças nos máximos das bandas de emissão e de excitação, de acordo com as concentrações de rodamina B em cada material dispersante. A análise microscópica dos espécimes em dentina confirmou que é possível utilizar sistemas adesivos contendo rodamina B em concentrações muitas vezes menores do que as mencionadas na literatura. Ambos os sistemas avaliados puderam ser visualizados, microscopicamente, quando marcados com rodamina B nas três concentrações pré-selecionadas para a

avaliação da interface de adesão: C₂ (0,10 mg/mL), C₃ (0,02 mg/mL) e C₄ (0,004 mg/mL), sendo que C₃ forneceu os melhores resultados em relação ao contraste e à saturação nas fotomicrografias. Concluiu-se que o comportamento fotofísico da rodamina B é influenciado tanto pela concentração, como pelo sistema adesivo no qual o marcador está dissolvido. A concentração de rodamina B também interfere na qualidade da análise morfológica da interface de adesão, sendo que o excesso do marcador pode dificultar a distinção de detalhes micromorfológicos.

Palavras-chave: Sistemas adesivos. Rodamina. Microscopia confocal. Espectroscopia de fluorescência. Diluição.

ABSTRACT

Strategies for adding rhodamine B to bonding agents

Rhodamine B and other fluorescent markers have been used for the assessment of the bonding interface via confocal laser scanning microscopy. By adding rhodamine into adhesive systems, it is possible to study morphological characteristics of the hybrid layer, the extent and amount of resin tags and the adhesive layer thickness, as well as detecting potential defects or alterations at bonding interface. Meantime the literature reveals lack of standards among the quantities of fluorescent markers in resin-based polymers. The effects of rhodamine B concentration on the quality of the microscopic analysis, as well as on the photophysics of labeled adhesive systems were not assessed up to now. This study aimed to systematize methodologies for adding rhodamine B into adhesive systems, including suitable strategies for determining the minimum serviceable rhodamine concentrations to perform the morphological analysis of the bonding interface. Two non-simplified adhesive system – considered gold standard categories – Adper[™] Scotchbond[™] Multi-Purpose (3 steps conventional) and Clearfil[™] SE Bond (2 steps self-etching) were modified with rhodamine B at five concentrations: C₁ (0.5 mg/ml), C₂ (0.10 mg/ml), C₃ (0.02 mg/ml), C₄ (0.004 mg/ml) and C₅ (0.0008 mg/ml) and the fluorescent behavior of the labeled resins was assessed both by photoluminescence spectroscopy and by confocal laser microscopy. The preparation of the labeled resins was proceed by means of a precise proportioning technique in which the fluorescent marker was incorporated into the bonding agents from solutions of rhodamine B in ethanol. The fluorescence spectra showed differences in the intensity and wavelength fluorescence according to the rhodamine B concentration. Microscopic analysis of the dentin specimens confirmed adhesive systems can be modified with rhodamine B at far lower concentrations than those mentioned in the literature. Both evaluated systems were microscopically visualized while labeled with Rhodamine B at three pre-selected concentrations: C₂ (0.10 mg/mL), C₃ (0.02 mg/ml) and C₄ (0.004 mg/ml), and C₃ offered the best outcome with respect to contrast and saturation in photomicrographs. It was concluded that the photophysical behavior of rhodamine B

depends on both the concentration and labeled adhesive system. The rhodamine B concentration also interferes with the quality of morphological analysis of the bonding interface, and the excess of the fluorescent marker may jeopardize the discrimination of morphological details.

Keywords: Adhesive systems. Rhodamine. Confocal microscopy. Fluorescence spectroscopy. Dilution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aspecto da dentina, evidenciando túbulos dentinários. MVT, x50/1.0 AN em óleo. Cópia de Watson e Boyde (1987a).....	30
Figura 2 -	Fotomicrografia mostrando túbulos dentinários. MVT, filtro de excitação 546 nm, sem filtro de emissão, x40/1.3 AN. Cópia de Watson (1989).	32
Figura 3 -	Mesmo campo da Figura 2. Fotomicrografia evidenciando a distribuição do sistema adesivo na interface dente-restauração, com a formação de tags. MVT com filtro de emissão 600 nm, x40/1.3 AN. Cópia de Watson (1989).....	33
Figura 4 -	Fotomicrografia mostrando a distribuição do adesivo (em verde) e do primer (em vermelho) marcados com fluoresceína e rodamina B respectivamente. (C) resina composta; (D) túbulos dentinários. MVT com filtros de barreira 520 nm (fluoresceína) e 600 nm (rodamina), x40/1.3. Cópia de Watson e Wilmot (1992).....	34
Figura 5 -	Imagem composta por sobreposição. Primer (P) marcado com luciferina; adesivo (A) marcado com rodamina B. MCVL, x 60/1.4 em óleo, PC 100 µm, filtros de emissão 546/600 nm. Cópia de Griffiths, Watson e Sherriff (1999).....	35
Figura 6 -	Presença de espaços “submicrômicos” (setas) na interface de adesão. MCVL. Cópia de Ding et al. (2010).	37
Figura 7 -	Micromorfologia da camada híbrida (A) registrada com rodamina B (no adesivo) e fluoresceína (solução via túbulos dentinários). (B) camada de adesivo, (C) resina composta, (D) tag, (E) túbulo marcado com fluoresceína. MEDF, x40/0.8 NA, PC 230 µm.	38
Figura 8 -	Soluções de rodamina B em etanol obtidas com diluições sucessivas.....	55

Figura 9 -	Esquema simplificado do funcionamento do espectrofluorímetro.	56
Figura 10 -	Filmes do adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose (mp) contendo rodamina B nas concentrações (mg/mL) C ₁ (0,50), C ₂ (0,10), C ₃ (0,02), C ₄ (0,004) e C ₅ (0,0008).	57
Figura 11 -	Filmes do adesivo Clearfil SE Bond (se) contendo rodamina B nas concentrações (mg/mL) C ₁ (0,50), C ₂ (0,10), C ₃ (0,02), C ₄ (0,004) e C ₅ (0,0008).	57
Figura 12 -	Transferência da alíquota de etanol para a lâmina de vidro.	60
Figura 13 -	Aspecto do molhamento, quando a lâmina de vidro não é friccionada, previamente, com a luva de látex.	60
Figura 14 -	Aspecto da massa de rodamina após a evaporação do etanol.	61
Figura 15 -	Transferência do adesivo sobre a massa de rodamina B.	61
Figura 16 -	Mistura do adesivo com a rodamina B.	62
Figura 17 -	Aspecto do sistema adesivo modificado após a homogeneização.	62
Figura 18 -	Sobreposição da lamínula de vidro.	63
Figura 19 -	Concentrações de rodamina B selecionadas para o estudo da interface de adesão.	65
Figura 20 -	Esquema dos cortes transversais no preparo das coroas.	67
Figura 21 -	(A) fenda central dividindo a superfície em duas metades, (B) fenda lateral para distinção do tratamento em cada metade.	68
Figura 22 -	Mistura de maiores quantidades de componentes sobre recipiente de vidro apropriado.	69

Figura 23 - Espécime de dentina confeccionado para microscopia. (A) fenda central separando as metades; (B) fenda lateral para diferenciação das metades; (C) camada de resina composta; (D) dentina; (E) câmara pulpar.	71
Figura 24 - Estratégias para a adição de rodamina B a sistemas adesivos.	72
Figura 25 - Fotomicrografias dos filmes mp . MCVL $\lambda_{\text{exc}}=532$ nm; intensidade do laser 10%; x40/1,15 AN em óleo.	78
Figura 26 - Fotomicrografias dos filmes se . MCVL. $\lambda_{\text{exc}}=532$ nm; intensidade do laser 10%; x40/1,15 AN em óleo.	78
Figura 27 - Representação do fenômeno de fluorescência (diagrama de Jablonski). S₀ : estado (singleto) fundamental, S₁ : estado excitado singleto de menor energia, S₂ : estado excitado singleto de maior energia.	88
Figura 28 - Ilustração do fenômeno de quenching fotoquímico.	91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Utilização de microscopia confocal em estudos com sistemas adesivos marcados. Dados retirados do quadro 2.....	39
Gráfico 2 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de emissão das soluções de etanol contendo rodamina B ($\lambda_{\text{EXC}}=532$ nm).....	75
Gráfico 3 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de emissão dos filmes de adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose ($\lambda_{\text{EXC}}=532$ nm).....	76
Gráfico 4 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de emissão dos filmes de adesivo Clearfil SE Bond ($\lambda_{\text{EXC}}=532$ nm).....	77
Gráfico 5 - Espectro de emissão (fotoluminescência) do filme mpC ₁	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Marcadores fluorescentes utilizados em microscopia confocal.....	36
Quadro 2 - Microscopia confocal no estudo da interface de adesão com sistemas adesivos marcados.	40
Quadro 3 - Utilização de marcadores fluorescentes em diferentes sistemas adesivos.	42
Quadro 4 - Materiais utilizados nas etapas experimentais e suas principais características.	51
Quadro 5 - Concentrações de rodamina B nos solventes.	53
Quadro 6 - Identificação dos filmes conforme o grupo de adesivo e a concentração de rodamina B.	58
Quadro 7 - Parâmetros utilizados no preparo dos filmes de adesivo modificado com rodamina B.	59
Quadro 8 - Parâmetros de técnica microscópica adotados na avaliação dos filmes.	64
Quadro 9 - Esquema de restauração das coroas de acordo com o sistema adesivo e a concentração de rodamina B.	66
Quadro 10 - Parâmetros para a modificação dos componentes resinosos de acordo com o grupo de coroas.	68
Quadro 11 - Instruções para a aplicação dos sistemas adesivos, segundo a bula dos fabricantes.	70
Quadro 12 - Resultados da análise microscópica com sistema Adper Scotchbond Multi-Purpose.	79
Quadro 13 - Resultados da análise microscópica com sistema Clearfil SE Bond.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Coordenadas x e y do máximo das bandas de emissão dos espectros no gráfico 2.	76
Tabela 2 -	Coordenadas x e y do máximo das bandas de emissão dos espectros no gráfico 3.	76
Tabela 3 -	Coordenadas x e y do máximo das bandas de emissão dos espectros no gráfico 4.	77

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

~	aproximadamente
μL	microlitro
μm	micrômetro
10-MDP	10-metacriloiloxidecil di-hidrogênio fosfato
AN	abertura numérica
Bis-EMA	bisfenol-A glicidil metacrilato etoxilato
Bis-GMA	bisfenol-A glicidil metacrilato
CH	camada híbrida
cm	centímetro
CRV	compósito reforçado por fibra de vidro (<i>fiber reinforced composite</i>)
D-R	dente-restauração
HEMA	2-hidroxietil metacrilato
L	litro
LED	diodo emissor de luz (<i>light-emitting diode</i>)
m	metro
M	molaridade (mol por litro)
MCVL	microscopia confocal de varredura a laser
MCVT	microscopia confocal de varredura tandem
MEDF	microscopia de excitação por dois fótons
mL	mililitro
mmol	milimol
MVT	microscópio de varredura tandem
mW	miliwatt
mW/cm ²	miliwatt por centímetro quadrado
n.c.	não consta
nm	nanômetro
°C	grau Celsius
°GL	grau Gay Lussac
PC	profundidade de campo
RC	resina composta
s	segundo
SA	sistema adesivo
UDMA	uretano dimetacrilato
unid. arb.	unidade arbitrária
W	watt
λ	comprimento de onda
λ _{EMI}	comprimento de onda de emissão
λ _{EXC}	comprimento de onda de excitação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
3	PROPOSIÇÃO	47
3.1	OBJETIVOS GERAIS	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1	MATERIAIS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.....	51
4.2	OBTENÇÃO DOS DENTES HUMANOS	52
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	52
4.3.1	<i>Preparo das soluções de rodamina B em etanol</i>	<i>53</i>
4.3.2	<i>Análise espectroscópica das soluções de rodamina B em etanol.....</i>	<i>56</i>
4.3.3	<i>Preparo de filmes de adesivo para análises espectroscópica e microscópica.....</i>	<i>56</i>
4.3.4	<i>Técnica de modificação de adesivos a partir de soluções de rodamina B em etanol.....</i>	<i>59</i>
4.3.5	<i>Análise espectroscópica dos filmes de adesivo.....</i>	<i>63</i>
4.3.6	<i>Análise microscópica dos filmes de adesivo.....</i>	<i>64</i>
4.3.7	<i>Preparo dos espécimes em dentina para a avaliação morfológica da interface de adesão</i>	<i>65</i>
4.3.8	<i>Análise da interface de adesão via microscopia confocal de varredura a laser 71</i>	
5	RESULTADOS	75
5.1	ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA DAS AMOSTRAS DE ETANOL E DOS FILMES DE ADESIVO.....	75
5.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS FILMES DE ADESIVO.....	77
5.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA DA INTERFACE DE ADESÃO	78

6	DISCUSSÃO	85
6.1	A TÉCNICA DE MODIFICAÇÃO DE SISTEMAS ADESIVOS A PARTIR DE SOLUÇÕES DE ETANOL.....	85
6.2	GENERALIDADES SOBRE O COMPORTAMENTO ÓTICO DA RODAMINA B NA MCVL ..	88
6.3	ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA.....	90
6.4	ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS FILMES DE ADESIVO.....	94
6.5	ANÁLISE MORFOLÓGICA DA INTERFACE DE ADESÃO VIA MCVL.....	95
7	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS.....	105
	APÊNDICES	115
	ANEXOS	137

1 Introdução

1 Introdução

O desvendamento de mecanismos pelos quais se estabelecem as interações físicas e químicas entre sistemas adesivos e substratos dentários é um processo essencial, para que se alcance a resolução de várias limitações ainda associadas a estes sistemas resinosos, com o propósito de aprimorá-los e permitir maior longevidade clínica. A contemplação visual da interface de adesão através de técnicas de microscopia confocal aliadas a marcadores fluorescentes é parte importante da história dessas investigações (WATSON, 1991; D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO et al., 2006b; DING et al., 2010; ALMAHDY et al., 2012). Esse tipo de microscopia tem permitido o estudo de vários mecanismos, características e fenômenos vinculados aos processos de adesão em esmalte e em dentina, desde a simples observação de aspectos morfológicos da união micromecânica em cada um desses tecidos (WATSON; BOYDE, 1987c; GRIFFITHS; WATSON, 1995; SAURO et al., 2010) até a detecção de defeitos na interface de adesão (DÖRFER et al., 2000; SAURO et al., 2008; DING et al., 2010).

Duas técnicas de microscopia confocal – a microscopia confocal de varredura tandem (MCVT) e a microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) – foram pioneiras e se popularizaram no estudo de biomateriais e tecidos duros, basicamente, por terem simplificado as manobras de preparo de espécimes e oferecido notável melhoria no contraste e na resolução das imagens, especialmente quando da associação com marcadores fluorescentes (WHITE et al., 1987; PIOCH et al., 1997; WATSON et al., 2000; SAURO et al., 2008). Outro avanço foi a capacidade de executar a varredura tanto de superfície, como de subsuperfície, sem a necessidade de se providenciar qualquer modificação no espécime durante a análise (WATSON, 1997). Vários planos focais, em diferentes profundidades, podem ser contemplados separadamente e, então, reagrupados em uma mesma imagem com o auxílio de computação, uma vez que os equipamentos atuais são sistemas óticos e eletrônicos completamente integrados (INOUE, 2006).

A vantagem de se associar o fenômeno da fluorescência à microscopia confocal é permitir a pré-seleção das estruturas do espécime as quais ganharão destaque durante a análise. Para isso, é necessário que se prepare os espécimes

rotulando-os, quimicamente, com um marcador fluorescente que permitirá a detecção específica da estrutura a ser analisada. Os marcadores são compostos químicos cujas moléculas apresentam alguns grupos (aromáticos normalmente) capazes de absorver energia radiante em determinados comprimentos de onda e transformarem parte dessa energia em fótons de maiores comprimentos de onda – na região visível do espectro comumente (LAKOWICZ, 2006b; PAWLEY, 2006; NECKERS; CAI, 2009). Assim, ao se fornecer energia aos fluoróforos por meio de uma fonte de luz apropriada, como o laser do microscópio confocal, promove-se a fluorescência do conteúdo marcado no espécime. Somando-se isso às demais características da MCVL, o resultado final é um ganho significativo na resolução da imagem e no contraste entre a estrutura marcada quimicamente e os demais componentes no espécime.

Neste contexto, na área da Dentística, tornou-se comum a inclusão de marcadores fluorescentes diretamente em sistemas adesivos (WATSON, 1989; D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO et al., 2006a; FOXTON et al., 2008). Uma vez que esses produtos foram marcados quimicamente, também se tornou possível estudar uma série de aspectos morfológicos microscópicos das restaurações adesivas, bem como associar a análise morfológica ao estudo de outras características dos sistemas resinosos e suas interações com os substratos aderidos (PIOCH et al., 1999; DING et al., 2010; SAMPAIO et al., 2011).

Dentre os marcadores, a rodamina B vem sendo empregada com maior frequência e em associação com a MCVL (D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO et al., 2006b). Prontamente solúvel em água e solventes orgânicos, a rodamina pode ser utilizada em baixas concentrações quando da modificação de sistemas adesivos, devido ao fato de manifestar excelentes propriedades fotofísicas, como coeficiente de extinção molar e rendimento quântico elevados (DREXHAGE, 1973; SNARE et al., 1982; ZHENG et al., 2012). Quando um sistema adesivo é modificado, experimentalmente, pela adição de rodamina, os fluoróforos se distribuem pela resina fluida de forma que continue a existir um sistema homogêneo e, após a reação de polimerização do adesivo, essas moléculas ficam retidas na rede polimérica, marcando-a quimicamente. Com isso, espécimes em esmalte e/ou dentina podem ser confeccionados, para se estudar a distribuição dos componentes resinosos (*primers* e adesivos) naqueles tecidos dentários e aspectos da união micromecânica e hibridização. Em se tratando de dentina, é possível contemplar a

extensão, espessura e quantidade de *tags* de resina, bem como a região da camada híbrida. Além disso, podem-se detectar defeitos e alterações na interface de adesão, como a ocorrência de zonas de incompleta infiltração de monômeros na dentina desmineralizada, onde as fibrilas de colágeno permanecem expostas e desprotegidas (SAURO et al., 2010).

Algumas inconsistências têm sido observadas na associação entre sistemas adesivos e marcadores fluorescentes. A mais bem aludida delas, até então, se refere à quantidade de marcadores adicionada nos componentes resinosos. As maiores contribuições acerca desse tema surgiram no ano de 2006 apenas, quando se chamou a atenção para a ausência de consenso a respeito das concentrações de diversos marcadores fluorescentes em sistemas adesivos (D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO et al., 2006b), bem como se evidenciou a influência da concentração de rodamina B sobre algumas características físico-químicas de um adesivo convencional simplificado previamente marcado (D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO et al., 2006a).

De fato, verifica-se que, na maioria dos estudos publicados, a quantidade de marcador fluorescente adicionada nos adesivos pareceu ter sido selecionada de forma assistemática, ou empírica. Faltam evidências de eventuais efeitos da concentração de rodamina B (nos componentes resinosos) sobre a qualidade da análise da interface adesiva via MCVL, bem como sobre uma série de propriedades dos sistemas adesivos que mantêm relação direta com o processo de adesão. Sabe-se que esse processo se baseia, fundamentalmente, em características físico-químicas tanto do substrato dentário previamente condicionado (MARSHALL et al., 1997; SAURO et al., 2010), como dos componentes resinosos a serem infiltrados (WANG et al., 2007; PARK et al., 2011). Ângulo de contato, molhamento, viscosidade, hidrofília, dentre outros, são conceitos diretamente ligados à dinâmica pela qual os adesivos permeiam os substratos aderentes afins (YE et al., 2007; MARSHALL et al., 2010). Modificar qualquer característica de fábrica dos sistemas adesivos pode significar, também, corromper o padrão morfológico da interface de adesão, que é observado microscopicamente.

Outro ponto bastante negligenciado diz respeito à falta de evidências sobre o comportamento fotofísico da rodamina B (e de outros marcadores fluorescentes) quando dissolvida em diferentes adesivos. A emissão de fluorescência é um fenômeno influenciado por vários fatores, como a polaridade, viscosidade e pH das

soluções (microambiente) e ,inclusive, pela própria concentração do marcador fluorescente (VALEUR, 2002). Embora esse tema não venha sendo considerado nos estudos com sistemas adesivos marcados, sabe-se que materiais sobrecarregados com marcador fluorescente podem apresentar supressão da fluorescência (PETIT; DENIS-GAY; RATINAUD, 1993; WATSON, 1997; TSIEN; ERNST; WAGGONER, 2006). Estudos da área química mostram que a intensidade da fluorescência depende da concentração de fluoróforos nos materiais dispersantes, sendo que soluções menos concentradas podem, eventualmente, promover emissões semelhantes, ou até mais intensas do que soluções sobrecarregadas (SNARE et al., 1982).

O conhecimento do comportamento fotofísico dos marcadores fluorescentes quando dissolvidos nos adesivos poderia proporcionar informações relevantes para a determinação das condições ideais da análise via MCVL, buscando-se a melhor relação entre intensidade da fluorescência e concentração do marcador, conforme as condições experimentais. Encontrar faixas de concentrações mínimas, mas ainda capazes de permitir uma análise microscópica apropriada, é um passo importante e que deve anteceder, inclusive, o estudo do efeito do marcador fluorescente sobre quaisquer propriedades dos sistemas adesivos, embora esta estratégia ainda não tenha sido adotada.

Além da discussão sobre a quantidade de marcador fluorescente nos adesivos, pode-se chamar a atenção para a maneira como os marcadores têm sido adicionados aos componentes resinosos. Especificações detalhadas sobre o proporcionamento de massa do marcador e volume das soluções (*primers* ou adesivos) são raras na literatura (D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO et al., 2006b); um fato que dificulta a reprodução dos experimentos e a viabilidade de se estabelecer comparações entre os estudos.

Diante do exposto, este trabalho apresenta novas estratégias para a adição de marcadores fluorescentes a sistemas adesivos, com foco na determinação das condições ideais da análise microscópica, incluindo-se o detalhamento de um método de adição de rodamina B a partir de soluções de etanol.

2 Revisão de Literatura

2 Revisão de Literatura

A observação microscópica da morfologia da interface de adesão tem sido uma das estratégias fundamentais na compreensão dos mecanismos pelos quais se estabelecem as interações físicas e químicas entre sistemas adesivos e substratos dentários. As primeiras evidências da formação da camada híbrida e de *tags* foram retratadas em fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (NAKABAYASHI; KOJIMA; MASUHARA, 1982) e de microscopia eletrônica de transmissão (MET) (NAKABAYASHI, 1985). Estes tipos de microscopia, desde então, têm contribuído no estudo de vários processos relacionados à adesão em substratos dentários (VAN MEERBEEK et al., 1993; GIACHETTI; BERTINI; SCAMINACI RUSSO, 2004; SAURO et al., 2008). Apesar do incremento na resolução oferecido por ambas as técnicas, existe uma série de exigências acerca do preparo de espécimes, as quais podem acarretar artefatos, ou mesmo corromper as estruturas preparadas para análise (WATSON; BOYDE, 1991; PIOCH et al., 1997). Neste sentido, a microscopia confocal se apresentou, desde o princípio, como uma poderosa alternativa para o estudo morfológico da interface de adesão, simplificando o preparo dos espécimes e permitindo que eles permanecessem intactos para a análise (WATSON, 1991, 1997). A associação a marcadores fluorescentes, comum nas técnicas de microscopia confocal, viabilizou o desenvolvimento de estratégias inovadoras de observação da interface, incluindo a marcação química de sistemas adesivos (D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO et al., 2006b).

Boyde e Watson foram pioneiros na aplicação de microscopia confocal ao estudo da interface dente-restauração (WATSON; BOYDE, 1987b; WATSON, 1991). As primeiras fotomicrografias publicadas foram obtidas a partir de um microscópio de varredura tandem (MVT), que operava no modo de reflexão de luz (WATSON; BOYDE, 1987a). Entretanto, o seu diferencial era que, por se tratar de um microscópio confocal, apenas um ponto em determinada profundidade da amostra era iluminado, e não mais o campo todo. A luz refletida do plano focal era captada e os pontos fora de foco rejeitados, resultando em melhor resolução para as análises (WATSON; BOYDE, 1987b).

As primeiras publicações tanto trataram de divulgar esta nova forma de representação da interface dente-restauração (**figura 1**), como destacavam as vantagens da técnica microscópica.

Figura 1 - Aspecto da dentina, evidenciando túbulos dentinários. MVT, x50/1.0 AN em óleo. Cópia de Watson e Boyde (1987a).

Além do incremento na resolução, a microscopia confocal havia simplificado o preparo dos espécimes em esmalte e dentina em comparação com a MEV e a MET, eliminando, inclusive, a necessidade da realização de cortes seriados (WATSON; BOYDE, 1987a; WATSON; BOYDE, 1991). Com o MVT, era possível realizar a varredura de vários planos focais consecutivos, sem a necessidade de se tocar no espécime durante a análise, produzindo imagens de camadas desde a superfície até uma determinada profundidade, o que também não era alcançado com a microscopia eletrônica. Outra vantagem para os espécimes em esmalte e em dentina é que eles poderiam ser analisados úmidos, evitando-se a ocorrência de artefatos na interface de união (PIOCH et al., 1997).

As evidências sobre o benefício da associação entre marcadores fluorescentes e microscopia confocal (WHITE; AMOS; FORDHAM, 1987; WRIGHT et al., 1989) não tardaram a repercutir nas estratégias de avaliação da interface dente-restauração. Assim, a adição de marcadores fluorescentes a sistemas adesivos foi a primeira delas, criada com a finalidade de melhorar a visualização da distribuição dos componentes resinosos na interface de adesão (D'ALPINO;

PEREIRA; SVIZERO et al., 2006b). Em um dos primeiros estudos sobre este tema (WATSON; BOYDE, 1987c), o sistema adesivo Scotchbond, da época, foi acrescido de rodamina B e empregado na restauração de cavidades cervicais em terceiros molares extraídos, para que a interface dente-restauração pudesse ser analisada no MVT. Uma lâmpada de mercúrio foi utilizada com alguns filtros de excitação, permitindo a execução da análise das restaurações no modo de fluorescência, como era denominado. Esses filtros serviam para que os espécimes fossem iluminados somente por comprimentos de onda relevantes no desencadeamento da fluorescência do adesivo, de acordo com as características de cada marcador fluorescente. Desta forma, o conteúdo marcado era visualizado por fluorescência, e não por reflexão da luz. As demais estruturas dentárias não marcadas foram observadas, convencionalmente, sem o emprego de filtro algum. Os autores concluíram que o funcionamento do MVT no modo de fluorescência havia facilitado a visualização do sistema adesivo, e que a possibilidade de se comparar imagens obtidas pelo modo convencional de reflexão da luz com as obtidas por fluorescência seria um importante meio de controle nos experimentos. Informações sobre a concentração do marcador fluorescente nos componentes resinosos e sobre a forma com que foram misturados não constaram na descrição do método, ainda que se tratasse de uma publicação incipiente.

No princípio, as fotomicrografias conseguidas com o MVT aliado a marcadores fluorescentes mostravam alguns detalhes da distribuição dos componentes resinosos (marcados) pelo esmalte e pela dentina, incluindo a espessura da camada de adesivo e a ocorrência de *tags* de resina, caracterizando certos aspectos da união micromecânica. Contudo, aqueles resultados ainda estavam longe de alcançar a qualidade das imagens a serem produzidas com a MCVL mais tarde (PIOCH et al., 1997; SAMPAIO et al., 2011). De qualquer forma, Boyde e Watson definiram as bases da aplicação de fluorescência no estudo da interface de adesão (WATSON; BOYDE, 1987b; WATSON; BOYDE, 1991).

Para melhorar o desempenho do MVT no modo de fluorescência, além dos filtros de excitação, os filtros de emissão (de barreira) passaram a ser empregados conjuntamente. Eles serviam para barrar a luz refletida do espécime, visando-se a passagem de emissões resultantes da fluorescência somente. Isso permitia contraste total entre os componentes marcados e um fundo escuro (a parte barrada da amostra). O resultado desta tática pode ser observado no trabalho de Watson

(1989). O *primer* e o adesivo do antigo sistema Scotchbond 2 foram modificados com marcadores fluorescentes. Espécimes em esmalte e dentina foram confeccionados para a análise microscópica, alternando-se os esquemas de aplicação dos componentes adesivos, ora com apenas o *primer* marcado, ora com apenas o adesivo, ora com ambos. Em alguns casos, o tipo de marcador fluorescente utilizado também foi variado. As imagens obtidas sem o filtro de emissão permitiram a observação das estruturas dentárias, porém, sem haver distinção entre elas e o sistema adesivo (**figura 2**). Já a utilização de filtros de emissão possibilitou uma melhor compreensão do aspecto da interface de adesão, dando destaque para a distribuição dos componentes resinosos marcados (**figura 3**).

Figura 2 - Fotomicrografia mostrando túbulos dentinários. MVT, filtro de excitação 546 nm, sem filtro de emissão, x40/1.3 AN. Cópia de Watson (1989).

Figura 3 - Mesmo campo da Figura 2. Fotomicrografia evidenciando a distribuição do sistema adesivo na interface dente-restauração, com a formação de *tags*. MVT com filtro de emissão 600 nm, x40/1.3 AN. Cópia de Watson (1989).

Sem dúvidas, os filtros de emissão beneficiavam a distinção dos componentes resinosos na amostra. Todavia, as imagens obtidas ainda não apresentavam riqueza de detalhes da interface de adesão, como a possibilidade de visualizar a micromorfologia da camada híbrida, por exemplo.

A utilização de diferentes filtros de passagem incrementou, também, o desenvolvimento de estratégias de dupla marcação (WATSON; BOYDE, 1991), ou seja, marcadores fluorescentes com espectros de emissão distintos (ou parcialmente distintos) poderiam ser adicionados, cada qual, no *primer* e no adesivo, separadamente, a fim de serem analisados com o auxílio de filtros compatíveis com tais características. Essa estratégia foi adotada em um estudo da interface de adesão formada com o sistema adesivo Syntac (WATSON; WILMOT, 1992). Diferentes esquemas de marcação dupla foram elaborados, utilizando-se rodamina B e fluoresceína, separadamente, no *primer* e no adesivo. Variando-se os filtros de passagem, foi possível detectar diferenças na distribuição dos componentes

resinosos, sendo que o *primer* e o adesivo nem sempre preencheram as mesmas regiões da interface (**figura 4**).

Figura 4 - Fotomicrografia mostrando a distribuição do adesivo (em verde) e do *primer* (em vermelho) marcados com fluoresceína e rodamina B respectivamente. (C) resina composta; (D) túbulos dentinários. MVT com filtros de barreira 520 nm (fluoresceína) e 600 nm (rodamina), x40/1.3. Cópia de Watson e Wilmot (1992).

Uma limitação da técnica de dupla marcação foi mencionada, mais tarde, em um estudo morfológico da interface de adesão, em dentina, com o sistema adesivo Scotchbond MP (GRIFFITHS; WATSON, 1995). Naquela ocasião, o *primer* e o adesivo foram marcados com rodamina B e fluoresceína respectivamente. Nas fotomicrografias, observaram-se boa penetração e adaptação dos componentes resinosos, com a formação de uma camada híbrida com 3-4 μm de espessura. Entretanto, por meio da análise seletiva com diferentes filtros de emissão, constatou-se que o *primer* foi, algumas vezes, removido pela aplicação do adesivo, ou incorporado a ele. Isso remete ao fato de que o *primer*, não sendo fotopolimerizável naquele sistema, possa ter permitido a difusão do marcador fluorescente nele dissolvido para o adesivo no momento da aplicação. Uma vez que essa difusão ocorra, presume-se que os marcadores fluorescentes não estabelecem ligações químicas com os componentes desses sistemas, permanecendo apenas dissolvidos.

Resultados diferentes foram obtidos, quando o *primer* do sistema adesivo também era fotopolimerizável. No estudo de Griffiths, Watson e Sherriff (1999),

alguns tipos de sistema adesivo foram avaliados, adotando-se um esquema de dupla marcação com luciferina, no *primer*, e rodamina B no adesivo. Nos grupos em que o *primer* foi fotopolimerizado antes da aplicação do adesivo, a utilização de filtros de emissão permitiu a realização de uma análise diferenciada. Assim, fotomicrografias obtidas com os diferentes filtros foram sobrepostas, com o auxílio de computação, tornando a distinção entre os componentes resinosos marcados mais confiável (**figura 5**).

Figura 5 - Imagem composta por sobreposição. *Primer* (P) marcado com luciferina; adesivo (A) marcado com rodamina B. MCVL, x 60/1.4 em óleo, PC 100 μ m, filtros de emissão 546/600 nm. Cópia de Griffiths, Watson e Sherriff (1999).

Os autores consideraram que as emissões características da rodamina B e da luciferina eram distintas o suficiente, para não haver falsos positivos, desde que os filtros de emissão apropriados fossem empregados durante a análise. Relataram, entretanto, que esquemas de dupla marcação com rodamina B e fluoresceína geraram falsos positivos na interpretação; uma limitação que foi atribuída aos filtros disponíveis para aquele experimento. No estudo, não foi informada a concentração dos marcadores fluorescentes nos componentes resinosos. Consta que cada marcador foi dispensado diretamente nos *primers* e adesivos fornecidos pelos fabricantes, e que a luciferina e a rodamina apresentaram boa solubilidade nas soluções, embora não se tenha especificado por qual método pó e líquido foram misturados e incorporados. Nota-se que a quantidade de marcador na amostra gerou elevada saturação de amarelos e vermelhos na imagem (figura 5).

Mesmo que o MVT tenha sido o primeiro equipamento empregado no estudo da interface de adesão com marcadores fluorescentes, novas publicações começaram a surgir, em que se adotava a microscopia confocal de varredura a laser (WATSON, 1991; PIOCH et al., 1997; GRIFFITHS; WATSON; SHERRIFF, 1999). Enquanto o MVT, convencionalmente, utilizava uma lâmpada como fonte de iluminação, o microscópio confocal de varredura a laser havia trazido a novidade da iluminação com lasers. Uma das vantagens de um dispositivo de luz monocromática e colimada é permitir a seleção de feixes de luz com comprimentos de onda coincidentes, ou, pelo menos, muito próximos do máximo comprimento de onda de excitação de cada marcador fluorescente. Assim, existe um conjunto de lasers adequados para atender as características fotofísicas de cada marcador (**quadro 1**).

Quadro 1 - Marcadores fluorescentes utilizados em microscopia confocal.

Marcador Fluorescente	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	λ_{EXC} máximo (nm)	λ_{EMI} máximo (nm)	Coefficiente de extinção molar (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Rodamina B	479	540	585	106,0
Rodamina B (isotiocianato)	536	570	595	107,0
Fluoresceína sódica	376	495	520	83,0
Fluoresceína (isotiocianato)	389	496	549	72,0
Luciferina	521	425	528	24,2
Acriflavina	260	436	520	19,9
Auramina O	304	460	550	25,3

Dados reproduzidos de D'Alpino et al. (2006b)

λ_{EXC} : comprimento de onda de excitação

λ_{EMI} : comprimento de onda de emissão

Resultados excelentes, em termos de imagem, têm sido alcançados com a MCVL (PIOCH et al., 1997; DING et al., 2010), inclusive por causa do desenvolvimento da computação. À medida que os equipamentos se tornaram sistemas óticos e eletrônicos integrados, novos *softwares* foram sendo empregados na aquisição e no processamento tridimensional das imagens (SCHÜPBACH; KREJCI; LUTZ, 1997; GRIFFITHS; WATSON; SHERRIFF, 1999). A melhoria na qualidade da imagem pode ser confirmada na **figura 6**, reproduzida de Ding et al. (2010), em que se adicionou isotiocianato de rodamina B aos *primers* dos sistemas

adesivos Syntac Classic e Prime & Bond NT, para a avaliação da morfologia da interface de adesão formada com cada um dos sistemas.

Figura 6 - Presença de espaços “submicrômicos” (setas) na interface de adesão. MCVL. Cópia de Ding et al. (2010).

A resolução e a nitidez da fotomicrografia garantiram a observação de detalhes micromorfológicos, incluindo-se a presença de espaços denominados de *submicron hiatus*. Além disso, imagens com maior qualidade viabilizaram o estabelecimento de associações entre o conteúdo analisado, microscopicamente, e outros fatores e variáveis. Naquele trabalho, por exemplo, foi avaliada a influência de espaços “submicrômicos” sobre a resistência adesiva em dentina.

O emprego de lasers, por outro lado, também acarretava algumas limitações para MCVL, devido ao risco de danificação de amostras biológicas (em função da potência do laser), e de provocar o processo conhecido como fotobranqueamento (*photobleaching*), que é a destruição fotoquímica do marcador fluorescente (DENK; STRICKLER; WEBB, 1990; DIASPRO; ROBELLO, 2000; MASTERS; SO, 2004).

O surgimento da microscopia de excitação por dois fótons (MEDF) acabou aliviando essas desvantagens do uso de lasers na MCVL convencional (DIASPRO; ROBELLO, 2000). Na técnica de excitação com fóton duplo, os fluoróforos são excitados pela ação sinérgica e simultânea de dois fótons (SO et al., 2000). O processo permite o aproveitamento da fluorescência com muito menos chances de ocorrer fotobranqueamento e danificação de amostras biológicas. Com essas

características também é possível atingir profundidades muito maiores (quase 1,0 mm) nas amostras sem o risco de as danificar (SO et al., 2000).

A MEDF acabou repercutindo na aplicação da microscopia confocal no estudo da interface de adesão (WATSON et al., 2000; SIDHU et al., 2002; D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO; RUEGGEBERG; CARVALHO et al., 2006), principalmente, por permitir um aproveitamento mais eficiente da fluorescência. D'Alpino et al. (2006) apresentaram a técnica como uma inovadora forma de avaliação da micromorfologia da camada híbrida, devido à alta resolução e ao nível de detalhes. O sistema Adper Single Bond foi modificado com rodamina B com a finalidade de incrementar a avaliação da micropermeabilidade na interface de adesão em dentina. Para a execução do teste de micropermeabilidade, uma solução de fluoresceína foi injetada no interior da câmara pulpar. Os autores concluíram que o método alcançou resultados excelentes com a microscopia confocal com laser de fóton duplo (**figura 7**).

Figura 7 - Micromorfologia da camada híbrida (A) registrada com rodamina B (no adesivo) e fluoresceína (solução via túbulos dentinários). (B) camada de adesivo, (C) resina composta, (D) tag, (E) túbulo marcado com fluoresceína. MEDF, x40/0.8 NA, PC 230 μ m.

Naquele estudo, consta que o pó de rodamina B foi misturado ao sistema adesivo (0,16 mg/mL) diretamente no frasco fornecido pelo fabricante. Com a referida concentração, nota-se, na figura 7, alta saturação de vermelhos e verdes, sugerindo-se que concentrações menores dos marcadores também permitiriam a realização da análise morfológica.

Desde o final dos anos 80 até os dias atuais, o estudo da interface de adesão através da modificação de sistemas adesivos com marcadores fluorescentes tem remetido, fundamentalmente, à utilização dessas três técnicas de microscopia aqui apresentadas (**gráfico 1**).

Gráfico 1 - Utilização de microscopia confocal em estudos com sistemas adesivos marcados. Dados retirados do quadro 2.

Com elas, os pesquisadores têm se empenhado em estudar a relação dos padrões observáveis na interface com uma série de outros fatores e variáveis. No início, como as imagens não mostravam tanta riqueza de detalhes, alguns aspectos da penetração e da adaptação dos componentes resinosos na interface eram as variáveis mais consideradas na análise morfológica. Em diferentes estudos, elas foram relacionadas com outros fatores, como o tipo de condicionamento das superfícies (WATSON; BOYDE, 1987c), a orientação dos túbulos dentinários e a espessura da *smear layer* (WATSON; WILMOT, 1992). Outro fato observado, desde cedo, é a difusão do marcador fluorescente contido no sistema adesivo para a resina composta. Esta infiltração no material restaurador foi associada à camada superficial de inibição por oxigênio, na qual o adesivo não se polimeriza por completo, deixando, supostamente, as moléculas do marcador livres para a difusão (WATSON, 1989). Isso já sugeria que a rodamina B se encontrava dissolvida nos sistemas, mas sem estabelecer ligações químicas que prevenissem o seu deslocamento para outros materiais.

Conforme as técnicas se aperfeiçoaram, o padrão das imagens em estudos posteriores se tornou muito melhor (D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO; RUEGGEBERG; CARVALHO et al., 2006; ALMAHDY et al., 2012). Paralelamente, os métodos empregados no estudo de outros fatores relacionados ao processo de adesão também se destacavam. O resultado disso é que tais fatores passaram a ser avaliados sob o ponto de vista morfológico, através do uso de marcadores fluorescentes em sistemas adesivos. Uma relação dos principais estudos, envolvendo diferentes técnicas de microscopia confocal e sistemas adesivos modificados com marcadores fluorescentes, é mostrada no **quadro 2**.

Quadro 2 - Microscopia confocal no estudo da interface de adesão com sistemas adesivos marcados.

Referência	Técnica de microscopia	Substratos analisados	Evento analisado com microscopia	Associação com outros fatores
Watson e Boyde (1987c)	MCVT	esmalte-SA dentina-SA	interface D-R	tipo de condicionamento; modo de ativação do sistema adesivo
Watson (1989)	MCVT	esmalte-SA dentina-SA	interface D-R	não houve
Watson e Wilmot (1992)	MCVT	dentina-SA	interface D-R	espessura da <i>smear layer</i> ; orientação dos túbulos dentinários
Pioch et al. (1997)	MCVL	esmalte-SA dentina-SA	interface D-R	sistemas adesivos / material restaurador
Schupbach, Krejci e Felix (1997)	MCVL	dentina-SA	interface D-R	orientação dos túbulos dentinários
Griffiths, Watson e Sherriff (1999)	MCVT / MCVL	dentina-SA	interface D-R (micropermeabilidade)	sistemas adesivos; técnica de aplicação
Krejci et al. (1999)	MCVL	esmalte-SA dentina-SA	interface D-R	sistemas adesivos; tipo de tratamento da superfície; termociclagem
Pioch et al. (1999)	MCVL	dentina-SA	interface D-R	tipo de condicionamento; resistência adesiva
Grobler et al. (2000)	MCVL	dentina-SA	interface D-R (microinfiltração)	sistemas adesivos; resistência ao cisalhamento;
Pioch et al. (2003)	MCVL	dentina-SA	interface D-R	tipo e tempo de condicionamento
D'Alpino et al. (2006)	MEDF	dentina-SA	Interface D-R (micropermeabilidade)	não houve
Foxton et al. (2008)	MCVL	dentina-SA	interface D-R	sistemas adesivos

Referência	Técnica de microscopia	Substratos analisados	Evento analisado com microscopia	Associação com outros fatores
Arrais et al. (2009)	MCVL	dentina-SA cimento-SA	interface D-R	sistemas de cimentação adesiva; modo de polimerização
Bitter et al. (2009a)	MCVL / SEM	dentina-SA RC-SA	interface D-R (espessura da camada híbrida e número de túbulos penetrados)	técnica microscópica
Bitter et al. (2009b)	MCVL	dentina-SA cimento-SA	interface D-R	sistemas de cimentação adesiva; resistência adesiva
Francisconi et al. (2009)	MCVL	dentina-SA	interface D-R (fendas marginais)	fadiga
Ding et al. (2010)	MCVL	dentina-SA	Interface D-R (espaços na camada híbrida)	resistência adesiva
Ramesh et al. (2010)	MCVL	esmalte-SA	interface D-R (profundidade de penetração de monômeros)	sistemas adesivos; tipo de condicionamento
Sampaio et al. (2011)	MCVL	dentina-SA	interface D-R	bases cavitárias; termociclagem
Wolf et al. (2012)	MCVL	CRV-SA	interdifusão de monômeros em CRV	tipo de matriz polimérica do pino (CRV)
Langer e Ilie (2013)	MCVL	dentina-SA	interface D-R (infiltração de monômeros em dentina)	sistemas adesivos

CRV: compósito reforçado por fibra de vidro (*fiber reinforced composite*)

D-R: dente-restauração

RC: resina composta

SA: sistema adesivo

Gradativamente, algumas limitações de cada técnica e suas implicações passaram a ser consideradas, de alguma forma, no estudo da interface dente-restauração. Ao revisar trabalhos em que sistemas adesivos haviam sido modificados com marcadores fluorescentes, Watson (1997) chamou a atenção para certos fatores com impacto na técnica microscópica, como o processo de fotobranqueamento. Destacou a possibilidade de ocorrência de artefatos, como o *speckle*, e de falsos positivos no estudo de sistemas adesivos em que esquemas de dupla marcação haviam sido empregados. Discutiu-se, também, a capacidade dos marcadores fluorescentes sofrerem lixiviação e se difundirem dos componentes adesivos para outras estruturas no espécime, ocasionando uma má interpretação da interface de adesão. Foi uma das primeiras vezes, inclusive, em que se demonstrou

a preocupação com a quantidade de marcador fluorescente dissolvida nos sistemas resinosos. O autor explicou que materiais com excesso de marcador fluorescente poderiam apresentar o fenômeno de supressão da fluorescência (*quenching*), uma redução drástica na intensidade da fluorescência, afetando a viabilidade das análises.

Essa discussão gerou dúvidas sobre a forma com que os marcadores fluorescentes estavam sendo adicionados aos sistemas adesivos (D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO et al., 2006b). De fato, ao se revisar a literatura, observam-se algumas inconsistências nos métodos envolvendo a modificação desses sistemas com marcadores fluorescentes. A principal delas, provavelmente, seja a falta de precedentes acerca da quantidade de marcador adicionada aos componentes resinosos. Muitas vezes, a concentração do marcador sequer é mencionada na descrição dos métodos, ou os dados são inconclusivos (**quadro 3**). Esta carência de informações sugere que a quantidade de marcadores fluorescentes nos adesivos tem sido selecionada de forma empírica, inclusive, por faltarem evidências do possível efeito da concentração do marcador sobre a qualidade da análise microscópica (em termos de saturação e contraste nas imagens, por exemplo) e sobre uma série de características físico-químicas relacionadas ao processo de adesão.

Quadro 3 - Utilização de marcadores fluorescentes em diferentes sistemas adesivos.

Referência	Sistema adesivo	Compo- nente marcado	marcador fluorescente	Concentra- ção* do marcador
Watson e Boyde (1987c)	ScotchBond	<i>primer</i> / adesivo	acrilavina (<i>primer</i>) / rodamina B (adesivo)	n.c.
Watson (1989)	ScotchBond 2	<i>primer</i> / adesivo	fluoresceína / rodamina B (várias combinações)	n.c.
Watson e Wilmot (1992)	Syntac	<i>primer</i> / adesivo	fluoresceína / rodamina B / outros (várias combinações)	n.c.
Pioch et al. (1997)	Vários	<i>primers</i> / adesivos	rodamina B (várias combinações)	0,1 %**
Schupbach, Krejci e Felix (1997)	A.R.T. Composite Bonding System	<i>primer</i>	rodamina B	0,1 %**
Griffiths, Watson e Sherriff (1999)	Optibond / Clearfil Liner Bond 2/ Pertac Universal Bond	<i>primers</i> / adesivos	rodamina B / luciferina (várias combinações)	n.c.

Referência	Sistema adesivo	Compo- nente marcado	marcador fluorescente	Concentra- ção* do marcador
Krejci et al. (1999)	Optibond	adesivo	rodamina B	0,01 %**
Pioch et al. (1999)	Syntac / Gluma CPS / Prime & Bond 2.1	<i>primers</i>	rodamina B (isotiocianato)	~0,1 %**
Grobler et al. (2000)	Vários	adesivos	rodamina B (isotiocianato)	0,066 %**
Pioch et al. (2003)	Optibond SOLO	<i>primer</i>	rodamina B (isotiocianato)	~0,1 %**
D'Alpino et al. (2006)	Adper Single Bond	adesivo	Rodamina B	0,16 mg/mL
Foxton et al. (2008)	Adper Prompt L- Pop / i-Bond / OBF 2	adesivos	rodamina B	2-3 gramas (volume não informado)
Arrais et al. (2009)	All Bond 2 / Bond 1	<i>primers</i>	fluoresceína	40 µg/mL (All Bond 2); 160 µg/mL (Bond 1)
Bitter et al. (2009a)	Clearfil New Bond	adesivo	rodamina B (isotiocianato) / fluoresceína sódica	0,1 %**
Bitter et al. (2009b)	vários	<i>primers / adesivos</i>	fluoresceína sódica	0,1 %**
Francisconi et al. (2009)	Adper Single Bond 2	adesivo	rodamina B	0,16 mg/mL
Ding et al. (2010)	Prime & Bond NT / Syntac Classic	<i>primers</i>	rodamina B (isotiocianato)	0,1 %**
Ramesh et al. (2010)	Transbond XT / Transbond Plus	<i>primers</i>	rodamina B	0,1 mmol/L
Sampaio et al. (2011)	Adper Single Bond 2	adesivo	rodamina B	0,16 mg/mL
Wolf et al. (2012)	Optibond-FL	adesivo	rodamina B (isotiocianato)	n.c.
Langer e Ilie (2013)	vários	<i>primers / adesivos</i>	azul do nilo / rodamina B (isotiocianato)	0,1 %**

* As concentrações foram expressas exatamente como consta em cada referência. Não foi possível convertê-las para uma mesma unidade por falta de dados consistentes.

** Não foi informado se a porcentagem era em massa, ou volume.

~: aproximadamente

n.c.: não consta

Constatou-se que não há avaliações preliminares considerando possíveis variações no comportamento fluorescente dos marcadores, conforme os diferentes sistemas adesivos e as concentrações. Todavia, estudos da área química evidenciam que o comportamento fotofísico dos marcadores fluorescentes é influenciado por vários fatores, como a concentração de fluoróforo nas soluções, por

exemplo (SNARE et al., 1982; LAKOWICZ, 2006a). Esses fatores deveriam ser considerados na determinação das condições ideais da técnica microscópica, uma vez que alterações no comportamento fotofísico do marcador podem ter impacto sobre a qualidade e a viabilidade da análise (TSIEN; ERNST; WAGGONER, 2006).

A questão da concentração de marcadores em sistemas adesivos já foi abordada com o enfoque na influência sobre propriedades relacionadas ao processo de adesão. No estudo de D'Alpino, Pereira, Svizero et al. (2006a), foram estabelecidas correlações entre a concentração de rodamina B e algumas características do sistema Adper Single Bond. Concluiu-se que a concentração de rodamina B naquele adesivo influencia a resistência de união à dentina, chamando-se a atenção para uma possível limitação no uso do marcador em sistemas resinosos. Com base em tal estudo, a concentração de 0,16 mg/mL de rodamina B também foi adotada em estudos posteriores (D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO; RUEGGERBERG; CARVALHO et al., 2006; SAMPAIO et al., 2011). Apesar da relevância daquelas contribuições, é importante levar em consideração alguns fatos. Primeiramente, não há evidências de que os marcadores fluorescentes influenciem, da mesma maneira, as propriedades dos diferentes sistemas disponíveis no mercado, sejam convencionais ou autocondicionantes. Além disso, embora a concentração de 0,16 mg/mL tenha sido considerada segura para algumas variáveis, ainda não se confirmou, microscopicamente, se aquela é mesmo a melhor relação entre concentração do marcador e intensidade da fluorescência. Possivelmente, concentrações ainda menores podem ser capazes de emitir fluorescência suficiente, para a realização da análise morfológica via MCVL.

Nenhum dos trabalhos aqui revisados incluiu, no delineamento dos experimentos, quaisquer estratégias com a finalidade de avaliar aspectos da fluorescência nos sistemas adesivos marcados, inclusive a provável influência da concentração do marcador sobre a intensidade da fluorescência e a repercussão na análise microscópica da interface de adesão. Isso significa que não se tem a certeza de que as concentrações empregadas foram as menores possíveis, ou que se buscou a melhor relação entre intensidade da fluorescência e concentração do marcador. Havendo a preocupação com a possibilidade de se alterar propriedades de um sistema resinoso, presume-se que ele deva ser modificado com quantidades mínimas de marcador fluorescente, porém, ainda capazes de permitir uma análise microscópica apropriada.

3 Proposição

3 Proposição

3.1 Objetivos gerais

Este estudo foi realizado com o propósito de sistematizar um método de adição de rodamina B a sistemas adesivos a partir de soluções de rodamina em etanol. Conjuntamente, foi desenvolvida uma estratégia para a determinação de concentrações mínimas de marcador fluorescente nos componentes resinosos, porém, ainda viáveis para a realização da análise morfológica da interface de adesão através de microscopia confocal de varredura a laser.

3.2 Objetivos específicos

- A. Desenvolver uma técnica de modificação de sistemas adesivos a partir de soluções de rodamina B em etanol; avaliando-se sua eficácia e reprodutibilidade;
- B. Avaliar se o comportamento fotofísico da rodamina B depende da concentração do marcador fluorescente nos materiais dispersantes;
- C. Avaliar se o comportamento fotofísico da rodamina B depende do solvente no qual o marcador é dissolvido;
- D. Avaliar se diferentes concentrações de rodamina B interferem na qualidade da análise morfológica da interface de adesão;
- E. Avaliar se qualidade da análise morfológica depende do solvente em que a rodamina foi adicionada: *primer*, ou adesivo.

4 Material e Métodos

4 Material e métodos

4.1 Materiais utilizados nos experimentos

Os principais materiais utilizados nos experimentos desse estudo estão descritos no **quadro 4**.

Quadro 4 - Materiais utilizados nas etapas experimentais e suas principais características.

Produto	Lote e validade	Categoria	Composição
Filtek^{MR} Z250 XT (A2) (3M ESPE, St Paul, MN, EUA)	N327127BR 10/2014	resina composta microhíbrida	<i>Matriz orgânica:</i> - Bis-GMA - Bis-EMA - UDMA - canforoquinona <i>Parte inorgânica:</i> - zircônia/sílica (82% em peso, 60% em volume; partículas de 0,6 µm)
AdperTM ScotchbondTM Multi-Purpose – Primer (3M ESPE, St Paul, MN, EUA)	N322814 09/2014	componente (<i>primer</i>) de sistema adesivo convencional de três passos	- HEMA - copolímero de ácido polialcenóico - água
AdperTM ScotchbondTM Multi-Purpose – Adhesive (3M ESPE, St Paul, MN, EUA)	N342538 01/2015	componente (adesivo) de sistema adesivo convencional de três passos	- Bis-GMA - HEMA - canforoquinona
ClearfilTM SE Bond – Primer (Kuraray Co. Ltda., Osaka, Japão)	01090A 09/2013	componente (<i>primer</i>) de sistema adesivo autocondicionante de dois passos	- 10-MDP - HEMA - dl-canforoquinona - água
ClearfilTM SE Bond – Bond (Kuraray Co. Ltda., Osaka, Japão)	01628A 09/2013	componente (adesivo) de sistema adesivo autocondicionante de dois passos	-10-MDP - HEMA - Bis-GMA - dimetacrilatos hidrofóbicos - dl-canforoquinona - sílica coloidal
Ataque Gel (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, PR, Brasil)	62512 06/2015	condicionador ácido de esmalte e dentina	gel de ácido ortofosfórico a 37%

Produto	Lote e validade	Categoria	Composição
Álcool etílico absoluto P.A (Dinâmica® Química Contemporânea, Diadema, SP, Brasil)	54487 10/2016	etanol com alto grau de pureza	etanol 99,5 °GL
Rhodamine B (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Gillingham, Nwe Rd, Reino Unido)	33901062 06/2013	marcador fluorescente rodamina B	C ₂₈ H ₃₁ ClN ₂ O ₃ (M=479,01 g/mol)

10-MDP: 10-metacrilóiloxidecil di-hidrogênio fosfato

Bis-EMA: bisfenol-A glicidil metacrilato etoxilato

Bis-GMA: bisfenol-A glicidil metacrilato

HEMA: 2-hidroxietil metacrilato

UDMA: uretano dimetacrilato

4.2 Obtenção dos dentes humanos

O projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), sendo aprovado sob processo de nº 118/2011 (**anexo A**). Este requisito se fez necessário, uma vez que, em uma das etapas experimentais apresentada a seguir, utilizaram-se vinte e quatro terceiros molares humanos, extraídos por indicação odontológica. Os dentes foram coletados por doações de cirurgiões-dentistas que atenderam em consultórios particulares (**anexo B**), mediante assinatura dos termos de doação de dentes, conforme a regulamentação vigente do mesmo comitê.

4.3 Delineamento experimental

Neste estudo, a rodamina B foi adicionada aos sistemas adesivos a partir de soluções de rodamina em etanol, das quais se extraíram pequenas alíquotas de álcool contendo a massa de rodamina B necessária para a modificação de certo volume de resina fluida. Aspectos da fluorescência foram estudados, primeiramente,

nas soluções de etanol, nos adesivos modificados com o marcador fluorescente e, por fim, na interface de adesão (em dentina) com sistemas adesivos marcados.

No decorrer dos experimentos, a rodamina B foi adicionada a estes diferentes solventes (etanol, *primers* e adesivos) em cinco possíveis concentrações (**quadro 5**).

Quadro 5 - Concentrações de rodamina B nos solventes.

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
Concentração (mg/mL)	0,50	0,10	0,02	0,004	0,0008
Molaridade* (mol/L)	$1,04 \cdot 10^{-3}$	$2,09 \cdot 10^{-4}$	$4,18 \cdot 10^{-5}$	$8,35 \cdot 10^{-6}$	$16,7 \cdot 10^{-7}$

* Com base na massa molar da rodamina B (479,01 g/mol).

O delineamento de cada uma das etapas experimentais e os respectivos testes foram descritos de forma sequencial nos próximos itens.

4.3.1 Preparo das soluções de rodamina B em etanol

Cinco soluções de etanol anidro contendo rodamina B nas concentrações indicadas no quadro 5 foram preparadas. Para se identificar essas soluções, acrescentou-se as iniciais “**et**” (de **et**anol) antes da sigla de concentração: etC₁, etC₂, etC₃, etC₄ e etC₅.

O preparo das soluções foi realizado através de procedimento padrão de diluição (VOGEL; MENDHAM, 2000). A partir de uma solução de estoque (etC₁), obtiveram-se as demais soluções sucessivamente (etC₂, etC₃, etC₄ e etC₅). Para a obtenção de etC₁, foram pesados 50 miligramas de pó de rodamina B em balança analítica com legibilidade de 0,01 mg (GR-202, A&D ENGINEERING, INC., São José, CA, EUA). A rodamina foi sendo depositada, aos poucos e com cuidado, no interior de um balão volumétrico de 100 mL com o auxílio de uma espátula de metal. A pesagem do pó diretamente no balão evitou perdas com resíduo, comuns na transferência dos materiais entre uma vidraria e outra, levando-se em conta o elevado coeficiente de extinção molar do marcador fluorescente. Em seguida, o

mesmo balão foi preenchido com etanol anidro até que se atingisse a marcação de 100 mL. Após o fechamento do recipiente, agitou-se o sistema, manualmente, por trinta segundos e a agitação foi complementada com um banho ultrassônico (Ultracleaner USC-1600A, Unique, Indaiatuba, SP, Brasil) durante cinco minutos, para a homogeneização.

Procedendo-se com as diluições, a solução etC₂ foi preparada a partir de uma alíquota extraída de etC₁. Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, mediu-se 10 mL de etC₁, transferindo-os, imediatamente, para um novo balão volumétrico de 50 mL. O balão foi preenchido com etanol anidro até atingir a marcação de 50 mL (volume final de etC₂) e, então, tampado e agitado da mesma maneira explicada anteriormente.

As diluições foram realizadas sucessivamente e calculadas através da fórmula $C' \cdot V' = C'' \cdot V''$, em que o produto da concentração da solução antes de ser diluída (C') pelo volume (da alíquota) da mesma solução (V') deve ser igual ao produto da concentração da solução depois de diluída (C'') pelo volume final dessa nova solução (V'').

Adaptando-se a fórmula para as soluções de etanol, o cálculo da primeira diluição foi realizado através da **equação (1)**, em que $V_{1(AL)}$ é o volume da alíquota retirada da solução etC₁, e V_2 é o volume final da nova solução etC₂.

$$etC_1 \cdot V_{1(AL)} = etC_2 \cdot V_2 \quad (1)$$

Substituindo-se pelos valores citados anteriormente na descrição do preparo da solução etC₂, tem-se que $etC_2 = \frac{etC_1 \cdot V_{1(AL)}}{V_2} = \frac{(0,50) \cdot (10)}{50} = 0,10 \text{ mg/mL}$.

De forma semelhante, as soluções etC₃, etC₄ e etC₅ foram preparadas a partir de alíquotas de 10 mL retiradas das soluções etC₂, etC₃ e etC₄ respectivamente. Após a coleta, cada alíquota foi transferida para balões volumétricos de 50 mL (volume final das soluções diluídas) e diluída em etanol anidro.

Preparou-se a solução etC₃ com base na **equação (2)**, em que $V_{2(AL)}$ é o volume da alíquota extraída de etC₂, e V_3 é o volume final de etC₃.

$$etC_3 = \frac{etC_2 \cdot V_{2(AL)}}{V_3} \quad (2)$$

A solução etC_4 foi preparada de acordo com a **equação (3)**, em que $V_{3(AL)}$ é o volume da alíquota retirada de etC_3 , e V_4 é o volume final de etC_4 .

$$etC_4 = \frac{etC_3 \cdot V_{3(AL)}}{V_4} \quad (3)$$

Por fim, a solução etC_5 foi preparada com base na **equação (4)**, em que $V_{4(AL)}$ é o volume da alíquota extraída de etC_4 , e V_5 é o volume final de etC_5 .

$$etC_5 = \frac{etC_4 \cdot V_{4(AL)}}{V_5} \quad (4)$$

O resultado das diluições sucessivas pode ser observado na **figura 8**.

Figura 8 - Soluções de rodamina B em etanol obtidas com diluições sucessivas.

Após preparadas, as cinco soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e em abrigo da luz.

4.3.2 Análise espectroscópica das soluções de rodamina B em etanol

O comportamento fotoluminescente das cinco soluções de rodamina B em etanol foi avaliado através de um espectrofluorímetro (Spex Fluorolog FL3-222, Horiba Jobin Yvon S.A.S., Longjumeau, França) operando com lâmpada contínua de xenônio de 450 W (**figura 9**). Para a realização dos testes, uma alíquota de cada uma das soluções foi transferida para cubetas retangulares de quartzo (dimensões externas de 45x12,5x12,5 mm) acopláveis ao compartimento de amostras do espectrofluorímetro. Os espectros de emissão foram registrados de 550 nm a 750 nm ($\lambda_{\text{EXC}}=532$ nm), e os de excitação foram registrados de 250 nm a 570 nm ($\lambda_{\text{EMI}}=585$ nm). Na aquisição dos espectros de excitação, empregou-se um filtro de passagem de 370 nm, para a eliminação de harmônicos provenientes da fonte luminosa.

Figura 9 - Esquema simplificado do funcionamento do espectrofluorímetro.

4.3.3 Preparo de filmes de adesivo para análises espectroscópica e microscópica

Nesta etapa experimental, o sistema adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose foi referenciado com a sigla “mp”, enquanto que o Clearfil SE Bond foi associado à sigla “se”, ambas em letras minúsculas.

O componente adesivo dos sistemas mp e se foi empregado na confecção de dez amostras (cinco de cada sistema) de filmes de adesivo retidos entre uma lâmina de vidro e uma lamínula (**figuras 10 e 11**). Desta maneira, preparou-se cinco filmes do adesivo mp, cada qual contendo rodamina B em uma das cinco concentrações C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , ou C_5 (figura 10).

Figura 10 - Filmes do adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose (mp) contendo rodamina B nas concentrações (mg/mL) C_1 (0,50), C_2 (0,10), C_3 (0,02), C_4 (0,004) e C_5 (0,0008).

Da mesma forma, foram confeccionados cinco filmes do adesivo se, cada qual contendo rodamina B em uma daquelas mesmas cinco concentrações (figura 11).

Figura 11 - Filmes do adesivo Clearfil SE Bond (se) contendo rodamina B nas concentrações (mg/mL) C_1 (0,50), C_2 (0,10), C_3 (0,02), C_4 (0,004) e C_5 (0,0008).

A identificação dos grupos de filmes é mostrada no **quadro 6**.

Quadro 6 - Identificação dos filmes conforme o grupo de adesivo e a concentração de rodamina B.

	C₁	C₂	C₃	C₄	C₅
Grupo mp	mpC ₁	mpC ₂	mpC ₃	mpC ₄	mpC ₅
Grupo se	seC ₁	seC ₂	seC ₃	seC ₄	seC ₅

No preparo desses filmes, a rodamina B foi incorporada aos adesivos a partir daquelas soluções de etanol apresentadas anteriormente na figura 8. Neste método de proporcionamento, a massa de rodamina acrescentada a certo volume de adesivo foi extraída de pequenas alíquotas precisas das soluções de etanol. A massa de rodamina em cada alíquota foi calculada através da **equação (5)**, em que $C_{(ROD-AL)}$ é a concentração de rodamina na alíquota, $m_{(ROD-AL)}$ é a massa de rodamina na alíquota e $V_{(AL)}$ é o volume da alíquota.

$$C_{(ROD-AL)} = \frac{m_{(ROD-AL)}}{V_{(AL)}} \quad (5)$$

Isolando-se $m_{(ROD-AL)}$, tem-se que $m_{(ROD-AL)} = C_{(ROD-AL)} \cdot V_{(AL)}$.

Por outro lado, a massa de rodamina em certo volume de adesivo pode ser calculada pela **equação (6)**, em que $C_{(ROD-AD)}$ é a concentração de rodamina no adesivo, $m_{(ROD-AD)}$ é a massa de rodamina no adesivo e $V_{(AD)}$ é o volume de adesivo.

$$C_{(ROD-AD)} = \frac{m_{(ROD-AD)}}{V_{(AD)}} \quad (6)$$

Como $m_{(ROD-AL)}$ e $m_{(ROD-AD)}$ são iguais, tem-se a **equação (7)** empregada no preparo dos adesivos modificados.

$$C_{(ROD-AL)} \cdot V_{(AL)} = C_{(ROD-AD)} \cdot V_{(AD)} \quad (7)$$

Os filmes de adesivo modificado com rodamina B foram preparados com base na equação (7) e de acordo com os parâmetros a seguir (**quadro 7**).

Quadro 7 - Parâmetros utilizados no preparo dos filmes de adesivo modificado com rodamina B.

Identificação do filme	Origem da alíquota de etanol	Volume da alíquota (mL)	Volume de adesivo (mL)	Concentração final no adesivo (mg/mL)
mpC₁	solução etC ₁	0,025	0,025	0,50
mpC₂	solução etC ₁	0,010	0,050	0,10
mpC₃	solução etC ₂	0,010	0,050	0,02
mpC₄	solução etC ₃	0,010	0,050	0,004
mpC₅	solução etC ₄	0,010	0,050	0,0008
seC₁	solução etC ₁	0,025	0,025	0,50
seC₂	solução etC ₁	0,010	0,050	0,10
seC₃	solução etC ₂	0,010	0,050	0,02
seC₄	solução etC ₃	0,010	0,050	0,004
seC₅	solução etC ₄	0,010	0,050	0,0008

Com todos os parâmetros pré-determinados, a técnica empregada na confecção dos filmes foi descrita com detalhes no próximo item.

4.3.4 Técnica de modificação de adesivos a partir de soluções de rodamina B em etanol

A sequência de figuras a seguir ilustra a confecção do filme de adesivo mpC₂ especificamente. Todavia, todos os outros filmes foram preparados exatamente com a mesma técnica.

Inicialmente, com uma micropipeta (Transferpette S, BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, Alemanha), coletou-se 0,01 mL (10 µL) da solução etC₁. A alíquota foi, imediatamente, depositada sobre o centro da superfície de uma lâmina de vidro (**figura 12**).

Figura 12 - Transferência da alíquota de etanol para a lâmina de vidro.

Para evitar que a alíquota se esparramasse pela lâmina (como exemplificado na **figura 13**), friccionou-se, antes da transferência, a superfície do vidro com uma luva de látex por alguns segundos. Este procedimento alterou a eletricidade estática no vidro, influenciando o molhamento.

Figura 13 - Aspecto do molhamento, quando a lâmina de vidro não é friccionada, previamente, com a luva de látex.

O etanol anidro volatilizou, facilmente, alguns segundos após a transferência, restando sobre a lâmina de vidro apenas a massa de rodamina B (**figura 14**). A evaporação do etanol foi acelerada, colocando-se a lâmina sobre uma placa aquecedora a temperatura de 50 °C (Fisatom 502, Fisatom Equipamentos Científicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

Figura 14 - Aspecto da massa de rodamina após a evaporação do etanol.

Após a evaporação do etanol, retirou-se a lâmina do aquecimento, para que ela resfriasse até a temperatura ambiente. Então, uma micropipeta foi utilizada, para a aquisição de 0,05 mL (50 μ L) do componente adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose. O adesivo foi coletado diretamente do frasco fornecido pelo fabricante. A ponteira descartável, acoplada à micropipeta, foi posicionada próxima do fundo do frasco, e a resina foi pipetada, vagarosamente, aguardando-se um intervalo de vinte segundos antes de se retirar a ponteira do líquido. Adotaram-se estas precauções com as finalidades de prevenir a incorporação de bolhas de ar e de garantir maior precisão na coleta, posto que a viscosidade do adesivo fosse muito maior que a do *primer*, dificultando o procedimento. Após a coleta, o adesivo foi sobreposto ao pó de rodamina B localizado no centro da superfície da lâmina de vidro (**figura 15**).

Figura 15 - Transferência do adesivo sobre a massa de rodamina B.

Com o auxílio de uma espátula de metal, misturaram-se os componentes com movimentos circulares por, pelo menos, um minuto, ou até que o sistema aparentasse homogêneo (**figuras 16 e 17**).

Figura 16 - Mistura do adesivo com a rodamina B.

Figura 17 - Aspecto do sistema adesivo modificado após a homogeneização.

O adesivo, já modificado com rodamina B, foi contraposto a uma lamínula, formando um dispositivo apropriado para as futuras análises espectroscópica e microscópica (**figura 18**).

Figura 18 - Sobreposição da lamínula de vidro.

Imediatamente após o posicionamento da lamínula, o adesivo foi fotoativado com um aparelho de LED (Radii-cal 2, SDI, Bayswater, Victoria, Austrália) durante dez segundos. Ao final deste procedimento, obteve-se o filme mpC₂, contendo rodamina B na concentração de 0,10 mg/mL.

A manipulação dos adesivos ocorreu em ambiente com baixa iluminação, para se evitar a fotoativação precoce. Todos os outros filmes foram preparados com a mesma técnica, variando-se, entretanto, os parâmetros de concentração da alíquota de etanol, de volume da alíquota e de volume de adesivo, conforme consta no quadro 7 apresentado anteriormente. Os filmes foram armazenados ao abrigo da luz por um período de sete dias até a execução dos testes.

4.3.5 Análise espectroscópica dos filmes de adesivo

Assim como as soluções de etanol, os dez filmes de adesivo contendo rodamina foram avaliados no espectrofluorímetro (Spex Fluorolog FL3-222, Horiba Jobin Yvon S.A.S.), para a aquisição de espectros de fotoluminescência. Foi necessário adaptar cada lâmina de vidro ao porta-amostras, de forma que o feixe de luz pudesse atravessar o adesivo marcado com rodamina. As especificações técnicas adotadas no experimento corresponderam às mesmas da análise espectroscópica das soluções de rodamina em etanol (subtítulo 4.3.2).

4.3.6 Análise microscópica dos filmes de adesivo

Após a análise espectroscópica, os filmes de adesivo também foram avaliados em um microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS SPE, Leica Microsystems CMS, Mannheim, Alemanha), com o auxílio de *software* de microscopia apropriado (Leica Application Suite Advanced Fluorescence, Leica Microsystems CMS, Mannheim, Alemanha). Esta análise microscópica preliminar serviu para se averiguar o aspecto visual da fluorescência em cada filme, de acordo com o adesivo e as diferentes concentrações de rodamina B adotados, no intuito de se pré-selecionar as concentrações a serem adotadas, posteriormente, no estudo da interface de adesão em dentina. Esta etapa complementou o estudo espectroscópico realizado, previamente, com os mesmos filmes, permitindo o estabelecimento de comparações entre dados físico-químicos (análise espectroscópica) e visuais (análise microscópica).

Para que os filmes pudessem ser comparados, microscopicamente, entre si, todos foram avaliados sob os mesmos parâmetros de técnica de microscopia (**quadro 8**).

Quadro 8 - Parâmetros de técnica microscópica adotados na avaliação dos filmes.

Especificações da objetiva	ampliação	40x
	abertura numérica	1,15 (em óleo)
Especificações da varredura	resolução xyz (µm)	275 x 275 x 17
	faixa detectável de espectro (nm)	550 – 750
Especificações do laser	tipo de laser	estado sólido
	λ_{EXC} (nm)	532
	voltagem (V)	670
	intensidade FOAA* (%)	10

* FOAA: filtro ótico acústico ajustável

λ_{EXC} : comprimento de onda de excitação

Os filmes mpC₃ e seC₃ foram utilizados, separadamente, na determinação desses parâmetros da técnica de microscopia, porque ambos possuíam rodamina B em uma concentração intermediária (C₃) em relação aos demais filmes de seus respectivos grupos (mp e se). Ainda que, nesta etapa, os adesivos tenham sido avaliados puros, sem a associação a substratos dentários, os parâmetros da técnica

já foram pré-estabelecidos dentro de limites apropriados para a análise de tecidos dentários mineralizados.

4.3.7 Preparo dos espécimes em dentina para a avaliação morfológica da interface de adesão

Com base nos resultados preliminares da avaliação microscópica dos filmes de adesivo, três concentrações de rodamina B (C_2 , C_3 e C_4) foram pré-selecionadas, para o estudo da interface de adesão com sistemas adesivos modificados com o marcador fluorescente (**figura 19**).

Figura 19 - Concentrações de rodamina B selecionadas para o estudo da interface de adesão.

As concentrações C_2 , C_3 e C_4 foram testadas nos sistemas adesivos Adper Scotchbond Multi-Purpose e Clearfil SE Bond, quando da aplicação direta em espécimes em dentina, confeccionados para avaliação microscópica.

Os espécimes foram obtidos a partir de vinte e quatro terceiros molares extraídos por indicação odontológica. Após a coleta, os dentes foram limpos com o auxílio de cureta (Duflex 55G, SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), para a remoção de restos de tecidos periodontais. Depois de limpos, foram armazenados em solução de timol (0,1%), renovada semanalmente até os mesmos serem empregados no preparo dos espécimes.

Cada dente teve a sua coroa processada, previamente, para servir de substrato de aplicação dos sistemas adesivos, conforme o esquema mostrado no **quadro 9**. Nesta etapa experimental, o sistema adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose foi identificado com a sigla “MP”, enquanto que o Clearfil SE Bond foi associado à sigla “SE”, ambas em letras maiúsculas.

Quadro 9 - Esquema de restauração das coroas de acordo com o sistema adesivo e a concentração de rodamina B.

Grupo de coroas	Descrição
MPC₂ n=4 (coroas)	Coroa restaurada com sistema adesivo MP . Em uma das metades da coroa, apenas o <i>primer</i> foi modificado com rodamina B (0,10 mg/mL). Na outra metade, apenas o adesivo foi modificado (0,10 mg/mL).
MPC₃ n=4 (coroas)	Coroa restaurada com sistema adesivo MP . Em uma das metades da coroa, apenas o <i>primer</i> foi modificado com rodamina B (0,02 mg/mL). Na outra metade, apenas o adesivo foi modificado (0,02 mg/mL).
MPC₄ n=4 (coroas)	Coroa restaurada com sistema adesivo MP . Em uma das metades da coroa, apenas o <i>primer</i> foi modificado com rodamina B (0,004 mg/mL). Na outra metade, apenas o adesivo foi modificado (0,004 mg/mL).
SEC₂ n=4 (coroas)	Coroa restaurada com sistema adesivo SE . Em uma das metades da coroa, apenas o <i>primer</i> foi modificado com rodamina B (0,10 mg/mL). Na outra metade, apenas o adesivo foi modificado (0,10 mg/mL).
SEC₃ n=4 (coroas)	Coroa restaurada com sistema adesivo SE . Em uma das metades da coroa, apenas o <i>primer</i> foi modificado com rodamina B (0,02 mg/mL). Na outra metade, apenas o adesivo foi modificado (0,02 mg/mL).
SEC₄ n=4 (coroas)	Coroa restaurada com sistema adesivo SE . Em uma das metades da coroa, apenas o <i>primer</i> foi modificado com rodamina B (0,004 mg/mL). Na outra metade, apenas o adesivo foi modificado (0,004 mg/mL).

Por fins didáticos, a técnica de confecção dos espécimes em dentina foi descrita nos subitens seguintes.

4.3.7.1 Técnica de planificação das coroas

Em uma máquina de corte de precisão (IsoMet Low Speed Saw, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), os vinte e quatro dentes tiveram suas coroas seccionadas, transversalmente, no terço oclusal com disco diamantado (Extec Corp. – 102 mm x 0,3 mm x 12,7 mm, Enfield, CT, EUA) em baixa velocidade e sob refrigeração com água deionizada, a fim de se remover o esmalte da face oclusal e expor a sub superfície de dentina utilizada na realização dos procedimentos restauradores. As raízes também foram seccionadas no terço médio, para melhorar a geometria final dos espécimes (**figura 20**).

Figura 20 - Esquema dos cortes transversais no preparo das coroas.

Em seguida, as coroas seccionadas foram submetidas ao desgaste em uma lixadeira/politriz (Arolpol 2V200, Arotec, Cotia, SP, Brasil), de modo que a face (oclusal) de dentina exposta se manteve em contato com a lixa e paralela a mesma. Primeiramente, para a remoção de eventuais remanescentes de esmalte, empregou-se lixa d'água com granulação 320 (Carbimet Paper Discs, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) em baixa rotação e com refrigeração com água corrente. Então, para dar acabamento à superfície de dentina, bem como simular a formação de *smear layer*, utilizou-se lixas d'água com granulação 600 (Carbimet Paper Discs, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA).

A superfície de dentina exposta, em cada coroa, foi aproveitada para a realização de dois esquemas diferentes de aplicação de sistema adesivo, conforme consta no quadro 9. Por isso, utilizou-se uma ponta diamantada 3097 (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil), para criar uma fenda no centro da superfície de dentina no sentido vestibulo-lingual, resultando em duas metades separadas entre si pela fenda (**figura**

21-A). Além disso, outra fenda horizontal foi criada em uma das faces proximais de cada coroa, com a finalidade de facilitar a diferenciação do tratamento realizado em cada uma das metades (**figura 21-B**).

Figura 21 - (A) fenda central dividindo a superfície em duas metades, (B) fenda lateral para distinção do tratamento em cada metade.

4.3.7.2 Restauração das coroas planificadas

Para que as coroas pudessem ser restauradas conforme o delineamento descrito no quadro 9, envolvendo as concentrações C_2 , C_3 e C_4 , os sistemas adesivos foram modificados com rodamina B a partir das soluções de rodamina em etanol, através da mesma técnica de proporcionamento descrita, anteriormente, no preparo dos filmes de adesivo. Como os procedimentos restauradores requereram volumes maiores de adesivo em comparação ao empregado na confecção dos filmes, outros parâmetros foram adotados para a modificação das resinas fluidas (**quadro 10**).

Quadro 10 - Parâmetros para a modificação dos componentes resinosos de acordo com o grupo de coroas.

Grupo	Componente modificado	Concentração de rodamina no componente (mg/mL)	Volume do componente (mL)	Origem da alíquota de etanol	Volume da alíquota (mL)
MPC₂	<i>primer</i>	0,10	0,20	etC ₁	0,04
	adesivo	0,10	0,20	etC ₁	0,04

Grupo	Componente modificado	Concentração de rodamina no componente (mg/mL)	Volume do componente (mL)	Origem da alíquota de etanol	Volume da alíquota (mL)
MPC₃	<i>primer</i>	0,02	0,20	etC ₂	0,04
	adesivo	0,02	0,20	etC ₂	0,04
MPC₄	<i>primer</i>	0,004	0,20	etC ₃	0,04
	adesivo	0,004	0,20	etC ₃	0,04
SEC₂	<i>primer</i>	0,10	0,20	etC ₁	0,04
	adesivo	0,10	0,20	etC ₁	0,04
SEC₃	<i>primer</i>	0,02	0,20	etC ₂	0,04
	adesivo	0,02	0,20	etC ₂	0,04
SEC₄	<i>primer</i>	0,004	0,20	etC ₃	0,04
	adesivo	0,004	0,20	etC ₃	0,04

Por se tratar de volumes maiores de adesivo, a mistura dos componentes foi realizada sobre vidro de relógio de 4 cm de diâmetro (**figura 22**).

Figura 22 - Mistura de maiores quantidades de componentes sobre recipiente de vidro apropriado.

Depois de se incorporar a rodamina às resinas fluidas, restauraram-se as coroas, conforme o previsto para cada grupo (quadro 10). Entre a restauração de uma coroa e outra, os vidros de relógio foram cobertos por uma tampa de plástico fosco, para evitar contato com a luz ambiente.

A técnica de aplicação (em dentina) dos sistemas adesivos seguiu as recomendações de cada fabricante, conforme consta no **quadro 11**.

Quadro 11 - Instruções para a aplicação dos sistemas adesivos, segundo a bula dos fabricantes.

Sistema adesivo	Técnica de aplicação
Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose	<ol style="list-style-type: none"> 1 Condicionar a superfície de dentina durante 15 s com ácido fosfórico a 37%; 2 Enxaguar com jato de água abundante por 15 s; 3 Secar, levemente, com jato de ar por 5 s; 4 Aplicar uma camada do <i>primer</i>; 5 Secar suavemente durante 5 s; 6 Aplicar camada do adesivo; 7 Fotoativar por 10 s; 8 Proceder com a restauração.
Clearfil™ SE Bond	<ol style="list-style-type: none"> 1 Aplicar camada de <i>primer</i> sobre a superfície de dentina limpa e seca e aguardar 20 s; 2 Secar com leve jato de ar; 3 Aplicar uma camada de adesivo; 4 Aplicar leve jato de ar; 5 Fotoativar por 10 s; 6 Proceder com a restauração.

Nos casos em que o condicionamento prévio da dentina foi necessário (grupo tratado com Adper Scotchbond Multi-Purpose), aplicou-se ácido fosfórico em ambas as metades da coroa simultaneamente, enxaguando-as em seguida. Durante o procedimento restaurador, o *primer* foi aplicado em cada metade antes que qualquer uma delas recebesse o adesivo. Isso foi preconizado, para que uma das metades não perdesse mais umidade, enquanto a outra estivesse sendo restaurada. Por fim, cada metade recebeu o adesivo. Obviamente, os componentes resinosos estavam modificados de acordo com os critérios estabelecidos no quadro 9.

Após a aplicação do sistema adesivo, cada coroa foi recoberta com uma camada de 1,5 mm de espessura de resina composta Filtek Z250 XT (A2), isolando a camada de adesivo do meio externo. O incremento foi fotoativado durante vinte segundos com um aparelho de LED (Radii-cal 2) de intensidade de 1.200 mW/cm².

As coroas restauradas foram armazenadas em água deionizada a temperatura de 37 °C por um período de vinte e quatro horas até serem fatiadas.

4.3.7.3 Obtenção dos espécimes de dentina no formato de fatia

Na máquina de cortes seriados (IsoMet Low Speed Saw), cada coroa restaurada foi cortada longitudinalmente no sentido méso-distal com disco diamantado (Extec Corp – 102 mm x 0,3 mm x 12,7 mm) em baixa velocidade e sob refrigeração com água deionizada. Através de cortes sucessivos, extraíram-se, de cada coroa, duas fatias com 1,0 mm de espessura (**figura 23**).

Figura 23 - Espécime de dentina confeccionado para microscopia. (A) fenda central separando as metades; (B) fenda lateral para diferenciação das metades; (C) camada de resina composta; (D) dentina; (E) câmara pulpar.

As fatias foram armazenadas em água deionizada a 37 °C por sete dias até serem encaminhadas para a análise microscópica.

4.3.8 Análise da interface de adesão via microscopia confocal de varredura a laser

Pelo menos um espécime extraído de cada coroa (quadro 9) foi analisado via microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS SPE), com o objetivo de se determinar a viabilidade de diferentes concentrações de rodamina B na avaliação da interface de adesão com sistemas adesivos marcados. Empregou-se um laser de estado sólido ($\lambda_{\text{EXC}}=532 \text{ nm}$) e a análise da interface foi realizada com objetiva 40x,

1,15 AN em óleo. Outras especificações de técnica microscópica foram citadas nas legendas das fotomicrografias adquiridas.

As estratégias utilizadas para a modificação de sistemas adesivos com rodamina B estão resumidas no fluxograma seguinte (**figura 24**).

Figura 24 - Estratégias para a adição de rodamina B a sistemas adesivos.

5 Resultados

5 Resultados

5.1 Espectroscopia de fotoluminescência das amostras de etanol e dos filmes de adesivo

Cada espectro de emissão mostra, na condição experimental pré-estabelecida, qual foi a intensidade da fluorescência (eixo y) em cada comprimento de onda emitida (eixo x) durante a análise. Nesses espectros, é de grande interesse o ponto máximo (“pico”) de cada banda de emissão. Em um conjunto de espectros do mesmo grupo experimental, pode-se avaliar, portanto, a variação desses máximos das bandas, e compreender a influência da concentração de rodamina B sobre a intensidade máxima da fluorescência, por exemplo.

Os espectros de emissão obtidos com a análise das soluções de rodamina B em etanol foram dispostos no **gráfico 2**.

Gráfico 2 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de emissão das soluções de etanol contendo rodamina B ($\lambda_{\text{exc}}=532$ nm).

As coordenadas x e y do ponto máximo da banda de emissão de cada espectro estão apresentadas na **tabela 1**.

Tabela 1 - Coordenadas x e y do máximo das bandas de emissão dos espectros no gráfico 2.

	etC ₁	etC ₂	etC ₃	etC ₄	etC ₅
y (unid. arb.)	1,26	1,82	5,87	7,54	3,05
x (nm)	587	586	578,2	572	569

Os espectros de emissão obtidos com a análise dos filmes de adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose (mp) estão apresentados no **gráfico 3**.

Gráfico 3 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de emissão dos filmes de adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose ($\lambda_{\text{exc}}=532$ nm).

As coordenadas x e y do ponto máximo da banda de emissão de cada espectro estão apresentadas na **tabela 2**.

Tabela 2 - Coordenadas x e y do máximo das bandas de emissão dos espectros no gráfico 3.

	mpC ₁	mpC ₂	mpC ₃	mpC ₄	mpC ₅
y (unid. arb.)	3,47	1,27	0,36	0,08	0,006
x (nm)	576	573,2	569,2	568,4	565

Os espectros de emissão obtidos com a análise dos filmes do adesivo Clearfil SE Bond (se) estão mostrados no **gráfico 4**.

Gráfico 4 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de emissão dos filmes de adesivo Clearfil SE Bond ($\lambda_{\text{exc}}=532$ nm).

As coordenadas x e y do ponto máximo da banda de emissão de cada espectro estão apresentadas na **tabela 3**.

Tabela 3 - Coordenadas x e y do máximo das bandas de emissão dos espectros no gráfico 4.

	seC ₁	seC ₂	seC ₃	seC ₄	seC ₅
y (unid. arb.)	3,67	1,3	0,16	0,09	0,01
x (nm)	587,4	582,8	572,6	579,1	577

O deslocamento dos máximos das bandas de emissão em cada conjunto de espectro pode ser mais bem avaliado nos gráficos normalizados nos **apêndices A, B e C**. Além dos espectros de emissão, foram obtidos os espectros de excitação de todos os materiais testados, em que é possível avaliar o máximo comprimento de onda de excitação, conforme a concentração de rodamina B e o adesivo (**apêndices D, E e F**).

5.2 Análise microscópica dos filmes de adesivo

Com a análise microscópica dos cinco filmes de adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose, obtiveram-se as fotomicrografias abaixo (**figura 25**), as quais

serviram para a comparação da intensidade do sinal de fluorescência, de acordo com a concentração do marcador fluorescente em cada filme.

Figura 25 - Fotomicrografias dos filmes **mp**. MCVL $\lambda_{\text{EXC}}=532$ nm; intensidade do laser 10%; x40/1,15 AN em óleo.

A análise microscópica dos cinco filmes de adesivo Clearfil SE Bond proporcionou as seguintes fotomicrografias agrupadas na **figura 26**.

Figura 26 - Fotomicrografias dos filmes **se**. MCVL. $\lambda_{\text{EXC}}=532$ nm; intensidade do laser 10%; x40/1,15 AN em óleo.

5.3 Análise morfológica da interface de adesão

A análise qualitativa da interface de adesão com os sistemas adesivos modificados foi baseada em trinta fotomicrografias. A viabilidade das diferentes concentrações de rodamina B (C_2 , C_3 e C_4) nos *primers* e adesivos marcados foi avaliada de acordo com a saturação de vermelhos e o contraste entre as estruturas observadas durante a análise microscópica. Para que as diferentes condições experimentais pudessem ser comparadas, fotomicrografias de alguns espécimes foram selecionadas e agrupadas de forma didática nos **quadros 12 e 13**.

O resultado da estratégia de modificação do sistema Adper Scotchbond Multi-Purpose pode ser avaliado no quadro 12.

Quadro 12 - Resultados da análise microscópica com sistema Adper Scotchbond Multi-Purpose.

Grupo de coroas de onde o espécime proveio	Lado em que apenas o primer foi modificado	Lado em que apenas o adesivo foi modificado
MPC ₂
MPC ₃
MPC ₄

CH: camada híbrida
RC: resina composta

O resultado da estratégia de modificação do sistema Clearfil SE Bond pode ser avaliado no quadro 13.

Quadro 13 - Resultados da análise microscópica com sistema Clearfil SE Bond.

Grupo de coroas de onde o espécimes proveio	Lado em que apenas o <i>primer</i> foi modificado	Lado em que apenas o <i>adesivo</i> foi modificado
SEC ₂	tag	RC
SEC ₃	RC	camada de adesivo
SEC ₄		RC CH camada de adesivo

CH: camada híbrida
RC: resina composta

Outras fotomicrografias foram disponibilizadas, individualmente, no **apêndice M**, juntamente de suas respectivas especificações de técnica microscópica.

6 Discussão

6 Discussão

Por meio deste trabalho, foram reunidas várias informações sobre como diferentes concentrações de rodamina B podem influenciar a avaliação morfológica da interface de adesão com sistemas adesivos marcados. Isso foi possível com o estudo da fluorescência (nos adesivos marcados) tanto no âmbito espectroscópico, como no microscópico. Para viabilizar a utilização de concentrações diminutas de rodamina B no preparo das amostras, elaborou-se uma técnica precisa de modificação de adesivos a partir de soluções de rodamina B em etanol.

6.1 A técnica de modificação de sistemas adesivos a partir de soluções de etanol

Em função do alto coeficiente de extinção molar da rodamina B, sua concentração pode ser bastante baixa nas estruturas rotuladas para análise microscópica (WATSON, 1997; D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO et al., 2006b). Porém, a revisão da literatura revelou que não há evidências de quão pequena venha a ser a quantidade de rodamina (e de outros marcadores fluorescentes) necessária e suficiente para a visualização da interface de adesão com sistemas adesivos marcados. O quadro 3 mostra que sequer a concentração dos marcadores fluorescentes tem sido devidamente informada nos trabalhos publicados. A descrição da técnica de incorporação dos marcadores nos sistemas adesivos é igualmente rara. Nas poucas vezes em que se encontram esses detalhes, consta que o marcador foi adicionado diretamente no interior do frasco de adesivo fornecido pelo fabricante (GRIFFITHS; WATSON; SHERRIFF, 1999; D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO; RUEGGEBERG; CARVALHO et al., 2006; D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO et al., 2006a; ARRAIS et al., 2009). Sobre este procedimento, destacamos algumas possíveis fragilidades, como a incerteza de que o conteúdo líquido do frasco seja, exatamente, igual ao informado pelo fabricante no rótulo do produto. Além disso, os sistemas adesivos costumam ser comercializados em frascos que contêm poucos mililitros de resina fluida (menos de 10 mL geralmente). Isso se torna

um fator limitante, quando se deseja alcançar concentrações muito baixas do marcador fluorescente nas soluções, pois, quanto menor for o volume da solução, menor deverá ser a massa de soluto empregada ($C = m_{\text{(SOLUTO)}}/V_{\text{(SOLUÇÃO)}}$). Mesmo que se utilize uma balança analítica do tipo semi-micro (legibilidade de 0,01 mg), a pesagem de massas demasiadamente pequenas pode ser inviável, inclusive, porque fatores externos, como temperatura e umidade, passam a ter maior influência sobre o desvio padrão da leitura¹ e, conseqüentemente, sobre a precisão do procedimento. Talvez, esta dificuldade de se pesar quantidades mínimas de pó tenha contribuído para que, na maioria dos estudos publicados, a concentração de marcador fluorescente nos sistemas adesivos tenha sido maior do que o necessário aparentemente.

Neste estudo, a fluorescência da rodamina B foi avaliada de acordo com diferentes condições experimentais, variando-se os fatores **(a)** tipo de solvente e **(b)** concentração de rodamina. Desta forma, os sistemas adesivos Adper Scotchbond Multi-Purpose e Clearfil SE Bond foram modificados com o marcador em várias concentrações decrescentes (C_1 , C_2 , C_3 , C_4 e C_5). Para se ter uma noção de quanto as concentrações variaram, C_5 (0,0008 mg/mL) é seiscentos e vinte e cinco vezes menor que C_1 (0,50 mg/mL). Além disso, nos adesivos modificados, a molaridade (mol/L) da rodamina se tornou, gradativamente, muito baixa (quadro 5). Como o volume de resina fluida empregado nos experimentos também foi pequeno (da ordem de alguns microlitros), houve a necessidade de se adotar uma técnica de proporcionamento que permitisse a distinção de quantidades diminutas de rodamina, a fim de se atingir as concentrações mais baixas com precisão.

A modificação de sistemas adesivos a partir de soluções de rodamina B em etanol mostrou-se um procedimento eficaz e preciso. Com essa técnica, a massa de rodamina B estipulada para a marcação de determinado volume de adesivo foi adquirida através de pequenas alíquotas de etanol concentradas. Essas alíquotas provieram de soluções de etanol contendo rodamina B em diferentes concentrações. Mesmo que a concentração fosse alta, a massa de rodamina contida na alíquota permanecia muito pequena (devido ao baixo volume utilizado), de tal forma que essa massa não poderia ter sido pesada em uma balança analítica. Entretanto, o volume das alíquotas pôde ser aferido, facilmente, com o auxílio de micropipeta e transferido

¹ Fatores com influência no desvio padrão da leitura na balança são, normalmente, informados no manual de instruções do equipamento.

para recipiente apropriado para a mistura com as resinas fluidas. Desta forma, desde que se conheça a concentração de rodamina B na solução de onde a alíquota proveio, qualquer massa de soluto (rodamina) pode ser adquirida e transportada, variando-se o volume da alíquota dispersante.

A técnica foi aplicada, com êxito, na confecção dos filmes de adesivo (quadro 7) e no preparo dos sistemas adesivos utilizados na avaliação microscópica da interface de adesão (quadro 10). Nesse estudo, especificamente, trabalhou-se com volumes reduzidos de resina fluida (de 25 μL a 200 μL). Todavia, a técnica pode ser adotada na modificação de volumes maiores, desde que se considerem as seguintes particularidades:

- i. As alíquotas contendo rodamina devem ser transferidas para recipientes de vidro, pois há evidências de que o marcador sofra adsorção em materiais poliméricos (Huang, Huang et al., 2008; Yu, Li et al., 2009). As dimensões do recipiente devem ser apropriadas para a mistura dos componentes;
- ii. Os recipientes devem ser lisos, pois a presença de irregularidades na superfície, como sulcos e ranhuras, pode fazer com que a rodamina B se deposite nessas regiões, tornando-se indisponível para a mistura com o adesivo;
- iii. O solvente das alíquotas (etanol) sempre deve ser evaporado antes da transferência do *primer*/adesivo, restando a massa de soluto apenas;
- iv. Os componentes devem ser misturados até que haja homogeneidade.

Para obter maior precisão na concentração da solução de estoque, ainda seria possível recorrer à titulação por exemplo.

Com a elaboração da técnica de proporcionamento, as resinas fluidas puderam ser modificadas com rodamina B de acordo com as condições experimentais pré-determinadas, dando-se início ao estudo do comportamento ótico do marcador fluorescente, no intuito de se determinar quais concentrações deveriam ser utilizadas na avaliação microscópica da interface de adesão.

6.2 Generalidades sobre o comportamento ótico da rodamina B na MCVL

Quando uma estrutura impregnada com marcador fluorescente é observada via MCVL, a percepção visual da cor é consequência do fenômeno de fluorescência (PAWLEY, 2006). Este princípio se aplica à análise da interface de adesão com sistemas adesivos modificados com rodamina B, diferindo-se completamente da maneira como a rodamina é percebida durante o preparo dos adesivos, ou espécimes marcados por exemplo.

A percepção das cores se baseia em dois princípios físicos distintos: (i) reflexão (especular ou difusa) da luz em determinados comprimentos de onda (HANRAHAN; KRUEGER, 1993; BASS et al., 2010); (ii) emissão (fluorescência) de luz por elétrons retornando de um estado excitado para um estado de menor energia (PAWLEY, 2006). Na reflexão da luz, as cores que enxergamos são o resultado da soma de todas as ondas eletromagnéticas (no espectro visível) não absorvidas pelas substâncias. Já a fluorescência envolve o processo de excitação de grupos moleculares específicos (fluoróforos), em que se absorve energia radiante em certo comprimento de onda e, então, parte dessa energia é liberada em outros comprimentos de onda de menor energia (**figura 27**).

Figura 27 - Representação do fenômeno de fluorescência (diagrama de Jablonski). S_0 : estado (singlete) fundamental, S_1 : estado excitado singlete de menor energia, S_2 : estado excitado singlete de maior energia.

Considerando estas informações, as cores visualizadas, a olho nu, nas soluções de etanol (figura 8) e nos filmes de adesivo (figuras 10 e 11) resultam, fundamentalmente, do fenômeno de reflexão da luz visível. Sob as condições de

iluminação ambiente, o que se percebe da rodamina B são as cores refletidas, variando, de modo geral, de matizes de vermelho (soluções mais concentradas) para matizes de rosa e magenta (soluções mais diluídas). A fluorescência da rodamina, praticamente, não pode ser percebida nessas condições de iluminação, porque os fluoróforos necessitam de maior energia de excitação, para que o efeito visual da fluorescência consiga suplantar o da luz refletida.

As condições ideais para a excitação dos fluoróforos podem ser alcançadas com a utilização de lasers específicos, que contemplem as características necessárias para o desencadeamento da fluorescência (INOUE, 2006). Desta forma, na análise microscópica, as amostras contendo rodamina B foram iluminadas com um laser de cor verde (melhor banda de excitação para a rodamina), porém a percepção visual do conteúdo marcado remeteu aos vermelhos.

Estas diferenças na percepção ótica das amostras também são evidentes, ao se comparar os filmes de adesivo na figura 10, registrados por reflexão da luz branca (com câmera fotográfica), com as fotomicrografias na figura 25, registradas por fluorescência (via MCVL) a partir das mesmas amostras. Comparação semelhante pode ser estabelecida entre as amostras na figura 11 e as fotomicrografias na figura 26. Trata-se dos mesmos filmes de adesivo registrados a partir de dois fenômenos distintos: reflexão de luz e fluorescência.

Outro fator a influenciar a forma como enxergamos as amostras coradas é a concentração de marcador fluorescente nas soluções. Na figura 8, a cor de cada solução de rodamina em etanol aparenta menos saturada conforme a concentração do corante diminui. De fato, segundo a lei de Lambert-Beer, a intensidade da luz transmitida por uma solução (corada) é uma função da concentração da substância absorvente no meio (VOGEL; MENDHAM, 2000). A fluorescência, entretanto, não mantém uma relação linear com a concentração de fluoróforo necessariamente (LAKOWICZ, 2006a), e isso pode afetar a forma como as amostras marcadas são percebidas na MCVL. Estudos físico-químicos mostram, inclusive, que materiais sobrecarregados com marcador fluorescente podem apresentar supressão da fluorescência (PENZKOFER; LU, 1986; PETIT; DENIS-GAY; RATINAUD, 1993; TSIEN; ERNST; WAGGONER, 2006), comprometendo a viabilidade da análise microscópica das estruturas marcadas.

Para melhor compreender a fluorescência da rodamina B nas amostras, foi adequado recorrer à espectroscopia de fotoluminescência. O estudo espectroscópico

da rodamina se justificou por revelar aspectos do comportamento fotofísico do marcador fluorescente nas diferentes condições experimentais e fornecer parâmetros importantes na determinação das condições ideais da técnica de microscopia confocal, como os máximos comprimentos de ondas de excitação e de emissão.

6.3 Espectroscopia de fotoluminescência

A espectroscopia de fotoluminescência é uma ferramenta utilizada no levantamento de dados físico-químicos de materiais fotoluminescentes, como a rodamina B, por exemplo. Isso envolve os processos de absorção de energia radiante e de emissão de parte dessa energia na forma de luz, normalmente, na região visível do espectro eletromagnético (BLASSE; GRABMAIER, 1994; LAKOWICZ, 2006b). Com esta técnica, foi possível estudar aspectos do comportamento fotofísico da rodamina nas soluções de etanol e nos filmes de adesivo (grupos mp e se). Mesmo havendo maior interesse pelos adesivos marcados, amostras das soluções de rodamina em etanol também foram analisadas, pois, nesse estudo, o marcador foi adicionado aos adesivos a partir de alíquotas provenientes daquelas soluções.

Cada espectro de emissão registrado (gráficos 2, 3 e 4) permitiu monitorar a intensidade da fluorescência (eixo y) em cada comprimento de onda emitida (eixo x). Desta forma, avaliou-se, em diferentes grupos experimentais, o efeito da concentração de rodamina B sobre a intensidade da fluorescência e o deslocamento horizontal de banda.

Em sintonia com outros estudos (PETIT; DENIS-GAY; RATINAUD, 1993; LAKOWICZ, 2006a) o efeito não linear da concentração de marcadores fluorescentes sobre a intensidade da fluorescência foi confirmado nos espectros de emissão das soluções de rodamina B em etanol (gráfico 2). A solução etC₁ – a mais concentrada de todas – apresentou a menor intensidade de emissão (1,26 unid. arb.), enquanto que a solução etC₄, uma das menos concentradas, mostrou uma banda de emissão com a maior intensidade de fluorescência (7,54 unid. arb.). Os espectros registrados de etC₁ e etC₂ (as soluções mais concentradas) evidenciaram

a ocorrência de supressão da fluorescência (*quenching*), confirmando que a concentração é um dos fatores com influência sobre os processos de excitação de fluoróforos e liberação de energia radiante.

Em soluções muito concentradas, as moléculas se mantêm demasiadamente próximas umas das outras e podem acabar transferindo energia não radiante entre si, em vez de liberar, na forma de fluorescência, parte da energia absorvida (LAKOWICZ, 2006a) (**figura 28**). Quanto maior for o número de transferências, maiores serão as perdas com energia não radiante, como na forma de calor por exemplo.

Figura 28 - Ilustração do fenômeno de transferência de energia.

Este aspecto do comportamento fotofísico da rodamina B em etanol não se repetiu, regularmente, nos espectros de emissão dos filmes de adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose (gráfico 3) e Clearfil SE Bond (gráfico 4). Na maioria das amostras de resina polimerizada, a intensidade da fluorescência diminuiu, gradativamente, com a concentração do marcador fluorescente. Diferentemente do ocorrido com as soluções de rodamina em etanol, as concentrações mais altas não apresentaram sinal de supressão.

Um dos propósitos do estudo espectroscópico da rodamina adicionada a diferentes solventes (etanol e adesivos) foi, justamente, ter a oportunidade de detectar as variações do comportamento fotofísico do marcador fluorescente, de acordo com cada material dispersante e com as concentrações adotadas. Tais variações podem estar relacionadas a propriedades do material dispersante, como a viscosidade (CHANG; BORST, 1990; DESHPANDE; NAMDas, 2000, VALEUR, 2002). Assim, enquanto as partículas dispersas podem se deslocar livremente pelo etanol (baixíssima viscosidade), aproximando-se umas das outras, a rede polimérica dos adesivos (MALACARNE et al., 2006) deve dificultar esta movimentação. Supõe-se que a redução na mobilidade das moléculas contribua para a não ocorrência de

supressão da fluorescência naqueles dois filmes onde havia maior quantidade de rodamina B.

Nos filmes de adesivo, as concentrações C_4 e C_5 forneceram espectros de emissão com as menores intensidades. Esses espectros podem sugerir, precipitadamente, que aquelas duas concentrações mais baixas não seriam viáveis no estudo da interface de adesão com sistemas adesivos modificados com o marcador fluorescente. Entretanto, deve-se considerar que os espectros são simples representações gráficas de um processo, não envolvendo nenhum meio de percepção visual do sinal da fluorescência. Por isso, embora eles tenham sido fundamentais no estudo fotofísico da rodamina B em diferentes condições experimentais, a confirmação da viabilidade das concentrações de rodamina nos adesivos dependeu, principalmente, da avaliação microscópica (MCVL) dos filmes.

Na análise espectroscópica, cada ponto no espectro fornece não somente informações acerca da intensidade da fluorescência (eixo y), mas sobre o deslocamento horizontal de banda também (eixo x). Embora a relação entre intensidade e concentração tenha se manifestado de forma bastante divergente entre as soluções de rodamina em etanol, o mesmo não ocorreu com o deslocamento horizontal dos máximos das bandas de emissão tanto das soluções, como dos filmes de adesivo. No geral, em cada conjunto de espectros, os máximos das bandas de emissão se deslocaram para menores comprimentos de onda (eixo x), conforme a concentração de rodamina nos solventes reduziu (apêndices A, B e C). Apesar dos deslocamentos, o ponto máximo das bandas se manteve na mesma faixa no espectro visível – entre os amarelos e alaranjados (tabelas 1, 2 e 3).

Afirmar que, em cada espectro de emissão, a máxima intensidade da fluorescência ocorreu em um comprimento de onda na região dos amarelos pode parecer confuso, uma vez que os espécimes marcados com rodamina B são vermelhos, quando visualizados no microscópio confocal de varredura a laser. Na realidade, a cor percebida durante a análise microscópica é o resultado do efeito somatório de várias emissões em diferentes comprimentos de onda no espectro visível. Para esclarecer este processo, o espectro de emissão do filme mpC₁ foi sobreposto a um espectro contínuo de luz visível correspondente aos comprimentos de onda de emissão (**gráfico 5**).

Gráfico 5 - Espectro de emissão (fotoluminescência) do filme mpC₁.

Nesse espectro, embora a máxima intensidade da fluorescência ($y=3,47$ unid. arb.) ocorra na região dos amarelos ($x=576$ nm), foram registradas várias outras emissões de menor intensidade (e diferentes comprimentos de onda) tanto à esquerda, como a direita do ponto máximo da banda de emissão, incluindo-se os verdes e uma faixa mais larga de alaranjados vermelhos. Por isso, não se percebe a cor amarela unicamente durante a análise microscópica. Isso seria possível, se um filtro de barreira (de emissão) fosse utilizado. Todavia, os resultados obtidos com uma faixa mais ampla de detecção de luz são satisfatórios, tanto que o microscópio confocal de varredura a laser utilizado nos experimentos foi ajustado, previamente, para detectar luz entre 550 nm e 750 nm em todas as análises. Contudo, conhecer essas características de emissão de fluorescência em adesivos marcados pode auxiliar na determinação de parâmetros importantes para a MCVL, como a faixa ajustável de detecção de espectro, o que pode ser extremamente útil em estratégias de dupla marcação, em que são utilizados dois marcadores fluorescentes com características de emissão diferentes.

Além dos espectros de emissão, também foram registrados os espectros de excitação das soluções de etanol e dos filmes de adesivo (apêndices D, E e F). Para obter um espectro de excitação, é preciso estipular um comprimento de onda de emissão fixo (fluorescência em um único comprimento de onda) e, então, monitorar como a intensidade da fluorescência (naquele mesmo comprimento de onda) varia,

ao se radiar o fluoróforo com luz de diferentes comprimentos de onda de excitação (TURRO; RAMAMURTHY; SCAIANO, 2010).

Uma importante informação extraída desses espectros é o máximo comprimento de onda de excitação do fluoróforo. Com isso, é possível prever “a melhor cor” (comprimento de onda) de laser utilizado na MCVL. Todos os espectros de excitação capturados dos filmes de adesivo (apêndices E e F) mostraram máximos das bandas de excitação nos verdes (553-563 nm). Considerando-se que, nos experimentos, o microscópio confocal utilizado oferecia lasers de comprimentos de onda 405 nm (violeta), 488 nm (ciano), 532 nm (verde), 561 nm (verde), ou 635 nm (vermelho), foi necessário verificar se os melhores resultados seriam obtidos com iluminação a 532 nm, ou a 561 nm durante a análise microscópica, embora a variação de intensidade (em cada espectro) entre esses dois comprimentos de onda tenha sido baixa aparentemente.

6.4 Análise microscópica dos filmes de adesivo

Complementando o estudo espectroscópico, o comportamento ótico da rodamina B nos filmes de adesivo também foi avaliado no âmbito microscópico. Por isso, uma fotomicrografia de cada filme foi registrada via MCVL.

Uma das constatações mais importantes dessa avaliação microscópica preliminar é que as fotomicrografias dos filmes de adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose (na figura 25) são muito semelhantes às dos filmes de Clearfil SE Bond (na figura 26). Para uma mesma concentração de rodamina B (C_1 , C_2 , C_3 , C_4 ou C_5), os diferentes adesivos marcados (mp e se) apresentaram intensidade de fluorescência – percebida na saturação de cor – praticamente idênticas durante a análise microscópica. Curiosamente, os espectros de emissão registrados dos filmes de adesivo mostraram que uma mesma concentração de rodamina manifestou diferenças no comportamento fotofísico de acordo com o tipo de adesivo (**apêndices G, H, I, J e K**). Este contraste de informações entre a microscopia e a espectroscopia sugere que, nem sempre, a visão humana será capaz de perceber algumas variações mensuráveis através de ferramentas mais sensíveis e precisas. Por outro lado, espectroscopia e microscopia se corresponderam constantemente,

no que diz respeito ao efeito da redução da concentração (nos filmes) sobre a intensidade da fluorescência.

A redução na concentração de rodamina B nos filmes de adesivo – seja do grupo mp, ou do se – ocasionou a redução da intensidade do sinal observado via MCVL. À medida que a concentração de rodamina no adesivo diminuiu, a saturação da cor registrada microscopicamente também se tornou escassa (figura 25-D/E e figura 26-D/E). A ausência de cor (figuras 25-E e 26-E) indica que o marcador fluorescente não foi capaz de promover fluorescência suficiente para a visualização do conteúdo marcado, conforme os parâmetros adotados na MCVL.

Neste momento, é importante considerar outros fatores com influência sobre a MCVL, como a intensidade do laser. Para que os filmes de adesivo pudessem ser comparados entre si, todas as fotomicrografias foram capturadas, mantendo-se parâmetros fixos de técnica microscópica (quadro 8). Com base naqueles parâmetros, os filmes de adesivo (dos grupos mp e se) contendo rodamina nas concentrações C_4 e C_5 não produziram fluorescência suficiente durante a análise microscópica. Contudo, com o intuito de chamar a atenção para a influência de configurações técnicas sobre a qualidade da análise, um simples procedimento extra foi conduzido com os filmes mp C_4 e se C_4 , em que se aumentou a intensidade do laser (FOAA) de 10% para 30%. O resultado desta nova análise foi que os filmes passaram a espalhar luz mais intensamente, melhorando a visualização do conteúdo (**apêndice L**). Isso mostra que a determinação das concentrações de marcador fluorescente nos sistemas adesivos depende, inclusive, dos parâmetros técnicos adotados para a realização da análise microscópica. Esta constatação foi levada em conta na pré-seleção das concentrações de rodamina B adotadas no estudo da interface de adesão com sistemas adesivos marcados (figura 19).

6.5 Análise morfológica da interface de adesão via MCVL

Através da análise microscópica dos espécimes em dentina, confirmou-se que, realmente, é possível utilizar sistemas adesivos contendo rodamina B em concentrações muito menores do que as mencionadas na literatura até agora (quadro 3). De acordo com os resultados apresentados nos quadros 12 e 13, os

sistemas adesivos Adper Scotchbond Multi-Purpose e Clearfil SE Bond puderam ser visualizados, microscopicamente, quando marcados com rodamina B nas três concentrações pré-selecionadas: C₂ (0,10 mg/mL), C₃ (0,02 mg/mL) e C₄ (0,004 mg/mL).

Nos espécimes provenientes dos grupos (de coroas) MPC₂ e SEC₂, os adesivos ou *primers* continham rodamina a 0,10 mg/mL. As fotomicrografias registradas daqueles espécimes mostram alta saturação de vermelhos e alto contraste e, em relação à qualidade da análise microscópica, elas não sugeriram nenhuma vantagem, quando comparadas com as fotomicrografias dos grupos MPC₃ e SEC₃ (concentração de rodamina cinco vezes menor). Nesses últimos grupos, os componentes resinosos continham o marcador a 0,02 mg/mL, e as fotomicrografias registradas apresentam contraste satisfatório e saturação dos vermelhos ligeiramente menor, favorecendo a distinção das microestruturas marcadas.

Mesmo nos espécimes provenientes dos grupos MPC₄ e SEC₄ (0,004 mg/mL) foi possível observar a morfologia da interface de adesão, ainda que o contraste e a saturação tenham diminuído notavelmente. Os resultados da análise microscópica sugerem, inclusive, que outras concentrações entre C₃ e C₄ permitiriam a observação das estruturas marcadas de forma satisfatória dentro dos parâmetros de técnica envolvidos. Por isso, é mais razoável considerar a viabilidade de faixas de concentrações mínimas, em vez de se enfatizar um valor ou outro separadamente, tornando-os um padrão. Inclusive, porque o resultado final não depende, unicamente, da concentração do marcador, mas também de uma série de fatores, conforme já foi abordado.

Em vários estudos laboratoriais publicados, os marcadores fluorescentes têm sido dissolvidos tanto em *primers*, como em adesivos. Por isso, na confecção dos espécimes em dentina destinados à análise microscópica, adotou-se uma estratégia de aplicação dos sistemas adesivos (MP e SE) em que, ou apenas o *primer* havia sido marcado com rodamina previamente, ou apenas o adesivo (quadro 9). Desta maneira, foi possível constatar como a marcação distinta desses componentes influenciou a análise morfológica da interface de adesão. No geral, quando a rodamina B foi adicionada nos *primers* somente, notou-se uma tendência de se visualizar, com mais ênfase, as *tags* de resina, enquanto a camada superficial de adesivo e, esporadicamente, a camada híbrida apresentaram menor saturação e contraste (fotomicrografias à esquerda nos quadros 12 e 13). Já nos casos em que a

rodamina foi adicionada nos adesivos apenas, toda a micromorfologia da interface de adesão pôde ser contemplada de forma mais homogênea: a camada de resina composta impregnada por rodamina, a camada subjacente de adesivo marcado, a camada híbrida e as *tags* (fotomicrografias à direita nos quadros 12 e 13). Estas diferenças na visualização das estruturas, conforme o componente marcado, foram mais pronunciadas nos espécimes em que a concentração de rodamina estava mais baixa (grupos MPC₃, MPC₄, SEC₃ e SEC₄).

Nas vezes em que apenas o *primer* havia sido marcado previamente, as *tags* puderam ser mais bem visualizadas do que as outras estruturas, provavelmente, porque as moléculas de rodamina B se concentraram no interior dos túbulos dentinários, à medida que o *primer* deslocou (ou se misturou com) parte da água neles remanescente (WANG; SPENCER, 2002; SAURO et al., 2010). Sendo o *primer* muito menos viscoso que o adesivo, também pode ser que algumas moléculas de rodamina tenham se difundido para a dentina peritubular úmida, marcando-a. A difusão de marcadores fluorescentes para outros materiais é semelhante ao processo de lixiviação já descrito em outros estudos (D'ALPINO; PEREIRA; SVIZERO et al., 2006a, b). Ao contrário do *primer*, a alta viscosidade dos adesivos deve dificultar a difusão de moléculas de rodamina B para estruturas adjacentes, contribuindo para a preservação da homogeneidade do sistema mesmo após a aplicação sobre a dentina úmida. De fato, a adição de rodamina nos adesivos forneceu melhores resultados em relação à totalidade de estruturas observadas microscopicamente.

Avaliar a interface de adesão, variando-se a concentração de rodamina B nos sistemas adesivos, foi um passo decisivo na determinação final da faixa mínima de concentrações de rodamina em que a análise microscópica ainda é viável. Estudos anteriores não reportaram esta etapa na verificação das condições ideais da técnica de microscopia em seus experimentos (quadro 3).

Conhecer uma faixa de concentrações mínimas de marcador fluorescente, porém suficientes, é importante, à medida que se pretende alterar minimamente a composição original dos sistemas adesivos. Presume-se que, quanto menor a quantidade de marcador acrescentado às resinas fluidas, menores serão as chances de haver alteração de suas propriedades/características físico-químicas, as quais estão associadas, intimamente, ao processo de adesão (WANG et al., 2007; PARK et al., 2011). Ao se determinar uma faixa mínima de concentrações, pretende-se

contemplar a preservação de tais características dos materiais resinosos. Uma vez que certa concentração seja validada, pode-se, então, avaliar o seu efeito sobre diferentes propriedades dos sistemas adesivos, adotando-se os métodos apropriados.

No estudo de D'Alpino, Pereira, Svizero et al. (2006a), foram avaliadas algumas características do sistema Adper Single Bond em função da concentração de rodamina B no adesivo. Os autores concluíram que a concentração de 0,16 mg/mL não provocou alterações na resistência de união à dentina por exemplo, sendo considerada segura. Não se avaliou, entretanto, o aspecto da interface de adesão em espécimes tratados com rodamina B naquela concentração (0,16 mg/mL), tampouco se concentrações ainda menores também permitiriam a visualização das estruturas marcadas.

A concentração 0,10 mg/mL (C_2) é bastante próxima da referida por D'Alpino et al. (2006a). Ainda que os sistemas adesivos avaliados sejam outros, os resultados da análise microscópica mostraram que a concentração C_2 foi maior que o necessário, pois C_3 (cinco vezes menor) forneceu resultados totalmente satisfatórios na MCVL. Por isso, é mais razoável que a faixa mínima de concentrações de marcador fluorescente nas resinas fluidas seja determinada antes do estudo de propriedades, pensando-se nas características de cada sistema empregado.

Sobre outros fatores com impacto na MCVL, é importante informar que, durante a análise morfológica dos espécimes em dentina, oscilaram-se, singelamente, algumas configurações, como a intensidade e a voltagem do laser. Esses parâmetros não excederam, todavia, os limites para uma análise de conteúdo biológico – no caso, a dentina. Esta flexibilidade na configuração de alguns parâmetros é valiosa para o melhor aproveitamento da técnica microscópica, de acordo com as condições experimentais estipuladas. Atentando-se para o impacto dos vários fatores já discutidos, é possível usufruir da fluorescência com menos chances de comprometimento dos materiais marcados.

7 Conclusões

7 Conclusões

A quantidade de rodamina B em sistemas adesivos não deve ser estimada de forma empírica, como tem se observado na literatura. Este trabalho mostrou que, com base em estudos espectroscópios e microscópicos, é possível determinar uma faixa de concentrações mínimas de rodamina, porém suficientes para a avaliação da interface de adesão com os adesivos modificados.

Sobre a técnica utilizada no preparo dos sistemas adesivos marcados com rodamina, concluímos que:

1. A técnica de adição de rodamina B a sistemas adesivos a partir de soluções de etanol mostrou-se bastante eficaz e precisa, permitindo o preparo homogêneo de volumes reduzidos (microlitros) de resina fluida contendo rodamina em concentrações mínimas.

Com base nos resultados das análises espectroscópicas e microscópicas, conclui-se que:

2. O comportamento fluorescente da rodamina B, avaliado através dos espectros de emissão e excitação, foi influenciado tanto pela concentração, como pelo tipo de solvente no qual o marcador estava dissolvido;
3. A concentração de rodamina B interfere na qualidade da análise morfológica da interface de adesão, sendo que o excesso do marcador pode dificultar a distinção de detalhes micromorfológicos. A concentração C_3 (0,02 mg/mL) ofereceu os melhores resultados na avaliação da interface com sistemas adesivos marcados;
4. A qualidade da análise morfológica é influenciada pelo solvente (*primer*, ou adesivo) em que a rodamina é adicionada, sendo que melhores resultados, em termos de contraste e saturação, foram obtidos quando o marcador havia sido adicionado ao componente adesivo;

5. A determinação das condições ideais da análise (morfológica) microscópica dependeu, principalmente, da concentração de rodamina nas resinas fluidas, do solvente em que a rodamina foi adicionada (*primer* ou adesivo) e do ajuste de parâmetros técnicos, como a intensidade do laser utilizado e o comprimento de onda de excitação mais apropriado, por exemplo.

Referências

REFERÊNCIAS

ALMAHDY, A. et al. Effects of MMP inhibitors incorporated within dental adhesives. **J Dent Res**, v. 91, n. 6, p. 605-11, June 2012.

ARRAIS, C. A. G. et al. Micromorphology of Resin/Dentin Interfaces Using 4th and 5th Generation Dual-curing Adhesive/Cement Systems: A Confocal Laser Scanning Microscope Analysis. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 11, n. 1, p. 15-26, Jan. 2009.

BASS, M. et al. **Handbook of optics. Volume III, Vision and vision optics**. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 2010. 1100 p.

BITTER, K. et al. Correlation of Scanning Electron and Confocal Laser Scanning Microscopic Analyses for Visualization of Dentin/Adhesive Interfaces in the Root Canal. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 11, n. 1, p. 7-14, Jan. 2009.

BITTER, K. et al. Morphological and bond strength evaluation of different resin cements to root dentin. **European Journal of Oral Sciences**, v. 117, n. 3, p. 326-333, June 2009.

BLASSE, G.; GRABMAIER, B. C. **Luminescent materials**. 1st ed. New York: Springer-Verlag, 1994. 232 p.

CHANG, T.-L.; BORST, W. L. Effect of solvent polarity on a rotational isomerization mechanism of rhodamine-B in normal alcohols. **The Journal of Chemical Physics**, v. 93, n. 7, p. 4724-4729, Jan. 1990

D'ALPINO, P. H. et al. A new technique for assessing hybrid layer interfacial micromorphology and integrity: two-photon laser microscopy. **J Adhes Dent**, v. 8, n. 5, p. 279-84, Oct. 2006.

D'ALPINO, P. H. et al. Factors affecting use of fluorescent agents in identification of resin-based polymers. **J Adhes Dent**, v. 8, n. 5, p. 285-92, Oct. 2006a.

D'ALPINO, P. H. et al. Use of fluorescent compounds in assessing bonded resin-based restorations: a literature review. **J Dent**, v. 34, n. 9, p. 623-34, Oct. 2006b.

DENK, W.; STRICKLER, J. H.; WEBB, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 73-6, Apr. 1990.

DESHPANDE, A. V.; NAMDAS, E. B. Correlation between lasing and photophysical performance of dyes in polymethylmethacrylate. **Journal of Luminescence**, v. 91, n. 1-2, p. 25-31, Sept. 2000.

DIASPRO, A.; ROBELLO, M. Two-photon excitation of fluorescence for three-dimensional optical imaging of biological structures. **J Photochem Photobiol B**, v. 55, n. 1, p. 1-8, Mar. 2000.

DING, P. G. et al. Relationship between microtensile bond strength and submicron hiatus at the composite-dentin interface using CLSM visualization technique. **Dent Mater**, v. 26, n. 3, p. 257-63, Mar. 2010.

DREXHAGE, K.-H. Structure and properties of laser dyes. In: SCHÄFER, F. **Dye Lasers**. New York: Springer, 1973. cap. 5, p.155-200.

DREXHAGE, K.-H. Fluorescence efficiency of laser dyes. **J. Res. Nat. Bur. Stand. Sec. A: Phys. Ch.**, v. 80A, n. 3, p. 421-28, 1976.

DÖRFER, C. E. et al. The nanoleakage phenomenon: influence of different dentin bonding agents, thermocycling and etching time. **Eur J Oral Sci**, v. 108, n. 4, p. 346-51, Aug. 2000.

FRANCISCONI, L. F. et al. The effects of occlusal loading on the margins of cervical restorations. **J Am Dent Assoc**, v. 140, n. 10, p. 1275-82, Oct. 2009.

FOXTON, R. M. et al. Long-term durability of one-step adhesive-composite systems to enamel and dentin. **Oper Dent**, v. 33, n. 6, p. 651-7, Nov./Dec. 2008.

GIACHETTI, L.; BERTINI, F.; SCAMINACI RUSSO, D. Investigation into the nature of dentin resin tags: a scanning electron microscopic morphological analysis of demineralized bonded dentin. **J Prosthet Dent**, v. 92, n. 3, p. 233-8, Sept. 2004.

GRIFFITHS, B. M.; WATSON, T. F. Resin-dentin interface of Scotchbond Multi-Purpose dentin adhesive. **Am J Dent**, v. 8, n. 4, p. 212-6, Aug. 1995.

GRIFFITHS, B. M.; WATSON, T. F.; SHERRIFF, M. The influence of dentine bonding systems and their handling characteristics on the morphology and micropermeability of the dentine adhesive interface. **J Dent**, v. 27, n. 1, p. 63-71, Jan. 1999.

GROBLER, S. R. et al. Shear bond strength, microleakage, and confocal studies of 4 amalgam alloy bonding agents. **Quintessence Int**, v. 31, n. 7, p. 501-8, 2000.

HANRAHAN, P.; KRUEGER, W. Reflection from layered surfaces due to subsurface scattering. **Proceedings of the 20th annual conference on Computer graphics and interactive techniques**, p.165-174. July 1993.

HUANG, J.-H. et al. Adsorption of Rhodamine B and methyl orange on a hypercrosslinked polymeric adsorbent in aqueous solution. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 330, n. 1, p. 55-61, Nov. 2008.

INOUE, S. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. In: PAWLEY, J. B. **Handbook of Biological Confocal Microscopy**. 3rd ed. Boston: Springer-Verlag US, 2006. cap. 1, p.1-19.

KREJCI, I. et al. The ultrastructure of a compomer adhesive interface in enamel and dentin, and its marginal adaptation under dentinal fluid as compared to that of a composite. **Dent Mater**, v. 15, n. 5, p. 349-58, Sept. 1999.

LAKOWICZ, J. R. Quenching of Fluorescence. In: _____. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Boston: Springer, 2006a. p.278-327.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3rd ed. Boston: Springer, 2006b. 980 p.

LANGER, A.; ILIE, N. Dentin infiltration ability of different classes of adhesive systems. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 1, p. 205-216, Jan. 2013.

MALACARNE, J. et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. **Dent Mater**, v. 22, n. 10, p. 973-80, Oct. 2006.

MARSHALL, G. W. et al. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **J Dent**, v. 25, n. 6, p. 441-58, Nov. 1997.

MARSHALL, S. J. et al. A review of adhesion science. **Dent Mater**, v. 26, n. 2, p. e11-6, Feb. 2010.

MASTERS, B. R.; SO, P. T. Antecedents of two-photon excitation laser scanning microscopy. **Microsc Res Tech**, v. 63, n. 1, p. 3-11, Jan. 2004.

NAKABAYASHI, N. Bonding of restorative materials to dentine: the present status in Japan. **Int Dent J**, v. 35, n. 2, p. 145-54, June 1985.

NAKABAYASHI, N.; KOJIMA, K.; MASUHARA, E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. **J Biomed Mater Res**, v. 16, n. 3, p. 265-73, May 1982.

NECKERS, D. C.; CAI, X. Organic photochemistry. **Annual Reports Section "B" (Organic Chemistry)**, v. 105, n. 0, p. 380-397, 2009.

PARK, J. et al. The influence of chemical structure on the properties in methacrylate-based dentin adhesives. **Dent Mater**, v. 27, n. 11, p. 1086-93, Nov. 2011.

PAWLEY, J. B. **Handbook of biological confocal microscopy**. 3rd ed. New York: Springer, 2006. 985 p.

PENZKOFER, A.; LU, Y. Fluorescence quenching of rhodamine 6G in methanol at high concentration. **Chemical Physics**, v. 103, n. 2-3, p. 399-405, Apr. 1986.

PETIT, J. M.; DENIS-GAY, M.; RATINAUD, M. H. Assessment of fluorochromes for cellular structure and function studies by flow cytometry. **Biol Cell**, v. 78, n. 1-2, p. 1-13, 1993.

PIOCH, T. et al. Surface characteristics of dentin experimentally exposed to hydrofluoric acid. **Eur J Oral Sci**, v. 111, n. 4, p. 359-64, Aug. 2003.

PIOCH, T. et al. Interfacial micromorphology and tensile bond strength of dentin bonding systems after NaOCl treatment. **J Adhes Dent**, v. 1, n. 2, p. 135-42, 1999.

PIOCH, T. et al. Applications of confocal laser scanning microscopy to dental bonding. **Adv Dent Res**, v. 11, n. 4, p. 453-61, Nov. 1997.

SAMPAIO, P. C. et al. Effect of conventional and resin-modified glass-ionomer liner on dentin adhesive interface of Class I cavity walls after thermocycling. **Oper Dent**, v. 36, n. 4, p. 403-12, 2011 July/Aug. 2011.

SAURO, S. et al. Micropermeability of current self-etching and etch-and-rinse adhesives bonded to deep dentine: a comparison study using a double-staining/confocal microscopy technique. **Eur J Oral Sci**, v. 116, n. 2, p. 184-93, Apr. 2008.

SAURO, S. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. **Dent Mater**, v. 26, n. 4, p. 368-79, Apr. 2010.

SCHÜPBACH, P.; KREJCI, I.; LUTZ, F. Dentin bonding: effect of tubule orientation on hybrid-layer formation. **Eur J Oral Sci**, v. 105, n. 4, p. 344-52, Aug. 1997.

SIDHU, S. K. et al. The morphology and stability of resin-modified glass-ionomer adhesive at the dentin/resin-based composite interface. **Am J Dent**, v. 15, n. 2, p. 129-36, Apr. 2002.

SNARE, M. J. et al. The photophysics of rhodamine B. **J Photochem**, v. 18, n. 4, p. 335-46, 1982.

SO, P. T. et al. Two-photon excitation fluorescence microscopy. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 2, p. 399-429, 2000.

TSIEN, R. Y.; ERNST, L.; WAGGONER, A. Fluorophores for Confocal Microscopy: Photophysics and Photochemistry. In: PAWLEY, J. B. **Handbook of biological confocal microscopy**. 3rd ed. New York: Springer, 2006. cap. 16, p.338-52.

TURRO, N. J.; RAMAMURTHY, V.; SCAIANO, J. C. **Modern molecular photochemistry of organic molecules**. Sausalito, Calif.: University Science Books, 2010. xxxiii, 1084 p.

VALEUR, B. Molecular fluorescence : principles and applications. Weinheim; New York: Wiley-VCH, 2002. viii, 250 p.

VAN MEERBEEK, B. et al. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. **J Dent Res**, v. 72, n. 2, p. 495-501, Feb. 1993.

VOGEL, A. I.; MENDHAM, J. **Vogel's textbook of quantitative chemical analysis**. 6th. Harlow: Prentice Hall, 2000. xxvii, 806 p.

WANG, Y.; SPENCER, P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. **J Biomed Mater Res**, v. 59, n. 1, p. 46-55, Jan. 2002.

WANG, Y. et al. Effect of solvent content on resin hybridization in wet dentin bonding. **J Biomed Mater Res A**, v. 82, n. 4, p. 975-83, Sept. 2007.

WATSON, T. F. A confocal optical microscope study of the morphology of the tooth/restoration interface using Scotchbond 2 dentin adhesive. **J Dent Res**, v. 68, n. 6, p. 1124-31, June 1989.

WATSON, T. F. Applications of confocal scanning optical microscopy to dentistry. **Br Dent J**, v. 171, n. 9, p. 287-91, Nov. 1991.

WATSON, T. F. Fact and artefact in confocal microscopy. **Adv Dent Res**, v. 11, n. 4, p. 433-41, Nov. 1997.

WATSON, T. F. et al. Confocal and multi-photon microscopy of dental hard tissues and biomaterials. **Am J Dent**, v. 13, n. Spec No, p. 19D-24D, Nov. 2000.

WATSON, T. F.; BOYDE, A. Tandem scanning reflected light microscopy: a new method for in vitro assessment of dental operative procedures and restorations. **Clin Mater**, v. 2, n. 1, p. 33-43, 1987a.

WATSON, T. F.; BOYDE, A. Tandem scanning reflected light microscopy: applications in clinical dental research. **Scanning Microsc**, v. 1, n. 4, p. 1971-81, Dec. 1987b.

WATSON, T. F.; BOYDE, A. The use of fluorescent markers for studying the distribution of a dentine bonding agent between a composite restoration and tooth. v. 2, n. 1, p. 45-53, 1987c.

WATSON, T. F.; BOYDE, A. Confocal light microscopic techniques for examining dental operative procedures and dental materials. A status report for the American Journal of Dentistry. **Am J Dent**, v. 4, n. 4, p. 193-200, Aug. 1991.

WATSON, T. F.; WILMOT, D. M. A confocal microscopic evaluation of the interface between Syntac adhesive and tooth tissue. **J Dent**, v. 20, n. 5, p. 302-10, Oct. 1992.

WHITE, J. G.; AMOS, W. B.; FORDHAM, M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. **J Cell Biol**, v. 105, n. 1, p. 41-8, July 1987.

WOLFF, D. et al. Analysis of the interdiffusion of resin monomers into pre-polymerized fiber-reinforced composites. **Dent Mater**, v. 28, n. 5, p. 541-7, May 2012.

WRIGHT, S. J. et al. Confocal fluorescence microscopy with the tandem scanning light microscope. **J Cell Sci**, v. 94 (Pt 4), p. 617-24, Dec. 1989.

YE, Q. et al. Relationship of solvent to the photopolymerization process, properties, and structure in model dentin adhesives. **J Biomed Mater Res A**, v. 80, n. 2, p. 342-50, Feb. 2007.

YU, J.-X. et al. Polymer modified biomass of baker's yeast for enhancement adsorption of methylene blue, rhodamine B and basic magenta. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, n. 2-3, p. 1147-1154, sept. 2009.

ZHENG, H. et al. Advances in modifying fluorescein and rhodamine fluorophores as fluorescent chemosensors. **Chem Commun (Camb)**, v. 49, n. 5, p. 429-47, Dec. 2012.

Apêndices

APÊNDICE A – Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de emissão normalizados das soluções de rodamina B em etanol

	etC ₁	etC ₂	etC ₃	etC ₄	etC ₅
$\lambda_{\text{EMI}} \text{ máximo (nm)}$	587	586	578,2	572	569

APÊNDICE B – Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de emissão normalizados dos filmes de adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose (mp)

	mpC ₁	mpC ₂	mpC ₃	mpC ₄	mpC ₅
$\lambda_{\text{EMI}} \text{ máximo (nm)}$	576	573,2	569,2	568,4	565

APÊNDICE C – Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de emissão normalizados dos filmes de adesivo Clearfil SE Bond (se)

	seC ₁	seC ₂	seC ₃	seC ₄	seC ₅
λ_{EMI} máximo (nm)	587,4	582,8	572,6	579,1	577

APÊNDICE D – Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de excitação das soluções de etanol contendo rodamina B ($\lambda_{\text{EMI}}=585 \text{ nm}$)

Máximo de excitação*	etC ₁	etC ₂	etC ₃	etC ₄	etC ₅
y (unid. arb.)	13,5	77,4	124,2	89,8	35,8
x (nm)	554,8	493,2	564	545,2	542,8

* Ponto máximo registrado na banda de luz visível da análise (400-570 nm)

APÊNDICE E – Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de excitação dos filmes de adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose ($\lambda_{EMI}=585$ nm)

Máximo de excitação*	mpC ₁	mpC ₂	mpC ₃	mpC ₄	mpC ₅
y (unid. arb.)	101	26,95	2,81	0,56	0,04
x (nm)	553,6	554,4	553,2	553,6	553

* Ponto máximo registrado na banda de luz visível da análise (400-570 nm)

APÊNDICE F – Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de excitação dos filmes de adesivo Clearfil SE Bond ($\lambda_{EMI}=585$ nm)

Máximo de excitação*	seC ₁	seC ₂	seC ₃	seC ₄	seC ₅
y (unid. arb.)	149	18,25	1,21	0,41	2,81
x (nm)	561,8	561,6	554,4	563	560,4

* Ponto máximo registrado na banda de luz visível da análise (400-570 nm)

APÊNDICE G – Espectroscopia de fotoluminescência (emissão). Comparação entre os adesivos **mp** e **se** modificados com rodamina B na mesma concentração C_1

APÊNDICE H – Espectroscopia de fotoluminescência (emissão). Comparação entre os adesivos **mp** e **se** modificados com rodamina B na mesma concentração C_2

APÊNDICE I – Espectroscopia de fotoluminescência (emissão). Comparação entre os adesivos **mp** e **se** modificados com rodamina B na mesma concentração C_3

APÊNDICE J – Espectroscopia de fotoluminescência (emissão). Comparação entre os adesivos **mp** e **se** modificados com rodamina B na mesma concentração C_4

APÊNDICE K – Espectroscopia de fotoluminescência (emissão). Comparação entre os adesivos **mp** e **se** modificados com rodamina B na mesma concentração C_5

APÊNDICE L – Resultado da variação da intensidade do laser na análise dos filmes de adesivo mpC₄ e seC₄

faixa de intensidade do laser	mpC ₄	seC ₄
10 %
30 %

APÊNDICE M – Fotomicrografias obtidas com a avaliação da interface de adesão através de microscopia confocal de varredura a laser – **material complementar**

Fotomicrografia 1 - Exemplar do grupo **MPC₃**. Campo onde o *primer* foi aplicado na composição original e o **adesivo modificado com rodamina (0,02 mg/mL)**. MCVL; $\lambda_{\text{EXC}}=532$ nm; intensidade do laser 17%; x40/1,15 AN em óleo.

Fotomicrografia 2- Exemplar do grupo **MPC₄**. Campo onde o ***primer*** foi modificado com **rodamina B (0,004 mg/mL)** e o adesivo aplicado na composição original. MCVL; $\lambda_{\text{exc}}=532$ nm; intensidade do laser 17%; x40/1,15 AN em óleo.

Fotomicrografia 3 - Exemplar do grupo **SEC₃**. Campo onde o *primer* foi aplicado na composição original e o **adesivo modificado com rodamina (0,02 mg/mL)**. MCVL; $\lambda_{\text{exc}}=532$ nm; intensidade do laser 18%; x40/1,15 AN em óleo.

Fotomicrografia 4- Exemplar do grupo **SEC₄**. Campo onde o *primer* foi aplicado na composição original e o **adesivo modificado com rodamina (0,004 mg/mL)**. MCVL; $\lambda_{\text{exc}}=532$ nm; intensidade do laser 15%; x40/1,15 AN em óleo.

Anexos

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 118/2011

Bauru, 5 de setembro de 2011.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Avaliação do efeito de adição de agente fluorescente (Rodamina B) a sistemas adesivos não simplificados"**, de autoria de Odair Bim Junior, Leslie Carol Casas Apayço, Luciana Fávoro Francisconi, Prof. Dr. Paulo Henrique Perlatti Dalpino e Prof^ª Dr^ª Ana Flávia Sanches Borges, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e apreciado em reunião realizada no dia **31 de agosto de 2011**.

O CEP-FOB/USP considerou o projeto APROVADO lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Prof^ª Dr^ª Linda Wang

Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos

ANEXO B – Termo de doação de dentes humanos por cirurgiões-dentistas **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73

PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS POR CIRURGIÕES-DENTISTAS

Eu, Henrique Taniguchi,
 Cirurgião(ã)-dentista, inscrito no CRO sob o número 8865, com
 consultório situado à avenida multoat 2361, no bairro
marista, na cidade de Guaria, UF GO,
 CEP 74150-340, telefone 6239417282, doo 72 dentes para a
 Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, a fim de
 contribuir para a realização da pesquisa intitulada "Avaliação do efeito de adição de
 agente fluorescente (Rodamina B) a sistemas adesivos não simplificados", de
 autoria de Odair Bim Júnior, Leslie Carroll Casas-Apayco, Luciana Fávaro
 Francisconi, Paulo Henrique Perlatti D'Alpino, Ana Flávia Sanches Borges e Linda
 Wang. Declaro que estes dentes foram extraídos por indicação terapêutica, cujos
 históricos fazem parte dos prontuários dos pacientes de quem se originam,
 arquivados sob minha responsabilidade. Estou ciente de que o material recolhido
 será utilizado pelos pesquisadores desta Faculdade unicamente para a realização
 da presente pesquisa.

Bauru, 05 de dezembro de 2011.

Dr. Henrique Taniguchi
 Cirurgião Dentista
 CRO-GO 8865

Cirurgião(ã) – Dentista