UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CARLOS ANDRES VILLAVICENCIO ESPINOZA

**Efeito da contaminação por saliva humana na interface adesiva:
resistência de união, análise de camada híbrida e conversão de
sistemas adesivos**

BAURU
2017

CARLOS ANDRES VILLAVICENCIO ESPINOZA

**Efeito da contaminação por saliva humana na interface adesiva:
resistência de união, análise de camada híbrida e conversão de
sistemas adesivos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Bauru da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências no
Programa de Ciências Odontológicas
Aplicadas, na área de concentração Dentística.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Atta

Versão Corrigida

BAURU

2017

V713e Espinoza, Carlos Andres Villavicencio
Efeito da contaminação por saliva humana na interface adesiva: resistência de união, análise de camada híbrida e conversão de sistemas adesivos / Carlos Andres Villavicencio. – Bauru, 2016.
97 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Atta

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
CAAE: 38566814.0.0000.5417
Data: 25/04/2016

(Cole a cópia de sua folha de aprovação aqui)

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho a minha família, minha noiva Mayara e
amigos. Gratidão sempre !**

AGRADECIMENTOS

À Deus

Por guiar meu caminho e colocar as pessoas certas na minha vida...

Aos meus pais, Elizabeth e Carlos

Pelo apoio, carinho e amor incondicional ao longo da minha vida, sem vocês não seria possível satisfazer meus desejos. Amo vocês.

As minhas irmãs

Priscila e Jacqueline, as mulheres que me inspiram todos os dias para tentar ser uma melhor pessoa, obrigado a vocês “Nãs”.

A minha Noiva Mayara

Minha companheira, parceira e meu grande amor obrigado por ter ficado e apoiado nos meus sonhos, mesmo que pareciam impossíveis. Amo você.

À toda minha família Ramon Espinoza

Meus tios Arturo e Rocio, e meus primos Carlos Arturo e Maria Fernanda. Vocês não permitiram que desista nunca. Obrigado pela torcida incondicional.

Especial agradecimento a família Narimatsu

A família brasileira que me adotou e cuidou nestes últimos anos. Gratidão por vocês Massaru, Priscila, Vanessa, Dayana, Bianca, Brass e Maria.

À minha Orientadora Professora Teresa

Você sempre foi incrível, mas o que torna especial em você, é seu jeito simples de acreditar e apoiar as pessoas, mesmo que tenham muito dificuldade. Obrigado por ter me guiado ao longo de 6 anos que trabalhamos juntos.

Aos professores do Departamento de Dentística

Só quem vive dentro de esta casa sabe o trabalho e dedicação de vocês para ensinar as novas gerações, passando ao mesmo tempo, muitos conhecimentos de vida. Obrigado aos meus eternos mestres (Rafael Mondelli, Linda Wang, Sergio Ishikiriana, Adilson Furuse, Jose Mondelli, Juliana bombonatti, Eduardo Franco)

Aos professores do Departamento de Materiais Dentários

Considero a minha segunda casa na FOB, Obrigado por ter acreditado no meu trabalho e oportunidades criadas (Profa. Ana Flavia Borges e professor Paulo Franschiconi).

Ao meu “eterno mestre” Dr. Richard Rodriguez

Por sempre abrir as portas da sua casa, e ter me ajudado ao longo de estes anos. Gratidão sempre meu amigo.

Aos mestres fora da FOB

Grande agradecimento aos professores que me ensinarem amar a odontologia, foi uma honra participar nos seus cursos (Profa. Cecilia Veronezi, Profa. Bela Ishikiriana, Prof. Renato Freitas e Prof. Luis Gustavo Barrotte).

Aos funcionários da FOB-USP

Pela disponibilidade e dedicação do seu trabalho, nunca poderei retribuir tanto carinho e dedicação durante todos esses anos de convivência.

Os funcionários da Dentística-Materiais (Nelson, Châ, Audria, Eliseo, Rita), Especial agradecimento ao Alcides com quem criei uma grande amizade. Obrigado meu grande amigo.

Os funcionários da *Pós-graduação* (Fátima, Leticia e Leila). Também aos Funcionários *Do CIP* e da *Clínica multidisciplinar*, Pela disponibilidade e concretização da minha formação.

Obrigado a Marcia Graeff e Sr. Edimauro

Pela disponibilidade e concretização da realização neste trabalho.

Ao meus Amigos V4Team

São meus irmãos e se tornarem minha família em Bauru !Gracias Brothers! (Diego, Juan, Pablo, Aldo, Carlos F, Pedro).

Aos Profissionais Dra. Jenny e Dr. Florencio

Meus terapeutas que ajudaram durante momentos difíceis que passei aqui em Bauru, sem vocês talvez não conseguiria enxergar a luz no final do caminho.

À turma de Mestrado e Doutorado da Dentística

São muitas amizades criadas, muitas lembranças, mas também muito carinho e admiração. Agradecido por todos meu companheiros desde os veteranos até os mais novos.

*“Não Existe Palavras para Descrever emoções, não existe palavras
para agradecer, só existe Gratidão”*

Flávio Augusto Da Silva

RESUMO

Este estudo teve como objetivo analisar o efeito da contaminação por saliva humana na resistência de união (RU) da interface adesiva em dentina por microtração, nas características morfológicas da camada híbrida (CH) em microscopia confocal e no grau de conversão (GC) de 2 sistemas adesivos: Adper™ Single bond 2 (SB) e Single Bond® Universal (SU). Cento e oitenta dentes terceiros humanos hígidos foram divididos em 12 grupos (n=10), de acordo com o sistema adesivo utilizado, a presença de saliva e o tempo de armazenagem. Após o procedimento adesivo e aplicação da resina composta Filtek Z250, os dentes foram mantidos em água destilada em estufa a 37°C por 48 horas, 6 meses ou 12 meses antes de serem seccionados em palitos (0,8mm x 0,8mm, aproximadamente) para serem levados à máquina de ensaios universal Instron para os testes de microtração. Para à análise da interface adesiva em microscopia confocal de varredura a laser para verificação e mensuração de alterações internas na interface foram utilizados 60 dentes divididos em 6 grupos (n=10) de acordo com os tempos de 48 horas, 6 meses, e 12 meses respectivamente, empregando os sistemas adesivos (SB) e (SU). O efeito da presença de saliva também foi avaliado pelo grau de conversão dos adesivos, empregando-se espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier empregando os sistemas adesivos (SB) e (SU) com incorporação de saliva humana na sua composição (n=5) com concentrações 10%, 25% e 50% em vol. Para a comparação das variáveis: RU, (GC), espessura da CH, na presença de saliva e tempo de armazenamento foram utilizados os testes de Análise de Variância a três critérios e de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$). Os valores de RU (MPa $\pm$ dp: 48horas/6meses/1ano) foram: SB (43,53 $\pm$ 6,0; 40,10 $\pm$ 3,4; 38,59 $\pm$ 5,4); SalSB (43,09 $\pm$ 6,2; 39,86 $\pm$ 6,6; 37,25 $\pm$ 5,8); SU (42,98 $\pm$ 4,3; 39,30 $\pm$ 3,6; 40,44 $\pm$ 5,7); Sal SU (44,39 $\pm$ 4,2; 42,26 $\pm$ 2,5; 38,26 $\pm$ 5,7). Os Valores médios da CH (MPa $\pm$ dp: 48horas/6meses/1ano) foram: SalSB (3,59 $\pm$ 0,8; 3,59 $\pm$ 1,0; 2,08 $\pm$ 1,5). SalSU (1,26 $\pm$ 0,5; 1,73 $\pm$ 0,8; 1,07 $\pm$ 0,3). Os valores de GC (MPa $\pm$ dp: 10%/25%/50%vol) foram: SB (85,59 $\pm$ 3,4; 49,68 $\pm$ 12,8; 38,56 $\pm$ 11,8); SU (85,52 $\pm$ 3,3; 86,27 $\pm$ 3,5; 57,82 $\pm$ 11,1). Conclui-se, portanto, que a contaminação por saliva humana não interferiu na RU da interface dentina/resina composta após 48 horas, 6 meses e 12 meses. A morfologia da camada híbrida foi alterada pela presença da saliva nos períodos 6 e 12 meses. O GC dos sistemas adesivos foi afetado pela

presença de saliva após a polimerização imediata. Entretanto o fator tempo foi determinante para a deformação da interface dentina/resina para ambos os sistemas adesivos

Palavra-chave: Dentina, Adesivos Dentinários, Saliva, Resistência Adesiva, grau de Conversão, Armazenamento em Água.

ABSTRACT

Effect of human saliva contamination on adhesive interface: bond strength, hybrid layer analysis and conversion of adhesive systems.

The objective of this study was to analyze the effect of human saliva contamination on bond strength of the dentin/adhesive interface, morphology of the hybrid layer by confocal microscopy and SEM analysis and degree of conversion of 2 adhesive systems: Adper[™] Single bond 2 (SB) and Single Bond® Universal (SU). One hundred and eighty healthy human third teeth were divided into 12 groups (n = 10), according to the adhesive system used, the presence of saliva and the storage time. After the adhesive procedure and placement of resin composite (Filtek Z250), the teeth were stored in distilled water at 37 ° C for 48 hours, 6 months or 12 months before being cut into sticks (0.8mm x 0.8mm, approximately) to the microtensile strength tests. For the analysis of the adhesive interface in confocal microscopy of laser scanning for verification and measurement of internal interface changes, 60 teeth were used divided into 6 groups (n = 10) according to the storage time: 48 hours, 6 months, and 12 months and (SB) and (SU). The effect of the presence of saliva was also evaluated by the degree of conversion of the adhesives using Fourier transform infrared spectroscopy employing adhesive (SB) and (SU) systems incorporating human saliva in its composition (n = 5) with 10%, 25% and 50% vol. For the comparison of the variables: bond strength, degree of conversion, and hybrid layer thickness in the presence of saliva and storage time, the three criteria Variance Analysis and Tukey multiple comparisons tests (p <0.05) were used. The values of bond strength (MPa ± dp: 48hours / 6meses / year) were: SB (43.53 ± 6.0, 40.10 ± 3.4, 38.59 ± 5.4); SalSB (43.09 ± 6.2, 39.86 ± 6.6, 37.255.8); SU (42.98 ± 4.3, 39.30 ± 3.6, 40.44 ± 5.7); SU salt (44.39 ± 4.2, 42.26 ± 2.5, 38.26 ± 5.7). The mean values of hybrid layer thickness (MPa ± dp: 48hours / 6meses / year) were: SalSB (3.59 ± 0.8, 3.59 ± 1.0, 2.08 ± 1.5). SalSU (1.26 ± 0.5, 1.73 ± 0.8, 1.07 ± 0.3). The values of degree of conversion (MPa ± dp: 10% / 25% / 50% vol) were: SB (85.59 ± 3.4, 49.68 ± 12.8, 38.56 ± 11.8); (85.52 ± 3.3, 86.27 ± 3.5, 57.82 ± 11.1). It was therefore concluded that human saliva contamination did not interfere on bond strength of the dentin/adhesive interface after 48 hours, 6 months and 12 months. The morphology of the hybrid layer was altered by

the presence of saliva after 6 and 12 months. The degree of conversion of adhesive systems was affected by the presence of saliva immediately after polymerization. However, the time factor was determinant for the dentine/resin interface deformation for both adhesive systems.

Keywords: Dentin, Dentin-Bonding Agents, Saliva, Bond Strength, Degree of Conversion, Water Storage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 - Espécime após 48 horas do procedimento adesivo. A) Adper Single Bond 2 e B) Adper Single Bond Universal. Observa-se que a camada adesiva (CA) formada pelo SB apresenta maior espessura, assim como a camada híbrida (CH) com espessura média de $3,59 \pm 0,8 \mu\text{m}$, enquanto a do SU foi de $1,26 \pm 0,56 \mu\text{m}$ e os tags (t) apresentaram-se mais longos. 53
- Figura 2 - Espécime após 6 meses de armazenagem em meio aquoso. (A) SB e (B) SU apresentam CA, CH e (t) semelhante aos grupos correspondentes a cada material no período de 48 horas. Note-se a presença de Fluoresceína (saliva) em contato com a parte inferior da camada híbrida para ambos adesivos..... 53
- Figura 3 - Espécime após 12 meses de armazenagem em meio aquoso. O sistema adesivo SB (A) apresenta (CH) com maior interação entre os dois marcadores fluorescentes, com uma camada híbrida não homogênea. (t) A interação dos dois marcadores na área dos tags, mostra uma menor espessura estatisticamente significante em relação ao grupo 48 horas. O espécime do sistema adesivo SU (B) apresenta a presença de Fluoresceína (saliva) em contato com a parte inferior da camada híbrida de maneira isolada, sem interagir com CH e os tags (t) apresentam-se com menor comprimento em relação ao grupo de 48 horas. Pouca interação entre os marcadores fluorescentes ao longo dos tags foi observada 55
-
-

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação gráfica da resistência de união nos tempos 48 horas, 6 meses e 12 meses dos sistemas adesivos Adper Single Bond 2 e Adper Single Bond Universal com e sem contaminação com saliva.	49
Gráfico 2 - Distribuição do tipo de fraturas dos grupos estudados.....	50
Gráfico 3 - Representação gráfica da interação entre marcadores fluorescentes (CH/Rodamina B), (CH/Flouresceína) após armazenamento de 48 horas, 6 meses e 12 meses dos sistemas adesivos Adper Single Bond 2 (SB) e Adper Single Bond Universal (SU) com contaminação com saliva.	55
Gráfico 4 - Representação gráfica da interação entre marcadores fluorescentes (CH/Rodamina B), (CH/Flouresceína) após 48 horas, 6 meses e 12 meses de armazenamento do sistema adesivo Single Bond 2 (SB).....	57
Gráfico 5 - Representação gráfica da interação entre marcadores fluorescentes (CH/Rodamina B), (CH/Flouresceína) após 48 horas, 6 meses e 12 meses e armazenagem do sistema adesivo Single Bond Universal (SU).....	58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- QUADROS

Quadro 1 - Composição e fabricante dos materiais utilizados	39
---	----

- TABELAS

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão da resistência de união na dentina (MPa)	49
Tabela 2 - Médias e desvios-padrão do grau de conversão (%) em diferentes volumes de saliva adicionados (10%, 25% e 50%).....	50
Tabela 3 - Médias e desvios-padrão da camada híbrida e comprimento de tags(μm).....	51
Tabela 4 - Média (área μm^2) e desvios-padrão da interação do sistema adesivo com a saliva (associação dos dois marcadores fluorescentes na região da camada híbrida).	52

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	por cento
%vol	por cento em volume
+	mais
<	menor
=	igual
>	maior
®	marca registrada
µm	micrômetro(s)
4-META	metacriloxi-etil-trimetilano
ANOVA	Análise de Variância
Bis-GMA	Bisfenol-glicidil metacrilato
CA	Camada Adesiva
CH	Camada Híbrida
cm ²	centímetro (s) quadrado
cm ²	Centímetro ao quadrado
D	Dentina
DEGDMA	di-eterileno glicol dimetacrilato
Dp	desvio-padrão
DP	desvio padrão
EGDMA	etileno glicol dimetacrilato
Et al .	e colaboradores
Fator C	fator de configuração cavitária
h	horas
HEMA	2-hidroxi-etil metacrilato
Kgf	quilograma (s)-força
Ltda.	Limitada
m	meses
mg/mL	miligrama (s) por mililitro
mL	mililitro
ml/min	mililitro (s) por minuto
ml/min	mililitro (s) por minuto

mm	milímetro (s)
mm/min	milímetro (s) por minuto
MMP's	metaloproteinases
MPa	megapascal (s)
Mpa	Megapascals
mW/cm ²	miliwatt (s) por centímetro quadrado
N	Newton(s)
Nº	número
°	graus
°C	grau(s) Celsius
pH	potencial de hidrogênio
Phenyl P	(Hidrogenofosfato de 2-(metacriloiloxietil) fenilo
RJ	Rio de Janeiro
s	segundo (s)
SB	Single Bond 2
SP	São Paulo
St. Paul	Saint Paul
SU	Single Bond Universal
t	Tags
Ta	Tipo adesiva
Tcd	Tipo coesiva em dentina
Tcr	Tipo coesiva em resina composta
TEGDMA	Trietilen Glicol dimetracrilato
Tm	Tipo mista
UDMA	Uretano dimetracrilato
USA	United States of America (Estados Unidos da América)
USP	Universidade de São Paulo
x	vezes
µL	microlitro
µm ²	micrômetro(s) ao quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1	Materiais Utilizados.....	39
4.2	Obtenção dos dentes humanos.....	40
4.3	Coleta da Saliva.....	40
4.4	Preparo dos Espécimes para Microtração.....	40
4.5	Preparo dos dentes para análise morfológica da camada híbrida.....	44
4.5.1	Microscopia Confocal de Varredura a Laser.....	44
4.6	Grau de Conversão dos sistemas adesivos	45
4.7	Análise estatística.....	46
5	RESULTADOS	47
5.1	Microtração.....	49
5.1.1	Tipo de fratura	50
5.2	Grau de conversão	50
5.3	Microscopia confocal de varredura a laser	51
5.3.1	Análise quantitativa da espessura da camada híbrida e dos tags de resina.....	51
5.3.1.1	Camada Híbrida.....	51
5.3.1.2	Tags de resina.....	52
5.3.2	Análise de interação entre marcadores fluorescentes.....	52
5.3.3	Correlação de Pearson.....	57
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Conseguir a união eficaz entre restauração e os tecidos duros do dente é o objetivo principal na Odontologia adesiva. Basicamente consiste na substituição parcial de minerais removidos da estrutura dentária por monômeros resinosos estabelecendo ligações micromecânicas entre o dente e o sistema adesivo após a polimerização (MCLEAN et al., 2015). A união alcançada deve contemplar as características necessárias para um desempenho clínico satisfatório (De MUNCK et al., 2003; ABDALLA; FEILZER, 2008; MUNAGA et al., 2014).

Para a obtenção da união entre estrutura dentária e sistema adesivo, é importante que haja a formação de uma camada híbrida na interface dentina-resina (PERDIGAO et al., 1997; GIANNINI et al., 2004), descrita originalmente por Nakabayashi et al. (1982) que demonstraram a infiltração de monômeros resinosos nos espaços criados pela desmineralização da superfície da dentina, formando uma nova estrutura composta pela matriz resinosa, fibrilas de colágeno e hidroxiapatita.

Os sistemas adesivos disponíveis no mercado são muito variados e podem ser classificados basicamente em duas categorias: a) convencionais que contém um agente condicionante de natureza ácida (ácido fosfórico), primer de característica hidrofílica (dissolvido por solvente, na maioria água, etanol ou acetona) e adesivo de característica hidrofóbica à base de Bis-GMA (PASHLEY et al., 2011); b) autocondicionantes que prescindem da utilização do ácido fosfórico por conterem no primer um monômero ácido com características hidrofílicas que dissolve a smear layer e forma a camada híbrida, e um agente adesivo à base de Bis-GMA que garante a estabilidade hidrofóbica na interface de união dentina/resina composta (VAN MEERBEEK et al., 2011). Existem no mercado as versões simplificadas dos convencionais e autocondicionantes, que podem apresentar seus componentes separados ou associados entre si, o que determinará o número de passos de aplicação (1 ou 2 passos), basicamente todos os sistemas adesivos presentes no mercado contêm monômeros hidrofílicos e hidrofóbicos.

A durabilidade e estabilidade da interface adesiva entre dentina e restauração dependem da adequada infiltração dos monômeros na rede de colágeno para a

formação da camada híbrida (PARK et al., 2011; STANSBURY, 2012). Diversos fatores podem interferir no processo de “hibridização”, sendo um deles, a contaminação por saliva, sangue ou óleo da caneta de alta rotação (PASHLEY et al., 1982; XIE et al., 1993; HIRAISHI et al., 2003; EBRAHIMI et al., 2013). A contaminação por saliva é um dos problemas clínicos de maior frequência, uma vez que pode ocorrer em qualquer fase durante o procedimento de restauração (MOJON et al., 1996; YOO et al., 2006; KIM et al., 2015), principalmente nas margens cervicais de cavidades.

A nanomorfologia da camada híbrida contaminada por saliva pode ser alterada não só pela presença da água, maior componente da saliva, mas também, pela presença das proteínas salivares entre outros compostos da saliva (SPENCER; SWAFFORD, 1999; SPENCER et al., 2010; PERDIGAO et al., 2012; GUPTA et al., 2015). Essa alteração na estrutura da camada híbrida poderia dificultar a polimerização, uma vez que os componentes da saliva influenciariam na segmentação das ligações monoméricas, impedindo as reações químicas durante a conversão (ABEDIN et al., 2015), e reduziriam a compatibilidade entre o fotoiniciador e a fase hidrofílica do adesivo (YU et al., 2014), consequentemente, afetando as suas propriedades fisicomecânicas, incluindo a resistência adesiva, resultando na perda da restauração (HITMI et al., 1999; DARABI et al., 2012).

O efeito da contaminação da saliva sobre a morfologia da interface da união dentinária não foi completamente compreendido e ainda não totalmente elucidado. Inúmeros estudos indicaram que os efeitos da contaminação de saliva sobre a resistência de união da dentina são relacionados ao tipo de adesivo, ao momento em que ocorreu a contaminação e à estratégia de descontaminação (PARK; LEE, 2004; YOO et al., 2006; CHUNG et al., 2009; PINZON et al., 2010). Foi demonstrado que adesivos convencionais simplificados são menos sensíveis à contaminação com saliva do que os adesivos convencionais de 3 passos (PARK; LEE, 2004). Estudos a curto, médio e longo prazo são necessários para determinar a influência da saliva na resistência e união e na estabilidade da interface dente/restauração (PINZON et al., 2011).

Considerando o uso rotineiro dos sistemas adesivos simplificados (MINE et al., 2009), foram desenvolvidos sistemas adesivos mais versáteis que podem ser utilizados no modo convencional ou como autocondicionante e são chamados de

“universais”. Essa modalidade de sistemas adesivos foi desenvolvida com o mesmo propósito dos sistemas adesivos simplificados de encurtar o tempo de aplicação, tornando o procedimento clínico mais favorável (HANABUSA et al., 2012), mas eles também possuem características ótimas de união química e micromecânica, graças à incorporação do monômero MDP e do copolímero de Vitrebond, que teoricamente garantem uma união mais duradora e estável. Graças à hidrofobicidade do MDP, os sistemas adesivos que o contém podem ser utilizados inclusive em substratos onde a umidade pode estar presente (VAN MEERBEEK et al., 2011), tornando-se um adesivo interessante (MARCHESI et al., 2014). No entanto, há pouca informação na literatura sobre o efeito da contaminação por saliva na interface da dentina com os adesivos universais e de como os componentes da saliva poderiam influenciar na morfologia da camada híbrida e seu comportamento na adesão a longo prazo.

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da contaminação da saliva humana sobre a resistência de união de um sistema adesivo convencional 2 passos e um sistema adesivo universal à dentina, com modo de aplicação convencional, através de teste de microtração, a micromorfologia da camada híbrida através da microscopia confocal de varredura a laser e o grau de conversão do sistema adesivo pela espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os sistemas adesivos têm um papel importante na Odontologia restauradora na promoção da união entre estrutura dental e material restaurador, através da interação entre os monômeros resinosos e a hidroxiapatita e o colágeno, formando uma estrutura conjunta de biopolímero (NAKABAYASHI et al., 1982; SPENCER et al., 2010).

O mecanismo de união ocorre pela formação de retenções micromecânicas no componente inorgânico do substrato dentário, através da sua desmineralização por um ácido, o ácido fosfórico, técnica introduzida por Buonocore, em 1955 (BUONOCORE, 1955; VAN MEERBEEK et al., 2003). Esse mecanismo é bastante adequado, simples e satisfatório na superfície do esmalte, mas a infiltração dos monômeros na dentina ainda é um processo muito complexo. Considerando que a dentina não é uma estrutura homogênea como o esmalte, sendo, de fato, complexa com 70% de material inorgânico, 20% de material orgânico e 10% de água em volume (MARSHALL, 1993; TEN CATE, 1994), a presença de grande quantidade de matéria orgânica e de água é um desafio para integração dos monômeros resinosos à dentina.

Cabe salientar que a característica morfológica da dentina é muito variada e, frequentemente, apresenta variações na sua composição em razão de estímulos como lesão cariosa (pela deposição de dentina reparadora), idade (pela deposição de dentina secundária) e do número, orientação e tamanho dos túbulos dentinários que variam de acordo com a profundidade da dentina. (BERTASSONI et al., 2012), Em média, o diâmetro do túbulo dentinário é de 1 a 2 μm sendo revestido por uma camada altamente mineralizada denominada dentina peritubular. A dentina intertubular, localizada entre os túbulos, é composta por cristais de apatita associados à matriz orgânica que, por sua vez, é composta por matriz de colágeno de tipo I (WEINER et al., 1999; BERTASSONI et al., 2012). A presença dessas fibrilas de colágeno e cristais de carbonato de apatita na dentina intertubular permite uma condição favorável de remoção da parte mineral por meio de condicionamento ácido, sem causar danos morfológicos na estrutura de colágeno.

Nakabayashi et al. (1962) observaram esta condição morfológica e desenvolveram monômeros com características hidrofílicas e com suficiente fluidez para impregnar os espaços entre as fibrilas de colágeno expostas pela desmineralização proporcionada pelo ácido. Essa interação de monômeros infiltrados e a dentina foi denominada camada híbrida. A camada híbrida é uma interface altamente orgânica (fibrilas de colágeno) e relativamente hidrofóbica, que proporciona uma ligação contínua e estável (SPENCER; WANG, 2002).

O processo adesivo em dentina envolve, portanto, a desmineralização pelo ácido fosfórico, a utilização de monômeros com característica hidrofílica (primer) diluídos por solvente, na maioria água, etanol ou acetona, e um monômero com característica hidrofóbica (adesivo), à base de Bis-GMA (PASHLEY et al., 2011). Esses componentes podem apresentar-se separados ou associados entre si, o que determinará o número de passos de aplicação. Para garantir uma camada híbrida adequada, a aplicação do primer na dentina úmida é essencial, pois apenas a presença de água evita o colapso das fibrilas de colágeno e a perda dos espaços interfibrilares, permitindo a penetração do adesivo (PASHLEY et al., 1993). Visando diminuir as desvantagens desse sistema e minimizar possíveis erros de técnica, os fabricantes uniram o primer e o bond em um “único frasco”, tornando a aplicação em (2 passos), ou seja, condicionamento ácido e aplicação do primer/bond (PASHLEY et al., 2011).

Uma vez que a preservação dos espaços interfibrilares é bastante crítica, tecnicamente, e que não é possível controlar a profundidade de penetração do adesivo na área desmineralizada, sistemas adesivos que dispensam o uso do ácido fosfórico para desmineralizar a dentina foram desenvolvidos, os sistemas adesivos simplificados autocondicionantes que contém um monômero ácido, o primer, que desmineraliza a dentina simultaneamente à infiltração através da dentina. Esses sistemas adesivos contém os monômeros Phenyl P e/ou 4-META (CHAN et al., 2003; VAN MEERBEEK et al., 2011), que facilitam o controle da umidade na dentina, simplificado a técnica de aplicação. Como desmineralizam e, simultaneamente, infiltram a dentina, dispensam a etapa de lavagem para remoção do ácido como ocorre na técnica de aplicação dos sistemas adesivos convencionais e evitam a ocorrência de falhas como a diminuição dos espaços interfibrilares pela secagem excessiva (MOSZNER et al., 2005).

No entanto, todos os adesivos estão constituídos, em sua maioria, por solventes à base de água e etanol, e os monômeros HEMA (hidrofílico) e BisGMA (hidrofóbico). Novos componentes têm sido incorporados aos sistemas adesivos como o copolímero de ácido polialquênico, mais conhecido como “copolímero de deVitrebond” (VCP) (KUBO et al., 2006), e o monômero funcional 10-MDP, originário dos sistemas autocondicionantes, que é composto por um radical polimerizável (metacrilato), um radical hidrofílico (fosfórico) e entre eles há uma longa cadeia hidrófoba. Ambos componentes têm por função a ligação ao cálcio da hidroxiapatita. Essa categoria de sistemas adesivos chamados de “Universais” proporcionam união micromecânica e química (ALEX, 2015).

A particularidade desse monômero funcional é a ligação química ao cálcio da hidroxiapatita proveniente da desmineralização através de ligações iônicas e a formação de sais estáveis de cálcio-fosfato e cálcio-carboxílico (VAN MEERBEEK et al., 2011). Alguns estudos têm mostrado que essa união química entre o monômero e o substrato gera estabilidade na resistência de união e maior grau de conversão, dando a ele boas propriedades físicoquímicas a longo prazo (HANABUSA et al., 2012; YOSHIDA et al., 2012).

Apesar da tecnologia e progressos relacionados com os materiais dentários, a contaminação durante a hibridação do sistema adesivo é uma realidade muito frequente (HIRAISHI et al., 2003; YOO et al., 2006). A contaminação por saliva ainda é um grande problema, principalmente nas restaurações diretas, em que há dificuldade técnica em conseguir um isolamento absoluto, como em restaurações cervicais tipo Classe V, ou lesões não cariosas cervicais (GOING; SOWINSKI, 1967). Na prática, o controle de umidade e contaminação é inexistente ou quase nulo. O mesmo pode ocorrer em restaurações extensas de cavidade de Classe II e na cimentação adesiva de coroas livre de metal, facetas e lentes de contato. Em todas essas situações, o isolamento absoluto pode não ser possível e, conseqüentemente, a contaminação com saliva pode ocorrer (WHITE et al., 1992; ZMENER et al., 2013).

A saliva é composta principalmente por água (99,4%) com 0,6% de sólidos que são compostos por macromoléculas de proteínas, glicoproteínas, açúcares e amilase glicose (HANSEN; MUNKSGAARD, 1989; CARPENTER, 2013), além de uma variedade de eletrólitos como sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonatos e

fosfatos e partículas orgânicas com ureia, aminoácidos, ácidos graxos. Cada um desses componentes tem diferentes funções como modular o pH e capacidade tampão da saliva (bicarbonatos, fosfatos e ureia), limpar e controlar quantidade de bactérias, agregando microrganismos orais que contribuem no metabolismo da placa bacteriana (macromoléculas e mucina), modular os processos de desmineralização e remineralização (cálcio, fosfato e as proteínas) (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). Em outras palavras, a diversidade das funções da saliva, tanto quanto a complexidade dos seus componentes, torna-a um elemento heterogêneo e variante de indivíduo para indivíduo. Particularmente, as glicoproteínas e água são os principais fatores que afetam a adesão entre adesivos e superfícies de dentina e esmalte contaminadas (FRITZ et al., 1998).

A degradação da interface resina/dentina ocorre por uma cascata de fatores correlacionados, podendo ocorrer de 3 formas: I) degradação das fibrilas de colágeno por processo enzimático; II) incompleta infiltração do sistema adesivo favorecendo a exposição de fibrilas de colágeno e III) degradação hidrolítica do sistema adesivo pela presença de água (YIU et al., 2005; CARRILHO et al., 2007; CARRILHO et al., 2009; CAI et al., 2014). Na contaminação com saliva, as glicoproteínas são as principais responsáveis pelos fatores I e II e a água da saliva pelo fator III (PASHLEY et al., 1993; HASHIMOTO, TAY, et al., 2003).

O principal representante das glicoproteínas é a mucina, responsável pela capacidade de formar géis e, por isso, é um componente chave na maioria das secreções, cumprindo funções que variam de lubrificação até sinalização celular, conformando barreiras físicas e químicas que muitas vezes desempenham um papel inibitório bacteriano (MARIN et al., 2008). Entretanto, durante a contaminação da dentina pode comportar-se como um “mucus” (barreira física e química) impedindo a penetração adequada do sistema (HANNIG et al., 2004). Além do aspecto negativo da contaminação física, as enzimas hidrolíticas presentes na saliva podem comprometer a estabilidade estrutural da camada híbrida, como resultado da destruição das fibrilas de colágeno (HIRAISHI et al., 2003; SATTABANASUK et al., 2006; ABOUSHELIB, 2011).

A degradação hidrolítica pode ser atribuída pela água da saliva que pode ser absorvida, resultando em enfraquecimento da rede de polímero (Itoh et al.,

2010), atuando como membrana semipermeável (SPENCER; WANG, 2002; TAY, PASHLEY; GARCIA-GODOY, et al., 2004; TAY; PASHLEY; SUH, et al., 2004), permitindo o movimento da água através da camada adesiva, mesmo após a polimerização (PAUL et al., 1999). Os efeitos da contaminação por saliva interrompem as reações fotoquímicas e químicas da polimerização efetiva, conduzindo a uma deterioração das suas propriedades mecânicas (Hosaka et al., 2009), o que irá afetar a integridade da adesão na interface (GUO et al., 2007).

Uma vez que, durante o processo adesivo, aconteça a contaminação com saliva, a dúvida está em qual estratégia de descontaminação aplicar na superfície dentinária sem prejudicar a resistência de união. Eiriksson et al. (2004) recomendaram o enxague e secagem da dentina e posterior a aplicação de adesivo. Por outro lado, Ari et al. (2008) observaram que não há diferença na resistência de união entre realizar esses procedimentos ou simplesmente aplicar o sistema adesivo sobre a dentina contaminada. Alguns estudos recomendam uma alternativa mais radical para descontaminação, como a remoção completa da interface adesiva empregando ponta diamantada, e reaplicação do sistema adesivo (EL-KALLA, GARCIA-GODOY, 1997; ARI et al., 2008; COBANOGU et al., 2013).

Independente da estratégia de descontaminação, não existem informações contundentes sobre a influência e efeitos da contaminação por saliva (HIRAISHI et al., 2003; PARK; LEE, 2004). Os relatos são controversos, visto que dependem do tipo de adesivo, momento de contaminação e estratégia de descontaminação (PARK; LEE, 2004; YOO et al., 2006; CHUNG et al., 2009; PINZON et al., 2010). Entretanto, a maioria dos trabalhos relata que a contaminação da dentina prévia à aplicação do primer e antes da fotoativação reduziu drasticamente a resistência de união. Presumivelmente, a presença da água e das proteínas salivares misturadas à dentina pode interferir na penetração do primer, resultando em uma camada híbrida inadequada que irá alterar a característica mecânica da interface adesiva (YAMADA et al., 2004).

Uma vez que o sucesso da adesão à dentina não depende exclusivamente das propriedades mecânicas do adesivo e da resistência da união da camada híbrida (EIRIKSSON et al., 2004), depende, além disso, da polimerização satisfatória do adesivo (CHIBA et al., 2006), de uma copolimerização suficiente entre o

primer/adetivo e entre o adetivo/resina (YU et al., 2014), a contaminação por saliva pode afetar essas propriedades interferindo no grau de conversão dos monômeros.

O grau de conversão (GC) é um fator que indica o grau de polimerização de ligações duplas C=C, e afeta o desempenho de ligação de aditivos poliméricos (UEKUSA et al., 2006). A GC pode ser determinada por espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia Raman (GAUTHIER et al., 2005; ABEDIN et al., 2015). O GC depende da estrutura química dos monômeros e das condições de polimerização (SODERHOLM et al., 2008). No entanto, estudos demonstram que a contaminação do sangue ou da saliva poderia dificultar a polimerização uma vez que a contaminação pode resultar na alteração da composição do adetivo (EIRIKSSON et al., 2004). Além disso, o efeito da contaminação da saliva sobre o desempenho dos adesivos simplificados Universais ainda continua com evidência científica insuficiente para seu completo entendimento (CHAI et al., 2013).

Embora, os adesivos universais têm características estáveis em meio úmido pela sua ligação química e sejam atraentes para o clínico, pelo menor número de etapas e redução da sensibilidade da técnica de aplicação (De MUNCK et al., 2005; PEUMANS et al., 2005), essa simplificação só é possível através da inclusão de maior quantidade de solventes orgânicos e monômeros hidrofílicos (VAN MEERBEEK et al., 2003; YIU et al., 2005) que, em teoria conduziria uma maior afinidade a interação com os fluidos salivais, conseqüentemente diminuindo o grau de conversão (CADENARO et al., 2005) que, por sua vez, poderiam diminuir consideravelmente a resistência de união do adetivo (CHO; DICKENS, 2004; REIS et al., 2010; HASS et al., 2011), aumentando a permeabilidade da camada híbrida após a polimerização (ITO et al., 2005; MALACARNE et al., 2006).

Uma vez que a contaminação ocorre, deve-se considerar um possível comprometimento da camada híbrida pela degradação das fibrilas de colágeno e conseqüente diminuição da resistência de união das restaurações. Como os sistemas adesivos simplificados universais apresentam uma característica hidrofóbica, torna-se fundamental a avaliação da distribuição e adaptação morfológica da camada híbrida a longo prazo, comparada a seus predecessores simplificados convencionais

realizadas em restaurações com contaminação com saliva humana após o condicionamento ácido.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo in vitro foi analisar o efeito da contaminação com saliva humana na interface dentina/adesivo empregando dois sistemas adesivos Adper Single Bond 2 (SB) e Adper Single Bond Universal (SU), através de testes de resistência de união por microtração, análise da morfologia da camada híbrida por microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura e da verificação do grau de conversão dos sistemas adesivos.

As seguintes hipóteses nulas foram levantadas:

- A resistência de união à dentina, por microtração, dos sistemas adesivos (SB) e (SU) não é afetada pela presença da saliva após 48 horas, 6 meses, e 12 meses.
 - A morfologia da camada híbrida não é alterada pela presença da saliva na dentina nos períodos de 48 horas, 6 meses, e 12 meses.
 - O grau de conversão dos sistemas adesivos (SB) e (SU) não é afetado pela presença de saliva, após a polimerização imediata.
-
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais Utilizados

Para a realização deste estudo foram utilizados os materiais constantes no quadro 1.

Quadro 1 - Composição e fabricante dos materiais utilizados.

Material	Composição	Fabricante
Condicionador Dental Gel®	Solução de ácido fosfórico na concentração de 37% em gel	Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Rio de Janeiro/RJ - Brasil
Filtek Z250 Universal Restorative® - Cor A3	Matriz orgânica: Bis-GMA UDMA Bis-EMA Canforoquinona Parte inorgânica: Zircônia/Sílica (82% em peso, 60% em volume; partículas de 0,6 µm).	3M ESPE Produtos Odontológicos, Sumaré/SP – Brasil
Adper™ Single Bond 2®	Bis-GMA, HEMA, Diuretanodimetacrilato, Copolímero do ácido polialcenóico, Canforoquinona, Água, Etanol, Glicerol 1,3 dimetacrilato, Sílica (5nm;10% em peso)	3M ESPE Produtos Odontológicos, Sumaré/SP – Brasil
Adper™ Single Bond® Universal	Adesivo: metacriloiloxidecildihidrogênio fosfato, monômero fosfato, dimetacrilato, hidroxietil metacrilato, copolímero de ácido polialcenóico modificado por resina, carga, etanol, água, iniciadores, silano)	3M ESPE Produtos Odontológicos, Sumaré/SP – Brasil
Álcool etílico absoluto P.A	etanol 99,5° GL	Dinâmica® Química Contemporânea, Diadema, SP, Brasil
Rhodamine B	Marcador fluorescente rodamina B C ₂₈ H ₃₁ ClN ₂ O ₃ (M=479,01 g/mol)	Sigma-AldrichChemieGmbH, Gillingham, Nwe Rd, Reino Unido
Fluoresceína	Marcador fluorescente fluoresceína C ₂₀ H ₁₂ O ₅ (M=332.31 g/mol)	Sigma-AldrichChemieGmbH, Gillingham, Nwe Rd, Reino Unido

4.2 Obtenção dos dentes humanos

Para este estudo foram utilizados 180 dentes terceiros molares extraídos por indicação odontológica. Os dentes foram obtidos nas Clínicas de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP e por doações de cirurgiões-dentistas que atendem em consultórios particulares, mediante assinatura do termo de Doação de Dentes (Anexos A e B), segundo a resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (Ministério da Saúde, DF), e após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da FOB-USP (nº CAEE 38566814.0.0000.5417).

Após a extração, os dentes foram limpos com curetas (Duflex 55G, SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro/RJ – Brasil) para remoção de restos de tecidos gengivais e, posteriormente, foram armazenados em água destilada com cristais de timol renovada a cada 15 dias para evitar proliferação bacteriana, onde ficaram imersos durante todo o período até o preparo dos espécimes.

4.3 Coleta da Saliva

Imediatamente antes dos procedimentos adesivos, a saliva foi coletada de um único indivíduo (pesquisador), os parâmetros da saliva coletada foram: saliva estimulada pH 7,0; capacidade tampão pH 2,0 e fluxo salivar de 2,5ml/min., uma vez que a saliva fresca é considerada um material aceitável para uso em testes de contaminação por saliva. (ERICSSON, 1959; FROSTELL, 1980; HIRAISHI et al., 2003). A coleta da saliva foi realizada sempre no mesmo horário e após, pelo menos, 3 horas da última refeição para evitar diferenças significativas na sua composição.

4.4 Preparo dos Espécimes para Microtração

Cento e vinte dentes foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos (n=10):

- SB-48h (controle): Condicionamento com ácido fosfórico a 37% durante 15 segundos. Lavagem com jato de ar e água por 30 segundos. Secagem com papel absorvente. Aplicação e polimerização do sistema adesivo Adper™ Single bond 2®, de acordo com as instruções do fabricante. A polimerização foi feita com aparelho de luz led (Radii-cal SDI- Southern Dental Industries- Austrália) com intensidade de 1200 mW/cm² verificada periodicamente por um radiômetro (Gnatus). Inserção de resina composta (Filtek Z250- 3M ESPE Produtos Odontológicos, Sumaré/SP – Brasil) em 2 incrementos de 2mm aproximadamente e fotoativação por 40 segundos cada incremento. Armazenamento em estufa a 37°C em água deionizada por 48 horas
 - SB-6m: mesmos procedimentos descritos para o grupo SB-48h, mas com os espécimes armazenados por 6 meses em estufa a 37°C em água deionizada.
 - SB-12m: mesmo procedimentos descritos para os dois grupos acima, mas com armazenamento por 12 meses nas mesmas condições já descritas.
 - SBsal-48h: Condicionamento com ácido fosfórico a 37% durante 15 segundos. Lavagem com jato de ar e água por 30 segundos. Secagem com papel absorvente. Contaminação com saliva fresca aplicada com microbrush e deixada por 30 segundos. Secagem com papel absorvente. Aplicação do sistema adesivo Adper™ Single bond 2® e polimerização por 20 segundos. Inserção de resina composta. Armazenamento dos dentes por 48 horas em estufa a 37°C em água deionizada.
 - SBsal-6m: preparado como descrito para o grupo SBsal-48h, mas com os espécimes armazenados por 6 meses.
 - SBsal-12m: mesmos procedimentos descritos acima, mas com e armazenamento por 12 meses.
 - SU-48h (controle): Condicionamento com ácido fosfórico a 37% durante 15 segundos. Lavagem com jato de ar e água por 30 segundos. Secagem com papel absorvente. Aplicação do sistema Single Bond® Universal de acordo
-
-

com as instruções do fabricante com a técnica de condicionamento total. Inserção de resina composta Filtek Z250 em dois incrementos de 2mm fotopolimerizados por 40s com aparelho de luz LED (Radii-cal SDI- Southern Dental Industries- Austrália) com intensidade de 1200 mW/cm².

- SU-6m: mesmos procedimentos descritos para o grupo SU-48h, mas com armazenamento de 6 meses.
- SU-12m: mesmos procedimentos descritos para o grupo SU-48h, mas com armazenamento de 12 meses.
- USal-48h: Condicionamento com ácido fosfórico a 37% durante 15 segundos. Lavagem com jato de ar e água por 30 segundos. Secagem com papel absorvente. Contaminação com saliva fresca aplicada com microbrush e deixada por 30 segundos. Aplicação do sistema Single Bond® Universal de acordo com as instruções do fabricante com a técnica de condicionamento total. Inserção de resina composta. Armazenamento dos dentes por 48 horas em estufa a 37°C em água deionizada.
- USal-6m: mesmos procedimentos descritos para o grupo USal-48h, mas armazenamento por 6 meses em estufa a 37°C em água deionizada.
- USal-12m: mesmos procedimentos descritos acima, com armazenamento durante 12 meses.

Decorridas as 48 horas da restauração, os dentes foram removidos da estufa, secos e fixados com cera pegajosa em um dispositivo de base cilíndrica que permitiu a adaptação na máquina de corte seriado (Isomet™LowSpeedSaw® Buehler, Lake Bluff - USA). Os dentes foram seccionados no sentido vestibulolingual com disco de diamante (Extec Dia. Waferblade 5"x.015x1/2, cód 12240 ExtecCorp-Einfeld, CT USA) em baixa velocidade sob refrigeração. Desse primeiro seccionamento foram obtidas fatias com espessura média de 0,8mm. Após o primeiro seccionamento, as fatias restantes foram novamente fixadas com cera pegajosa e o dispositivo acoplado à máquina de corte foi girado 90° para permitir realização do segundo seccionamento no sentido mesiodistal, perpendicularmente aos primeiros cortes. Dessa maneira,

foram obtidos palitos constituídos de resina composta e dentina com uma área transversal de aproximadamente 0,8mm².

Os palitos foram armazenados em água deionizada, a 37°C para os grupos correspondentes a 6 e 12 meses a fim de avaliar o efeito da presença da saliva na resistência adesiva dos diferentes sistemas adesivos ao longo do tempo. A água de armazenamento foi trocada semanalmente para evitar proliferação bacteriana.

Para avaliação da resistência adesiva, os palitos foram fixados individualmente ao dispositivo de microtração tipo Bencor multi T com um adesivo à base de cianocrilato (Loctite Super Bonder gel control, Henkel Ltda SP-Brasil), pelas extremidades, de modo a posicionar a interface adesiva em orientação perpendicular à força aplicada a uma velocidade 0,5mm/min., utilizando uma célula de carga de 50N em uma máquina de ensaios universal Instron (Número 3342 Illinois Tool Works, Noewood, EUA). Os valores obtidos foram referentes à força máxima e força de ruptura, expressas em Kgf, sendo o valor de força de ruptura utilizado para o cálculo de resistência de união. Após o teste, as porções fraturadas foram cuidadosamente removidas e a área transversal de união correspondente à fratura foi medida utilizando um paquímetro digital. O valor da área de secção transversal foi transformado em cm². A resistência de união foi calculada dividindo o valor de força de ruptura (Kgf) pela área (cm²) e, posteriormente, foi convertida em megapascascales (MPa).

As superfícies fraturadas de ambos os segmentos foram analisadas com o auxílio de um microscópio ótico (200x DINO-LITE digital microscope, AnMoElectronics Corporation, Hsinchu-China) para determinação do padrão de fratura. As fraturas foram classificadas em tipo adesiva, mista ou coesiva:

- Tipo adesiva (Ta): quando a fratura ocorreu na interface adesiva,
 - Tipo coesiva em dentina (Tcd): quando a fratura ocorreu no substrato dentário (dentina),
 - Tipo coesiva em resina composta (Tcr): quando a fratura ocorreu no material restaurador (resina composta),
 - Tipo mista (Tm): fratura adesiva e coesiva.
-

4.5 Preparo dos dentes para análise morfológica da camada híbrida

Foram utilizados os 60 molares divididos em 6 grupos (n=10). Os espécimes foram preparados da mesma maneira descritos no item “Preparo dos dentes” e “com contaminação com saliva”. Após a restauração, os 6 grupos foram armazenados em meio aquoso, por períodos de 48 horas (grupos SalSB-48h e SalSU-48h); 6 meses (grupos SalSB-6m e SalSU-6m) e 12 meses (grupos SalSB-12m e SalSU-12m). Foram obtidas duas fatias selecionadas aleatoriamente com espessura média de 0,8mm de cada dente após os respectivos períodos de armazenagem.

4.5.1 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Como a análise da camada híbrida foi feita em microscópio confocal, houve a necessidade de realizar a marcação dos sistemas adesivos com o corante fluorescente Rodamina B (Rhodamine B® – C₂₆H₃₁CIN₂O₃ Sigma-AldrichChemieGmbHGillingham/New Rd – UK), na concentração final de 0.02mg/mL em etanol (BIM JUNIOR et al., 2017) ,e da saliva com o corante fluorescente Fluoresceína (Sigma-AldrichChemieGmbHGillingham/New Rd – UK), adicionada em uma concentração final de 0.5 mg/mL

O preparo da solução de Rodamina B foi feito através do procedimento padrão de diluição (BIM JUNIOR, 2013) a partir de uma solução estoque e soluções sucessivas até conseguir a concentração de 0.1 mg/mL. Isso foi feito pesando-se 50 mg de pó de Rodamina B depositado no interior de um balão volumétrico com 100mL de etanol anidro e agitado manualmente por 30s. Em seguida, o recipiente foi levado a um aparelho ultrassônico (Ultraclearner USC-1600^a, Unique, Indaiatuba, SP, Brasil) para homogeneização durante 5 minutos. A solução de Rodamina B assim obtida foi incorporada aos adesivos em concentração de 0,50mL, a partir de 0,010mL de solução de etanol.

Para a obtenção da solução de Fluoresceína, procedimento similar ao descrito acima para a Rodamina foi realizado e, após a coleta da saliva, a Fluoresceína foi imediatamente adicionada e misturada em uma lâmina de vidro com auxílio de uma espátula de metal.

A primeira fatia dos grupos foi utilizada para análise em microscopia confocal (Leica TCS SPE, Mannheim – Germany) com uma excitação a laser de diodo de 532nm com a finalidade de avaliar a espessura e a interação com a saliva marcada da interface de adesão. A análise foi realizada com objetiva de 40x. A segunda fatia de cada dente foi preparada para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura.

4.6 Grau de Conversão dos sistemas adesivos

O grau de conversão (GC) dos sistemas adesivos foi aferido por espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (RPreStige-21, Shimadzu, Tokyo, Japão). Nesta etapa, foram avaliados os adesivos SB/SU na composição original e também modificados com 3 concentrações diferentes de saliva 10%, 25%, 50% em volume. Inicialmente foi realizada a leitura do sistema adesivo em estado líquido antes da polimerização empregando uma micropipeta (Transferpette S, BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, Alemanha). (2,0 µL). O adesivo foi dispensado sobre o centro do cristal do dispositivo Miracle: reflectância total atenuada (ART) (MiraclePike EUA). O espectro foi obtido com 32 varreduras com uma resolução de 4 cm⁻¹ a uma velocidade do espelho de 2,8 mm/s, obtendo-se espectros compreendidos entre 1750 a 1550 cm⁻¹. Posteriormente, o mesmo espécime foi fotoativado por 20s por aparelho de luz LED (Radii-cal SDI- Southern Dental Industries- Australia) com intensidade de 1200 mW/cm². O grau de conversão foi determinado pela proporção de transformação de duplas ligações de carbono alifáticas subtraindo a % C = C e aromáticas (controle interno, sem variações no modo polimerizado como não polimerizado), uma vez que a absorção de energia para essas duas condições de dupla ligação ocorre, respectivamente, nos comprimentos de onda de 1608 cm⁻¹ e 1638 cm⁻¹.

Como para a análise em microscopia confocal foi necessária a incorporação de Rodamina B nos sistemas adesivos, também foi verificado o grau de conversão dos sistemas adesivos marcados.

4.7 Análise estatística

Para a comparação das variáveis resistência de união foram utilizados os testes de ANOVA a 3 critérios (sistema adesivo, presença de saliva e tempo de armazenagem) e Tukey com o nível de significância de 5%. E a análise do grau de conversão (GC) e da morfologia da camada híbrida (quanto à espessura e penetração dos *tags* de resina) foi feita aplicando-se o teste ANOVA a 2 critérios e Tukey com nível significância de 5%. Adicionalmente a análise de correlação de Pearson foi utilizada para determinar a interação das variáveis da morfologia da camada híbrida e saliva.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Microtração

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão da resistência de união na dentina (MPa)

Grupo	Controle (48h)	6 meses (6m)	12 meses (12m)
SB	43,53 ($\pm 6,0$) ^a	40,10 ($\pm 3,4$) ^b	38,59 ($\pm 5,4$) ^c
SBsal	43,09 ($\pm 6,2$) ^a	39,86 ($\pm 6,6$) ^b	37,25 ($\pm 5,8$) ^c
SU	42,98 ($\pm 4,3$) ^a	39,30 ($\pm 3,6$) ^b	40,44 ($\pm 5,7$) ^c
SUsal	44,39 ($\pm 4,2$) ^a	42,26 ($\pm 2,5$) ^b	38,26 ($\pm 5,7$) ^c

n=10 ($p \leq 0,05$).

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) nos grupos para os fatores de variação contaminação e sistema adesivo. Em relação ao fator sistema adesivo não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os dois sistemas nos diferentes tempos testados. No entanto, para o fator tempo ($p = 0,002$) houve diferença estatisticamente significativa nos dois sistemas adesivos comparados com o seu respectivo grupo controle (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Representação gráfica da resistência de união nos tempos 48 horas, 6 meses e 12 meses dos sistemas adesivos Adper Single Bond 2 e Adper Single Bond Universal com e sem contaminação com saliva.

5.1.1 Tipo de fratura

Foi possível observar que as falhas foram predominantemente adesivas para todos os grupos experimentais. A distribuição dos tipos de fratura dos espécimes está representada no gráfico abaixo

Gráfico 2 - Distribuição do tipo de fraturas dos grupos estudados.

5.2 Grau de conversão

Tabela 2 - Médias e desvios-padrão do grau de conversão (%) em diferentes volumes de saliva adicionados (10%, 25% e 50%).

Material	Controle	Saliva (10%)	Saliva (25%)	Saliva (50%)
SB	84,86 ($\pm 1,4$) ^a	85,59 ($\pm 3,4$) ^a	49,68 ($\pm 12,8$) ^{b,c}	38,56 ($\pm 11,8$) ^c
SU	80,88 ($\pm 3,1$) ^a	85,52 ($\pm 3,3$) ^a	86,27 ($\pm 3,5$) ^a	57,82 ($\pm 11,1$) ^b

N=5 ($p \leq 0.05$).

A análise dos resultados permitiu verificar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no grau de conversão entre os grupos controle (adesivo sem contaminação) e os grupos com 10% do volume de saliva, para os dois sistemas adesivos (Adper Single Bond) e (Adper Single Bond Universal). Já o acréscimo de maior quantidade

de saliva (25% em vol) diminuiu significativamente o grau de conversão do sistema adesivo Adper Single Bond, mas não afetou o grau de conversão do sistema adesivo Adper Single Bond Universal. O acréscimo de saliva em maior quantidade (50% em vol) afetou diminuindo significativamente o grau de conversão para ambos os sistemas adesivos estudados.

5.3 Microscopia confocal de varredura a laser

5.3.1 Análise quantitativa da espessura da camada híbrida e dos tags de resina.

Tabela 3 - Médias e desvios-padrão da camada híbrida e comprimento de tags(μm).

ADESIVO	TEMPO	Camada Híbrida (CH)	Tags
		Média (DP)	Média (DP)
salSB-48h	48Horas	3,59 ($\pm 0,8$) ^{A,a}	19,15 ($\pm 4,2$) ^{C,c}
SalSU-48h	48 Horas	1,26 ($\pm 0,5$) ^{B,a}	13,96 ($\pm 3,5$) ^{D,c}
SalSB-6m	6 Meses	3,59 ($\pm 1,0$) ^{A,a}	14,85 ($\pm 3,1$) ^{C,d}
SalSU-6m	6 Meses	1,73 ($\pm 0,8$) ^{B,a}	9,75 ($\pm 2,7$) ^{D,d}
SalSB-12m	12 Meses	2,08 ($\pm 1,5$) ^{A,b}	12,06 ($\pm 3,6$) ^{C,d}
SalSU-12m	12 Meses	1,07 ($\pm 0,3$) ^{B,b}	7,36 ($\pm 2,9$) ^{D,d}

N=10 ($p \leq 0.05$).

*Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre materiais.

**Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa para o fator tempo.

5.3.1.1 Camada Híbrida

Entre os dois adesivos a análise da camada híbrida, após 48 horas, mostrou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$) entre os dois adesivos na presença de saliva (Tabela 3). A análise de variância entre grupos de 48 horas e 6 meses não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$). Não entanto, a análise de variância após 12 meses, revelou que houve diferença estatisticamente significativa para ambos os adesivos ($P = 0,0012$).

A espessura da camada híbrida para os dois materiais foi estatisticamente significativa ($P= 0,00001$) sendo os valores médios para o sistema adesivo Single Bond 2 de $3,09 \mu\text{m}$ ($\pm 0,8$) e para o Single Bond Universal de $1,34 \mu\text{m}$ ($\pm 0,3$).

5.3.1.2. Tags de resina.

A análise do comprimento dos tags de resina do adesivo Adper Single Bond 2 ($15,35 \pm 3,5$) e Adper Single Bond Universal ($10,33 \pm 3,3$) revelou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0001$).

A análise de variância do fator tempo entre os grupos, após armazenamento por 48 horas e 6 meses, não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$). Por outro lado, o armazenamento por 12 meses determinou uma diminuição ($p=0,0001$) no comprimento dos tags para ambos os sistemas adesivos.

5.3.2. Análise de interação entre marcadores fluorescentes.

Tabela 4 - Média (área μm^2) e desvios-padrão da interação do sistema adesivo com a saliva (associação dos dois marcadores fluorescentes na região da camada híbrida).

ADESIVO	TEMPO	CH/Rodamina B	CH/Fluoresceína
		Média (DP)	Média (DP)
SalSB-48h	48Horas	155,01($\pm 34,2$) ^a	101,71 ($\pm 46,3$) ^b
SalSU-48h	48Horas	151,42 ($\pm 28,3$) ^{a, b, c, d, e, g}	63,58 ($\pm 34,5$) ^{a, b, d, h}
SalSB-6m	6 Meses	152,68 (± 29) ^{a, c}	102,34 (± 32) ^{b, c, d}
SalSU-6m	6 Meses	143,29 ($\pm 31,9$) ^{a, b, c, d, e, f, g, i}	60,66 ($\pm 27,9$) ^{d, h}
SalSB-12m	12 Meses	149,32 ($\pm 45,3$) ^{a, b, c, d, e}	117,97 ($\pm 34,7$) ^{a, b, d, e, f}
SalSU-12m	12 Meses	178,43 ($\pm 30,1$) ^{a, c, e, g, i}	113,11 ($\pm 25,1$) ^{a, b, c, d, e, f, g, h, i}

N=10 ($p \leq 0,05$).

A análise dos dois marcadores fluorescentes na região da camada híbrida revelou que houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0001$) com relação ao fator tempo. Foi empregado o teste ANOVA a dois critérios. A espessura da camada evidenciada pela Rodamina B (CH/Rodamina B), em valores médios, foi de

152,31 $\pm$ 2,83 μm^2 , para o sistema SB e de 157,71 $\pm$ 18,39 μm^2 para o sistema SU. Não houve interação entre os fatores.

A camada evidenciada pelo marcador Fluoresceína (CH/Flouresceína) apresentou um aumento significativo para os grupos SU-12m e SB-12m ($p \leq 0.05$).

Figura 1 - Espécime após 48 horas do procedimento adesivo. A) Adper Single Bond 2 e B) Adper Single Bond Universal. Observa-se que a camada adesiva (CA) formada pelo SB apresenta maior espessura, assim como a camada híbrida (CH) com espessura média de $3,59 \pm 0,8 \mu\text{m}$, enquanto a do SU foi de $1,26 \pm 0,56 \mu\text{m}$ e os tags (t) apresentaram-se mais longos.

Figura 2 - Espécime após 6 meses de armazenagem em meio aquoso. (A) SB e (B) SU apresentam CA, CH e (t) semelhante aos grupos correspondentes a cada material no período de 48 horas. Note-se a presença de Fluoresceína (saliva) em contato com a parte inferior da camada híbrida para ambos adesivos.

Figura 3 - Espécime após 12 meses de armazenagem em meio aquoso. O sistema adesivo SB (A) apresenta (CH) com maior interação entre os dois marcadores fluorescentes, com uma camada híbrida não homogênea. (t) A interação dos dois marcadores na área dos *tags*, mostra uma menor espessura estatisticamente significativa em relação ao grupo 48 horas. O espécime do sistema adesivo SU (B) apresenta a presença de Flouresceína (saliva) em contato com a parte inferior da camada híbrida de maneira isolada, sem interagir com CH e os *tags* (t) apresentam-se com menor comprimento em relação ao grupo de 48 horas. Pouca interação entre os marcadores fluorescentes ao longo dos *tags* foi observada

Gráfico 3 - Representação gráfica da interação entre marcadores fluorescentes (CH/Rodamina B), (CH/Flouresceína) após armazenamento de 48 horas, 6 meses e 12 meses dos sistemas adesivos Adper Single Bond 2 (SB) e Adper Single Bond Universal (SU) com contaminação com saliva.

5.3.3 Correlação de Pearson

Análise de correlação de Pearson (área μm^2) entre os fatores fluorescentes adesivo-Rodamina B e saliva-Fluoresceína na camada híbrida demonstrou relação parcialmente significativa entre ambos marcadores para o sistema adesivo Adper Single Bond 2 ($r=0,5631$; $p=0,0901$), após armazenagem por 48 horas. Após 6 meses de armazenagem, não houve interação entre os fatores ($r=0,0205$; $p=0,955$). No entanto, após 12 meses ($r=0,916$; $p=0,002$) houve uma correlação estatisticamente significativa. A análise de correlação de Pearson para o sistema adesivo Adper Single Bond Universal não demonstrou interação estatisticamente significativa após o armazenamento de 48 horas ($r=0,057$; $p=0,875$), de 6 meses ($r=0,469$; $p=0,171$) e 12 meses ($r=0,220$; $p=0,540$). A correlação entre os marcadores fluorescentes para os sistemas adesivos SB e SU pode ser observado nos gráficos 5 e 6.

Gráfico 4 - Representação gráfica da interação entre marcadores fluorescentes (CH/Rodamina B), (CH/Fluoresceína) após 48 horas, 6 meses e 12 meses de armazenagem do sistema adesivo Single Bond 2 (SB).

Gráfico 5 - Representação gráfica da interação entre marcadores fluorescentes (CH/Rodamina B), (CH/Flouresceína) após 48 horas, 6 meses e 12 meses e armazenagem do sistema adesivo Single Bond Universal (SU).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A formação da camada híbrida em dentina pode ser influenciada, direta e indiretamente, pela composição dos sistemas adesivos, pelo seu grau de conversão e pela hidrólise na interface adesiva dentina/resina ao longo do tempo (TJADERHANE et al., 2013a). A camada híbrida pode ser estudada através de testes de resistência de união e de análises morfológicas, assim como, pelo grau de conversão dos monômeros constituintes do sistema adesivo. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a camada híbrida formada após a contaminação, por saliva, da dentina desmineralizada antes da aplicação do sistema adesivo, utilizando teste de resistência de união por microtração e da análise morfológica da camada híbrida por análise microscópica. Além disso, também foi estudado o efeito da presença de saliva no grau de conversão do sistema adesivo.

Resistência de união

Os efeitos negativos da presença da saliva na dentina, após a desmineralização, pode afetar a infiltração dos monômeros pela presença das proteínas salivares (SPENCER; SWAFFORD, 1999; SPENCER et al., 2010), como a mucina.

Os valores de resistência de união obtidos neste trabalho foram semelhantes para todos os grupos, independente da presença ou ausência de saliva. Pinzon et al., (2011), em um estudo in vitro, verificaram que a mucina não alterou a resistência de união de diferentes sistemas e concluíram que outros estudos devem ser realizados para procurar determinar o efeito de outras proteínas salivares e demais componentes da saliva que influenciariam alterações na resistência adesiva em dentina (tabela 1).

Por outro lado, existem vários trabalhos que demonstraram a diminuição da RU com a dentina desmineralizada contaminada com saliva. De fato, o momento mais crítico de contaminação com saliva ocorre após o condicionamento ácido (FURUSE et al., 2007; COBANOGLU et al., 2013; SANTACHI et al., 2015). Neste trabalho, o método adotado foi o de apenas evaporar a saliva, que foi considerado um método não confiável de descontaminação por (COBANOGLU et al., 2013). No entanto,

alguns trabalhos também indicaram que a contaminação com saliva antes da aplicação do adesivo não influenciou na resistência de união na dentina (TOWNSEND; DUNN, 2004; SAMPAIO, 2009; SHEIKH et al., 2010; ACOSTA, 2012; CASAS, 2013; AZEVEDO, 2015).

Existem duas explicações possíveis para os valores de resistência de união não terem sido afetados pela presença da saliva na camada híbrida. O solvente etanol presente nos dois adesivos testados poderia ter desnaturado as glicoproteínas que formam a película salivar e, dessa forma, teria “limpado” a superfície da dentina (COBANOGLU et al., 2013). Também, poderia ser explicado pela alta hidrofiliabilidade dos adesivos (HEMA) que podem penetrar através da película salivar no substrato de dentina úmida durante a aplicação (EL-KALLA; GARCIA-GODOY, 1999; TOWNSEND; DUNN, 2004; SATTABANASUK et al., 2006).

Neste trabalho foi utilizada saliva humana natural como contaminante porque a saliva artificial pode confundir os resultados, dependendo da composição e concentração dos componentes (MOSZNER et al., 2005; VAN LANDUYT et al., 2008; SHEIKH et al., 2010; YU et al., 2014). Em muitos estudos, a saliva humana foi aceita como um meio contaminante aceitável (EL-KALLA, 1999; TASKONAK; Sertgoz, 2002; YAZICI et al., 2007; JIANG et al., 2010). Provavelmente, outros componentes poderiam influenciar na redução da resistência de união na dentina, como enzimas hidrolíticas, pH, água entre outros. Por esse motivo, neste trabalho foi coletada saliva com parâmetros padronizados e considerados normais de acordo com a literatura. Saliva estimulada com pH 7,0, capacidade tampão pH 2,0 e fluxo salivar de 2,5ml/min (ERICSSON, 1959; FROSTELL, 1980; HIRAISHI et al., 2003).

Vários métodos de lidar com a contaminação por saliva, durante os procedimentos adesivos, são propostos como tentativa de conseguir condições adequada para a hibridização do sistema adesivo no substrato dentinário. Cobanoglu et al. (2013) argumentam que, indiferente do momento da contaminação durante o processo de aplicação do sistema adesivo, reaplicar novamente o sistema adesivo melhora significativamente a resistência de união. Segundo Ari et al. (2008) uma alternativa eficiente seria remover com uma ponta diamantada a camada do adesivo contaminado e reaplicar novamente o sistema adesivo. Já alguns pesquisadores sugerem que aplicar clorexidina sobre a dentina contaminada pode promover a

limpeza do substrato contaminado (HASHIMOTO; OHNO, et al., 2003; HASHIMOTO; TAY, et al., 2003; BRESCHI et al., 2004; LIN et al., 2005; CARRILHO et al., 2007; FURUSE et al., 2007) e preservar a integridade da camada híbrida através da inativação das metaloproteinases (MMP's) que degradam as fibrilas de colágeno a longo prazo (BRESCHI et al., 2009; CAMPOS et al., 2009; BRESCHI, et al., 2010; BRESCHI; MAZZONI, et al., 2010; CARRILHO et al., 2010; KIM et al., 2010; TEZVERGIL-MUTLUAY et al., 2010). Porém, (AZEVEDO, 2015) verificou que a aplicação de clorexidina na dentina contaminada com saliva não alterou os valores de RU, tanto logo após o processo adesivo, quanto após 6 meses e 1 ano de armazenamento, utilizando dois tipos de adesivos convencionais (2 e 3 passos). O que coincide com o resultado encontrado por Campos et al. (2009) que concluíram que clorexidina a 0,12% e 2%, não mostrou influência sobre a resistência de união da interface criada por nenhum desses sistemas adesivos utilizados. Alguns autores concluem que o resultado pode depender diretamente do tipo e composição do adesivo (De MUNCK et al., 2003). Não existe consenso científico do melhor procedimento para lidar com a contaminação por saliva.

Os dois sistemas adesivos simplificados utilizados nesse trabalho apresentam em sua composição a incorporação do copolímero de ácido polialcenóico, mais conhecido como “copolímero do Vitrebond” (VCP) com capacidade de interagir quimicamente com os tecidos dentários mineralizados através da ligação ao cálcio da hidroxiapatita. Kubo et al. (2006) demonstraram um bom comportamento clínico do VCP em sistemas adesivos convencionais que o tem na sua formulação.

(AZEVEDO, 2015) avaliou diferentes métodos de contaminação de saliva na dentina e obteve os maiores valores de RU para o sistema adesivo SB que contém VCP, quando comparado com convencional de 3 passos (Adper Scotchbond Multipurpose - 3M ESPE) considerado como adesivo padrão ouro na adesão RU. No presente trabalho, os valores registrados de resistência de união foram similares para os dos sistemas SB e SU, com sem contaminação com saliva, para todos os períodos testados, o que poderia ser justificado pela presença do VCP dentro dos seus componentes para ambos materiais.

Os sistemas adesivos “universais” são caracterizados pela substituição parcial do monômero dimetacrilato pelo monômero 10-metacriloxidecildihidrogeniofosfato

(MDP) que tem pH ácido, o que o torna com capacidade autocondicionante e permite a ligação química entre esmalte e dentina, proporcionando interfaces dente/restauração estáveis e duradoras (YOSHIDA et al., 2012).

Yoshihara et al. (2010) relataram que a união promovida pelas cadeias de 10-MDP é mais eficaz formando estruturas regulares através de seus grupos de fosfatos com a superfície da hidroxiapatita revelando a formação de microcamadas de 4nm. Cada camada desta estrutura da microcamada consta de duas moléculas de 10-MDP com seus grupos metacrilatos se inter-relacionando, o que torna uma união mais forte e estável com alta taxa de conversão de sua resina hidrofóbica, proporcionando excelentes características hidrofóbicas (PEUMANS et al., 2010).

Em nosso estudo foi comparado o desempenho das duas gerações de sistemas adesivos simplificados (SB) e (SU) nos períodos de 48 horas, 6 meses e 12 meses. Não houve registro de valores de RU ($p \leq 0.05$) estatisticamente diferentes. Hipoteticamente, este resultado pode ser atribuído à presença dos componentes com ligação química ao substrato inorgânico dental que ambos sistemas contém, demonstrando a efetividade a longo prazo (in vitro). Deve-se tomar cuidado para não atribuir o sucesso clínico a valores de RU isoladamente, uma vez que esses valores não são o único fator determinante no sucesso (MANHART et al., 2010).

Morfologia da Camada Híbrida

A análise microscópica de varredura confocal é um método valioso que possibilita observar e quantificar a interface adesiva (BITTER et al., 2004; FLORESCU et al., 2014).

Para um maior entendimento, este estudo teve o objetivo de avaliar morfologicamente a modificação da camada híbrida contaminada com saliva com tempos de avaliação até 12 meses. Nesse sentido, os grupos controle foram para ambos os sistemas adesivos com contaminação inicial após 48 horas, empregando marcadores fluorescentes e avaliados no confocal. A intenção do estudo foi quantificar as possíveis mudanças da camada híbrida dos dois sistemas adesivos com ligação química ao substrato dentinário.

Foram registrados a espessura da camada híbrida (CH) e o comprimento dos tags de resina. Os valores médios de espessura da camada híbrida formada pelo sistema adesivo Adper Single Bond 2 foi de $3,09 \mu\text{m} \pm 0,8$ e o comprimento dos tags foi de $15,35 \mu\text{m} (\pm 3,5)$ e para o Adper Single Bond Universal foram $1,34 \mu\text{m} (\pm 0,3)$ e $10,33 \mu\text{m} (\pm 3,3)$, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos presentes na literatura que indicam, em média, espessura de camada híbrida entre 2 a $5 \mu\text{m}$ (WALSHAW; MCCOMB, 1996; ANCHIETA et al., 2015) e de 5 a $7 \mu\text{m}$. (ARRAIS; GIANNINI, 2002). A espessura da camada híbrida pode variar dependendo dos métodos e técnica empregada, principalmente, as técnicas convencionais.

De acordo com o trabalho de Wagner et al. (2014), a espessura da CH em dentina humana do adesivo universal empregando condicionamento ácido foi em torno de $2.3 \mu\text{m}$ e o comprimento dos tags foi de 20-30 μm . Nosso trabalho empregou métodos de mensuração similares ao empregados por (WAGNER et al., 2014), em que foram obtidos dados exclusivamente da CH, sem incluir a camada Adesiva (CA), o que é de vital importância para evitar interpretações e resultados falso-positivos, considerando que ambos sistemas adesivos tem protocolos distintos de aplicação, segundo o fabricante. Para a aplicação do SB é recomendado duas camadas (atuando como primer e adesivo), enquanto que para o SU a recomendação é da aplicação de uma única camada atuando como primer/adesivo. De fato, o adesivo SB apresentou uma maior espessura de CA comparado com SU.

Uma possível explicação seria a sugerida por (PASHLEY et al., 2003; YU et al., 2014) que demonstrou a capacidade da saliva em formar uma barreira superficial, impedindo a união coesiva do adesivo. Para isto, os pesquisadores avaliaram os adesivos contaminados entre duas camadas, demonstrando que pode influenciar a formação de uniões mais fracas (forças de Van der Waals) e prejudicar, a longo prazo, o desempenho mecânico do adesivo (NAKAJIMA et al., 2002). Em nosso trabalho, apesar da contaminação por saliva não ter ocorrido entre as camadas dos adesivos, a saliva poderia se comportar como barreira física entre as fibras de colágeno da dentina. Por outro lado, o impedimento da infiltração dos monômeros entre os espaços interfibrilares ocorreu, possivelmente, porque as glicoproteínas da saliva competem com os monômeros durante o processo de hibridização, reduzindo o tamanho da CH, assim como a resistência de união (ABOUSHLIB, 2011).

Adicionalmente, pode-se observar a morfologia dentinária nas figuras (1-3), onde a penetração do marcador de fluoresceína (incorporado à saliva) foi expressiva em 83,7% das amostras. No entanto, 16,3% apresentaram pouca penetração. Isso pode ser explicado pela orientação dos túbulos, assim como, pelo tamanho e diâmetro dos túbulos e a idade biológica da dentina (CARVALHO et al., 2001).

Além dos possíveis efeitos da contaminação por saliva na resistência adesiva imediata em dentina, não se conhece os efeitos dessa contaminação a longo prazo, principalmente pelo fato da saliva conter um alto volume de água (99,4%). A umidade, provinda da saliva, pode interferir na qualidade da infiltração dos monômeros hidrofílicos (HITMI et al., 1999; DARABI et al., 2012). De acordo com nossos resultados, não houve diferença significativa entre os grupos de 48 horas e 6 meses ($p > 0,05$). No entanto, a análise de variância após 12 meses revelou que houve diferença estatisticamente significativa para ambos os adesivos. O prolongamento do tempo de armazenagem, aumenta a susceptibilidade à degradação das fibrilas de colágeno e também à degradação hidrolítica.

Em diversos estudos, a presença de defeitos ou alterações na interface adesiva foi observada em dentina contaminada com saliva empregando sistemas adesivos convencionais que requerem condicionamento ácido das estruturas dentárias (TUNCER et al., 2014). Para esses sistemas, a adesão ocorre pela infiltração dos monômeros na rede de fibrilas de colágeno exposta pela desmineralização da dentina. De tal forma, os monômeros hidrofílicos não foram capazes de encapsular completamente a matriz de colágeno (aproximadamente 0,5 microns), deixando as fibrilas de colágeno expostas e susceptíveis à biodegradação da rede de colágeno (GREGOIRE et al., 2013). Por outro lado, o efeito do ácido fosfórico ativa as enzimas MMPs, ao remover todos os cristais extra e intrafibrilares, expondo as fibrilas de colágeno (PASHLEY et al., 2003; MAZZONI et al., 2007; De MUNCK et al., 2009).

O estudo de Hirashi et al., em 2003 avaliou a alteração do pH da superfície da dentina após a contaminação por saliva artificial. Após condicionamento com ácido fosfórico a 37%, a superfície da dentina apresentou um pH de 5,9 que a simples lavagem com água não foi suficiente para neutralizá-la. No entanto, a aplicação de saliva imediatamente após aumentou o pH para 6,2, sugerindo que a contaminação com saliva pode influenciar na acidez da dentina, neutralizando parcialmente a

ativação das MMPs. Por outro lado, segundo Hashimoto et al. (2003), a saliva contém algumas enzimas proteolíticas que aceleram o processo de hidrólise nas fibrilas de colágeno, o que poderia diminuir o diâmetro das fibrilas de colágeno (HASHIMOTO, OHNO, et al., 2003; BRESCHI et al., 2009) e, conseqüentemente, com o tempo, aumentar a susceptibilidade à degradação hidrolítica, devido ao contato direto com a água, ocorrendo uma perda e desarranjo da arquitetura do colágeno, aumento do espaço interfibrilar e diminuição do diâmetro das fibrilas de colágeno (HASHIMOTO; TAY, et al., 2003). Assim, este fato pode ser uma estimativa para compreender a ação da saliva na hidrólise das fibrilas de colágeno.

A degradação hidrolítica da camada híbrida ainda pode ser evidenciada, a longo prazo, com a movimentação de água dentro da camada híbrida, acelerando a plastificação de resinas adesivas e a degradação do colágeno exposto dentro da camada híbrida (De MUNCK et al., 2003; TAY; PASHLEY, 2003). Dessa forma, a quantidade e tipo de saliva presente pode influenciar na inadequada infiltração de monômeros, alterando a composição da camada híbrida (CAI et al., 2014), que pode ser uma explicação para nossos resultados, que determinaram uma diminuição do comprimento da CH e dos tags para ambos os sistemas adesivos após o armazenamento por 12 meses. Hipoteticamente, isso pode determinar a quebra de ligações covalentes e a perda das fibrilas de colágeno reduzindo a resistência mecânica do material adesivo (HASHIMOTO et al., 2000; MIRANDA DDE et al., 2011), justificando a diminuição da RU para ambos os grupos após 12 meses (tabela 1).

Há pouca informação na literatura sobre o comportamento dos adesivos universais quando ocorre contaminação com saliva durante o processo adesivo. Perdigão et al., em 2015 citam, em sua revisão sobre adesivos universais, que estes sofrem um padrão de degradação hidrolítica parecida com a de outros adesivos simplificados.

Sezinando et al. (2015) demonstraram que a aplicação de uma única camada do adesivo universal pode ser insuficiente para se obter estabilidade a longo prazo, recomendando a aplicação de duas camadas de adesivo, ou de resina hidrofóbica, para aumentar a sua propriedade hidrofóbica, evitando hidrólise e instabilidade na dentina a longo prazo. O sistema adesivo universal usado neste estudo, apesar de apresentar o (MDP) na sua composição que tem características hidrofóbicas (CHEN

et al., 2015; MUNOZ et al., 2015), não é resistente à hidrólise em meio aquoso, especialmente devido à presença do HEMA, pois está constantemente em contato direto com a umidade da dentina, produzindo a separação das fases dos polímeros (EIRIKSSON et al., 2004).

Nos grupos de 6 meses e 12 meses, para ambos adesivos, foi possível observar a proximidade do marcador (CH/Flouresceína) colocado na saliva (imagens 2-3). Esta aproximação da banda (aquosa), possivelmente de saliva, sugere a interação constante que apresenta a dentina úmida com o sistema adesivo (VYALIKH et al., 2011; TJADERHANE et al., 2013a; TJADERHANE et al., 2013b). Todos os trabalhos afirmam que a incorporação de água dentro da camada híbrida ocorre prematuramente durante a aplicação do sistema adesivo.

Trabalhos de (YIU et al., 2005; MALACARNE et al., 2006; TJADERHANE et al., 2013b), demonstram a presença de água residual nos túbulos dentinários (bound water), relatando que é um fator que poderia produzir hidrólise do adesivo. Assim, a armazenagem evidencia a hidrólise de camadas híbridas adesivas a longo prazo incorporando água (higroscopia) dentro da matriz polimérica. Grande parte dos monômeros do primer são hidrofílicos, favorecendo o ganho de água dentro da sua estrutura (HASHIMOTO et al., 2000; HASHIMOTO; OHNO, et al., 2003). Outros autores sugerem que a quantidade de monômero hidrofílico insaturado pode ocasionar a incorporação da água (MOSZNER et al., 2005; VAN LANDUYT et al., 2008) e, na presença dos fluidos salivares, acelerar o processo de hidrólise polimérica (YU et al., 2014).

Devido às limitações da nossa pesquisa, os dentes foram armazenados em meio líquido sem simulador de pressão aquosa intrapulpar devido à presença dos marcadores fluorescentes. (TAY et al., 2002; TAY et al., 2003; TAY; PASHLEY, 2003). Nestas circunstâncias não foi possível registrar o fenômeno de migração de líquido de maneira passiva, em direção da dentina para a CH. A espessura da CH foi significativamente menor, para ambos os sistemas adesivos, após 12 meses. Cabe assinalar que na dentina com vitalidade, o movimento de fluidos ocorre de maneira dinâmica frente a estímulos durante a função do dente (CIUCCHI et al., 1995), o qual poderia acelerar o processo de migração de água em direção à interface adesiva, consequentemente, favorecendo a hidrólise.

Uma análise quantitativa foi realizada em relação a esta área da camada híbrida (CH) em contato com a dentina. Foi empregada a análise de correlação de Pearson realizado entre os marcadores para adesivo (CH/Rodamina B) e saliva (CH/Flouresceína). Estatisticamente foi demonstrado uma relação parcialmente significativa entre os dois fatores para o sistema adesivo Adper Single Bond 2 apenas no período de 12 meses ($r=0,916$; $p=0,002$). E para o Adper Single Bond Universal não houve interação estatisticamente significante em todos os períodos avaliados.

Ambos os sistemas adesivos contém Bis-GMA e HEMA e a presença de água pode causar uma separação de fase entre monômeros hidrofílicos e hidrofóbicos (SPENCER; E WANG, 2002), inibindo a infiltração do monômero hidrofóbico BisGMA, o que pode afetar a integridade da adesão na interface (VAN LANDUYT et al., 2008). O que explica nossos resultados com armazenagem após 12 meses, em que a CH de ambos os sistemas adesivos apresentou espessura menor em relação ao grupo controle. No entanto, estatisticamente não houve correlação entre a contaminação com saliva e os adesivos testados, exceto para o sistema SB após 12 meses de armazenagem, concluindo que houve dependência do fator tempo em relação ao material. Por essa razão, a influência dos seus componentes na composição adesivo (HASHIMOTO et al., 2004; ITO et al., 2005) e interferência nas reações fotoquímicas no processo de polimerização (HASHIMOTO et al., 2004; GREGOIRE et al., 2010) determinam a estabilidade e sucesso a longo prazo para cada tipo de sistema adesivo.

Grau de Conversão

Independente da procedência da água que atinja a região da interface adesiva, através da própria dentina (água residual ou água presa (POURPOINT et al., 2007; GREGOIRE et al., 2013) no interior do corpo da dentina), de meios externos como infiltração marginal ou pelo ingresso de fluido como a saliva, a sua presença pode contribuir fortemente para o prejuízo da integridade do sistema adesivo a longo prazo (De MUNCK et al., 2005).

Como neste trabalho foram empregados os sistemas adesivos Adper Single Bond e Adper Single Bond Universal com a incorporação de diferentes concentrações de saliva humana (10%-25%-50% em volume), foi necessário verificar, também, se a presença de saliva, com seu alto volume de água, poderia afetar o grau de conversão

dos sistemas adesivos estudados, uma vez que a obtenção de uma maior taxa de conversão de monômeros permite maximizar as propriedades químicas e físicas no interior do material. Além da polimerização adequada de adesivos e resinas compostas, também melhora a biocompatibilidade de um material através da redução da quantidade de monômeros residuais que podem ser lixiviados para o ambiente oral (GREGOIRE et al., 2010; GREGOIRE et al., 2013) .

A análise dos resultados permitiu verificar que não houve diferença significativa entre os dois sistemas adesivos para os grupos controle (formulação comercial) e com saliva humana na concentração de 10% vol. Já a incorporação de saliva em volume de 25% afetou negativamente o grau de conversão (GC) do sistema adesivo SB. A incorporação de maior volume de saliva (50%) afetou negativamente o GC de ambos os sistemas adesivos

A quantidade do solvente, água (saliva) e falta de evaporação pode diminuir a distância entre os monômeros e aumentar o grau de conversão. Alguns autores relatam que as propriedades físicas dos materiais fotopolimerizáveis podem variar de acordo com a distância da superfície irradiada uma vez que a quantidade de monômeros residuais é maior com o aumento da distância de ativação (GREGOIRE et al., 2013; TJADERHANE et al., 2013a). Dessa forma, nos grupos SB10% e SB10% e SU25%, apesar de terem obtido uma taxa alta de conversão, não significa necessariamente que a união seja estável e do tipo covalente (NAKAJIMA et al., 2002; PASHLEY et al., 2003).

Por outro lado, a saliva contém outros compostos como a mucina. (CHAI et al., 2013) relatam que, durante o processo de polimerização, os monômeros são parcialmente isolados e seus movimentos moleculares são restritos devido à alta viscosidade da saliva. Por conseguinte, os monômeros não podiam reagir de forma livre com os monômeros disponíveis. A propagação da polimerização é interrompida quando ocorre a contaminação por saliva. Justificando nossos resultados, à medida que foi sendo acrescentada uma maior quantidade de saliva (50% em vol.) no adesivo, ocorreu a diminuição significativa do grau de conversão para ambos os sistemas adesivos estudados (tabela 2).

O GC vai depender da estrutura química de cada sistema adesivo. A

incorporação de água e outros componentes pode reduzir as propriedades físico-químicas dos adesivos. Vários autores relatam (PAUL et al., 1999; GIANNINI et al., 2004) que não depende unicamente do tipo de composição monomérica (ARRAIS et al., 2007) e do tipo de solvente orgânico. Os dois adesivos utilizados contém etanol, o que pode ter influenciado nos resultados já que existem pesquisas (CADENARO et al., 2009), que apontam que os sistemas adesivos com maior quantidade de etanol apresentam menores taxas de grau de conversão. Adicionalmente a água proveniente do substrato dentinário (intrínseca ou extrinsicamente) altera radicalmente o grau de conversão dos adesivos.

SB e SU são considerados adesivos simplificados e ambos contém solventes orgânicos como etanol e água misturados com alta quantidade de monômeros hidrofílicos, fazendo com que o sistema adesivo tenha uma camada altamente hidrofílica. Os solventes orgânicos têm a função de preparar a camada desmineralizada para uma melhor infiltração dos monômeros hidrofílicos, ao mesmo tempo, que eliminam a água residual da CH (GREGOIRE et al., 2013). Por outro lado, a água residual da CH é necessária para impedir o colapso das fibrilas de colágeno e permitir infiltração da resina hidrofílica, formando o tramado colágeno/resina (VYALIKH et al., 2011) .

As simulações de dinâmica molecular indicaram que alta interação de energia é encontrada entre CH e água, seguida pela interação de energia entre colágeno e água e finalmente entre colágeno e CH (VAIDYANATHA et al., 2001; VAIDYANATHAN et al., 2003). A interação mais forte entre HA e colágeno ocorre através de moléculas de água, um componente essencial da dentina viva (BHOWMIK et al., 2007). A diferença entre os dois sistemas com relação à presença de água na presença do MDP do adesivo universal, com propriedades de natureza hidrofóbica (CHEN et al., 2015), o que o torna mais tolerante à umidade. Há necessidade demais trabalhos para avaliar, de maneira isolada, o comportamento do MDP com relação à saliva humana.

Pode-se concluir que resistência de união não foi influenciada pela presença da saliva humana e os resultados expostos neste trabalho não revelaram uma interação direta na alteração da morfologia da camada híbrida com a saliva. Importante entender que a contaminação da saliva, mesmo que aconteça durante a

hibridação, pode alterar a composição dos sistemas adesivos, interferindo nas reações químicas do mesmo, assim, dependendo da composição do adesivo irá influenciar o desempenho de interface adesiva a longo prazo.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A contaminação por saliva humana não interferiu na resistência de união da interface dentina/resina composta após 48 horas, 6 meses e 12 meses. No entanto, mostrou menores valores de resistência de união após 6 meses e 12 meses em todos os grupos testados. A hipótese nula foi aceita.

A morfologia da camada híbrida não foi alterada pela presença da saliva nos períodos de 48 horas para ambos os sistemas adesivos, mas a saliva promoveu alterações na espessura da camada híbrida e dos *tags* de resina dentro dos túbulos dentinários nos períodos de 6 e 12 meses. Sendo assim, a hipótese nula foi rejeitada.

O grau de conversão dos sistemas adesivos (SB) e (SU) foi afetado pela presença de saliva após a polimerização imediata. A hipótese nula foi rejeitada.

Adicionalmente, dentro das limitações deste trabalho, se constatou que o fator tempo foi determinante para a deformação da interface dentina/resina para ambos os sistemas adesivos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

_____. Effect of saliva contamination on micromorphological adaptation of single-bottle adhesives to etched enamel. **J Clin Pediatr Dent**, v. 24, n. 1, p. 69-74, Fall 1999.

ABDALLA, A. I.; FEILZER, A. J. Four-year water degradation of a total-etch and two self-etching adhesives bonded to dentin. **J Dent**, v. 36, n. 8, p. 611-7, Aug 2008.

ABEDIN, F.; YE, Q.; CAMARDA, K. et al. Impact of light intensity on the polymerization kinetics and network structure of model hydrophobic and hydrophilic methacrylate based dental adhesive resin. **J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.**, Sep 04 2015.

ABOUSHLIB, M. N. Clinical performance of self-etching adhesives with saliva contamination. **J Adhes Dent**, v. 13, n. 5, p. 489-93, Oct 2011.

ACOSTA, V. **Resistência adesiva dos cimentos resinosos convencionais e autoadesivos à dentina contaminada por saliva**. (Tese de mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2012.

ALEX, G. Universal adhesives: the next evolution in adhesive dentistry? **Compend Contin Educ Dent**, v. 36, n. 1, p. 15-26; quiz 28, 40, Jan 2015.

ANCHIETA, R. B.; MACHADO, L. S.; MARTINI, A. P. et al. Effect of long-term storage on nanomechanical and morphological properties of dentin-adhesive interfaces. **Dent Mater**, v. 31, n. 2, p. 141-53, Feb 2015.

ARI, H.; DONMEZ, N.; BELLI, S. Effect of artificial saliva contamination on bond strength to pulp chamber dentin. **Eur J Dent**, v. 2, n. 2, p. 86-90, Apr 2008.

ARRAIS, C. A.; GIANNINI, M. Morphology and thickness of the diffusion of resin through demineralized or unconditioned dentinal matrix. **Pesqui Odontol Bras**, v. 16, n. 2, p. 115-20, Apr-Jun 2002.

ARRAIS, C.; PONTES, F.; SANTOS, L. et al. Degree of conversion of adhesivesystems light-curedby LED and halogen light. **Braz Dent J**, v. 18, n. 1, p. 54-59, 2007.

AZEVEDO, L. **Efeito da contaminação salivar na resistência de união da interface dentina/resina composta, tratada com**

BERTASSONI, L. E.; ORGEL, J. P.; ANTIPOVA, O. et al. The dentin organic matrix - limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. **Acta Biomater**, v. 8, n. 7, p. 2419-33, Jul 2012.

BHOWMIK, R.; KAPLANA, S.; DINESH, R. Mechanics of molecular collagens influenced by hydroxyapatite in natural bone. **Journal of Materials Science** v. 42, p. 8795-8803, 2007.

BIM JUNIOR, O. **Estratégias para a a adição de rodamina B em sistemas adesivos**. (Tese de mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2013.

BIM JUNIOR, O.; CEBIM, M. A.; ATTA, M. T. et al. Determining Optimal Fluorescent Agent Concentrations in Dental Adhesive Resins for Imaging the Tooth/Restoration Interface. **Microsc Microanal**, v. 23, n. 1, p. 122-130, Feb 2017.

BITTER, K.; PARIS, S.; MARTUS, P. et al. A Confocal Laser Scanning Microscope investigation of different dental adhesives bonded to root canal dentine. **Int Endod J**, v. 37, n. 12, p. 840-8, Dec 2004.

BRESCHI, L.; CAMMELLI, F.; VISINTINI, E. et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. **J Adhes Dent**, v. 11, n. 3, p. 191-8, Jun 2009.

BRESCHI, L.; MARTIN, P.; MAZZONI, A. et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. **Dent Mater**, v. 26, n. 6, p. 571-8, Jun 2010.

BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; NATO, F. et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. **Dent Mater**, v. 26, n. 4, p. 320-5, Apr 2010.

BRESCHI, L.; PRATI, C.; GOBBI, P. et al. Immunohistochemical analysis of collagen fibrils within the hybrid layer: a FEISEM study. **Oper Dent**, v. 29, n. 5, p. 538-46, Sep-Oct 2004.

BUONOCORE, M. G. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. **J Dent Res**, v. 34, n. 6, p. 849-53, Dec 1955.

CADENARO, M.; ANTONIOLLI, F.; SAURO, S. et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. **Eur J Oral Sci**, v. 113, n. 6, p. 525-30, Dec 2005.

CADENARO, M.; BRESCHI, L.; RUEGGEBERG, F. A. et al. Effects of residual ethanol on the rate and degree of conversion of five experimental resins. **Dent Mater**, v. 25, n. 5, p. 621-8, May 2009.

CAI, K.; DELAVIZ, Y.; BANH, M. et al. Biodegradation of composite resin with ester linkages: identifying human salivary enzyme activity with a potential role in the esterolytic process. **Dent Mater**, v. 30, n. 8, p. 848-60, Aug 2014.

CAMPOS, E. A.; CORRER, G. M.; LEONARDI, D. P. et al. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. **J Dent**, v. 37, n. 2, p. 108-14, Feb 2009.

CARPENTER, G. H. The secretion, components, and properties of saliva. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 4, p. 267-76, 2013.

CARRILHO, M. R.; CARVALHO, R. M.; SOUSA, E. N. et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. **Dent Mater**, v. 26, n. 8, p. 779-85, Aug 2010.

CARRILHO, M. R.; GERALDELI, S.; TAY, F. et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **J Dent Res**, v. 86, n. 6, p. 529-33, Jun 2007.

CARRILHO, M. R.; TAY, F. R.; DONNELLY, A. M. et al. Membrane permeability properties of dental adhesive films. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 88, n. 2, p. 312-20, Feb 2009.

CARVALHO, R. M.; FERNANDES, C. A.; VILLANUEVA, R. et al. Tensile strength of human dentin as a function of tubule orientation and density. **J Adhes Dent**, v. 3, n. 4, p. 309-14, Winter 2001.

CASAS, A. **Efeito da solução de clorexidina a 2% na adesão de um sistema restaurador adesivo à dentina previamente erodida com refrigerante tipo cola regular e light**. (Tese de doutorado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2013.

CHAI, W.; ZHANG, Y.; HU, Y. Well-defined cationic polyacrylamides with dot-charges: synthesis via an aqueous living RAFT polymerization, characterization, and intrinsic viscosity. **Polym Chem**, n. 4, p. 1006, 2013.

CHAN, K. M.; TAY, F. R.; KING, N. M. et al. Bonding of mild self-etching primers/adhesives to dentin with thick smear layers. **Am J Dent**, v. 16, n. 5, p. 340-6, Oct 2003.

CHEN, C.; NIU, L. N.; XIE, H. et al. Bonding of universal adhesives to dentine--Old wine in new bottles? **J Dent**, v. 43, n. 5, p. 525-36, May 2015.

CHIBA, Y.; RIKUTA, A.; YASUDA, G. et al. Influence of moisture conditions on dentin bond strength of single-step self-etch adhesive systems. **J Oral Sci**, v. 48, n. 3, p. 131-7, Sep 2006.

CHO, B. H.; DICKENS, S. H. Effects of the acetone content of single solution dentin bonding agents on the adhesive layer thickness and the microtensile bond strength. **Dent Mater**, v. 20, n. 2, p. 107-15, Feb 2004.

CHUNG, C. W.; YIU, C. K.; KING, N. M. et al. Effect of saliva contamination on bond strength of resin luting cements to dentin. **J Dent**, v. 37, n. 12, p. 923-31, Dec 2009.

CIUCCHI, B.; BOUILLAGUET, S.; HOLZ, J. et al. Dentinal fluid dynamics in human teeth, in vivo. **J Endod**, v. 21, n. 4, p. 191-4, Apr 1995.

clorexidina 0,2%. Tese de doutorado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2015.

COBANOGLU, N.; UNLU, N.; OZER, F. F. et al. Bond strength of self-etch adhesives after saliva contamination at different application steps. **Oper Dent**, v. 38, n. 5, p. 505-11, Sep-Oct 2013.

DARABI, F.; TAVANGAR, M.; DAVALLOO, R. Effect of different decontamination procedures from a saliva-contaminated cured bonding system (Single Bond). **Dent Res J (Isfahan)**, v. 9, n. 4, p. 399-403, Jul 2012.

DE MUNCK, J.; VAN DEN STEEN, P. E.; MINE, A. et al. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. **J Dent Res**, v. 88, n. 12, p. 1101-6, Dec 2009.

DE MUNCK, J.; VAN LANDUYT, K.; PEUMANS, M. et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. **J Dent Res**, v. 84, n. 2, p. 118-32, Feb 2005.

DE MUNCK, J.; VAN MEERBEEK, B.; YOSHIDA, Y. et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. **J Dent Res**, v. 82, n. 2, p. 136-40, Feb 2003.

EBRAHIMI, S. F.; SHADMAN, N.; ABRISHAMI, A. Effect of ferric sulfate contamination on the bonding effectiveness of etch-and-rinse and self-etch adhesives to superficial dentin. **J Conserv Dent**, v. 16, n. 2, p. 126-30, Mar 2013.

EIRIKSSON, S. O.; PEREIRA, P. N.; SWIFT, E. J., JR. et al. Effects of saliva contamination on resin-resin bond strength. **Dent Mater**, v. 20, n. 1, p. 37-44, Jan 2004.

EL-KALLA, I. H. Saliva contamination and resin micromorphological adaptation to cavity walls using single-bottle adhesives. **Am J Dent**, v. 12, n. 4, p. 172-6, Aug 1999.

EL-KALLA, I. H.; GARCIA-GODOY, F. Saliva contamination and bond strength of single-bottle adhesives to enamel and dentin. **Am J Dent**, v. 10, n. 2, p. 83-7, Apr 1997.

ERICSSON, Y. Clinical Investigations of salivary buffering action. **Acta Odontol Scand**, v. 17, n. 2, p. 131-165, 1959.

FLORESCU, A.; EFREM, I. C.; HAIDOIU, C. et al. Microscopic aspects of the hybrid layer formed by the SE 1-step Futurabond M (Voco) adhesive system applied to normal and sclerotic dentin. **Rom J Morphol Embryol**, v. 55, n. 4, p. 1395-400, 2014.

FRITZ, U. B.; FINGER, W. J.; STEAN, H. Salivary contamination during bonding procedures with a one-bottle adhesive system. **Quintessence Int**, v. 29, n. 9, p. 567-72, Sep 1998.

FROSTELL, G. A colourimetric screening test for evaluation of the buffer capacity of saliva. **Swed Dent J**, v. 4, n. 3, p. 81-6, 1980.

FURUSE, A. Y.; DA CUNHA, L. F.; BENETTI, A. R. et al. Bond strength of resin-resin interfaces contaminated with saliva and submitted to different surface treatments. **J Appl Oral Sci**, v. 15, n. 6, p. 501-5, Dec 2007

GAUTHIER, M. A.; STANGEL, I.; ELLIS, T. H. et al. A new method for quantifying the intensity of the C=C band of dimethacrylate dental monomers in their FTIR and Raman spectra. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6440-8, Nov 2005.

GIANNINI, M.; DE GOES, M. F.; NIKAIDO, T. et al. Influence of activation mode of dual-cured resin composite cores and low-viscosity composite liners on bond strength to dentin treated with self-etching adhesives. **J Adhes Dent**, v. 6, n. 4, p. 301-6, Winter 2004.

GOING, R. E.; SOWINSKI, V. J. Frequency of use of the rubber dam: a survey. **J Am Dent Assoc**, v. 75, n. 1, p. 158-66, Jul 1967.

GREGOIRE, G.; DABSIE, F.; DELANNEE, M. et al. Water permeability, hybrid layer long-term integrity and reaction mechanism of a two-step adhesive system. **J Dent**, v. 38, n. 7, p. 526-33, Jul 2010.

GREGOIRE, G.; SHARROCK, P.; DELANNEE, M. et al. Depletion of water molecules during ethanol wet-bonding with etch and rinse dental adhesives. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, n. 1, p. 21-7, Jan 01 2013.

GUO, X.; SPENCER, P.; WANG, Y. et al. Effects of a solubility enhancer on penetration of hydrophobic component in model adhesives into wet demineralized dentin. **Dent Mater**, v. 23, n. 12, p. 1473-81, Dec 2007.

GUPTA, N.; TRIPATHI, A. M.; SAHA, S. et al. Effect of Saliva on the Tensile Bond Strength of Different Generation Adhesive Systems: An In-Vitro Study. **J Clin Diagn Res**, v. 9, n. 7, p. ZC91-4, Jul 2015.

HANABUSA, M.; MINE, A.; KUBOKI, T. et al. Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. **J Dent**, v. 40, n. 6, p. 475-84, Jun 2012.

HANNIG, M.; FIEBIGER, M.; GUNTZER, M. et al. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. **Arch Oral Biol**, v. 49, n. 11, p. 903-10, Nov 2004.

HANSEN, E. K.; MUNKSGAARD, E. C. Saliva contamination vs. efficacy of dentin-bonding agents. **Dent Mater**, v. 5, n. 5, p. 329-33, Sep 1989.

HASHIMOTO, M.; ITO, S.; TAY, F. R. et al. Fluid movement across the resin-dentin interface during and after bonding. **J Dent Res**, v. 83, n. 11, p. 843-8, Nov 2004.

HASHIMOTO, M.; OHNO, H.; KAGA, M. et al. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. **J Dent Res**, v. 79, n. 6, p. 1385-91, Jun 2000.

HASHIMOTO, M.; OHNO, H.; SANO, H. et al. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. **Biomaterials**, v. 24, n. 21, p. 3795-803, Sep 2003.

HASHIMOTO, M.; TAY, F. R.; OHNO, H. et al. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 66, n. 1, p. 287-98, Jul 15 2003.

HASS, V.; FOLKUENIG, M. S.; REIS, A. et al. Influence of adhesive properties on resin-dentin bond strength of one-step self-etching adhesives. **J Adhes Dent**, v. 13, n. 5, p. 417-24, Oct 2011.

HIRAISHI, N.; KITASAKO, Y.; NIKAIDO, T. et al. Effect of artificial saliva contamination on pH value change and dentin bond strength. **Dental Materials**, v. 19, n. 5, p. 429-434, Jul 2003.

HITMI, L.; ATTAL, J. P.; DEGRANGE, M. Influence of the time-point of salivary contamination on dentin shear bond strength of 3 dentin adhesive systems. **J Adhes Dent**, v. 1, n. 3, p. 219-32, Autumn 1999.

HOSAKA, K.; NISHITANI, Y.; TAGAMI, J. et al. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. **J Dent Res**, v. 88, n. 2, p. 146-51, Feb 2009.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **J Prosthet Dent**, v. 85, n. 2, p. 162-169, Feb 2001.

ITO, S.; HASHIMOTO, M.; WADGAONKAR, B. et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6449-59, Nov 2005.

ITOH, S.; NAKAJIMA, M.; HOSAKA, K. et al. Dentin bond durability and water sorption/solubility of one-step self-etch adhesives. **Dent Mater J**, v. 29, n. 5, p. 623-30, Oct 2010.

JIANG, Q.; PAN, H.; LIANG, B. et al. Effect of saliva contamination and decontamination on bovine enamel bond strength of four self-etching adhesives. **Oper Dent**, v. 35, n. 2, p. 194-202, Mar-Apr 2010.

KIM, J.; HONG, S.; CHOI, Y. et al. The effect of saliva decontamination procedures on dentin bond strength after universal adhesive curing. **Restor Dent Endod**, v. 40, n. 4, p. 299-305, Nov 2015.

KIM, J.; UCHIYAMA, T.; CARRILHO, M. et al. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. **Dent Mater**, v. 26, n. 8, p. 771-8, Aug 2010.

KUBO, S.; KAWASAKI, K.; YOKOTA, H. et al. Five-year clinical evaluation of two adhesive systems in non-carious cervical lesions. **J Dent**, v. 34, n. 2, p. 97-105, Feb 2006.

LIN, B. A.; JAFFER, F.; DUFF, M. D. et al. Identifying enzyme activities within human saliva which are relevant to dental resin composite biodegradation. **Biomaterials**, v. 26, n. 20, p. 4259-4264, Jul 2005.

MALACARNE, J.; CARVALHO, R. M.; DE GOES, M. F. et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. **Dent Mater**, v. 22, n. 10, p. 973-80, Oct 2006.

MANHART, J.; CHEN, H. Y.; HICKEL, R. Clinical evaluation of the posterior composite Quixfil in class I and II cavities: 4-year follow-up of a randomized controlled trial. **J Adhes Dent**, v. 12, n. 3, p. 237-43, Jun 2010.

MARCHESI, G.; FRASSETTO, A.; MAZZONI, A. et al. Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-year in vitro study. **J Dent**, v. 42, n. 5, p. 603-12, May 2014.

MARIN, F.; LUQUET, G.; MARIE, B. et al. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. **Curr Top Dev Biol**, v. 80, p. 209-76, 2008.

MARSHALL, G. W., JR. Dentin: microstructure and characterization. **Quintessence Int**, v. 24, n. 9, p. 606-17, Sep 1993.

MAZZONI, A.; MANNELLO, F.; TAY, F. R. et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. **J Dent Res**, v. 86, n. 5, p. 436-40, May 2007.

MCLEAN, D. E.; MEYERS, E. J.; GUILLORY, V. L. et al. Enamel Bond Strength of New Universal Adhesive Bonding Agents. **Oper Dent**, v. 40, n. 4, p. 410-7, Jul-Aug 2015.

MINE, A.; DE MUNCK, J.; CARDOSO, M. V. et al. Bonding effectiveness of two contemporary self-etch adhesives to enamel and dentin. **J Dent**, v. 37, n. 11, p. 872-83, Nov 2009.

MIRANDA DDE, A.; BERTOLDO, C. E.; AGUIAR, F. H. et al. Effects of mouthwashes on Knoop hardness and surface roughness of dental composites after different immersion times. **Braz Oral Res**, v. 25, n. 2, p. 168-73, Mar-Apr 2011.

MOJON, P.; KALTIO, R.; FEDUIK, D. et al. Short-term contamination of luting cements by water and saliva. **Dent Mater**, v. 12, n. 2, p. 83-7, Mar 1996.

MOSZNER, N.; SALZ, U.; ZIMMERMANN, J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. **Dent Mater**, v. 21, n. 10, p. 895-910, Oct 2005.

MUNAGA, S.; CHITUMALLA, R.; KUBIGIRI, S. K. et al. Effect of saliva contamination on the shear bond strength of a new self-etch adhesive system to dentin. **J Conserv Dent**, v. 17, n. 1, p. 31-4, Jan 2014.

MUNOZ, M. A.; LUQUE-MARTINEZ, I.; MALAQUIAS, P. et al. In vitro longevity of bonding properties of universal adhesives to dentin. **Oper Dent**, v. 40, n. 3, p. 282-92, May-Jun 2015.

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.

NAKAJIMA, M.; OKUDA, M.; PEREIRA, P. N. et al. Dimensional changes and ultimate tensile strengths of wet decalcified dentin applied with one-bottle adhesives. **Dent Mater**, v. 18, n. 8, p. 603-8, Dec 2002.

PARK, J. W.; LEE, K. C. The influence of salivary contamination on shear bond strength of dentin adhesive systems. **Oper Dent**, v. 29, n. 4, p. 437-42, Jul-Aug 2004.

PARK, J.; ESLICK, J.; YE, Q. 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.

PASHLEY, D. H.; AGEE, K. A.; CARVALHO, R. M. et al. Effects of water and water-free polar solvents on the tensile properties of demineralized dentin. **Dent Mater**, v. 19, n. 5, p. 347-52, Jul 2003.

PASHLEY, D. H.; CIUCCHI, B.; SANO, H. et al. Permeability of dentin to adhesive agents. **Quintessence Int**, v. 24, n. 9, p. 618-31, Sep 1993.

PASHLEY, D. H.; NELSON, R.; KEPLER, E. E. THE EFFECTS OF PLASMA AND SALIVARY CONSTITUENTS ON DENTIN PERMEABILITY. **J Dent Res**, v. 61, n. 8, p. 978-981, 1982 1982.

PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; BRESCHI, L. et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. **Dent Mater**, v. 27, n. 1, p. 1-16, Jan 2011.

PAUL, S. J.; LEACH, M.; RUEGGEBERG, F. A. et al. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. **J Dent**, v. 27, n. 3, p. 209-14, Mar 1999.

PERDIGAO, J.; RAMOS, J. C.; LAMBRECHTS, P. In vitro interfacial relationship between human dentin and one-bottle dental adhesives. **Dent Mater**, v. 13, n. 4, p. 218-27, Jul 1997.

PERDIGAO, J.; SEZINANDO, A.; MONTEIRO, P. C. Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. **Am J Dent**, v. 25, n. 3, p. 153-8, Jun 2012.

PERDIGAO, J.; SWIFT, E. J., JR. Universal Adhesives. **J Esthet Restor Dent**, v. 27, n. 6, p. 331-4, Nov-Dec 2015.

PEUMANS, M.; DE MUNCK, J.; VAN LANDUYT, K. L. et al. Eight-year clinical evaluation of a 2-step self-etch adhesive with and without selective enamel etching. **Dent Mater**, v. 26, n. 12, p. 1176-84, Dec 2010.

PEUMANS, M.; KANUMILLI, P.; DE MUNCK, J. et al. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials. **Dent Mater**, v. 21, n. 9, p. 864-81, Sep 2005.

PINZON, L. M.; OGURI, M.; O'KEEFE, K. et al. Bond strength of adhesives to dentin contaminated with smoker's saliva. **Odontology**, v. 98, n. 1, p. 37-43, Feb 2010.

PINZON, L. M.; POWERS, J. M.; O'KEEFE, K. L. et al. Effect of mucoprotein on the bond strength of resin composite to human dentin. **Odontology**, v. 99, n. 2, p. 119-128, May 23 2011.

POURPOINT, F.; GERVAIS, C.; BONHOMME-COURY, L. et al. Calcium Phosphates and Hydroxyapatite: Solid-State NMR Experiments and First-Principles Calculations. **Appl. Magn. Reson**, v. 32, n. 4, p. 435-457, 2007.

REIS, A. F.; CARRILHO, M. R.; GHANAME, E. et al. Effects of water-storage on the physical and ultramorphological features of adhesives and primer/adhesive mixtures. **Dent Mater J**, v. 29, n. 6, p. 697-705, Nov 2010.

SAMPAIO, P. **Efeito da base de cimento de ionômero de vidro convencional e modificado por resina na interface adesiva dente/resina composta após termociclagem.** (Tese de mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2009.

SANTSCHI, K.; PEUTZFELDT, A.; LUSSI, A. et al. Effect of salivary contamination and decontamination on bond strength of two one-step self-etching adhesives to dentin of primary and permanent teeth. **J Adhes Dent**, v. 17, n. 1, p. 51-7, Feb 2015.

SATTABANASUK, V.; SHIMADA, Y.; TAGAMI, J. Effects of saliva contamination on dentin bond strength using all-in-one adhesives. **J Adhes Dent**, v. 8, n. 5, p. 311-8, Oct 2006.

SEZINANDO, A.; LUQUE-MARTINEZ, I.; MUNOZ, M. A. et al. Influence of a hydrophobic resin coating on the immediate and 6-month dentin bonding of three universal adhesives. **Dent Mater**, v. 31, n. 10, p. e236-46, Oct 2015.

SHEIKH, H.; HEYMANN, H. O.; SWIFT, E. J., JR. et al. Effect of saliva contamination and cleansing solutions on the bond strengths of self-etch adhesives to dentin. **J Esthet Restor Dent**, v. 22, n. 6, p. 402-10, Dec 2010.

SODERHOLM, K. J.; SOARES, F.; ARGUMOSA, M. et al. Shear bond strength of one etch-and-rinse and five self-etching dental adhesives when used by six operators. **Acta Odontol Scand**, v. 66, n. 4, p. 243-9, Aug 2008.

SPENCER, P.; SWAFFORD, J. R. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. **Quintessence Int**, v. 30, n. 7, p. 501-7, Jul 1999.

SPENCER, P.; WANG, Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. **J Biomed Mater Res**, v. 62, n. 3, p. 447-56, Dec 05 2002.

SPENCER, P.; YE, Q.; PARK, J. et al. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. **Ann Biomed Eng**, v. 38, n. 6, p. 1989-2003, Jun 2010.

STANSBURY, J. W. Dimethacrylate network formation and polymer property evolution as determined by the selection of monomers and curing conditions. **Dent Mater**, v. 28, n. 1, p. 13-22, Jan 2012.

TASKONAK, B.; SERTGOZ, A. Shear bond strengths of saliva contaminated 'one-bottle' adhesives. **J Oral Rehabil**, v. 29, n. 6, p. 559-64, Jun 2002.

TAY, F. R.; HASHIMOTO, M.; PASHLEY, D. H. et al. Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin. **J Dent Res**, v. 82, n. 7, p. 537-41, Jul 2003.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Water treeing--a potential mechanism for degradation of dentin adhesives. **Am J Dent**, v. 16, n. 1, p. 6-12, Feb 2003.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; GARCIA-GODOY, F. et al. Single-step, self-etch adhesives behave as permeable membranes after polymerization. Part II. Silver tracer penetration evidence. **Am J Dent**, v. 17, n. 5, p. 315-22, Oct 2004

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; SUH, B. et al. Single-step, self-etch adhesives behave as permeable membranes after polymerization. Part I. Bond strength and morphologic evidence. **Am J Dent**, v. 17, n. 4, p. 271-8, Aug 2004.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; YOSHIYAMA, M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. **J Dent Res**, v. 81, n. 7, p. 472-6, Jul 2002.

TEN CATE, A. **Oral histology development, structure and function**. Louis: Mosby, 456-468, 1994.

TEZVERGIL-MUTLUAY, A.; AGEE, K. A.; HOSHIKA, T. et al. The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. **Dent Mater**, v. 26, n. 11, p. 1059-67, Nov 2010.

TJADERHANE, L.; NASCIMENTO, F. D.; BRESCHI, L. et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. **Dent Mater**, v. 29, n. 1, p. 116-35, Jan 2013b.

TJADERHANE, L.; NASCIMENTO, F. D.; BRESCHI, L. et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. **Dent Mater**, v. 29, n. 10, p. 999-1011, Oct 2013a.

TOWNSEND, R. D.; DUNN, W. J. The effect of saliva contamination on enamel and dentin using a self-etching adhesive. **J Am Dent Assoc**, v. 135, n. 7, p. 895-901; quiz 1036, 1038, Jul 2004.

TUNCER, S.; DEMIRCI, M.; TEKCE, N. et al. Effect of saliva contamination on shear bond strength and microleakage of one-bottle etch-and-rinse and self-etch adhesives: scanning electron and confocal laser microscopic analyses. **J ADHES SCI TECHNOL**, v. 28, n. 6, p. 525-545, Mar 19 2014.

UEKUSA, S.; YAMAGUCHI, K.; MIYAZAKI, M. et al. Bonding efficacy of single-step self-etch systems to sound primary and permanent tooth dentin. **Oper Dent**, v. 31, n. 5, p. 569-76, Sep-Oct 2006.

VAIDYANATHA, J.; VAIDYANATHAN, T. K.; YADAV, P. et al. Collagen-ligand interaction in dentinal adhesion: computer visualization and analysis. **Biomaterials**, v. 22, n. 21, p. 2911-20, Nov 2001.

VAIDYANATHAN, J.; CHINNASWAMY, K.; VAIDYANATHAN, T. K. Biomimetic recognition and immunochemical assay of ligand binding to collagen. **J Adhes Dent**, v. 5, n. 1, p. 7-17, Spring 2003.

VAN LANDUYT, K.; YOSHIDA, Y.; HIRATA, I. et al. Influence of the chemical structure of functional monomers on their adhesive performance. **J Dent Res**. 87: 757-761 p. 2008.

VAN MEERBEEK, B.; DE MUNCK, J.; YOSHIDA, Y. et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. **Oper Dent**, v. 28, n. 3, p. 215-35, May-Jun 2003.

VAN MEERBEEK, B.; YOSHIHARA, K.; YOSHIDA, Y. et al. State of the art of self-etch adhesives. **Dent Mater**, v. 27, n. 1, p. 17-28, Jan 2011.

VYALIKH, A.; SIMON, P.; KOLLMANN, T. et al. Local Environment in Biomimetic Hydroxyapatite–Gelatin Nanocomposites As Probed by NMR Spectroscopy. **J. Phys. Chem. C**, v. 115, n. 5, p. 1513-1519, 2011.

WAGNER, A.; WENDLER, M.; PETSCHLT, A. et al. Bonding performance of universal adhesives in different etching modes. **J Dent**, v. 42, n. 7, p. 800-7, Jul 2014.

WALSHAW, P. R.; MCCOMB, D. Clinical considerations for optimal dentinal bonding. **Quintessence Int**, v. 27, n. 9, p. 619-25, Sep 1996.

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.

WEINER, S.; VEIS, A.; BENIASH, E. et al. Peritubular dentin formation: crystal organization and the macromolecular constituents in human teeth. **J Struct Biol**, v. 126, n. 1, p. 27-41, Jun 01 1999.

WHITE, S. N.; YU, Z.; KIPNIS, V. Effect of seating force on film thickness of new adhesive luting agents. **J Prosthet Dent**, v. 68, n. 3, p. 476-81, Sep 1992.

XIE, J.; POWERS, J. M.; MCGUCKIN, R. S. In vitro bond strength of two adhesives to enamel and dentin under normal and contaminated conditions. **Dent Mater**, v. 9, n. 5, p. 295-9, Sep 1993.

YAMADA, M.; MIYAZAKI, M.; MOORE, B. K. Influence of interchanging adhesive resins and self-etching primers on the mechanical properties of adhesive resins. **Oper Dent**, v. 29, n. 5, p. 532-7, Sep-Oct 2004.

YAZICI, A. R.; TUNCER, D.; DAYANGAC, B. et al. The effect of saliva contamination on microleakage of an etch-and-rinse and a self-etching adhesive. **J Adhes Dent**, v. 9, n. 3, p. 305-9, Jun 2007.

YIU, C. K.; PASHLEY, E. L.; HIRAISHI, N. et al. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6863-72, Dec 2005.

YOO, H. M.; OH, T. S.; PEREIRA, P. N. Effect of saliva contamination on the microshear bond strength of one-step self-etching adhesive systems to dentin. **Oper Dent**, v. 31, n. 1, p. 127-34, Jan-Feb 2006.

YOSHIDA, Y.; YOSHIHARA, K.; NAGAOKA, N. et al. Self-assembled Nano-layering at the Adhesive interface. **J Dent Res**, v. 91, n. 4, p. 376-81, Apr 2012.

YOSHIHARA, K.; YOSHIDA, Y.; NAGAOKA, N. et al. Nano-controlled molecular interaction at adhesive interfaces for hard tissue reconstruction. **Acta Biomater**, v. 6, n. 9, p. 3573-82, Sep 2010.

YU, M.; WU, Z.; PAN, H. et al. Effects of saliva contamination on bonding performance of self-etching adhesives. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 28, n. 20, p. 2032-2045, Jul 29 2014

ZMENER, O.; PAMEIJER, C. H.; RINCON, S. M. et al. Sealing properties of three luting agents used for complete cast crowns: a bacterial leakage study. **Oper Dent**, v. 38, n. 6, p. E221-8, Nov-Dec 2013.

ANEXOS

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "Efeito da contaminação por saliva na interface adesiva: avaliando o grau de conversão de sistemas adesivos e a resistência de união"

Pesquisador: Carlos Andres Villavicencio Espinoza

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38566814.0.0000.5417

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 918.490

Data da Relatoria: 09/12/2014

Apresentação do Projeto:

Este estudo tem como objetivo analisar o efeito da contaminação por saliva na resistência de união na interface adesiva em dentina e grau de conversão de 2 sistemas adesivos: Adper™ Single bond 2 (SB) e Single Bond® Universal (SU). Cento e vinte dentes terceiros humanos hígidos, extraídos por indicação odontológica, serão divididos em 12 grupos ($n=10$), de acordo com o sistema adesivo utilizado, a presença de saliva e o tempo de armazenagem. Após o procedimento adesivo e colocação da resina composta Filtek Z250, os dentes serão mantidos em água destilada em estufa a 37°C por 48 horas, 6 meses ou 12 meses antes de serem seccionados em palitos (0,8mm x 0,8mm, aproximadamente) para serem levados à máquina de ensaios universal Instron para os testes de microtração. Uma fatia de cada dente será separada aleatoriamente para análise em microscopia confocal de varredura a laser para verificação e mensuração de alterações internas na interface dentina/resina composta. O grau de conversão de adesivos puros e contendo marcadores fluorescentes em concentrações predeterminadas será avaliado, empregando-se espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. Para a comparação das variáveis: sistema adesivo, grau de conversão, tratamento do sistema adesivo marcados com Rodamina B e tempo de armazenamento serão utilizados os testes de Análise de Variância a três critérios e de comparações múltiplas de Tukey ($p<0,05$).

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 918.490

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo *in vitro* é analisar o efeito da presença de saliva humana na dentina na resistência de união da interface dentina/adesivo empregando dois sistemas adesivos Adper Single Bond 2 (SB) e Single Bond Universal (SU), empregando-se testes de microtração, microscopia confocal de varredura a laser e grau de conversão, em três diferentes tempos: 48 horas, 6 meses e 12 meses. Considerar-se-ão as seguintes hipóteses nulas:

- A resistência de união a dentina dos sistemas adesivos (SB) e (SU) não é afetada pela presença da saliva após 24 horas, 6 meses, e 12 meses.
- A camada híbrida não é alterada pela presença da saliva na dentina nos períodos de 24 horas, 6 meses, e 12 meses.
- O grau de conversão dos sistemas adesivos (SB) e (SU) não é afetado pela presença de saliva após 24 horas, 6 meses, e 12 meses.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador não há riscos já que a pesquisa será *in vitro* e também não haverá benefícios diretos ao paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo *in vitro* com terceiros molares extraídos. Os dentes serão obtidos nas Clínicas de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP e por cessão de cirurgiões-dentistas que atendem em consultórios particulares, mediante assinatura do termo de cessão de Dentes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem lista de pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 918.490

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião extraordinária do CEP de 15.12.2014, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

BAURU, 17 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Flaviana Bombarda de Andrade
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br