**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

ODAIR BIM JÚNIOR

**Efeito de adição de rodamina B e fluoresceína sódica a sistemas adesivos
não simplificados: aspectos fotofísicos e físico-químicos**

**BAURU
2017**

ODAIR BIM JÚNIOR

**Efeito de adição de rodamina B e fluoresceína sódica a sistemas adesivos
não simplificados: aspectos fotofísicos e físico-químicos**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Atta

Versão corrigida

**BAURU
2017**

Bim Júnior, Odair
B51e Efeito de adição de rodamina B e fluoresceína sódica a sistemas adesivos não simplificados: aspectos fotofísicos e físico-químicos / Odair Bim Júnior. – Bauru, 2017.
143 p. : il. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. 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 tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Odair Bim Júnior

Data: 13/07/2017

Comitê de Ética da FOB-USP
CAAE: 37048414.3.0000.5417
Data: 15/10/2014

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe, *Valéria*, meu pai, *Odair*, meu irmão, *Luís Felipe*, e a minha avó *Myrtes*, que a cada gesto de amor e apreço criam condições essenciais para que eu resista, persista e alcance.

A meu avô *Bricks* (*in memoriam*) por ter sido meu maior admirador e incentivador.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço, primeiramente, à *Profa. Dra. Maria Teresa Atta* por ter conduzido sua orientação de forma clara, objetiva e amistosa, ajudando-me a transpor barreiras e a alcançar minhas metas com praticidade. Obrigado por ter confiado em mim e me apoiado na busca de novos horizontes e desafios. Por ter sido compreensiva com minhas características e me aconselhado quanto a pontos fracos. Obrigado por ter me dado a honra de ser um de seus últimos orientados!

Ao *Prof. Dr. Marco Aurélio Cebim* por ter sido para mim uma referência de equilíbrio, consciência e superação. Obrigado por se importar verdadeiramente com a realização e o bem-estar de seus alunos, por ter cuidado para que eu me sentisse parte de sua equipe no Instituto de Química de Araraquara, e por ter me dado perspectiva. Obrigado pela experiência transmitida e pelo privilégio de um tratamento humano, positivo e descomplicado.

À *Profa. Dra. Linda Wang* por ter sido o ponto de partida de grandes conquistas. Muito obrigado pelas inúmeras oportunidades de colaboração e de crescimento que você reservou para mim, sempre apostando no espírito de equipe e no amadurecimento de seus alunos. Por seu empenho perseverante e corajoso para que haja acesso a melhores recursos e, cada vez mais, reconhecimento de nossa pesquisa.

À *Dra. Paulette Spencer* por ter aberto as portas do *Bioengineering Research Center* (Universidade do Kansas) para mim e por seus esforços para me proporcionar uma experiência desafiadora, mas extremamente recompensadora. Obrigado por ter me mostrado que a ciência tem uma língua própria, que mais bela fica quanto mais procuramos conhecê-la.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos e companheiros de viagem que, de uma forma ou de outra, ajudaram-me a chegar até aqui; não deixaram faltar calor humano no dia-a-dia e, por vezes, fizeram de nuvens escuras no caminho sombras para o descanso: *Ana Flávia Soares, Andrea Maselli, Carla Müller Ramos-Tonello* (minha querida dupla!), *Carlos Villavicencio, Cassiana Koch Scotti, Elaine Consolmagno, Henrique Gomide, Jovan Duran, Letícia Brianezzi, Lorena de Mello, Loures Chiok, Luara Pires, Karin Modena, Marcela Calabria, Maria Angélica Silvério, Maria Cristina (Kiki) C. de Almendra Freitas, Marina Giacomini, Marina Stuart, Martha Beteghelli, Mayara Narimatsu, Rafael Maenosono, Rafael Simões, Raphaela Rodrigues, Ricardo Brayner, Ronaldo Dias Hilario, Stella Esteves, Tamires Bueno, Tânia Mara* e tantos outros...

Àqueles que me ensinaram sobre as coisas diferentes do mundo, do Peru à Rússia, e me acolheram durante meu estágio de pesquisa no exterior: *Dmytro Khvostenko, Gala Kornienko, Lena Shergina, Netty Dalma Pérez, Payam Poorsolhjoui e Zhenya Holubnyak*.

Ao querido (para não dizer favorito) *Lucas Pessoa Maretto*, que mesmo longe se fez tão presente e me ajudou a ser mais confiante, otimista e corajoso diante de minhas responsabilidades e desafios.

À amiga *Letícia Ferreira de Freitas Brianezzi* por ter me ajudado generosamente nas vezes em que a procurei e me dado a oportunidade de participar de alguns de seus trabalhos.

À tia *Mariza*, aos tios *Ladislau e Mitze* e à prima *Ana Flávia* pela torcida e pelo incentivo constante.

Aos prestimosos *Luís Felipe Bricks Bim* e *Vagner Antonio Morales*, a quem devo resultados importantes dessa tese.

À *Márcia S. Z. Graeff* pelo trabalho primoroso que conduz com o microscópio confocal, sempre garantindo os melhores resultados, e pela amizade.

Ao *Prof. Dr. Miguel Jafelicci Júnior*, do Departamento de Físico-química do Instituto de Química de Araraquara (UNESP) e a seu então aluno de mestrado *Douglas R. de Assis* por terem tornado possível a concretização das medidas de ângulo de contato.

Ao *Prof. Dr. José Carlos Pereira* por ter sido generoso comigo, aconselhando-me e dispondo de seu tempo para que algumas expectativas pudessem ser atendidas. Muito obrigado!

Ao *Prof. Dr. Sergio Eduardo de Paiva Gonçalves* pela acolhida em momento oportuno, pelo carinho e por me motivar a buscar novos desafios.

Aos colegas (doutores e pesquisadores) do *Bioengineering Research Center*, *Farhana Abedin*, *Linyong Song*, *Qiang (Charles) Ye* e *Xueping Ge*, por terem sido tão acessíveis e diligentes comigo, tornando minha experiência no laboratório prazerosa e profícua.

Aos docentes da disciplina de Dentística, pelos valiosos ensinamentos e por não medirem esforços para oferecer a seus alunos grandes oportunidades de crescimento: *Prof. Dr. Adilson Yoshio Furuse*, *Profa. Dra. Juliana Fraga Soares Bombonatti*, *Profa. Dra. Linda Wang*, *Profa. Dra. Maria Teresa Atta*, *Prof. Dr. Rafael Francisco Lia Mondelli* e *Prof. Dr. Sérgio Kiyoshi Ishikiriyama*. Agradeço especialmente por saberem, além de nos transmitir seus conhecimentos, transmitir-nos sua experiência e acreditar no potencial de seus alunos.

À *Profa. Dra. Ana Flávia Sanches Borges* e ao *Prof. Dr. Paulo Afonso Silveira Francisconi* pela consideração, disponibilidade e por viabilizarem o acesso a recursos excelentes nos laboratórios do setor de Materiais Odontológicos.

Aos colegas e funcionários dos setores de Dentística e de Materiais Odontológicos, não só por terem sido extremamente prestativos, atenciosos e compreensivos, mas pela convivência amistosa e pelos momentos de descontração: *Alcides Urias da Costa*, *Audria Veronez*, *Charlene Aparecida dos Santos*, *Elizio Afonso C. de Menezes*, *Ligia Ramos de Oliveira Campos*, *Natália de Carli Octaviano*, *Nelson Queiroz*, *Rita Capossi*, *Sandra Cléa Pirola Azuaga* e *Zuleica Valderes Roberto*.

Às secretárias *Ana Letícia P. Momesso*, *Fatima C. Carvalho*, *Leila R. Sanchez* (da Sessão de Pós-graduação) e *Maristela P. Ferrari* (da Comissão Ética) pelos inúmeros esclarecimentos concedidos e pela indispensável assistência com os trâmites de processos.

Enfim, agradeço a todos aqueles que me ajudaram de alguma maneira a alcançar meus objetivos nessa jornada. MUITÍSSIMO obrigado!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Odontologia de Bauru.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Zago, digníssimo Reitor da Universidade de São Paulo.

À Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, Diretora da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Ao Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson, Presidente da Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processos nº 2013/13161-2 e nº 2014/18419-0).

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

À Universidade do Kansas e ao Bioengineering Research Center.

Expresso a minha gratidão e o meu reconhecimento por terem possibilitado, direta ou indiretamente, a realização desse trabalho e de outros, bem como pelo privilégio da concessão de recursos superiores os quais criaram espaços para importantes avanços e conquistas profissionais e pessoais.

*"Há muitas pessoas de visão perfeita que nada vêem...
O ato de ver não é coisa natural.
Precisa ser aprendido!"*

Rubem Alves

RESUMO

A adição de corantes fluorescentes a adesivos odontológicos possibilita a investigação da distribuição espacial desses materiais na interface dente-restauração, utilizando-se a microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). A literatura indica falta de padronização na aplicação de agentes fluorescentes com tal finalidade. Esse estudo sistematizou estratégias para a adição de rodamina B (RB) e fluoresceína sódica (FS) a um sistema adesivo convencional de três passos, Adper Scotchbond Multi-Purpose (MP), e um autocondicionante de dois passos, Clearfil SE Bond (SE), considerados “padrão-ouro” na Odontologia. Os objetivos principais foram (a) determinar a menor faixa de concentrações de RB e FS necessária para produzir imagens satisfatórias da interface dentina-adesivo e (b) avaliar o efeito da adição desses corantes sobre algumas propriedades das resinas. Os adesivos foram marcados com RB ou FS em concentrações decrescentes (0,5, 0,1, 0,02 e 0,004 mg/mL) por meio de um método de dispersão semidireto. O comportamento fotofísico/fluorescente dos adesivos marcados foi investigado por espectroscopia de fotoluminescência e MCVL. Paralelamente, avaliaram-se os adesivos quanto ao grau de conversão (GC) e ao ângulo de contato (AC). Tanto os resultados de GC como os de AC foram submetidos à análise de variância com dois fatores (adesivo e tratamento) com $\alpha = 0,05$, seguida de teste post-hoc de Tukey. Os máximos comprimentos de onda de emissão e de excitação da RB e da FS foram influenciados pelo meio polimérico e pela concentração de corante de modo geral. A MCVL preliminar de amostras de adesivo polimerizado, realizada sob condições experimentais padronizadas, mostrou que o comportamento fluorescente da RB em MP e SE foi muito semelhante na mesma concentração de corante, mas o mesmo não pôde ser dito do comportamento da FS, que foi notavelmente inferior no adesivo autocondicionante, SE, na concentração mais alta. Em dentina, os adesivos preparados com RB nas concentrações-alvo de 0,1 e 0,02 mg/mL apresentaram fluorescência ótima; já aqueles preparados com 0,004 mg/mL produziram fraco sinal. Adesivos preparados com FS a 0,5 mg/mL apresentaram ótima fluorescência na interface de adesão, enquanto que concentração menor desse corante não produziu sinal suficiente. Padrões morfológicos aparentemente atípicos foram observados na interface de adesão, quando da associação do adesivo SE com o corante FS. A adição de RB e FS nas quatro concentrações indicadas aos adesivos MP e SE não afetou o GC nem o AC em comparação com os grupos de controle correspondentes. Em suma, a RB mostra-se um corante mais versátil que a FS na avaliação morfológica das interfaces dentina-MP e dentina-SE via MCVL. A menor faixa de concentrações de RB nos adesivos MP e SE, na qual é possível produzir imagens satisfatórias das interfaces, situa-se entre 0,1–0,02 mg/mL. Já o corante FS deve ser adicionado a esses adesivos a pelo menos 0,5 mg/mL para produzir níveis de fluorescência satisfatórios na interface de adesão. A não ocorrência de efeitos deletérios sobre a polimerização e a molhabilidade das resinas estabelece uma margem de segurança para a incorporação desses agentes fluorescentes (em concentração $\leq 0,5$ mg/mL) nesses sistemas monoméricos.

Palavras-chave: Sistemas adesivos. Rodamina. Fluoresceína. Espectroscopia de infravermelho. Espectroscopia de fluorescência.

ABSTRACT

Effect of addition of rhodamine B and fluorescein to conventional etch-and-rinse and self-etching adhesive systems: photophysical and physical-chemical aspects

The addition of fluorescent dyes to dental adhesives makes it possible to investigate the spatial distribution of such resin-based materials in the tooth-restoration interface, using confocal laser scanning microscopy (CLSM). Literature indicates a lack of standardization on the application of fluorescent agents for this purpose. This work presents strategies for adding rhodamine B (RB) and fluorescein sodium salt (FS) to a three-step etch-and-rinse adhesive system, Adper Scotchbond Multi-Purpose (MP), and a two-step self-etching one, Clearfil SE Bond (SE), both regarded as "gold standard" in restorative dentistry. The main objectives were (a) to determine the lowest range of RB and FS concentrations required to produce suitable images of the dentin-adhesive interface via CLSM and (b) to investigate potential effects of addition of these dyes on some resin properties. The adhesives were labeled with RB or FS at decreasing concentrations (0.5, 0.1, 0.02 and 0.004 mg/mL) by means of a semi-direct dispersion method. The photophysical/fluorescent behavior of the labeled resins was investigated by photoluminescence spectroscopy and by CLSM. The adhesives were also investigated with regards to the degree of conversion (DC) and contact angle (CA). A two-way ANOVA of "adhesive" and "treatment" was conducted on DC and CA separately, followed by Tukey's test. The maximum emission and excitation wavelengths of RB and FS were influenced by the host polymer and the dye concentration in general. The preliminary CLSM of cured adhesive samples, performed with standardized settings, showed that the fluorescent behavior of RB in MP and SE was very similar in the same dye concentration, unlike the behavior of FS, which was lower in the self-etching adhesive for the highest dye concentration. In dentin, the adhesives prepared with RB at the target concentrations of 0.1 and 0.02 mg/mL presented optimal fluorescence; those with 0.004 mg/mL produced poor signal. Adhesives prepared with FS at 0.5 mg/mL presented optimal fluorescence at the bonding interface, whereas lower concentrations of FS did not produce sufficient signal. Atypical morphological features were observed at the bonding interface, when adhesive SE was used with FS. The addition of RB and FS at the four decreasing concentrations to adhesives MP and SE did not affect DC or CA compared to the corresponding controls. In short, RB is more versatile than FS for the morphological characterization of dentin-MP and dentin-SE interfaces via MCVL. The lowest range of RB concentrations in adhesives MP and SE that can produce suitable images of the bonding interface lies between 0.1–0.02 mg/mL. The dye FS should be added to these adhesives at 0.5 mg/mL at least to produce satisfactory fluorescence levels at the bonding interface. Since negative effects on polymerization and wettability of the resins were not observed, the use of RB and FS (in concentration ≤ 0.5 mg/mL) together with MP and SE should be reliable in terms of resin properties.

Keywords: Adhesive systems. Rhodamine. Fluorescein. Infrared spectroscopy. Fluorescence spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição de adesivo odontológico (marcado com o corante fluorescente rodamina B) na interface dentina-adesivo.....	24
Figura 2 -	Tríade de elementos sob a qual esse estudo se estruturou	26
Figura 3 -	Célula HeLa visualizada por fluorescência	30
Figura 4 -	Fórmulas estruturais e moleculares do xanteno (A), da fluoresceína (B) e da rodamina B (C).....	31
Figura 5 -	Versão simplificada do diagrama de Jablonski, ilustrando as principais etapas do fenômeno de fluorescência	33
Figura 6 -	Esquema de óptica no microscópio confocal de varredura Tandem	37
Figura 7 -	Microscopia confocal no modo de reflexão de luz da dentina humana.....	38
Figura 8 -	Microscopia confocal da interface dentina-adesivo com uso de filtros passa-banda.....	40
Figura 9 -	Fotomicrografia mostrando a distribuição, em dentina, do adesivo (em verde) e do <i>primer</i> (em vermelho) marcados com fluoresceína e rodamina B respectivamente.....	41
Figura 10 -	Microscopia confocal de varredura a laser. Interface dentina-adesivo registrada com o uso de um adesivo universal contendo rodamina B (isotiocianato)	42
Figura 11 -	Microscopia confocal de varredura a laser. Caracterização de micropermeabilidade na interface dentina-adesivo	44
Figura 12 -	Pós de rodamina B (à esquerda) e de fluoresceína sódica (à direita) sobre vidros de relógios	57
Figura 13 -	Montagem de amostra de adesivo (marcado com rodamina B) sobre lâmina microscópica para a avaliação preliminar via microscopia confocal de varredura a laser	60

Figura 14 - Esquema de cortes transversais utilizados na planificação das coroas dentárias	62
Figura 15 - (A) Acessório de refletância total atenuada MIRracle™, equipado com (B) cristal de diamante de ZnSe de refletância única	64
Figura 16 - Gotas de adesivo marcado com rodamina B dispensadas sobre lâmina de polimetacrilato de metila (PMMA) para a medida de ângulo de contato com o auxílio de goniômetro computadorizado	67
Figura 17 - Imagens capturadas com a câmera digital do goniômetro. Sequência ilustrando a formação da gota de resina fluida na extremidade da agulha metálica.....	67
Figura 18 - Imagens registradas com a câmera digital do goniômetro. Sequência de transferência de adesivo para a superfície de polimetacrilato de metila (PMMA) para a medida de ângulo de contato	68
Figura 19 - Diagrama CIE de cromaticidade. Coordenadas geradas a partir de espectros de emissão de Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose (MP) contendo rodamina B (RB) ou fluoresceína sódica (FS)	79
Figura 20 - Diagrama CIE de cromaticidade. Coordenadas geradas a partir de espectros de emissão de Clearfil™ SE Bond (SE) contendo rodamina B (RB) ou fluoresceína sódica (FS).....	80
Figura 21 - Intensidade de fluorescência em função da concentração de rodamina B nos adesivos	81
Figura 22 - Intensidade de fluorescência em função da concentração de fluoresceína sódica nos adesivos	82
Figura 23 - Padrões morfológicos na interface dentina-adesivo evidenciados com o uso de corantes fluorescentes.....	83
Figura 24 - Microscopia confocal de varredura a laser da interface dentina-adesivo com o uso de rodamina B	84

Figura 25 - Microscopia confocal de varredura a laser da interface dentina-adesivo. Adesivo Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose preparado com fluoresceína sódica nas concentrações de 0,5 mg/mL (A) e 0,1 mg/mL (B)	85
Figura 26 - Microscopia confocal de varredura a laser da interface dentina-adesivo. Adesivo Clearfil™ SE Bond preparado com fluoresceína sódica (FS) nas concentrações de 0,5 mg/mL (A e B) e 0,1 mg/mL (C e D)	86
Figura 27 - Fórmula estrutural do monômero ácido 10-metacriloiloxidecil di-hidrogênio fosfato (10-MDP)	99
Figura 28 - Tautômeros da fluoresceína em seus equilíbrios dinâmicos dependentes do pH.....	100
Figura 29 - Microscopia eletrônica de varredura de dentina desmineralizada	103
Figura 30 - Estágios de iniciação (A) e propagação (B) da polimerização do metacrilato de metila (C ₅ H ₈ O ₂) através de adição de radicais livres	106
Figura 31 - Formação de radicais livres por sistema fotoiniciador à base de canforoquinona (CQ) e amina (2-[N,N-dimetilamino-metacrilato de metilo [DMAEMA]) por irradiação de luz visível	106
Figura 32 - Microscopia eletrônica de varredura de superfícies dentinárias após (a) desgaste com lixa de abrasiva e (b) desgaste seguido de condicionamento com ácido fosfórico	109
Figura 33 - Tubo contendo mistura incompleta de adesivo com rodamina B	111

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Espectros de absorção e emissão do corante fluorescente rodamina B	34
Gráfico 2 - Espectros de absorção (- - -) e de emissão (—) dos corantes fluorescentes Alexa Fluor® 350, Cy®3 e BODIPY® 650-655	35
Gráfico 3 - Espectros de infravermelho do adesivo Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose registrados antes e depois da fotopolimerização da (mesma) amostra.....	65

Gráfico 4 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de emissão dos adesivos (A) Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e (B) Clearfil™ SE Bond (amostras polimerizadas) contendo rodamina B em diferentes concentrações.....	73
Gráfico 5 - Intensidade de emissão integrada (normalizada) em função da concentração de rodamina B nos adesivos – Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose (MP) e Clearfil™ SE Bond (SE) – e em etanol (etOH).....	74
Gráfico 6 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de excitação dos adesivos (A) Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e (B) Clearfil™ SE Bond (amostras polimerizadas) contendo rodamina B em diferentes concentrações.....	75
Gráfico 7 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de emissão dos adesivos (A) Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e (B) Clearfil™ SE Bond (amostras polimerizadas) contendo fluoresceína sódica em diferentes concentrações	76
Gráfico 8 - Intensidade de emissão integrada (normalizada) em função da concentração de fluoresceína sódica nos adesivos – Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose (MP) e Clearfil™ SE Bond (SE) – e em etanol (etOH)	77
Gráfico 9 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de excitação dos adesivos (A) Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e (B) Clearfil™ SE Bond (amostras polimerizadas) contendo fluoresceína sódica em diferentes concentrações	78
Gráfico 10 - Efeitos principais dos fatores adesivos e tratamento sobre o ângulo de contato (aferido após 8 s).....	88
Gráfico 11 - Efeitos principais dos fatores adesivo e tratamento sobre o ângulo de contato (aferido após 30 s).....	89
Gráfico 12 - Espectros de emissão de amostras de Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose marcadas com rodamina B (RB) ou fluoresceína sódica (FS) em diferentes concentrações	95

- QUADROS

Quadro 1 - Exemplos de corantes fluorescentes sintéticos e algumas características ..	32
Quadro 2 - Comparações de características entre a microscopia confocal de varredura Tandem e a microscopia confocal de varredura a laser (no modo de fluorescência)	42
Quadro 3 - A microscopia confocal no estudo da interface de adesão com sistemas adesivos modificados com corantes fluorescentes	45
Quadro 4 - Utilização de corantes fluorescentes em diferentes sistemas adesivos	47
Quadro 5 - Principais materiais utilizados nas etapas experimentais e suas características	55
Quadro 6 - Parâmetros utilizados na análise dos adesivos por espectroscopia de fotoluminescência	59
Quadro 7 - Parâmetros utilizados na microscopia confocal de varredura a laser preliminar dos adesivos marcados com rodamina B ou fluoresceína sódica	61
Quadro 8 - Instruções de aplicação dos sistemas adesivos, segundo a bula dos fabricantes	63
Quadro 9 - Fatores de estudo e níveis da análise de variância	69
Quadro 10 - Concentrações-alvo dos corantes rodamina B e fluoresceína sódica nos adesivos Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e Clearfil™ SE Bond pré-selecionadas para microscopia confocal de varredura a laser em dentina	83

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Médias de grau de conversão (%) dos adesivos Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e Clearfil™ SE Bond puros e com diferentes concentrações de rodamina B ou fluoresceína sódica	87
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

10-MDP	10-metacrilóiloxidecil di-hidrogênio fosfato
AC	ângulo de contato
ADSA-P	<i>axisymmetric drop shape analysis-profile</i>
AN	abertura numérica
BisGMA	bisfenol-A glicidil metacrilato
CCD	dispositivo de carga acoplada (<i>charge-coupled device</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FOAA	filtro óptico-acústico ajustável
FS	fluoresceína sódica
FT-IR	espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GC	grau de conversão
HEMA	2-hidroxietil metacrilato
LED	diodo emissor de luz (<i>light-emitting diode</i>)
MCVL	microscopia confocal de varredura a laser
MCVT	microscopia confocal de varredura Tamden
MEDF	microscopia de excitação por dois fótons
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MP	Adper Scotchbond Multi-Purpose
MVT	microscópio de varredura Tandem
n/a	não se aplica
PMMA	polimetacrilato de metila
RB	rodamina B
SE	Clearfil SE Bond

LISTA DE SÍMBOLOS

$\times$	vezes
$\approx$	aproximadamente
$^{\circ}$	grau(s)
$^{\circ}\text{C}$	grau(s) Celsius
μL	microlitro(s)
cm	centímetro(s)
L	litro(s)
M	molar
mL	mililitro(s)
MM	massa molecular
mmol	milimol(es)
mW/cm^2	miliwatt(s) por centímetro(s) quadrado(s)
nm	nanômetro(s)
O_2	oxigênio
pH	potencial de hidrogênio
s	segundo(s)
S_0	estado singleto fundamental
S_1	estado excitado singleto de menor energia
S_1'	estado excitado singleto de maior energia
TM	marca registrada (<i>trademark</i>)
u	unidade(s) de massa atômica
V	volt(s)
ZnSe	seleneto de zinco
ε	coeficiente de extinção molar
θ	ângulo de contato
λ_{EM}	comprimento de onda de emissão
λ_{EX}	comprimento de onda de excitação
π	pi
τ	tempo de vida
Φ_{F}	rendimento quântico de fluorescência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	OS CORANTES FLUORESCENTES	29
2.2	A FLUORESCÊNCIA.....	32
2.3	EXPERIMENTOS COM MARCAÇÃO MÚLTIPLA	34
2.4	PARÂMETROS FOTOFÍSICOS DE INTERESSE	35
2.5	O USO DE CORANTES FLUORESCENTES EM SISTEMAS ADESIVOS ODONTOLÓGICOS	36
3	OBJETIVOS	49
3.1	OBJETIVO GERAL.....	51
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4	METODOLOGIA.....	53
4.1	MATERIAIS NECESSÁRIOS PARA A REALIZAÇÃO DO ESTUDO	55
4.2	ASPECTOS ÉTICOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO	56
4.3	ASPECTOS GERAIS DO DELINEAMENTO	56
4.4	ADICIONANDO OS CORANTES FLUORESCENTES AOS ADESIVOS	56
4.4.1	Preparo de soluções etanólicas de rodamina B e fluoresceína sódica.....	57
4.4.2	Método de adição de corantes fluorescentes via alíquota de etanol.....	57
4.5	ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA	58
4.6	DIAGRAMA CIE DE CROMATICIDADE.....	59
4.7	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (MCVL) PRELIMINAR DE ADESIVOS MARCADOS COM RB/FS	60
4.8	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (MCVL) DA INTERFACE DENTINA- ADESIVO.....	61
4.9	MEDIDAS DE GRAU DE CONVERSÃO	63
4.9.1	Validação de dados espectroscópicos.....	65
4.10	MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO	66
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69

5	RESULTADOS	71
5.1	ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA	73
5.2	DIAGRAMA CIE DE CROMATICIDADE.....	79
5.3	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (MCVL) PRELIMINAR DE ADESIVOS MARCADOS COM RB/FS	81
5.4	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (MCVL) DA INTERFACE DENTINA- ADESIVO.....	83
5.5	MEDIDAS DE GRAU DE CONVERSÃO	86
5.6	MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO	87
6	DISCUSSÃO	91
6.1	ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA	93
6.2	DIAGRAMA CIE DE CROMATICIDADE.....	97
6.3	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (MCVL) PRELIMINAR DE ADESIVOS MARCADOS COM RB/FS	98
6.4	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (MCVL) DA INTERFACE DENTINA- ADESIVO.....	101
6.4.1	Aspectos gerais da fluorescência na interface dentina-adesivo	101
6.4.2	Aspectos morfológicos e possíveis artefatos	102
6.5	MEDIDAS DE GRAU DE CONVERSÃO	105
6.6	MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO	108
6.7	CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÉTODO DE DISPERSÃO DE CORANTES	110
6.8	PERSPECTIVAS	112
7	CONCLUSÕES.....	113
	REFERÊNCIAS	117
	APÊNDICES	129
	ANEXOS	137

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Adesivos odontológicos são sistemas monoméricos (à base de metacrilatos comumente) utilizados para aderir compósitos restauradores ao esmalte e à dentina (VAN LANDUYT et al., 2007). Inúmeros estudos demonstram que a interface dentina-adesivo é o elo frágil das restaurações adesivas (PASHLEY et al., 2007; SPENCER et al., 2010; FRASSETTO et al., 2016). Os dois processos fundamentais envolvidos na adesão micromecânica à dentina são: (a) remoção da fase mineral da superfície dentinária através de condicionamento ácido, expondo-se a rede de fibrilas de colágeno e (b) preenchimento dos espaços interfibrilares com uma resina fluida que sofre polimerização *in situ*, formando a estrutura imbricada conhecida como camada híbrida (NAKABAYASHI; KOJIMA; MASUHARA, 1982; PASHLEY et al., 2011). A complexa composição da dentina e a presença de fluidos/ água durante os procedimentos adesivos acarretam uma série de processos inter-relacionados que limitam a estabilidade da camada híbrida: infiltração incompleta de monômeros, polimerização parcial, separação de fases, degradação hidrolítica do polímero e degradação enzimática de colágeno subjacente (SANTERRE; SHAJII; LEUNG, 2001; SPENCER; WANG, 2002; SANTINI; MILETIC, 2008; TJÄDERHANE et al., 2013).

A compreensão das interações físicas e químicas entre substrato dentinário e agentes de união é fundamental na busca de soluções para limitações da adesão em dentina, com o propósito de se aprimorar os sistemas adesivos e obter maior longevidade clínica. A caracterização morfológica da interface dentina-adesivo através de técnicas microscópicas constitui importante parte do histórico de investigações e desvendamentos nesse contexto (NAKABAYASHI; KOJIMA; MASUHARA, 1982; SPENCER; WANG, 2002; SAURO et al., 2008).

A microscopia de fluorescência é um dos métodos mais utilizados na análise morfológica de materiais poliméricos, incluindo-se a caracterização de interfaces (AOKI, 2014). Em meados da década de oitenta, Watson e Boyde incorporaram, pela primeira vez, corantes fluorescentes a polímeros odontológicos com finalidade experimental (WATSON; BOYDE, 1987a). Esses pesquisadores advogavam que a adição de agentes fluorescentes a sistemas adesivos era uma nova forma de se caracterizar a morfologia de restaurações adesivas, utilizando-se a microscopia de fluorescência. Desde então, a marcação de adesivos com corantes fluorescentes tradicionais, tais como fluoresceínas e rodaminas, tornou-se um

método versátil para se evidenciar a distribuição espacial de agentes de união na interface dentina-adesivo (KREJCI et al., 1999; D'ALPINO et al., 2006a; DING et al., 2010; TOLEDANO et al., 2013). A Figura 1 exemplifica a visualização dessa interface através do uso de adesivo modificado com o corante fluorescente rodamina B.

Nota: (a) camada superficial de adesivo (fora da dentina) disponível para ligação com o material restaurador; (h) camada híbrida (entre linhas tracejadas); (t) tag de resina, que é uma porção de adesivo que penetrou no interior do túbulo dentinário e se polimerizou. As zonas em preto ao redor de tags representam a dentina mineralizada.

Fonte: proveniente de estudo-piloto.

Figura 1 - Distribuição de adesivo odontológico (marcado com o corante fluorescente rodamina B) na interface dentina-adesivo

O método de marcação se baseia no simples processo de dispersão de um corante fluorescente de baixo peso molecular no sistema monomérico, em vez de se ligar o fluoróforo aos monômeros por covalência (D'ALPINO et al., 2006b; TOLEDANO et al., 2014). A rodamina B tem sido o corante mais utilizado na marcação de sistemas adesivos (D'ALPINO et al., 2006a). O pó de rodamina B, solúvel em água e vários solventes orgânicos, mistura-se facilmente com adesivos que apresentam etanol ou acetona na composição (GRIFFITHS; WATSON; SHERRIFF, 1999; PIOCH et al., 2003; D'ALPINO et al., 2006a). Além disso, esse corante tradicional apresenta excelentes propriedades fotofísicas, não sendo tão sensível a variações de pH quanto as fluoresceínas por exemplo (CLAXTON; FELLERS; DAVIDSON, 2006; GONÇALVES, 2009). Nos experimentos, os espécimes de dentina preparados com adesivo marcado são, comumente, avaliados com o auxílio de microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Essa técnica permite a aquisição de imagens de

superfície e sub-superfície (seções ópticas) de forma não destrutiva e com alta resolução e especificidade (PADDOCK, 1999). Para o pesquisador, uma das maiores vantagens da MCVL é a simplificação do processo de preparo de espécimes em dentina (PIOCH et al., 1997; WATSON et al., 2000).

Observam-se, entretanto, fatores e variáveis que podem limitar o uso de corantes fluorescentes em polímeros odontológicos. Por exemplo, a falta de padronização da concentração de corantes em diferentes sistemas adesivos, revisada na literatura (D'ALPINO et al., 2006a), gera dúvidas sobre possíveis efeitos da adição de corante sobre propriedades físicas, mecânicas e viscoelásticas dos adesivos. D'Alpino et al. (2006b) avaliaram a influência de diferentes concentrações de rodamina B sobre algumas características de um sistema adesivo simplificado (de frasco único). Os autores indicaram que 1,33 mg daquele corante por mililitro do adesivo causou impacto negativo na resistência adesiva em dentina e na polimerização, enquanto que concentrações menores (como 0,16 mg/mL) não afetaram tais medidas. Enquanto os achados de D'Alpino et al. (2006b) trouxeram uma margem de segurança para a incorporação de rodamina B num produto específico, existem outros corantes e sistemas adesivos que podem ser combinados e, para tais combinações, faltam evidências em termos de possíveis interações. Bons candidatos para novas análises seriam, de um lado, corantes tradicionais (como fluoresceína e rodamina B) e, do outro, sistemas adesivos considerados “padrão-ouro” na Odontologia: os convencionais de três passos e os autocondicionantes de dois passos (PASHLEY et al., 2011; VAN MEERBEEK et al., 2011).

Há, também, certas conjecturas sobre o uso de corantes em adesivos que merecem atenção. D'Alpino et al. (2006a) cogitaram uma preocupação com a adição de fluoresceína – cuja fluorescência é significativamente reduzida em meios ácidos – a sistemas adesivos autocondicionantes, que contêm monômeros funcionais ácidos. Supõe-se, ainda, que corantes fluorescentes, por absorverem luz, reduzem a quantidade de energia radiativa que chega ao sistema iniciador durante a fotoativação, podendo prejudicar o processo de polimerização (D'ALPINO et al., 2006a). A este respeito, vale observar que a fluoresceína apresenta máximo de absorção (de luz) na região dos azuis, da mesma forma que a canforoquinona, que é o fotoiniciador presente na maioria dos sistemas adesivos (GONÇALVES, 2009; COOK; CHEN, 2011). Tais conjecturas nos reforçaram a necessidade de novas investigações, envolvendo corantes e sistemas adesivos com características peculiares que sugerem interações preocupantes.

Outro aspecto crítico se refere à falta de estudos sobre o comportamento fotofísico de corantes fluorescentes em diferentes sistemas adesivos. A fluorescência é um fenômeno influenciado por fatores associados ao ambiente químico. As eficiências com que diferentes fluoróforos absorvem e emitem luz podem variar de acordo com a polaridade, viscosidade e pH do meio por exemplo (WAGNER, 2009; VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012a; KRISTOFFERSEN et al., 2014). O conhecimento de aspectos do comportamento fotofísico de corantes dispersos em diferentes adesivos pode proporcionar informações relevantes para a otimização de parâmetros da MCVL, buscando-se a melhor relação entre o sinal e a concentração de corante (PAWLEY, 2000).

Por fim, convém mencionar que maioria dos estudos afins não provém informações detalhadas sobre a miscibilidade dos corantes fluorescentes nos sistemas adesivos, tampouco sobre o método utilizado para a dispersão e homogeneização dos componentes, o que dificulta a reprodução dos experimentos (D'ALPINO et al., 2006a; FRANCISCONI et al., 2009; SAMPAIO et al., 2011).

Com base no exposto, este estudo fornece estratégias sistemáticas para a adição de rodamina B e fluoresceína (forma sódica) a um sistema adesivo convencional de três passos e a um autocondicionante de dois passos considerados “padrão-ouro” na Odontologia. Tais estratégias visaram a determinação da menor faixa de concentrações de corante necessária para se obter imagens satisfatórias da interface dentina-adesivo através de MCVL. Nossa abordagem considerou, cuidadosamente, uma tríade de elementos que não foram levados em conta dentro de um mesmo estudo até então (Figura 2).

Figura 2 - Tríade de elementos sob a qual esse estudo se estruturou

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Antes de se revisar, especificamente, o uso de corantes fluorescentes em sistemas adesivos odontológicos, é essencial buscar compreender o que são tais corantes e como funcionam. Além disso, conhecer algumas das inúmeras de suas aplicações ajuda a detectar fatores e variáveis que não foram levados em conta em estudos anteriores (na área da Odontologia), mas podem afetar a interpretação de resultados.

2.1 OS CORANTES FLUORESCENTES

Espécies químicas¹ capazes de emitir luz através de fluorescência são conhecidas como corantes fluorescentes, fluorocromos ou fluoróforos (LAKOWICZ, 2006a; ISHIKAWA-ANKERHOLD; ANKERHOLD; DRUMMEN, 2012).

Existe um número limitado de fluoróforos naturais (ou intrínsecos), responsáveis pela fluorescência natural de certas estruturas em seres vivos. Por exemplo, os aminoácidos triptofano e tirosina e as coenzimas NADH (nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida) e FAD (dinucleótido de flavina e adenina) são capazes de emitir luz, quando estimulados com radiação ultravioleta (LAKOWICZ, 2006a). Há interesse científico na fluorescência dessas biomoléculas, pois ela pode ser utilizada no diagnóstico de doenças (CROCE; BOTTIROLI, 2014). A fluorescência intrínseca da dentina humana, por exemplo, pode auxiliar o dentista no diagnóstico de lesões de cárie, através do uso de dispositivos eletrônicos que detectam diferenças entre a fluorescência da dentina hígida e cariada (MATSUMOTO; KITAMURA; ARAKI, 2000; BUCHALLA, 2005; BETRISEY et al., 2014). Estima-se que mais de um fluoróforo intrínseco seja responsável pela fluorescência da dentina, sendo um deles o triptofano (FOREMAN, 1980).

Em contraste com a pequena variedade de fluoróforos naturais, desenvolveram-se dezenas de fluoróforos sintéticos (ou extrínsecos) nas últimas décadas para inúmeras aplicações associadas a técnicas microscópicas e espectroscópicas sensíveis à fluorescência (JOHNSON, 2010; MONDAL; DIASPRO, 2014a; SPECHT; BRASELMANN; PALMER,

¹ Espécie química (ou simplesmente espécie neste contexto) é o termo genérico utilizado para significar quaisquer espécies elementares, como átomos, íons, moléculas e radicais.

2017). O uso de sondas fluorescentes se destaca nessa gama de aplicações (DRUMMEN, 2012). Uma sonda fluorescente é um fluoróforo extrínseco designado para se localizar junto de uma estrutura ou região de interesse em um espécime ou para reagir a determinados estímulos do meio. Sondas fluorescentes são consideradas extremamente úteis e versáteis na pesquisa biológica, pois permitem aos pesquisadores detectar componentes de conjuntos biomoleculares complexos (incluindo células vivas) com alta sensibilidade e seletividade (DEMCHENKO, 2009). Diferentes sondas fluorescentes têm sido empregadas na evidência de biomoléculas (ex.: aminoácidos, peptídeos, anticorpos e ácidos nucleicos) e de estruturas celulares (ex.: mitocôndria, lisossomo, complexo de Golgi), bem como no diagnóstico de processos patológicos e no monitoramento de processos bioquímicos (HIRAOKA; SHIMI; HARAGUCHI, 2002; ZIMMERMANN; RIETDORF; PEPPERKOK, 2003; ROBERTSON; BUNEL; ROBERTS, 2013). A Figura 3 exemplifica o uso de sondas fluorescentes na evidência de componentes celulares.

Nota: Vários fluoróforos sintéticos (associados a diferentes técnicas de marcação) permitiram a visualização do núcleo celular (em azul), de microtúbulos (em verde), complexos de Golgi (em amarelo) e mitocôndrias (em roxo).

Fonte: Giepmans BNG, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY. The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science*. 2006;312(5771):217-24.

Figura 3 - Célula HeLa visualizada por fluorescência

Já no campo da ciência dos materiais, nota-se grande interesse pela incorporação de corantes fluorescentes a matrizes sólidas (de sílica, ou polímeros por exemplo) e a nanomateriais. Matrizes sólidas “dopadas” (com corantes), polímeros conjugados e nanomateriais fluorescentes vêm sendo desenvolvidos com diversos fins, como a produção de lasers (*solid-state dye lasers*) e de uma série de materiais que atuam como sensores de alvos

específicos, como oxigênio (O_2), íons, etc. (REISFELD; YARIV; MINTI, 1997; SINGH et al., 2003; LEE; POVLIH; KIM, 2010; SCHÄFERLING, 2012).

As fluoresceínas e rodaminas (derivados do xanteno) são corantes sintéticos tradicionais e versáteis amplamente utilizados na gama de aplicações mencionadas acima (Figura 4).

Figura 4 - Fórmulas estruturais e moleculares do xanteno (A), da fluoresceína (B) e da rodamina B (C)

Dentre as razões pelo amplo uso de fluoresceínas e rodaminas, citam-se: o alto rendimento quântico, a compatibilidade com amostras biológicas, a hidrossolubilidade e miscibilidade com diferentes solventes orgânicos. Além disso, possuem uma série de derivados reativos (para ligação a alvos específicos, como anticorpos e outras biomoléculas) e são excitáveis com luz visível (o que evita a utilização de luz ultravioleta, que pode induzir a fluorescência natural de certas proteínas em amostras biológicas na microscopia) (BEIJA; AFONSO; MARTINHO, 2009; GONÇALVES, 2009; ZHENG et al., 2013).

Além dos corantes tradicionais, desenvolveram-se outras dezenas de corantes mais robustos (mais caros também), os quais costumam apresentar melhores propriedades fotofísicas e fotoestabilidade, tolerância a variações de pH (e/ou a outros fatores relacionados ao meio), além de capacidade de se ligar a alvos específicos (JOHNSON, 2010). Dentre esses corantes mais robustos, encontram-se as cianinas e os corantes da família BODIPY® e Alexa Fluor® da empresa Thermo Fisher Scientific Inc.

O Quadro 1 apresenta alguns dos corantes sintéticos mais utilizados.

Corante fluorescente	Nome em inglês	Algumas características
Fluoresceína	Fluorescein	Uso genérico; apresenta vários derivados. Hidrossolúvel. Pode ser usada como indicador de pH.
Isotiocianato de fluoresceína	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	Derivado da fluoresceína bastante utilizado em conjugação com proteínas.
Rodamina B	Rhodamine B	Uso genérico; apresenta vários derivados. Solúvel em água e vários solventes orgânicos.
Rodamina 123	Rhodamine 123	Sonda fluorescente para mitocôndria. prontamente captado pela organela, porém não se retém bem durante a fixação celular (lixiviação).
MitoTracker®	n/a	Alternativa mais robusta para a rodamina 123. Concentra-se bem nas mitocôndrias e resiste ao processo de fixação celular.
4',6-diamidino-2- fenilindol	4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Liga-se fortemente a certas regiões do DNA. Usado para marcar células vivas e fixadas.
Iodeto de propídio	Propidium iodide (PI)	Diferenciação entre células vivas e mortas em cultura. Não hidrossolúvel.
Cianinas	Cyanines (Cy2, Cy3, Cy5, Cy7)	Marcação de ácidos nucleicos e proteínas.
Família BODIPY®	n/a	Corantes estáveis em condições fisiológicas, relativamente insensíveis às variações de pH. Rendimentos quânticos elevados e picos de emissão estreitos. Conjugados fluorescentes de proteínas, nucleotídeos, fosfolípidios, etc.
Fluo-3, Fluo-4, Rhod-2	n/a	Indicadores de Ca ²⁺ .

n/a: não se aplica.

Fonte: GONÇALVES, 2009; JOHNSON, 2010.

Quadro 1 - Exemplos de corantes fluorescentes sintéticos e algumas características

2.2 A FLUORESCÊNCIA

As diversas aplicações dos corantes fluorescentes se baseiam, obviamente, na fluorescência ou em aspectos quânticos desse fenômeno (LAKOWICZ, 2006b; MONDAL; DIASPRO, 2014b). Para se conceituar o fenômeno de fluorescência, convém situá-lo na família de processos luminescentes. Luminescência (do latim, *lumen* = luz) é a emissão de radiação eletromagnética, comumente na região da luz visível, por espécies químicas que estejam “relaxando” de um estado excitado (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012a). As diferentes formas de luminescência – como a bioluminescência, termoluminescência, sonoluminescência, dentre outras – são classificadas de acordo com o estímulo responsável pela excitação das moléculas da substância luminescente (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012a). Quando tal estímulo for a absorção de fótons (luz), diz-se fotoluminescência. As duas principais formas de fotoluminescência são a fluorescência e a fosforescência. Embora esses dois processos fotoluminescentes envolvam a absorção e emissão de luz, eles se diferenciam

entre si pela configuração eletrônica do estado excitado, bem como pelo tempo de vida nesse estado (τ) (LAKOWICZ, 2006c; DRUMMEN, 2012). Na fluorescência, o estado excitado envolvido é do tipo singleto, em que a orientação de *spin* do elétron no orbital é idêntica a sua orientação no estado fundamental. Por outro lado, na fosforescência, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é diferente de sua orientação original (estado excitado tripleto). O retorno de elétrons do estado excitado singleto para o estado fundamental, que também tem caráter singleto, ocorre muito rapidamente na ordem de femtossegundos (10^{-15} s) (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012b). Já as transições eletrônicas do estado excitado tripleto para o estado fundamental são consideradas “proibidas”, levando muito mais tempo para acontecerem (de alguns milissegundos a vários minutos).

A Figura 5 ilustra os três eventos principais que caracterizam a fluorescência, sob os quais se fundamentam as técnicas microscópicas e fluorimétricas baseadas nesse fenômeno.

Fonte: Adaptação do diagrama de Jablonski. Disponível em <<http://aetherforce.com/how-fluorescent-light-works/>>.

Figura 5 - Versão simplificada do diagrama de Jablonski, ilustrando as principais etapas do fenômeno de fluorescência

De acordo com Lakowicz (2006c), o primeiro evento é a transferência da energia ($h\nu_{EX}$) de certo fóton para um elétron, resultando em transição eletrônica do estado singleto fundamental (S_0) para o estado excitado singleto de maior energia (S_1'). O segundo evento, denominado relaxação vibracional, é um processo não radiativo (que não envolve a emissão de luz), em que o excesso de energia vibracional no elétron (em S_1') é transferido ao meio na forma de calor, fazendo com que o elétron “relaxe” para um estado (singleto) excitado de menor energia (S_1). O terceiro e último evento é a emissão de um fóton e, conseqüentemente, o retorno do elétron ao estado fundamental (S_0). Devido à dissipação de energia durante o tempo no estado excitado, a energia do fóton emitido ($h\nu_{EM}$) é menor – e, portanto, de maior comprimento de onda – do que a

do fóton de excitação ($h\nu_{\text{EX}}$). A diferença entre $h\nu_{\text{EX}}$ e $h\nu_{\text{EM}}$ é chamada de deslocamento de Stokes (STOKES, 1852; DRUMMEN, 2012). Com base no deslocamento de Stokes de cada fluoróforo, é possível separar a luz de excitação da luz de emissão no microscópio de fluorescência através do uso de filtros e outros dispositivos ópticos (SANDERSON et al., 2014).

2.3 EXPERIMENTOS COM MARCAÇÃO MÚLTIPLA

Cada fluoróforo apresenta espectros de absorção e de emissão próprios, que caracterizam sua fluorescência. O Gráfico 1 mostra os espectros de absorção e de emissão da rodamina B, podendo-se notar o deslocamento de Stokes (*Stokes shift*), definido entre o máximo comprimento de onda de absorção e o de emissão.

Fonte: Os espectros foram copiados do banco de dados do programa de computador *PhotoChemCAD*. Disponível em <<http://www.photochemcad.com/index.html>>.

Gráfico 1 - Espectros de absorção e emissão do corante fluorescente rodamina B

A disponibilidade de corantes sintéticos com características espectrais (bandas de absorção e emissão) distintas permite a realização de técnicas de marcação múltipla, comumente utilizadas na MCVL (GARINI; YOUNG; MCNAMARA, 2006; ZUCKER et al., 2007). Nesses casos, mais de um corante fluorescente é simultaneamente utilizado para se marcar diferentes estruturas de interesse em uma amostra (como exemplificado na Figura 3) ou monitorar processos bioquímicos distintos.

Nas técnicas de marcação múltipla, é necessário selecionar corantes que possuam máximos de emissão que não se interponham para que seja possível detectar as emissões de

cada corante seletivamente através do uso de filtros de emissão, reduzindo as chances de haver cruzamento de emissões (*crosstalk* ou *bleed-through*) (GARINI; YOUNG; MCNAMARA, 2006; WATERS, 2009). O *crosstalk* ocorre quando a fluorescência associada a um corante é incluída na faixa de detecção destinada a outro (PADDOCK, 1999; D'ALPINO et al., 2006a). O Gráfico 2 ilustra os espectros de absorção e emissão de três corantes sintéticos comerciais bastante utilizados em técnicas de marcação múltipla.

Fonte: Os espectros foram obtidos a partir de dados disponibilizados pela empresa *Thermo Fisher Scientific* no aplicativo on-line *Fluorescence SpectraViewer*. Disponível em <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>>.

Gráfico 2 - Espectros de absorção (---) e de emissão (—) dos corantes fluorescentes Alexa Fluor® 350, Cy3® e BODIPY® 650-655

Corantes fluorescentes que apresentam pequeno deslocamento de Stokes, como Cy3 e BODIPY 650-655 (Gráfico 2) também oferecem vantagem nas técnicas de marcação múltipla, pois reduzem as chances de dada linha de laser (excitação) se sobrepor à região de detecção (emissão) de outros corantes utilizados simultaneamente.

2.4 PARÂMETROS FOTOFÍSICOS DE INTERESSE

A fluorescência de um dado corante depende da eficiência com que ele absorve e emite fótons, assim como do número de ciclos de excitação/emissão que é capaz de sofrer antes de “branquear” (DEMPSEY et al., 2011). As eficiências de absorção e de emissão podem ser quantificadas através do coeficiente de extinção molar (ϵ) e do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) respectivamente (SAUER; HOFKENS; ENDERLEIN, 2011). O

coeficiente de extinção molar, dado em $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, é uma dimensão da capacidade de uma substância absorver luz (num dado comprimento de onda). Já o rendimento quântico é a razão entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos, indicando com que eficiência o fluoróforo converte energia absorvida em fluorescência. Tanto ϵ como Φ_F são medidas sob influência de condições do meio químico (solventes, soluções experimentais, fluidos biológicos, etc.). Por exemplo, fluoresceínas e rodaminas são conhecidas por apresentar elevados coeficientes de extinção molar (em média $80.000 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (LAKOWICZ, 2006a). Contudo, a fluorescência das fluoresceínas é sensível a variações de pH, enquanto que as rodaminas podem formar dímeros em soluções concentradas os quais levam à supressão de fluorescência (SONG et al., 2000; BEIJA; AFONSO; MARTINHO, 2009).

Vários parâmetros relacionados ao meio podem influenciar a eficiência com que um corante absorve e/ou emite luz. Dentre eles, citam-se o pH, a polaridade, a viscosidade, a temperatura, presença de certos íons, formação de dímeros não fluorescentes, supressores, etc. (BEIJA; AFONSO; MARTINHO, 2009; VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012a). Os possíveis efeitos do meio sob a fluorescência devem ser considerados na hora da escolha de um corante para determinado experimento. Quando se deseja analisar uma amostra via microscopia de fluorescência, a redução na intensidade da fluorescência de um corante decorrente de interações com o meio pode comprometer a viabilidade da análise completamente. Já outras técnicas fluorimétricas tomam proveito de interações corante-meio específicas que permitem, por exemplo, o monitoramento de variações de pH e viscosidade, de flutuação de potencial elétrico de membrana e de processos oxidativos (SCADUTO; GROTYOHANN, 1999; LAKOWICZ, 2006d; WARDMAN, 2007).

2.5 O USO DE CORANTES FLUORESCENTES EM SISTEMAS ADESIVOS ODONTOLÓGICOS

A caracterização morfológica da interface dente-restauração tem sido um recurso fundamental na compreensão de interações entre substratos dentários e diferentes categorias de sistemas adesivos odontológicos. As primeiras evidências da formação da camada híbrida foram registradas com o auxílio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) por Nakabayashi, Kojima e Masuhara (1982). Desde então, a MEV e a microscopia eletrônica de transmissão (MET) têm sido aplicadas no estudo da adesão de materiais resinosos à dentina,

bem como de processos de degradação na interface de adesão (VAN MEERBEEK et al., 1993; NAKABAYASHI; SAIMI, 1996; SPENCER; WANG, 2002; HASHIMOTO et al., 2003; TAY et al., 2005; BARCELLOS et al., 2016). Apesar do excepcional incremento na resolução oferecido pela microscopia eletrônica, há uma série de exigências a respeito do preparo de espécimes – como desidratação, metalização e cortes seriados – as quais dificultam a realização da técnica em amostras biológicas e podem acarretar artefatos ou danos em microestruturas de interesse (PIOCH et al., 1997; WILSON; BACIC, 2012). Nesse sentido, a microscopia confocal (usualmente associada à fluorescência) apresentou-se como uma vantajosa alternativa para o estudo morfológico da interface dente-restauração, na medida que simplificou o processo de preparo de amostras de origem dentária, como abordado adiante (WATSON; BOYDE, 1991).

Na década de oitenta, Watson e Boyde foram os pioneiros na aplicação de microscopia confocal na pesquisa odontológica (WATSON; BOYDE, 1987b, 1987c). Trabalharam no primeiro microscópio confocal entregue a uma faculdade de Odontologia, o qual, no caso, era um microscópio de varredura Tandem (MVT) (WATSON, 1997). Neste tipo de equipamento, a imagem confocal era obtida através de um conjunto de discos giratórios (discos de Nipkow) contendo pequenos orifícios conhecidos como *pinholes*. O princípio da microscopia confocal era o mesmo: o *pinhole* permite passagem de luz proveniente de estruturas em foco, enquanto que suprime feixes refletidos/emitted de pontos fora de foco na amostra (STEPHENS; ALLAN, 2003). A Figura 6 apresenta um esquema do princípio óptico no MVT.

Nota: Feixes de iluminação/excitação em verde e de reflexão/emissão em azul.

Fonte: Adaptação de Stephens e Allan (2003).

Figura 6 - Esquema de óptica no microscópio confocal de varredura Tandem

Em suas primeiras publicações de estudos (*ex vivo* essencialmente) realizados com o MVT, Watson e Boyde divulgaram fotomicrografias do esmalte, da dentina e da interface dente-restauração – obtidas com o MVT operando no modo de reflexão de luz – e discutiam em que aspectos a microscopia confocal superava outras técnicas microscópicas na caracterização morfológica de tais tecidos/estruturas (WATSON; BOYDE, 1987b, 1987c). A Figura 7 mostra uma das primeiras imagens de tecido dentário obtida com o MVT.

Nota: Os túbulos dentinários aparecem como listras (regiões mais claras). 50×/1,0 AN em óleo.

Fonte: WATSON; BOYDE (1987b).

Figura 7 - Microscopia confocal no modo de reflexão de luz da dentina humana

De acordo com Watson e Boyde (1987b), a análise de estruturas dentárias com microscopia de luz comum era de pouca valia, porque tecidos como a dentina refletem pouca luz. O MVT (a princípio no modo de reflexão) oferecia uma solução para esse problema: com ele era possível obter imagens de alto contraste mesmo de estruturas que refletiam pouco ou que não estivessem polidas. Em se tratando de microscopia confocal, a técnica apresentava vantagens, ainda, sobre a epifluorescência (em relação à maior capacidade de resolver imagens de subsuperfície) e sobre a microscopia eletrônica, por dispensar as etapas de desidratação de amostra e cortes seriados por exemplo. Em suma, o MVT permitia a obtenção de imagens de superfície e de subsuperfície (com profundidade limitada) de estruturas dentárias úmidas, estando os espécimes em condições mais naturais.

Embora os primeiros estudos acima mencionados tenham sido realizados com o MVT no modo de reflexão de luz, a aplicação de microscopia confocal na pesquisa odontológica (mais especificamente em Dentística) alcançou maior impacto quando o modo

de fluorescência passou a ser utilizado. E foram Watson e Boyde, mais uma vez, os responsáveis pela introdução de uma nova forma de se observar a interface dente-restauração: através da dispersão de corantes fluorescentes tradicionais a sistemas adesivos odontológicos. Em 1987, esses pesquisadores publicaram um trabalho em que o sistema adesivo Scotchbond (da época) havia sido misturado com os corantes acriflavina ou rodamina B e utilizado na restauração de cavidades cervicais em terceiros molares extraídos para que a interface dente-restauração pudesse ser analisada no MVT por fluorescência (WATSON; BOYDE, 1987a). Os autores concluíram que tal estratégia, de fato, permitia localizar a distribuição de agentes de união em esmalte e dentina. No modo de fluorescência, apenas as estruturas marcadas – no caso, os adesivos – eram visualizadas. A visualização dos tecidos mineralizados podia ser realizada complementarmente por reflexão. Informações sobre a concentração dos corantes fluorescentes nos componentes resinosos e sobre a forma com que foram misturados não constaram na descrição do método, ainda que se tratasse de uma publicação inicial.

Para melhorar a especificidade das análises no MVT no modo de fluorescência, dois tipos de filtro passa-banda (*bandpass filter*) eram empregados comumente (WATSON; BOYDE, 1987a; WATSON, 1989). O filtro de excitação servia para limitar o amplo espectro da lâmpada de mercúrio (fonte de excitação no MVT), permitindo a passagem de comprimentos de onda congruentes com a banda de absorção do corante fluorescente em uso. Assim, prevenia-se a excitação de outras fontes de fluorescência (como a autofluorescência em certas estruturas) e reduzia-se a reflexão de luz por estruturas não marcadas no espécime. Já o filtro de emissão permitia a passagem de comprimentos de onda emitidos por dado fluoróforo e bloqueava a luz indesejada fora de sua banda emissão (como a luz de excitação refletida pelo espécime por exemplo). Ao bloquear emissões/reflexões indesejadas, o conjunto de filtros passa-banda assegurava um fundo (*background*) mais escuro, ou seja, melhor contraste.

O efeito da utilização de filtros passa-banda pode ser observado no trabalho de Watson (1989). Para avaliar a distribuição do antigo sistema adesivo Scotchbond 2 na interface dente-restauração, o *primer* e/ou adesivo foram modificados com corantes fluorescentes (fluoresceína ou rodamina B em esquemas alternados). Durante as análises no MVT, filtros de excitação e emissão de 460 nm e 520 nm, respectivamente, foram utilizados para a visualização dos componentes contendo fluoresceína. Para a rodamina B, um conjunto

de 546 nm (excitação) e 600 nm (emissão). A Figura 8 mostra alguns dos resultados daquele experimento de Watson.

Nota: À esquerda, estruturas visualizadas com filtro de excitação (546 nm) e sem filtro de emissão. Tanto a reflexão da dentina (túbulos), como a fluorescência do adesivo contendo rodamina B foram registradas. À direita, fotomicrografia do mesmo campo com uso de filtro de emissão de 600 nm. Apenas a fluorescência do adesivo na interface de adesão foi detectada. Barras de escala de 50 μ m.

Fonte: WATSON, 1989.

Figura 8 - Microscopia confocal da interface dentina-adesivo com uso de filtros passa-banda

O pesquisador mostrou que, quando as amostras foram examinadas sem o filtro de emissão apropriado, a luz (de excitação) refletida por estruturas não marcadas (ex.: dentina) podia ser visualizada. Já com o filtro de emissão incorporado ao sistema, bloqueava-se a passagem de luz refletida, registrando-se apenas a fluorescência dos polímeros marcados na interface de adesão.

Com a possibilidade de utilização de diferentes filtros no MVT, realizaram-se também, experimentos de dupla marcação. Watson e Wilmot (1992) adotaram tal estratégia para caracterizar, morfologicamente, a interface dente-restauração do sistema adesivo Syntac daquela época. Marcou-se o *primer* com rodamina B – a qual, segundo os autores, havia sido ligada aos monômeros pelos fabricantes – e outros corantes (auramina O, fluoresceína ou rodamina B) foram dispersados no adesivo. Utilizando conjuntos de filtros apropriados, os autores defendiam que era possível identificar a distribuição espacial de componentes individuais na interface de adesão, como exemplifica a Figura 9.

Nota: (C) resina composta; (D) dentina. Filtros de excitação/emissão de 490/520 nm (fluoresceína) e de 546/600 nm (rodamina B); 60×/1,4 AN em óleo.

Fonte: WATSON; WILMOT, 1992.

Figura 9 - Fotomicrografia mostrando a distribuição, em dentina, do adesivo (em verde) e do *primer* (em vermelho) marcados com fluoresceína e rodamina B respectivamente

Devido ao fato de corantes como rodamina e fluoresceína apresentarem largas bandas de emissão que se sobrepõem parcialmente, a ocorrência de *crosstalk* em esquemas de dupla marcação é apontada como potencial artefato de técnica (WATSON, 1997; D'ALPINO et al., 2006a).

Além da microscopia confocal de varredura Tandem (MCVT), com a qual se estabeleceram as bases do uso de corantes fluorescentes em sistemas adesivos, outros tipos de microscopia confocal passaram a ser aplicados na avaliação da interface dente-restauração. Dentre eles, tem destaque a MCVL (WATSON; BOYDE, 1991; PIOCH et al., 1997; TOLEDANO et al., 2013). O Quadro 2 apresenta uma comparação de características entre a MCVT e a MCVL onde se observa que a maior resolução é uma das vantagens da MCVL.

	Microscopia confocal de varredura Tandem	Microscopia confocal de varredura a laser
Dispositivo confocal	Discos de Nipkow, que contêm pequenos orifícios e microlentes.	Diafragma (<i>pinhole</i>) interposto no trajeto de feixes conjugados para eliminar luz fora de foco.
Fonte de excitação	Lâmpada de amplo espectro (arco de mercúrio ou xenônio) em conjunto com filtros de excitação.	Linhas de laser (ex.: 488 nm, 532 nm, 635 nm, etc.) compatíveis com as bandas de excitação da maioria dos fluoróforos sintéticos disponíveis.
Detectores de emissão	Sensor CCD (<i>charge-coupled device</i> , ou dispositivo de carga acoplada).	Tubo fotomultiplicador, que é capaz de detectar emissões pontuais, porém sua eficiência em converter luz em sinal elétrico é limitada, comparando-o com sensor CCD.
Varredura	A amostra é iluminada e a luz emitida de vários pontos é detectada simultaneamente.	O fino feixe de laser é varrido ponto a ponto e o sinal (emissão) detectado sequencialmente a partir de cada ponto pelo tubo fotomultiplicador, para formar uma imagem completa do plano focal.
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> rápida aquisição de imagem (ideal para se registrar processos dinâmicos). o tipo de iluminação implica em baixo risco de fotobranqueamento do fluoróforo e de danificar a amostra. 	<ul style="list-style-type: none"> maior resolução. maior capacidade de coletar seções ópticas bastante finas e em regiões mais profundas do espécime. pode ser utilizado para outros fins, que não registrar imagens, como estudos envolvendo fotobranqueamento.
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> menor capacidade de eliminar luz fora de foco. não pode resolver seções ópticas tão finas como a microscopia confocal de varredura a laser. 	<ul style="list-style-type: none"> maior tempo de aquisição de imagem. requer iluminação potente, que aumenta o risco de fotobranqueamento do fluoróforo.

Quadro 2 - Comparações de características entre a microscopia confocal de varredura Tandem e a microscopia confocal de varredura a laser (no modo de fluorescência)

Com a MCVL, incrementou-se o nível de detalhes registrados da morfologia da interface dente-restauração, como exemplifica a Figura 10.

AL= camada de adesivo; C= resina composta; D= dentina;
HL= camada híbrida; OIL= camada de inibição por oxigênio;
T= tag de resina.

Fonte: WAGNER et al., 2014.

Figura 10 - Microscopia confocal de varredura a laser. Interface dentina-adesivo registrada com o uso de um adesivo universal contendo rodamina B (isotiocianato)

A Figura 10 marca, nitidamente, transições entre diferentes estruturas morfológicas, como a camada de adesivo e a camada híbrida. Tais transições não costumavam ser registradas nas imagens obtidas anteriormente com o MVT (ex.: Figuras 8 e 9). Além disso, ao se observar *tags* de resina sobrepostas (Figura 10), tem-se a impressão de profundidade. Com a MCVL é possível coletar finas (micrométricas) seções ópticas sequenciais através do espécime – o que se chama de *Z-stack* – que podem ser sobrepostas, formando uma imagem com características tridimensionais (D’ALPINO et al., 2006a; SEMWOGERERE; WEEKS, 2008). É importante observar, no entanto, que a opacidade da dentina humana limita a capacidade de registrar seções ópticas mais profundas. O que se obtém da dentina, normalmente, é uma imagem formada pela sobreposição de algumas seções ópticas que dá a impressão de um plano focal estendido.

O desenvolvimento da microscopia de excitação por dois fótons (MEDF) acabou repercutindo na aplicação da microscopia confocal no estudo da interface dente-restauração (WATSON et al., 2000; SIDHU et al., 2002; D’ALPINO et al., 2006c). O fenômeno de excitação por dois fótons surge da absorção (pelo fluoróforo) simultânea de dois fótons, cujos comprimentos de onda são mais longos do que o da luz emitida resultante. Este processo de excitação tem vantagens únicas: maior profundidade de penetração nos espécimes (centenas de micrômetros), menor fototoxicidade e menor chance de ocorrer fotobranqueamento (*photobleaching*) do fluoróforo (DIASPRO; ROBELLO, 2000; SO et al., 2000). O fotobranqueamento, comumente causado pelo uso de elevada intensidade de laser (excitação), é um processo fotoquímico envolvendo modificações covalentes irreversíveis que convertem o fluoróforo em um produto não fluorescente (GHAUHARALI; BRAKENHOFF, 2000; BERNAS et al., 2005).

Com a utilização dessas diferentes técnicas de microscopia confocal, os pesquisadores têm sido capazes de avaliar desde aspectos básicos da morfologia da interface dentina-adesivo – como a espessura da camada de adesivo e da camada híbrida, quantidade e comprimento de *tags* de resina, etc. – até falhas associadas à infiltração e polimerização heterogêneas de componentes resinosos na dentina úmida (D’ALPINO et al., 2006a). Uma dessas falhas é conhecida como micropermeabilidade (SIDHU; WATSON, 1998; SAURO et al., 2008, 2010). O termo (micropermeabilidade) foi usado pela primeira vez por Sidhu e Watson (1998), ao se avaliar características interfaciais da dentina aderida à cimentos de ionômero de vidro modificados por resina. Tal termo se referia, originalmente, à difusão de fluidos na interface de adesão e nas porosidades do material restaurador. A técnica consiste

em injetar uma solução de corante fluorescente (originalmente a rodamina B) na câmara pulpar de dentes restaurados *ex vivo*, de forma que a solução atinja, via túbulos dentinários, a interface dentina-adesivo – inicialmente em torno das *tags* de resina até atingir, possivelmente, ramos laterais dos túbulos dentinários e microporosidades na base da camada híbrida. Para melhorar a evidenciação da micropermeabilidade via MCVL, os pesquisadores passaram a utilizar um corante fluorescente na solução injetada via câmara pulpar (ex.: fluoresceína) e outro disperso no sistema adesivo (ex.: rodamina B) (D'ALPINO et al., 2006c; TOLEDANO et al., 2014). O resultado dessa inovação pode ser observado na Figura 11.

Nota: (A) difusão de fluoresceína (em verde; solução injetada via câmara pulpar) ao redor de *tags* de resina e na base da camada híbrida (seta e indicador). (A1) mesmo campo em que apenas a emissão da fluoresceína foi registrada. (A2) mesmo campo em que apenas a fluorescência da rodamina B foi registrada, evidenciando a distribuição do sistema adesivo na interface de adesão.

a= adesivo; d= dentina; t= túbulo dentinário; rt= tag de resina.

Fonte: TOLEDANO et al., 2014.

Figura 11 - Microscopia confocal de varredura a laser. Caracterização de micropermeabilidade na interface dentina-adesivo

Similarmente, o termo nanoinfiltração (*nanoleakage*), criado por Sano et al. (1994b), tem sido empregado para designar a difusão de fluidos em espaços nanométricos na camada híbrida (TAY et al., 2002). Embora o método original de investigação da nanoinfiltração envolvesse o uso de MEV e impregnação de íons de prata, o fenômeno passou a ser investigado por MCVL da mesma forma que a micropermeabilidade (DÖRFER et al., 2000; DING et al., 2010; TOLEDANO et al., 2013).

O Quadro 3 apresenta uma lista dos principais estudos desenvolvidos com o emprego de sistemas adesivos modificados com corantes fluorescentes até então. Nesse quadro, é possível observar o tipo de microscopia confocal utilizada, os substratos analisados, bem como o objetivo da análise microscópica em cada estudo.

Referência	Técnica de microscopia	Substrato analisado	Objetivo da microscopia
Watson e Boyde (1987a)	MCVT	esmalte-adesivo; dentina-adesivo	Avaliação do efeito de tratamentos de superfícies mineralizadas na adaptação e penetração do sistema adesivo.
Watson (1989)	MCVT	esmalte-adesivo; dentina-adesivo	Caracterização de interfaces com o uso de diferentes corantes fluorescentes.
Watson e Wilmot (1992)	MCVT	dentina-adesivo	Avaliar adaptação e penetração de adesivo de acordo com espessura de <i>smear layer</i> e orientação de túbulos dentinários.
Pioch et al. (1997)	MCVL	esmalte-adesivo; dentina-adesivo; silano-cerâmica	Caracterização morfológica de diferentes interfaces de acordo com o tempo de condicionamento de superfície, dentre outros.
Schüpbach, Krejci e Lutz (1997)	MCVL	dentina-adesivo	Avaliação do efeito da orientação de túbulos dentinários na formação da camada híbrida.
Griffiths, Watson e Sherriff (1999)	MCVT/ MCVL	dentina-adesivo	Avaliar micropermeabilidade de acordo com sistema adesivo e técnica de aplicação.
Krejci et al. (1999)	MCVL	esmalte-adesivo; dentina-adesivo	Avaliar adaptação marginal de sistemas adesivos após termociclagem.
Pioch et al. (1999)	MCVL	dentina-adesivo	Avaliar o aspecto da camada híbrida em superfícies (dentina) tratadas com NaOCl a 10%.
Grobler et al. (2000)	MCVL	dentina-adesivo	Avaliação de microinfiltração em sistemas adesivos para amálgama.
Pioch et al. (2003)	MCVL	dentina-adesivo	Caracterização de interfaces submetidas a diferentes tipos e tempos de condicionamento.
D'Alpino et al. (2006c)	MEDF	dentina-adesivo	Avaliação de micropermeabilidade.
Foxton et al. (2008)	MCVL	dentina-adesivo	Avaliação de aspectos morfológicos em interfaces de diferentes sistemas adesivos.
Arrais et al. (2009)	MCVL	dentina-adesivo; cimento-adesivo	Caracterização de interfaces de sistemas de cimentação adesiva com diferentes modos de polimerização.
Bitter et al. (2009a)	MCVL/ SEM	dentina-adesivo; resina-adesivo	Correlação entre técnicas microscópicas na avaliação de espessura de camada híbrida e número de túbulos penetrados.
Bitter et al. (2009b)	MCVL	dentina-adesivo; cimento-adesivo	Correlação entre características morfológicas de interfaces (obtidas com diferentes sistemas de cimentação adesiva) e resistência adesiva.
Francisconi et al. (2009)	MCVL	dentina-adesivo	Avaliação de defeitos marginais em interfaces de restaurações cervicais submetidas à fadiga.
Ding et al. (2010)	MCVL	dentina-adesivo	Correlação entre falhas na camada híbrida e resistência adesiva.
Ramesh Kumar et al. (2011)	MCVL	esmalte-adesivo	Avaliação de profundidade de penetração de monômeros em interfaces, de acordo com diferentes sistemas adesivos e tipo de condicionamento.
Sampaio et al. (2011)	MCVL	dentina-adesivo	Avaliar características interfaciais de restaurações adesivas realizadas com bases cavitárias e submetidas à termociclagem.
Wolff et al. (2012)	MCVL	compósito-adesivo	Avaliação de difusão de monômeros resinosos em compósitos reforçados por fibras.
Langer e Ilie (2013)	MCVL	dentina-adesivo	Avaliação de capacidade de infiltração em dentina de diferentes classes de sistemas adesivos.
Toledano et al. (2013)	MCVL	dentina-adesivo	Caracterização de interfaces obtidas com adesivo dopado com partículas de zinco (micropermeabilidade/ nanoinfiltração).
Toledano et al. (2014)	MCVL	dentina-adesivo	Avaliar o efeito do tipo de condicionamento de superfície e de ciclagem mecânica na micropermeabilidade e remineralização de interfaces de adesão.
Wagner et al. (2014)	MCVL	dentina-adesivo	Caracterização de interfaces de sistemas adesivos universais de acordo com o modo de aplicação (convencional ou autocondicionante).
Wang et al. (2016)	MCVL	dentina-adesivo	Avaliação de aspectos morfológicos gerais em interfaces de sistemas adesivos não simplificados.

Quadro 3 - A microscopia confocal no estudo da interface de adesão com sistemas adesivos modificados com corantes fluorescentes

Gradativamente, limitações do uso de corantes fluorescentes na avaliação da interface dente-restauração passaram a ser consideradas. Watson (1997) chamou a atenção para fatores com impacto na técnica microscópica: o fotobranqueamento, falsos positivos em decorrência de *crosstalk* em esquemas de dupla marcação e a lixiviação/difusão de fluoróforos, originalmente nos adesivos marcados, para as estruturas dentárias adjacentes (de forma que a detecção da fluorescência poderia indicar a presença do corante apenas em vez do material resinoso a que havia sido disperso). Mencionou-se, sucintamente, que as propriedades dos materiais dispersantes deveriam ser verificadas para garantir que a adição de corante não lhes causaria alterações.

D'Alpino e colaboradores, mais tarde, revisaram o uso de corantes fluorescentes na avaliação de restaurações adesivas, apontando de forma mais incisiva a preocupação com o possível efeito do corante sobre propriedades físico-químicas dos agentes de união (D'ALPINO et al., 2006a). Segundo os autores, a adição de corantes poderia reduzir o grau de conversão dos adesivos, bem como a resistência de união a substratos dentários. De fato, a maioria dos estudos não menciona a concentração exata do corante misturado com o adesivo. Esta carência de informações sugere que a quantidade de corantes fluorescentes (nos adesivos) tem sido selecionada de forma empírica, inclusive por faltarem evidências do possível efeito da concentração do corante sobre a qualidade da análise microscópica (em termos de equilíbrio entre intensidade de fluorescência e ruído de fundo por exemplo) e sobre uma série de características físico-químicas relacionadas ao processo de adesão.

As informações reunidas no Quadro 4 ratificam a falta de padronização em relação à concentração de corante fluorescente em polímeros odontológicos.

Referência	Sistema adesivo	Componente marcado	Corante fluorescente	Concentração* do corante
Watson e Boyde (1987a)	ScotchBond	<i>primer</i> / adesivo	acriflavina (<i>primer</i>) / rodamina B (adesivo)	não consta
Watson (1989)	ScotchBond 2	<i>primer</i> / adesivo	fluoresceína / rodamina B (várias combinações)	não consta
Watson e Wilmot (1992)	Syntac	<i>primer</i> / adesivo	fluoresceína / rodamina B / outros (várias combinações)	não consta
Pioch et al. (1997)	vários	<i>primers</i> / adesivos	rodamina B (várias combinações)	0,1% **
Schüpbach, Krejci e Lutz (1997)	A.R.T. Composite Bonding System	<i>primer</i>	rodamina B	0,1% **
Griffiths, Watson e Sherriff (1999)	Optibond / Clearfil Liner Bond 2/ Pertac Universal Bond	<i>primers</i> / adesivos	rodamina B / luciferina (várias combinações)	não consta
Krejci et al. (1999)	Optibond	adesivo	rodamina B	0,01% **
Pioch et al. (1999)	Syntac / Gluma CPS / Prime & Bond 2.1	<i>primers</i>	rodamina B (isotiocianato)	≈ 0,1% **
Grobler et al. (2000)	vários	adesivos	rodamina B (isotiocianato)	0,066% **
Pioch et al. (2003)	Optibond SOLO	<i>primer</i>	rodamina B (isotiocianato)	≈ 0,1% **
D'Alpino et al. (2006c)	Adper Single Bond	adesivo	rodamina B	0,16 mg/ml
Foxton et al. (2008)	Adper Prompt L-Pop / i-Bond / OBF 2	adesivos	rodamina B	2-3 gramas (volume não informado)
Arrais et al. (2009)	All Bond 2 / Bond 1	<i>primers</i>	fluoresceína	40 µg/ml (All Bond 2); 160 µg/ml (Bond 1)
Bitter et al. (2009a)	Clearfil New Bond	adesivo	rodamina B (isotiocianato) / fluoresceína sódica	0,1% **
Bitter et al. (2009b)	vários	<i>primers</i> / adesivos	fluoresceína sódica	0,1% **
Francisconi et al. (2009)	Adper Single Bond 2	adesivo	rodamina B	0,16 mg/ml
Ding et al. (2010)	Prime & Bond NT / Syntac Classic	<i>primers</i>	rodamina B (isotiocianato)	0,1% **
Ramesh Kumar et al. (2011)	Transbond XT / Transbond Plus	<i>primers</i>	rodamina B	0,1 mmol/l
Sampaio et al. (2011)	Adper Single Bond 2	adesivo	rodamina B	0,16 mg/ml
Wolff et al. (2012)	Optibond-FL	adesivo	rodamina B (isotiocianato)	não consta
Langer e Ilie (2013)	vários	<i>primers</i> / adesivos	azul do nilo / rodamina B (isotiocianato)	0,1% **
Toledano et al. (2013)	Adper Single Bond Plus	adesivo	rodamina B	0,2% em massa
Toledano et al. (2014)	Adper Single Bond e Clearfil™ SE Bond	<i>primer</i> / adesivos	rodamina B	0,05% em massa em cada componente
Wagner et al. (2014)	vários adesivos (universais e autocondicionantes)	adesivo	rodamina B (isotiocianato)	0,008% em massa
Wang et al. (2016)	Adper Scotchbond Multi-Purpose e Clearfil SE Bond	adesivos	rodamina B	0,1 mg/mL

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

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

≈ aproximadamente.

Quadro 4 - Utilização de corantes fluorescentes em diferentes sistemas adesivos

Motivados pela falta de padronização da concentração de corantes fluorescentes em componentes adesivos, D'Alpino et al. (2006b) investigaram se a adição de rodamina B ao sistema adesivo (convencional simplificado) Adper™ Single Bond poderia influenciar certas propriedades da resina. Concluíram que sim: 1,33 mg daquele corante por mililitro do adesivo causou impacto negativo na resistência adesiva em dentina e na polimerização (grau de conversão), enquanto que concentrações menores (como 0,16 mg/mL) não afetaram tais medidas. Com base naquele estudo, a concentração de 0,16 mg/mL de rodamina B foi adotada na marcação de adesivos em estudos posteriores (D'ALPINO et al., 2006c; FRANCISCONI et al., 2009; SAMPAIO et al., 2011). Aqui, é importante chamar a atenção para alguns fatos. Primeiramente, os achados de D'Alpino et al. (2006b) são válidos para um sistema adesivo específico e propriedades específicas, não devendo ser extrapolados para outros sistemas que não foram avaliados quando à adição de rodamina B ou outros corantes fluorescentes. Além disso, embora a concentração de 0,16 mg/mL tenha sido considerada segura em termos de certas propriedades da resina, não se confirmou, microscopicamente, se aquela é mesmo a melhor relação entre concentração de rodamina B e intensidade da fluorescência. Possivelmente, concentrações ainda menores podem ser capazes de emitir fluorescência suficiente para a realização da análise morfológica via MCVL.

Por fim, é preciso mencionar que nenhum dos trabalhos aqui revisados incluiu, no delineamento dos experimentos, quaisquer estratégias com a finalidade de avaliar aspectos fotofísicos dos corantes fluorescentes quando dispersos em sistemas adesivos odontológicos. Conforme abordamos acima, o comportamento fluorescente de corantes pode ser influenciado pela substância dispersante; conhecê-lo é de fundamental importância para a determinação das condições ideais para a realização da MCVL, tendo em vista o uso racional do agente fluorescente nas resinas adesivas.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Neste estudo, foram sistematizadas estratégias para a adição de rodamina B (RB) e fluoresceína sódica (FS) a um sistema adesivo convencional de três passos – Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose (MP) – e a um autocondicionante de dois passos – Clearfil™ SE Bond (SE) – considerados “padrão-ouro” na Odontologia. Tais estratégias visaram a determinação da menor faixa de concentrações de cada corante (em cada adesivo) necessária para se obter imagens satisfatórias da interface dentina-adesivo através de MCVL.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar os espectros de emissão e de excitação da RB e da FS nos adesivos MP e SE quanto à possível influência do meio (polímero) e da concentração de corante sobre parâmetros fotofísicos;
- b. determinar se o fenômeno de supressão de fluorescência ocorre em amostras polimerizadas dos adesivos MP e SE contendo elevadas concentrações de RB ou FS;
- c. determinar se a fluorescência da FS – sensível a variações de pH – é reduzida no adesivo SE, que contém monômeros ácidos;
- d. avaliar se a adição de RB ou FS (diversas concentrações) aos adesivos MP e SE afeta o grau de conversão;
- e. avaliar se a adição de RB ou FS (diversas concentrações) aos adesivos MP e SE afeta a molhabilidade das resinas.

4 METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS NECESSÁRIOS PARA A REALIZAÇÃO DO ESTUDO

Os principais materiais utilizados neste estudo estão descritos no Quadro 5.

Produto	Categoria	Composição
Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose – Primer 3M ESPE, St Paul, MN, EUA <i>Lote: N481327</i>	Componente <i>primer</i> de sistema adesivo convencional de três passos.	- água (40–50%) - HEMA (35–45%) - copolímero de ácido polialcenoico
Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose – Adhesive 3M ESPE, St Paul, MN, EUA <i>Lote: N494505</i>	Componente adesivo de sistema adesivo convencional de três passos.	- BisGMA (60–70%) - HEMA (30–40%) - iniciadores < 0,5%
Clearfil™ SE Bond – Primer Kuraray Co. Ltda., Osaka, Japão <i>Lote: 01147A</i>	Componente <i>primer</i> de sistema adesivo autocondicionante de dois passos.	- HEMA (10–30%) - 10-MDP - água - dl-canforoquinona
Clearfil™ SE Bond – Bond Kuraray Co. Ltda., Osaka, Japão <i>Lote: 01714A</i>	Componente adesivo de sistema adesivo autocondicionante de dois passos.	- BisGMA (25–45%) - HEMA (20–40%) - 10-MDP - dimetacrilatos hidrofóbicos - dl-canforoquinona - sílica coloidal
Ethanol ACS reagent ≥ 99,5% Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Gillingham, Nwe Rd, Reino Unido <i>Lote: SHBF2299V</i>	Etanol com alto grau de pureza.	etanol 99,5 °GL C_2H_6O (MM = 46,07 u)
Rhodamine B for fluorescence Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Gillingham, Nwe Rd, Reino Unido <i>Lote: BCBK4860V</i>	Corante fluorescente rodamina B.	$C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ (MM = 479,01 u)
Fluorescein Sodium Salt Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Gillingham, Nwe Rd, Reino Unido <i>Lote: 080M0090V</i>	Corante fluorescente fluoresceína sódica (sal dissódico).	$C_{20}H_{10}Na_2O_5$ (MM = 376,27 u)

10-MDP= 10-metacrilóiloxidecil di-hidrogênio fosfato; **BisGMA**= bisfenol-A glicidil metacrilato; **HEMA**= 2-hidroxietil metacrilato; **MM**= massa molecular.

Quadro 5 - Principais materiais utilizados nas etapas experimentais e suas características

Informações complementares sobre a composição dos adesivos estão disponíveis no Apêndice A.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

O projeto de pesquisa referente a esse estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), tendo sido aprovado, CAAE: 37048414.3.0000.5417 (Anexo A). Este requisito se fez necessário, uma vez que um dos experimentos desenvolvidos envolveu a utilização de terceiros molares humanos hígidos, extraídos por motivos terapêuticos. Os dentes foram obtidos através de doações de cirurgiões-dentistas que atenderam em consultórios particulares, mediante assinatura dos termos de doação de dentes, conforme a regulamentação vigente do mesmo comitê.

4.3 ASPECTOS GERAIS DO DELINEAMENTO

Nesse estudo, os corantes fluorescentes RB e FS foram adicionados aos adesivos MP e SE em quatro concentrações decrescentes: 0,5; 0,1; 0,02 e 0,004 mg/mL. Os adesivos marcados foram empregados em testes de duas etapas principais. Na primeira delas, **focada nos fluoróforos**, investigaram-se aspectos do comportamento fluorescente da RB e da FS nos adesivos MP e SE com o auxílio de espectroscopia de fotoluminescência e MCVL. Essa primeira etapa envolveu a interpretação de espectros e de dados microscópicos (qualitativos) sem a necessidade de análise estatística. Já a segunda etapa do estudo, **focada nos adesivos**, foi dedicada à investigação do efeito da adição de fluoróforos sobre algumas propriedades físico-químicas das resinas. Avaliaram-se os adesivos marcados quanto ao grau de conversão através de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, bem como à molhabilidade através de medidas de ângulo de contato pelo método da gota séssil. Os resultados da segunda etapa foram submetidos à análise estatística, conforme o detalhado no item 4.11.

4.4 ADICIONANDO OS CORANTES FLUORESCENTES AOS ADESIVOS

Os corantes fluorescentes RB e FS (Figura 12) foram adicionados aos adesivos MP e SE por meio de um método de dispersão baseado no uso de soluções etanólicas de RB e FS.

Figura 12 - Pós de rodamina B (à esquerda) e de fluoresceína sódica (à direita) sobre vidros de relógios

4.4.1 Preparo de soluções etanólicas de rodamina B e fluoresceína sódica

Os corantes fluorescentes RB e FS foram dissolvidos em etanol para a obtenção das soluções de estoque etanol-RB (2,5 mg/mL ou $5,2 \times 10^{-3}$ mmol/mL) e etanol-FS (0,5 mg/mL ou $1,3 \times 10^{-3}$ mmol/mL). Para a preparo dessas soluções, 250 mg de pó de RB e 50 mg de FS foram pesados, separadamente, no interior de balões volumétricos de capacidade de 100 mL, utilizando-se balança analítica com legibilidade de 0,01 mg (GR-202, A&D ENGINEERING, INC., São José, CA, EUA). Em seguida, cada balão foi preenchido com 100 mL de etanol (alta pureza), tampado e agitado manualmente por trinta segundos. A agitação do sistema foi complementada com um banho ultrassônico (Ultracleaner USC-1600A, Unique, Indaiatuba, SP, Brasil) durante 15 min a 50 °C para completar a dissolução dos corantes. Diluições sequenciais foram, então, realizadas a partir das soluções de estoque de forma que, ao todo, obtiveram-se soluções etanólicas de RB e FS nas seguintes concentrações: 0,5; 0,1; 0,02 e 0,004 mg/mL.

4.4.2 Método de adição de corantes fluorescentes via alíquota de etanol

Amostras de 1,0 mL dos adesivos MP e SE foram marcadas com RB ou FS nas concentrações de 0,5, 0,1, 0,02 e 0,004 mg/mL (dados em mmol/mL no Apêndice B). A massa de corante necessária para a marcação de cada uma dessas amostras proveio de alíquota extraída calculadamente da solução de estoque etanol-RB ou etanol-FS (ou de solução diluída). O volume de cada alíquota etanólica, V_{AL} , foi determinado pela eq. (1),

$$V_{AL} = \frac{C_{AD} \times V_{AD}}{C_{AL}} \quad (1)$$

sendo C_{AD} a concentração (desejada) de corante fluorescente no adesivo, V_{AD} o volume de adesivo a ser modificado com o corante (fixado a 1,0 mL neste experimento) e C_{AL} a concentração de corante na alíquota (igual à concentração do corante na solução etanólica de origem).

Por exemplo, para o preparo de 1,0 mL de adesivo MP contendo 0,1 mg/mL de RB, foi necessária uma alíquota de 0,04 mL da solução de estoque etanol-RB (cuja concentração era de 2,5 mg/mL). De modo semelhante, para se acrescentar FS a 0,1 mg/mL em 1,0 mL de MP, utilizou-se uma alíquota de 0,2 mL da solução de estoque etanol-FS (cuja concentração era 0,5 mg/mL).

Uma vez calculados, os volumes das alíquotas foram coletados com micropipeta (Transferpette S, BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, Alemanha) e depositados dentro de microtubos de ensaio tipo Eppendorf. Os microtubos, contendo quantidades específicas de etanol/RB ou etanol/FS, foram colocados (com as tampas abertas) em uma estufa de laboratório a 80 °C até se observar a **completa evaporação do álcool**. Assim, somente a massa predeterminada de corante fluorescente permaneceu no interior dos recipientes para que o adesivo fosse acrescentado. Em seguida, quantidades de 1,0 mL dos adesivos MP ou SE foram depositadas nos microtubos correspondentes de acordo com as quatro concentrações de RB e FS. Para misturar e homogeneizar os componentes, utilizou-se uma broca de metal esférica de 1,0 mm de diâmetro adaptada em peça reta de mão para turbina odontológica (velocidade de até 20.000 rpm). A broca em rotação foi mantida em contato com a amostra resinosa por pelo menos 3,0 min. Os procedimentos foram realizados em ambiente iluminado por lâmpada amarela, evitando-se a exposição das resinas fotopolimerizáveis à luz branca.

4.5 ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA

Os adesivos MP e SE modificados com RB ou FS em diferentes concentrações foram empregados na confecção de discos de adesivo polimerizado para a espectrofluorimetria. Esses discos foram produzidos em matrizes metálicas cilíndricas (5,0 mm de diâmetro × 0,8 mm de altura) da seguinte forma. Depositaram-se alguns microlitros de adesivo no interior da matriz até preenchê-la. Então, uma tira de poliéster foi sobreposta à superfície livre da amostra e pressionada contra a matriz com o auxílio de uma lâmina de vidro, a fim de se eliminar o excesso de material. O adesivo foi fotopolimerizado por 30 s com um

fotopolimerizador de LED² (Radii-cal 2, SDI, Bayswater, Victoria, Austrália), cuja potência é de 1.200 mW/cm². Cada um dos discos produzidos foi analisado em um espectrofluorímetro (Spex Fluorolog FL3-222, Horiba Jobin Yvon Inc., Edison, Nova Jersey, EUA), operando com lâmpada contínua de xenônio de 450 W. Os espectros de emissão e de excitação da RB e da FS nas amostras de adesivo foram registrados conforme os parâmetros no Quadro 6.

	Parâmetros	Amostras contendo rodamina B	Amostras contendo fluoresceína sódica
Espectros de emissão	Faixa de detecção de emissão (nm)	525–700	450–700
	Comprimento de onda de excitação (nm)	516	430
	Tempo de integração (s)	0,2	0,4
	Incremento (nm)	0,2	1,0
	Fendas (nm)	0,8	1,0
Espectros de excitação	Faixa de excitação (nm)	275–575	300–550
	Comprimento de onda de emissão monitorado em (nm)	587	570
	Tempo de integração (s)	0,2	0,4
	Incremento (nm)	0,2	1,0
	Fendas (nm)	0,8	1,0

Quadro 6 - Parâmetros utilizados na análise dos adesivos por espectroscopia de fotoluminescência

Além das análises realizadas com os adesivos MP e SE, as soluções etanólicas de RB e FS também foram testadas no espectrofluorímetro.

4.6 DIAGRAMA CIE DE CROMATICIDADE

Os espectros de emissão (dados originais, não normalizados) coletados dos adesivos MP e SE contendo FS ou RB (em diferentes concentrações) foram processados no programa

² LED: *light emitting diode*, ou diodo emissor de luz.

computacional Spectra Lux v.2.0 (Ponto Quântico Nanodispositivos) para a obtenção das coordenadas cromáticas XYZ no diagrama CIE de cromaticidade.

4.7 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (MCVL) PRELIMINAR DE ADESIVOS MARCADOS COM RB/FS

Os adesivos MP e SE preparados com concentrações decrescentes de RB ou FS foram avaliados microscopicamente via MCVL (Leica TCS SPE, Leica Microsystems CMS, Mannheim, Alemanha). Cerca de 30 μ L de cada adesivo marcado foram transferidos, com o auxílio de micropipeta, sobre lâminas microscópicas. Uma lamínula de vidro foi sobreposta sobre cada amostra de resina fluida como ilustra a Figura 13.

Figura 13 - Montagem de amostra de adesivo (marcado com rodamina B) sobre lâmina microscópica para a avaliação preliminar via microscopia confocal de varredura a laser

Em seguida, realizou-se a fotopolimerização da amostra de adesivo com luz de LED (Radii-cal 2, SDI) durante 10 s. Todas as amostras em suas respectivas lâminas foram armazenadas ao abrigo da luz até o momento da avaliação microscópica. Para que a intensidade da fluorescência dos corantes RB/FS pudesse ser comparada em função de suas concentrações nos adesivos, todas as amostras foram analisadas com parâmetros padronizados, conforme o indicado no Quadro 7.

	Parâmetro	Amostras marcadas com rodamina B	Amostras marcadas com fluoresceína sódica
Especificações da objetiva	Ampliação	40×	40×
	Abertura numérica	1,15	1,15
Especificações da varredura	Resolução xy (μm)	275 × 275	275 × 275
	Faixa de detecção de emissão (nm)	550–675	500–600
	Voltagem no tubo fotomultiplicador (V)	780	780
Especificações do laser	Tipo de laser	Estado sólido	Estado sólido
	λ_{EX} (nm)	532	488
	Intensidade FOAA (%)	10	15

λ_{EX} = comprimento de onda de excitação. As linhas de laser foram selecionadas, para cada corante fluorescente, com base em (a) dados dos espectros de excitação registrados em etapa anterior e (b) de acordo com os lasers disponíveis na unidade de energia do microscópio confocal utilizado; FOAA= filtro óptico-acústico ajustável.

Quadro 7 - Parâmetros utilizados na microscopia confocal de varredura a laser preliminar dos adesivos marcados com rodamina B ou fluoresceína sódica

Este experimento preliminar complementou o estudo espectroscópico realizado com os adesivos marcados, permitindo o estabelecimento de comparações entre dados espectroscópicos e visuais/qualitativos (análise microscópica).

4.8 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (MCVL) DA INTERFACE DENTINA-ADESIVO

Com base nos resultados da MCVL preliminar, os adesivos MP e SE contendo RB ou FS em certas concentrações de interesse foram pré-selecionados para a realização de MCVL em dentina, conforme indica o Quadro 10 na sessão de resultados. Cada combinação adesivo-corante foi utilizada na restauração (*ex vivo*) de pelo menos três dentes. Os procedimentos de preparo de espécimes de dentina descritos abaixo foram executados com respaldo em estudos anteriores (SANO et al., 1994a; DING et al., 2009).

Neste experimento, foram utilizados terceiros molares humanos obtidos conforme as informações no item 4.2. Após a coleta, os dentes foram limpos com o auxílio de cureta periodontal para a remoção de restos de tecidos periodontais. Depois de limpos, foram armazenados em solução de timol (0,1%), renovada semanalmente até serem empregados no preparo de espécimes.

Utilizando-se máquina de corte de precisão (ISOMET Low Speed, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), cada dente teve sua coroa seccionada transversalmente no terço oclusal com disco diamantado (Extec Corp – 102 mm × 0,3 mm × 12,7 mm, Enfield, CT, EUA) em baixa velocidade e sob refrigeração com água deionizada, a fim de se remover o esmalte da face oclusal e expor a superfície de dentina necessária para os procedimentos adesivos. As raízes também foram removidas parcialmente pelo terço médio para melhorar a forma final dos espécimes (Figura 14).

Figura 14 - Esquema de cortes transversais utilizados na planificação das coroas dentárias

Em sequência, as coroas planificadas foram submetidas à ação de desgaste em uma politriz, mantendo-se a superfície de dentina paralela à lixa giratória. Para a remoção de eventuais remanescentes de esmalte, empregou-se lixa d'água com granulação 320 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-320, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) em baixa rotação e sob refrigeração com água. Para a planificação final da superfície de dentina, bem como simular a formação de *smear layer*, utilizou-se lixa d'água com granulação 600 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-320, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA).

Após enxague abundante com água deionizada, cada coroa recebeu aplicação de sistema adesivo conforme as instruções no Quadro 8 abaixo. Lembramos que o componente adesivo de cada sistema se encontrava marcado com RB ou FS, conforme o indicado no Quadro 10 da sessão de resultados. Os *primers* foram utilizados nas composições originais de fábrica.

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

Quadro 8 - Instruções de aplicação dos sistemas adesivos, segundo a bula dos fabricantes

Após os procedimentos adesivos, um incremento único ($\approx 2,0$ mm de espessura) de resina composta Filtek Z250 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi assentado sobre a superfície de dentina tratada e fotopolimerizado por 40 s. As coroas restauradas foram armazenadas em água destilada (37 °C) e, após sete dias, foram cortadas mesiodistalmente em fatias de $\approx 1,0$ mm de espessura paralelas ao longo eixo do dente, utilizando-se uma máquina de corte ISOMET e um disco diamantado. Uma fatia de cada coroa foi selecionada aleatoriamente e avaliada por MCVL, utilizando-se parâmetros semelhantes aos citados no Quadro 7, contudo mais flexíveis em relação à intensidade de laser e à voltagem no tubo fotomultiplicador.

4.9 MEDIDAS DE GRAU DE CONVERSÃO

O grau de conversão (GC) dos adesivos MP e SE (puros e marcados com RB ou FS) foi avaliado através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), utilizando-se o espectrofotômetro IRPrestige-21 (Shimadzu, Tokyo, Japão). Amostras dos adesivos foram analisadas no modo de refletância por meio do acessório de refletância total atenuada MIRacle (PIKE Technologies, Madison, Estados Unidos da América), mostrado na Figura 15.

Nota: As amostras foram testadas sobre o pequeno cristal no centro de (B).

Figura 15 - (A) Acessório de refletância total atenuada MIRacle™, equipado com (B) cristal de diamante de ZnSe de refletância única

Inicialmente, o espectrofotômetro foi calibrado através do método de validação JP Validation disponível no programa IRsolution (Shimadzu, Colômbia, MD, EUA). A performance do MIRacle também foi verificada, de tal forma que a transmitância do cristal de ZnSe se mantivesse sempre a $\approx 30\%$ na região de 1.000 cm^{-1} (máximo número de onda no espectro de transmitância do cristal de ZnSe).

Após a coleta do espectro de referência (*background*), cada amostra de adesivo foi testada conforme a descrição a seguir. Dispensava-se uma amostra de resina fluida ($\approx 3,0\text{ }\mu\text{L}$) sobre o cristal do MIRacle com auxílio de micropipeta. Imediatamente, coletava-se o espectro de infravermelho da amostra (não polimerizada) através do programa IRsolution, utilizando-se os seguintes parâmetros de varredura: intervalo de número de onda de 1.560 cm^{-1} a 1.760 cm^{-1} , trinta e duas acumulações e resolução de $4,0\text{ cm}^{-1}$. Em seguida, **a mesma amostra** sobre o cristal era fotoativada com fonte de LED (Radii-cal 2, SDI) a uma distância fixa de $\approx 5,0\text{ mm}$. Após 1,0 min (a partir do final da fotoativação), coletava-se um novo espectro de infravermelho com os mesmos parâmetros de varredura citados acima.

Comparando-se o par de espectros de mesma amostra (antes e depois da polimerização), monitorou-se a mudança na absorbância em $\approx 1.635\text{ cm}^{-1}$ – referente à dupla ligação de carbono do grupo polimerizável dos metacrilatos (ver fórmulas estruturais dos principais metacrilatos em questão no Apêndice A). Para cada espectro coletado, o valor de absorbância em 1.635 cm^{-1} foi normalizado pela absorbância em 1.608 cm^{-1} , associada aos anéis benzênicos do BisGMA e usada como referência interna para normalização (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Espectros de infravermelho do adesivo Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose registrados antes e depois da fotopolimerização da (mesma) amostra

Desta forma, o GC de cada amostra foi calculado através da eq. (2), em que $R = (\text{absorbância em } 1.635 \text{ cm}^{-1})/(\text{absorbância em } 1.608 \text{ cm}^{-1})$ e as letras subscritas d e a significam deopo e antes da fotopolimerização respectivamente.

$$GC = 100 \times \left[1 - \left(\frac{R_d}{R_a} \right) \right] \quad (2)$$

Nesse experimento, cada adesivo em dada condição experimental (ver Quadro 9) foi avaliado em triplicata e os procedimentos ocorreram em ambiente com umidade do ar em torno de 45% e temperatura de $\approx 20^\circ\text{C}$.

4.9.1 Validação de dados espectroscópicos

Os espectros de infravermelho dos adesivos MP e SE (amostras não polimerizadas) puros e modificados com RB ou FS foram comparados, de modo a se verificar se a adição de corante às resinas não interferiu nas absorbâncias de bandas de interesse no cálculo de GC. As médias da proporção R_a de grupos de controle (adesivos puros) foram comparadas com as

médias dos grupos experimentais correspondentes (adesivos contendo RB ou FS em diferentes concentrações). Os resultados dessa análise estatística foram apresentados no Apêndice C.

4.10 MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO

A molhabilidade dos adesivos MP e SE, puros e modificados com os corantes RB ou FS, foi avaliada através de medidas de ângulo de contato (AC, indicado por θ). O AC de gotas sésseis dos adesivos sobre uma superfície sólida padrão foi medido através de um goniômetro computadorizado (OCA 15 Plus, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemanha), utilizando-se o método ADSA-P³ (SPELT et al., 1987; KWOK; NEUMANN, 1999; HOORFAR; NEUMANN, 2006). Este método consiste basicamente em:

- a. capturar a imagem do perfil da gota através da câmera integrada ao goniômetro;
- b. determinar, com programa de computador específico, a forma do perfil da gota, utilizando-se métodos de detecção de borda e segmentação de imagem;
- c. determinar uma linha de base para a gota sobre a superfície sólida;
- d. aplicar um modelo matemático sobre todo o perfil traçado;
- e. calcular o AC com equação baseada em tal modelo.

Devido à grande heterogeneidade da dentina humana, que compromete a medida de AC pelo método ADSA-P (WEGE et al., 2002, 2003), as medidas foram realizadas utilizando-se superfícies lisas e padronizadas de polimetacrilato de metila (PMMA). Lâminas retangulares de PMMA com dimensões de 5,0 × 2,0 × 0,2 mm foram recortadas a partir de chapas pré-fabricadas de acrílico – protegidas com uma película plástica removível contra contaminantes e riscos.

Para cada condição experimental (Quadro 9), pelo menos sete gotas de adesivo foram dispensadas sobre uma lâmina intacta de PMMA e avaliadas quanto ao AC (Figura 16). Cada gota (3,0 μ L) foi dispensada automaticamente através de uma seringa de 500 μ L – equipada

³ ADSA-P é a sigla, em inglês, para *Axisymmetric Drop Shape Analysis-Profile*.

com agulha metálica descartável com diâmetro interno de 0,6 mm – acoplada à unidade amostradora do goniômetro.

Figura 16 - Gotas de adesivo marcado com rodamina B dispensadas sobre lâmina de polimetacrilato de metila (PMMA) para a medida de ângulo de contato com o auxílio de goniômetro computadorizado

Devido ao baixo volume e à alta afinidade do adesivo pela agulha metálica, as gotas de adesivo tendiam a se formar na abertura da agulha e não pingavam espontaneamente na lâmina de PMMA (Figura 17).

Nota: Em (F), o efeito indesejado da atração entre o adesivo e a superfície externa da agulha.

Figura 17 - Imagens capturadas com a câmera digital do goniômetro. Sequência ilustrando a formação da gota de resina fluida na extremidade da agulha metálica

Assim, para padronizar a transferência da gota para a superfície sólida, a extremidade da agulha era aproximada da lâmina de PMMA até quase a tocar (Figura 18).

Figura 18 - Imagens registradas com a câmera digital do goniômetro. Sequência de transferência de adesivo para a superfície de polimetacrilato de metila (PMMA) para a medida de ângulo de contato

Sendo o adesivo (resina fluída hidrofóbica) e o PMMA apolares, cada gota era facilmente atraída pela superfície, conforme o amostrador automático do goniômetro empurrava o êmbolo da seringa (Figura 18B e 18C). Assim que os 3,0 μL de adesivo haviam sido expelidos pelo orifício da agulha, retirava-se a agulha cuidadosamente do interior da gota (Figuras 18D e 18E). Para cada amostra, as medidas de AC foram realizadas em intervalos cronometrados de 8 s e 30 s após a completa retirada da agulha do interior da gota. As imagens foram registradas em tempo real, utilizando-se o programa de computador SCA 202 (versão 3.12.10, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemanha) e o cálculo de AC obtido pela equação da elipse (*ellipse fitting*).

Os testes foram realizados em temperatura ambiente (25 °C aproximadamente) e sob penumbra para se evitar o efeito da incidência de luz branca sobre os adesivos fotopolimerizáveis. A seringa de vidro utilizada para a deposição das amostras de adesivo foi completamente encapada com papel alumínio.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis dependentes GC e AC foram analisadas, separadamente, por análise de variância (ANOVA) com dois fatores – **adesivo** e **tratamento**. Os fatores de estudo (variáveis independentes) e seus respectivos níveis foram detalhados no Quadro 9.

Fatores de estudo	Níveis
1. Adesivo	A. Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose B. Clearfil™ SE Bond
2. Tratamento	a. Controle (sem adição de corante fluorescente) b. Rodamina B a 0,5 mg/mL c. Rodamina B a 0,1 mg/mL d. Rodamina B a 0,02 mg/mL e. Rodamina B a 0,004 mg/mL f. Fluoresceína sódica a 0,5 mg/mL g. Fluoresceína sódica a 0,1 mg/mL h. Fluoresceína sódica a 0,02 mg/mL i. Fluoresceína sódica a 0,004 mg/mL

Quadro 9 - Fatores de estudo e níveis da análise de variância

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA

O Gráfico 4 mostra os espectros de emissão normalizados dos adesivos MP e SE (amostras polimerizadas) contendo diferentes concentrações do corante RB.

Nota: Comprimento de onda de excitação (λ_{EX}) de 516 nm.

Gráfico 4 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de emissão dos adesivos (A) Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e (B) Clearfil™ SE Bond (amostras polimerizadas) contendo rodamina B em diferentes concentrações

Os adesivos marcados com RB apresentaram fluorescência numa ampla faixa do espectro de luz visível compreendida entre o final da região dos verdes e início dos vermelhos. Os máximos de emissão da RB a 0,5 mg/mL em MP e SE foram encontrados em ≈ 587 nm e ≈ 599 nm (laranjas) respectivamente. Nota-se que os máximos de emissão se deslocaram, gradativamente, para comprimentos de onda mais curtos (*blueshift*) com a diminuição da concentração de RB nos adesivos MP (Gráfico 4A) e SE (Gráfico 4B).

O Gráfico 5 mostra a intensidade de emissão integrada em função da concentração de RB nos adesivos e em soluções de etanol.

Gráfico 5 - Intensidade de emissão integrada (normalizada) em função da concentração de rodamina B nos adesivos – Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose (MP) e Clearfil™ SE Bond (SE) – e em etanol (etOH)

Nos adesivos MP e SE (amostras polimerizadas), a intensidade de emissão integrada sempre aumentou com o aumento da concentração de RB. Em ambos os adesivos, a intensidade integrada foi, relativamente, proporcional à concentração de corante. De forma oposta, a intensidade de emissão integrada diminuiu gradativamente com o aumento da concentração de RB em etanol.

Os espectros de excitação dos adesivos MP e SE contendo RB em diferentes concentrações estão registrados no Gráfico 6. Tais espectros mostram bandas bem definidas em regiões de luz visível e ultravioleta.

Nota: Comprimento de onda de emissão (λ_{EM}) fixado em 587 nm.

Gráfico 6 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de excitação dos adesivos (A) Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e (B) Clearfil™ SE Bond (amostras polimerizadas) contendo rodamina B em diferentes concentrações

Nos espectros de excitação de MP (Gráfico 6A), os máximos de excitação da RB (em qualquer concentração) localizam-se no final da região dos verdes entre ≈ 555 – 564 nm. Máximos de excitação secundários aparecem na região do ultravioleta em cerca de 360 nm. Observam-se, ainda nos espectros do Gráfico 6A, máximos de excitação terciários em ≈ 396 nm (violeta). Já nos espectros de SE (Gráfico 6B), os máximos de excitação ocorrem entre ≈ 561 – 564 nm (verdes). Máximos secundários aparecem em cerca de 425 nm (violeta) e se registram, ainda, máximos terciários em ≈ 354 nm (ultravioleta).

O Gráfico 7 mostra os espectros de emissão normalizados dos adesivos MP e SE contendo diferentes concentrações do corante FS.

Nota: Comprimento de onda de excitação (λ_{EX}) de 430 nm.

Gráfico 7 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de emissão dos adesivos (A) Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e (B) Clearfil™ SE Bond (amostras polimerizadas) contendo fluoresceína sódica em diferentes concentrações

Os adesivos marcados com FS apresentaram emissões em ampla faixa do espectro de luz visível compreendida, majoritariamente, entre as regiões do azul (início em 475 nm) e do laranja (início em 590 nm). Os máximos de emissão da FS a 0,5 mg/mL em MP (Gráfico 7A) e SE (Gráfico 7B) se localizam em 532 nm e 512 nm respectivamente (região dos verdes). No Gráfico 7A, averigua-se que a diminuição da concentração de FS ($< 0,5$ mg/mL) em MP

provocou deslocamento dos máximos de emissão para menores comprimentos de onda (*blueshift*). Já nos espectros do adesivo SE contendo FS (Gráfico 7B), os máximos de emissão apresentam-se, praticamente, sobrepostos.

O Gráfico 8 mostra a intensidade de emissão integrada em função da concentração de FS nos adesivos (amostras polymerizadas) e em soluções de etanol.

Gráfico 8 - Intensidade de emissão integrada (normalizada) em função da concentração de fluoresceína sódica nos adesivos – Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose (MP) e Clearfil™ SE Bond (SE) – e em etanol (etOH)

Nos adesivos MP e SE, a intensidade de emissão integrada aumentou com o aumento da concentração de FS, o que pode ser mais bem observado acima de 2×10^{-2} mg/mL de corante. Em SE, a queda relativa na intensidade integrada de 5×10^{-1} mg/mL para 10^{-1} mg/mL de FS foi mais acentuada do que em MP. Já em soluções etanólicas de FS, a intensidade de emissão integrada foi superior na concentração de 2×10^{-2} mg/mL, tendendo a diminuir, abruptamente, acima dessa.

O Gráfico 9 mostra os espectros de excitação dos adesivos MP e SE contendo FS em concentrações decrescentes.

Nota: Setas indicam máximos de excitação secundários para concentrações de corante < 0,5 mg mL⁻¹. Comprimento de onda de emissão (λ_{EM}) fixado em 570 nm.

Gráfico 9 - Espectroscopia de fotoluminescência. Espectros de excitação dos adesivos (A) Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e (B) Clearfil™ SE Bond (amostras polimerizadas) contendo fluoresceína sódica em diferentes concentrações

Embora o perfil dos espectros de excitação de MP tenha variado conforme a concentração de FS (Gráfico 9A), há características comuns entre eles: todos apresentam bandas largas, envolvendo a região do ultravioleta (< 400 nm) e mostrando máximos de excitação bem definidos entre 507–518 nm (início da região do verde).

Os espectros de excitação de SE (Gráfico 9B) revelam significativos deslocamentos de máximos de acordo com a concentração de FS no adesivo. O espectro de SE com FS a 0,5 mg/mL apresenta máximo de excitação em 491 nm (ciano) e um máximo secundário em 416 nm (violeta). Para concentrações de FS < 0,5 mg/mL, observa-se o deslocamento de máximos

de excitação para 422–425 nm (violetas), sendo que máximos secundários persistem na região dos cianos (ver setas no Gráfico 9B).

5.2 DIAGRAMA CIE DE CROMATICIDADE

As informações dispostas no Anexo B visam facilitar a identificação das regiões de cor das coordenadas nas Figuras 19 e 20.

A Figura 19 apresenta o diagrama CIE de cromaticidade obtido a partir de espectros de emissão do adesivo MP contendo RB ou FS em diferentes concentrações.

Nota: Letras **a–d**: MP contendo RB a 0,5 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,02 mg/mL e 0,004 mg/mL respectivamente. Letras **e–h**: MP contendo FS nessas mesmas concentrações decrescentes.

Figura 19 - Diagrama CIE de cromaticidade. Coordenadas geradas a partir de espectros de emissão de Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose (MP) contendo rodamina B (RB) ou fluoresceína sódica (FS)

A percepção de cor, pelos olhos humanos, da fluorescência da RB no adesivo MP se dá, de acordo com a concentração de corante, em tons de vermelho-alaranjados, laranja ou laranja-amarelados (Figura 19, letras a–d). Já a fluorescência do corante FS disperso MP (nas concentrações indicadas) é percebida em tons de verde (Figura 19, letras e–h).

A Figura 20 apresenta o diagrama CIE de cromaticidade construído a partir de espectros de emissão do adesivo SE contendo RB ou FS em diferentes concentrações.

Nota: Letras a–d: SE contendo RB a 0,5 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,02 mg/mL e 0,004 mg/mL respectivamente. Letras e–h: SE contendo FS nessas mesmas concentrações decrescentes.

Figura 20 - Diagrama CIE de cromaticidade. Coordenadas geradas a partir de espectros de emissão de Clearfil™ SE Bond (SE) contendo rodamina B (RB) ou fluoresceína sódica (FS)

A Figura 20 indica que a percepção de cor, pelos olhos humanos, da fluorescência da RB no adesivo SE se dá, de acordo com a concentração de RB, em tons de vermelho-alaranjado ou de laranjas (letras a–d). Já a fluorescência de FS em SE é percebida em diferentes tons de verde, conforme a concentração de corante (letras e–h).

5.3 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (MCVL) PRELIMINAR DE ADESIVOS MARCADOS COM RB/FS

A Figura 21 mostra fotomicrografias em série registradas a partir de amostras polimerizadas dos adesivos MP e SE contendo RB em concentrações decrescentes. Para ambos os adesivos, a intensidade de fluorescência pareceu semelhante na mesma concentração de corante.

Nota: Microscopia confocal de varredura a laser. (A–D): fotomicrografias representativas do adesivo Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose marcado com rodamina B (RB) a 0,5, 0,1, 0,02 e 0,004 mg/mL respectivamente. (E–H): fotomicrografias do adesivo Clearfil™ SE Bond marcado com RB nessas mesmas concentrações decrescentes. Comprimento de onda de excitação de laser de 532 nm, 10% de intensidade de laser (controle de filtro óptico-acústico ajustável), 40×/1,15 em óleo.

Figura 21 - Intensidade de fluorescência em função da concentração de rodamina B nos adesivos

A maior concentração de RB (0,5 mg/mL, Figuras 21A e 21E) produziu um sinal muito intenso comparável à de 0,1 mg/mL (Figuras 21B e 21F). Com o decréscimo na concentração de RB, a intensidade de fluorescência diminuiu gradualmente até um campo negro (praticamente sem fluorescência, como nas Figuras 21D e 21H). Com base nessa análise preliminar, a menor faixa de concentrações de RB em MP e SE que podem produzir imagens preliminares otimizadas situa-se entre 0,1–0,02 mg/mL.

A Figura 22 mostra fotomicrografias em série registradas a partir de amostras polimerizadas dos adesivos MP e SE contendo FS em concentrações decrescentes.

Nota: Microscopia confocal de varredura a laser. (A–D): fotomicrografias representativas do adesivo Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose marcado com fluoresceína sódica (FS) a 0,5, 0,1, 0,02 e 0,004 mg/mL respectivamente. (E–H): fotomicrografias do adesivo Clearfil™ SE Bond marcado com FS nessas mesmas concentrações decrescentes. Comprimento de onda de excitação de laser de 488 nm, 15% de intensidade de laser (controle de filtro óptico-acústico ajustável), 40×/1,15 em óleo.

Figura 22 - Intensidade de fluorescência em função da concentração de fluoresceína sódica nos adesivos

O corante FS apresentou intensidade ótima de fluorescência na concentração de 0,5 mg/mL no adesivo MP (Figura 22A). A intensidade de sinal (*i.e.*, o brilho do verde) caiu drasticamente com a redução na concentração de FS de 0,5 para 0,1 mg/mL nesse adesivo (Figura 22B). Estima-se que a menor faixa de concentração de FS em MP, a qual permita satisfatória detecção da resina via MCVL, situe-se entre 0,5–0,1 mg/mL. No corante SE, a fluorescência da FS a 0,5 mg/mL (concentração mais alta, Figura 22E) foi moderada comparada àquela observada em MP com a mesma concentração de corante. Concentrações menores não produziram sinal satisfatório (Figuras 22F–H).

É importante lembrar que esses resultados e comparações refletem os parâmetros de varredura utilizados nessa análise preliminar (Quadro 7).

As sequências de imagens nas Figuras 21 e 22 sugerem que o comportamento fluorescente da RB nos adesivos MP e SE é muito semelhante, mas o mesmo não pode ser dito do comportamento da FS. Com base nesses resultados preliminares, as melhores concentrações de RB e FS nos adesivos MP e SE foram pré-selecionadas para a realização de MCVL de espécimes de dentina, conforme indica o Quadro 10.

Concentração de corante	Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose		Clearfil™ SE Bond	
	Rodamina B	Fluoresceína sódica	Rodamina B	Fluoresceína sódica
0,5 mg/mL	—		—
0,1 mg/mL
0,02 mg/mL		—		—
0,004 mg/mL	—	—	—	—

Nota: A presença da fotomicrografia (miniatura) indica seleção, enquanto que o símbolo (—) indica não seleção.

Quadro 10 - Concentrações-alvo dos corantes rodamina B e fluoresceína sódica nos adesivos Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e Clearfil™ SE Bond pré-selecionadas para microscopia confocal de varredura a laser em dentina

Cabe mencionar que algumas outras combinações menos promissoras (ex.: adesivos MP e SE com RB a 0,004 mg/mL) também foram incluídas na MCVL de espécimes de dentina como testes extras.

5.4 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (MCVL) DA INTERFACE DENTINA-ADESIVO

As informações dispostas na Figura 23 visam auxiliar a interpretação dos resultados da MCVL da interface dentina-adesivo apresentados abaixo.

Nota: (a) zona de transição entre o adesivo e a resina composta; (b) camada de adesivo; (c) camada híbrida (zona de difusão constituída pelo adesivo que se infiltrou na dentina desmineralizada e se polimerizou; mais espessa na abordagem convencional); (d) tags de resina (adesivo no interior dos túbulos dentinários; mais longas e numerosas na abordagem convencional); (e) dentina mineralizada.

Figura 23 - Padrões morfológicos na interface dentina-adesivo evidenciados com o uso de corantes fluorescentes

A Figura 24 mostra fotomicrografias representativas da interface dentina-adesivo referentes aos adesivos MP e SE marcados com RB em diferentes concentrações.

Nota: (A, B e C): adesivo Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose preparado com rodamina B (RB) nas concentrações de 0,1, 0,02 e 0,004 mg/mL respectivamente. (D–F): adesivo Clearfil™ SE Bond preparado com RB nessas mesmas concentrações decrescentes. Comprimento de onda de excitação de laser de 532 nm, 40×/1,15 em óleo. Intensidade do laser (controle de filtro óptico-acústico ajustável): 10% (A e D), 17% (B e E) e 30% (C e F). Ganho no tubo fotomultiplicador entre $\approx$ 600–800 V.

Figura 24 - Microscopia confocal de varredura a laser da interface dentina-adesivo com o uso de rodamina B

As imagens confirmam que a menor faixa de concentrações de RB (em MP e SE) necessária para se obter imagens aceitáveis da interface dentina-adesivo está entre 0,1–0,02 mg/mL. Os adesivos preparados com RB a 0,1 mg/mL produziram intensa fluorescência (processada na cor vermelha) na interface dentina-adesivo (Figuras 24A e 24D). As resinas preparadas com 0,02 mg/mL (igual a $\frac{1}{5}$ da concentração de corante anterior) ainda permitiram a obtenção de imagens com intensidade e ruído de fundo balanceados (Figuras 24B e 24E). Os adesivos com RB a 0,004 mg/mL – que mostraram quase nenhuma fluorescência na MCVL preliminar (Figuras 21D e 21H) – proporcionaram discreta visualização da distribuição da resina em dentina (Figuras 24C e 24F), quando a intensidade do laser (controle FOAA) foi aumentada para 30% e a voltagem no tubo fotomultiplicador para a faixa de 800 V.

A Figura 25 mostra fotomicrografias representativas da interface dentina-adesivo referentes ao adesivo MP marcado com FS a 0,5 e 0,1 mg/mL.

Nota: Comprimento de onda de excitação de laser de 488 nm. 40×/1,15 em óleo. Intensidade do laser (controle de filtro óptico-acústico ajustável) de 25% e voltagem da fotomultiplicadora na faixa de 800 V.

Figura 25 - Microscopia confocal de varredura a laser da interface dentina-adesivo. Adesivo Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose preparado com fluoresceína sódica nas concentrações de 0,5 mg/mL (A) e 0,1 mg/mL (B)

Foi possível obter ótimas imagens da interface dentina-MP, utilizando-se o adesivo com FS a 0,5 mg/mL (Figura 25A). Já o adesivo preparado com FS a 0,1 mg/mL proporcionou discreta visualização da distribuição da resina na interface (Figura 25B), mesmo ao se otimizar os parâmetros de varredura. Esses resultados confirmam que a menor faixa de concentração de FS em MP necessária para localizar, apropriadamente, o adesivo na interface dentina-adesivo se situa entre 0,5–0,1 mg/mL.

A Figura 26 mostra fotomicrografias representativas das interface dentina-adesivo referentes ao adesivo SE com FS a 0,5 e 0,1 mg/mL. O adesivo autocondicionante preparado com FS a 0,5 mg/mL – que mostrou moderada fluorescência na MCVL preliminar (Figura 22E) – apresentou notável aumento na intensidade de sinal na interface dentina-adesivo (Figuras 26A e 26B), adotando-se intensidade do laser de 25% e ganho no tubo fotomultiplicador de ≈ 800 V durante a varredura. Quando preparado com FS a 0,1 mg/mL, o adesivo SE pode ser observado apenas discretamente na interface dentina-adesivo após a otimização de parâmetros de varredura.

Nota: Setas vazadas: curtas *tags* de resina; setas cheias: padrões em forma de vesícula na base da interface de adesão. Comprimento de onda de excitação de laser de 488 nm. 40×/1,15 em óleo (A, B e C), 100×/1,40 em óleo (D). Intensidade do laser (controle de filtro óptico-acústico ajustável) de 25% e voltagem da fotomultiplicadora na faixa de 800 V.

Figura 26 - Microscopia confocal de varredura a laser da interface dentina-adesivo. Adesivo Clearfil™ SE Bond preparado com fluoresceína sódica (FS) nas concentrações de 0,5 mg/mL (A e B) e 0,1 mg/mL (C e D)

Aspectos morfológicos da interface dentina-adesivo nas Figuras 25 e 26 foram apontados e discutidos no item 6.4.2 da sessão de Discussão.

5.5 MEDIDAS DE GRAU DE CONVERSÃO

O método estatístico ANOVA com dois fatores foi utilizado para examinar o efeito dos fatores **adesivo** e **tratamento** (ver Quadro 9) sobre o GC. Com $\alpha = 0,05$, a interação entre

os dois fatores foi significativa ($F_{(8,36)} = 6,33$, $p = 0,00$), o que indica que o efeito do adesivo no GC dependeu do tratamento. Ademais, houve diferença estatística significativa entre as médias do fator adesivo ($F_{(1,36)} = 356,47$, $p = 0,00$), bem como entre as do fator tratamento ($F_{(8,36)} = 4,62$, $p = 0,00$).

A Tabela 1 (interação) apresenta as médias de GC dos adesivos MP e SE puros e modificados com o corante RB ou FS.

Tabela 1 - Médias de grau de conversão (%) dos adesivos Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e Clearfil™ SE Bond puros e com diferentes concentrações de rodamina B ou fluoresceína sódica

Tratamento	Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose	Clearfil™ SE Bond
Controle (sem corante)	65,5 ± 0,6 ^{a, b}	68,7 ± 0,5 ^{d, e, f}
Rodamina B a 0,5 mg/mL	65,7 ± 1,3 ^{a, b}	68,9 ± 0,2 ^{d, e, f}
Rodamina B a 0,1 mg/mL	65,3 ± 0,2 ^{a, b}	69,8 ± 1,1 ^{e, f}
Rodamina B a 0,02 mg/mL	63,8 ± 0,3 ^a	70,8 ± 0,4 ^f
Rodamina B a 0,004 mg/mL	67,1 ± 0,3 ^{b, c, d}	68,4 ± 0,7 ^{d, e}
Fluoresceína sódica a 0,5 mg/mL	64,1 ± 0,8 ^a	68,1 ± 1,1 ^{c, d, e}
Fluoresceína sódica a 0,1 mg/mL	65,6 ± 0,4 ^{a, b}	69,9 ± 1,1 ^{e, f}
Fluoresceína sódica a 0,02 mg/mL	66,8 ± 1,0 ^{b, c, d}	70,0 ± 0,4 ^{e, f}
Fluoresceína sódica a 0,004 mg/mL	66,1 ± 0,8 ^{a, b, c}	70,3 ± 0,8 ^{e, f}

Nota: Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Dentre as várias comparações entre as médias de GC realizadas através do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), destaca-se que a adição de RB ou FS (nas quatro concentrações indicadas) aos adesivos MP e SE **não afetou o GC** em comparação com os grupos de controle correspondentes.

5.6 MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO

Sobre os ângulos de contato aferidos após 8 s tem-se o seguinte. Os resultados da ANOVA com dois fatores indicaram que, com $\alpha = 0,05$, houve diferença estatística significativa entre os níveis do fator **adesivo** ($F_{(1,108)} = 335,82$, $p = 0,00$), bem como do fator **tratamento** ($F_{(8,108)} = 4,48$, $p = 0,00$). Contudo, a interação entre esses dois fatores não foi significativa ($F_{(8,108)} = 1,29$, $p = 0,26$), o que indica que **a relação entre AC e adesivo não dependeu do tratamento**.

O Gráfico 10 mostra o efeito principal de cada fator (individualmente) sobre o AC, haja vista que não houve interação entre fatores.

Gráfico 10 - Efeitos principais dos fatores adesivos e tratamento sobre o ângulo de contato (aferido após 8 s)

A média de AC do adesivo SE (24,8 °) foi maior do que a do MP (22,2 °). Quanto ao fator tratamento, nota-se que o corante FS ocasionou valores de AC mais baixos do que o controle (23,7 °), enquanto a RB ocasionou valores mais altos. As médias e desvios-padrão dos níveis de cada fator, incluindo-se as devidas comparações com o teste de Tukey, podem ser examinadas no Apêndice D.

Sobre as medidas de AC após 30 s tem-se o seguinte. Houve um efeito principal significativo do fator **adesivo** sobre o AC ($F_{(1,108)} = 591,88$, $p = 0,00$). Da mesma maneira, houve um efeito principal significativo do fator **tratamento** sobre o AC ($F_{(8,108)} = 3,06$, $p = 0,00$). Não ocorreu, porém, interação entre esses dois fatores ($F_{(8,108)} = 1,78$, $p = 0,09$), logo, a **relação entre AC e adesivo não dependeu do tratamento**.

O Gráfico 11 nos ajuda a avaliar a influência isolada de cada fator no AC (após 30 s).

Gráfico 11 - Efeitos principais dos fatores adesivo e tratamento sobre o ângulo de contato (aferido após 30 s)

As médias e desvios-padrão dos níveis de cada fator, incluindo-se as devidas comparações com o teste de Tukey, podem ser examinadas no Apêndice E.

Os resultados do teste ANOVA *per se* permitem concluir que o efeito do adesivo sobre o AC (após 8 s ou 30 s) não é influenciado pela presença de RB ou FS nas concentrações testadas.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA

A espectroscopia de fotoluminescência fornece informações do comportamento fluorescente de uma amostra as quais nossos olhos não seriam capazes de capturar, ao observá-la através da ocular do microscópio de fluorescência. A alta sensibilidade e especificidade da espectrofluorimetria levam a medidas precisas e à quantificação dos processos de absorção (via espectro de excitação) e emissão (via espectro de mesmo nome) em amostras fluorescentes (LAKOWICZ, 2006e).

Conhecendo as características de absorção e emissão de dado fluoróforo numa amostra, o pesquisador é capaz de eleger condições de observação que atendam às exigências de um experimento. Com isso em mente e dada a escassez de parâmetros fotofísicos de corantes fluorescentes dispersos em sistemas adesivos odontológicos (WATSON; WILMOT, 1992; D'ALPINO et al., 2006a), consideramos a espectrofluorimetria um passo primordial na otimização das condições experimentais da MCVL da interface dentina-adesivo. A discussão que se segue interconecta a interpretação dos resultados da espectrofluorimetria com a determinação de parâmetros da MCVL.

Parâmetros elementares da MCVL, como a linha de laser e a faixa de detecção de emissão, são definidos com base nos perfis de absorção e emissão de diversos corantes fluorescentes conhecidos. A linha de laser deve ser condizente com a banda de absorção do corante em uso, ou de preferência com o máximo comprimento de onda dessa banda, permitindo máximo rendimento (GRATTON; VAN DEVEN, 2006; JOHNSON, 2010). As emissões características do corante também devem ser monitoradas seletivamente, delimitando-se, via programa computacional, uma faixa espectral de detecção de emissão – comumente chamada de janela de detecção (CLAXTON; FELLERS; DAVIDSON, 2006; GARINI; YOUNG; MCNAMARA, 2006). A propósito, a delimitação de janelas de detecção na MCVL, possível pela utilização de grades de difração em conjunto com a fotomultiplicadora, é análoga à seleção de filtros de emissão no antigo MVT.

Embora os perfis de absorção e emissão de inúmeros corantes estejam catalogados (JOHNSON, 2010) – o que facilita a seleção de parâmetros na MCVL –, sabe-se que eles podem variar em função de características do meio (ex.: pH, polaridade, viscosidade, etc.)

(VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012a). Nesse estudo, ficou clara a influência do meio (tipo de adesivo) e da concentração de corante nos espectros de excitação e de emissão associados à RB ou à FS – especialmente no que diz respeito aos máximos comprimentos de onda de excitação e de emissão.

As linhas de laser foram selecionadas, para cada corante fluorescente, com base (a) nos espectros de excitação registrados nos Gráficos 6 e 9 e (b) nas linhas disponíveis no microscópio confocal, que eram as de 405 nm (violeta), 488 nm (ciano), 532 nm (verde) e 635 nm (laranja-avermelhado). Dispersa nos adesivos MP e SE, a RB apresentou máxima excitação entre $\approx 555\text{--}564$ nm (Gráfico 6), o que é semelhante ao comportamento desse corante em etanol (KUBIN; FLETCHER, 1982). Assim, a MCVL de adesivos contendo RB foi realizada com a linha de laser de 532 nm. Embora tal linha esteja mais de 20 nm aquém dos máximos de excitação registrados (Gráfico 6), a excitação em 532 nm produziu intensa resposta (fluorescência), graças às largas bandas de excitação. Caso uma linha de laser amarelo-esverdeado estivesse disponível, teria sido utilizada preferencialmente, por ser mais próxima dos máximos de excitação registrados no Gráfico 6. Toledano et al. (2013, 2014), por exemplo, relataram o uso da linha de 568 nm na MCVL de adesivos odontológicos marcados com RB.

Para os adesivos com FS, a MCVL foi executada com a linha de laser de 488 nm, tradicionalmente empregada para a excitação de fluoresceínas (GONÇALVES, 2009). Ainda que os espectros de excitação de MP e SE contendo FS indiquem múltiplas possibilidades de excitação nas regiões do ultravioleta (Gráfico 9A) e do violeta (Gráfico 9B, especialmente para $FS < 0,5$ mg/mL), todos apresentam em comum intensa ou moderada excitação na região dos cianos. Com o intuito de manter o padrão observado na literatura (SAURO et al., 2012; TOLEDANO et al., 2014), preferimos adotar a linha de 488 nm na MCVL de todas as amostras com FS.

As janelas de detecção (MCVL) foram determinadas com base nos espectros de emissão nos Gráficos 4 e 7. Quando dispersas nos adesivos MP e SE (amostras polimerizadas), a RB e a FS apresentaram bandas de emissão peculiares (KLONIS; SAWYER, 1996; D'ALPINO et al., 2006a). Contudo, os máximos comprimentos de onda de emissão foram, de modo geral, dependentes do meio (tipo de adesivo) e da concentração de corante. As janelas foram ajustadas para adesivos marcados com RB (550–675 nm, Gráfico 4) ou FS (500–600 nm, Gráfico 7) de modo a abranger não somente os possíveis deslocamentos de máximos (em cada grupo de espectro), mas a maior parte das largas bandas de emissão.

Foi importante deixar um intervalo de alguns nanômetros entre a linha de laser em uso no microscópio confocal (de 532 nm para RB e 488 nm para FS) e o início das janelas de detecção selecionadas conforme o corante (em 550 nm para RB e 500 nm para FS) para evitar a inclusão de luz residual de excitação durante a varredura da amostra marcada (GARINI; YOUNG; MCNAMARA, 2006).

Conhecer os espectros de emissão de diferentes fluoróforos em uma amostra – em particular os máximos comprimentos de onda de emissão – é fundamental para evitar a ocorrência de emissões cruzadas (*crosstalk*) na MCVL, que levam a artefato de técnica. Para tal, deve-se delimitar uma janela de detecção estreita para cada fluoróforo na amostra, envolvendo, de preferência, os máximos de emissão. Corantes que apresentam largas bandas de emissão, como rodaminas e fluoresceínas, tornam a realização desse tipo de experimento dificultosa. Utilizamos dados espectroscópicos coletados nesse estudo, para justificar (Gráfico 12).

Nota: Os retângulos representam hipotéticas janelas de detecção de emissão para cada amostra.

Gráfico 12 - Espectros de emissão de amostras de Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose marcadas com rodamina B (RB) ou fluoresceína sódica (FS) em diferentes concentrações

No gráfico acima, nota-se que janelas de detecção hipotéticas foram definidas, acompanhando-se o máximo de emissão da RB ou FS no adesivo (que variou em função da concentração de corante). Devido à sobreposição das bandas de emissão, parte das emissões

da FS interfere nas janelas de detecção da RB. Isso nos reforça que experimentos envolvendo o uso simultâneo desses corantes em sistemas adesivos odontológicos (ex.: *primer* marcado com rodamina e adesivo com fluoresceína) podem ocasionar falsos positivos que comprometem a interpretação de resultados (WATSON, 1997; D'ALPINO et al., 2006a).

Rodaminas e fluoresceínas podem ser empregadas como sondas fluorescentes em quantidades bastante pequenas, devido aos seus elevados rendimentos quânticos de fluorescência – elas são capazes de transformar quase toda a energia absorvida em emissão de luz (de menor energia, comprimentos de onda mais longos). Materiais sobrecarregados com esses corantes podem, inclusive, apresentar supressão de fluorescência (*fluorescence quenching*). Por exemplo, em soluções pouco concentradas, o rendimento quântico da RB costuma ser elevado, enquanto que em soluções mais concentradas ($> 10^{-3}$ mmol/mL) tende a diminuir drasticamente (SETIAWAN et al., 2010). Isso ocorre porque, em soluções muito concentradas, as moléculas de corante se mantêm demasiadamente próximas umas das outras e podem acabar transferindo energia entre si por vias não radiativas, em vez de liberá-la na forma de luz. Comportamento semelhante foi averiguado no Gráfico 5, onde a intensidade de emissão integrada da RB em etanol diminuiu com o aumento da concentração. Soluções concentradas de FS em etanol também apresentaram queda de intensidade de emissão integrada (Gráfico 8).

Supressão de fluorescência refere-se a uma variedade de processos que levam à redução do rendimento quântico de um fluoróforo, ou, em outras palavras, da intensidade de fluorescência de uma amostra marcada (LAKOWICZ, 2006f). Dentre eles: a transferência de energia não radiativa, a formação de dímeros e agregados, o surgimento de formas não fluorescentes, como lactonas, etc. (KLONIS; SAWYER, 1996; SETIAWAN et al., 2010). Watson (1997) apontou a ocorrência de supressão em adesivo odontológico marcado com RB. Seu relato, todavia, parece controverso, pois não se baseou em dados espectroscópicos (quantitativos), mas na observação da distribuição do adesivo na interface dentina-adesivo (dados microscópicos, qualitativos). Os resultados nos Gráficos 5 e 8, provenientes de espectrofluorimetria, mostram que os adesivos MP e SE (amostras polimerizadas) dopados com RB ou FS não apresentam supressão de fluorescência na faixa de concentrações avaliada. Deve-se levar em conta que, durante a polimerização do adesivo, os fluoróforos acabam presos na rede polimérica. Com mobilidade restrita, é possível que a distância mínima entre as moléculas seja menor do que a necessária para que interajam entre si, trocando energia por

vias não radiativas. Aparentemente, a formação de espécies não luminescentes associada à abundância de fluoróforos no meio também não ocorreu antes da polimerização dos adesivos (*i.e.*, nos sistemas monoméricos). No caso de sistemas monoméricos não solvatados que possuem BisGMA na composição – como os adesivos MP e SE – a viscosidade do meio é notavelmente superior à de solventes como o etanol. Maior viscosidade implica em menor difusão molecular que, associada a outras características do meio resinoso, pode afetar o equilíbrio de dimerização de moléculas fluorescentes dispersas.

6.2 DIAGRAMA CIE DE CROMATICIDADE

O diagrama de cromaticidade CIE (do francês, *Commission internationale de l'éclairage*) representa um elo entre um espectro de emissão (dados espectroscópicos) e a cor em que esse espectro seria percebido pelo olho humano (OLEARI, 2015). A representação, através desse recurso, da cor dos espectros de emissão nos Gráficos 4 e 7 visa, apenas, complementar o estudo do comportamento fluorescente dos corantes RB e FS nos adesivos MP e SE. O principal objetivo dessa análise é mostrar que o máximo comprimento de onda de emissão de um fluoróforo (ou uma amostra fluorescente) não corresponde, necessariamente, à cor de sua fluorescência (isto é, a cor percebida pelo olho humano). Por exemplo, a emissão mais intensa da RB a 0,004 mg/mL no adesivo MP (amostra polimerizada) ocorreu na região do amarelo-esverdeado (≈ 572 nm; Gráfico 4A). Isso não significa, entretanto, que a fluorescência daquele adesivo (com RB na tal concentração) será visualizada em amarelo-esverdeado: a Figura 19, letra d, indica que sua fluorescência (conjunto de emissões) seria percebida em laranja-amarelado.

Uma implicação relevante dessa diferença é que um filtro de emissão (na microscopia de fluorescência, ou no MVT) ou uma janela de detecção (na MCVL) deve ser selecionado/a com base nos máximos de emissão (registrados por espectrofluorimetria) e não na cor da fluorescência segundo a percepção do olho humano.

6.3 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (MCVL) PRELIMINAR DE ADESIVOS MARCADOS COM RB/FS

A MCVL preliminar visou a pré-seleção de concentrações-alvo de RB e FS nos adesivos MP e SE para a avaliação morfológica da interface dentina-adesivo como próximo passo. Analisar, via MCVL, amostras de resina contendo certo corante em concentrações variadas – referimo-nos ao material resinoso em si, não aplicado em dentina – é a forma mais conveniente e prática de se obter informações qualitativas preliminares sobre a fluorescência do corante na resina. É intrigante que esse simples artifício não tenha sido adotado ou ao menos mencionado em trabalhos anteriores (D'ALPINO et al., 2006a), pois ele ajuda o pesquisador justificar a escolha da concentração de corante no material resinoso marcado.

Para se avaliar o efeito da concentração de RB ou FS (nos adesivos) sobre a intensidade de fluorescência, os parâmetros de varredura foram padronizados para cada corante. Tais parâmetros, informados no Quadro 7, foram determinados, levando-se em conta uma combinação equilibrada de intensidade de laser (controle de FOAA) e voltagem no tubo fotomultiplicador, a qual permitiu a obtenção de imagens preliminares com ótimo sinal e baixo ruído.

As fotomicrografias nas Figuras 21 e 22 nos proporcionaram as primeiras informações visuais da fluorescência da RB e da FS nos adesivos MP e SE (amostras polimerizadas). No geral, a RB mostrou-se mais eficaz do que a FS no que diz respeito à intensidade de fluorescência (*i.e.*, o brilho de vermelho ou verde nas fotomicrografias) em função da concentração de corante nos adesivos. Utilizando-se a RB, foi possível obter ótima relação entre intensidade e concentração (ex.: MP e SE com RB a 0,1 mg/mL; Figura 21B e 21F respectivamente). É provável que o menor rendimento da FS em MP e, especialmente, em SE (Figura 22) possa ser contornado com a elevação da concentração do corante nesses adesivos ($> 0,5$ mg/mL ou $> 1,3 \times 10^{-3}$ mmol/mL). Contudo, essa abordagem não nos pareceu viável, devido à dificuldade de solubilizar maiores quantidades de FS em etanol – para o preparo da solução de estoque empregada no método de marcação semidireto – e, possivelmente, nas resinas. Deve-se notar que a FS, ao contrário da RB, é apenas moderadamente solúvel em etanol.

A semelhança da intensidade de fluorescência de MP e SE com RB na mesma concentração (comparar, na Figura 21, a sequência A–D com a E–H) sugere que esse corante

não é sensível a diferenças na composição química daqueles dois adesivos – o que reforça sua versatilidade na marcação de sistemas adesivos odontológicos (D'ALPINO et al., 2006a).

Ao contrário da RB, o corante FS apresentou comportamento fluorescente dissimilar entre os dois adesivos – e notavelmente inferior no autocondicionante (SE) para a concentração mais alta de FS (Figura 22). Nesse caso, deve-se atentar para possíveis **interações corante-meio químico** com efeito na fluorescência. Em primeiro lugar, destacamos alguns aspectos relevantes sobre a composição dos adesivos. Conforme indica o Quadro 5, tanto MP como SE possuem em comum monometacrilatos hidrofílicos (HEMA), dimetacrilatos hidrofóbicos (BisGMA) e componentes do sistema fotoiniciador (ex.: canforoquinona). Por outro lado, uma das diferenças marcantes entre as composições é a presença de monômeros ácidos no adesivo SE, que faz parte de um sistema autocondicionante (VAN LANDUYT et al., 2007; VAN MEERBEEK et al., 2011). A Figura 27 apresenta a molécula do monômero 10-metacrililoiloxidecil di-hidrogênio fosfato (10-MDP) contido em SE.

Nota: Verificar a presença do grupo ácido fosfato na extremidade direita.

Figura 27 - Fórmula estrutural do monômero ácido 10-metacrililoiloxidecil di-hidrogênio fosfato (10-MDP)

Já em relação ao corante, é pertinente observar que a fluoresceína e vários de seus derivados exibem múltiplos tautômeros dependentes do pH do meio, sendo que cada um deles apresenta comportamento fluorescente característico (SJÖBACK; NYGREN; KUBISTA, 1995; KLONIS; SAWYER, 1996). Em soluções aquosas com pH > 9, a forma predominante da fluoresceína é o diânion, em que tanto o grupo funcional fenol, como o ácido carboxílico (na molécula) se encontram dissociados (Figura 28).

Fonte: Imagem adaptada de Johnson (2010, p. 886).

Figura 28 - Tautômeros da fluoresceína em seus equilíbrios dinâmicos dependentes do pH

Segundo Sjöback, Nygren e Kubista (1995), a acidificação gradativa do meio (básico) contendo o diânion provoca, primeiramente, a protonação do fenol, produzindo o monoânion de fluoresceína. Em seguida, provoca a protonação do ácido carboxílico, gerando espécies neutras da molécula (inclusive uma lactona) e, por último, aparece a forma catiônica ($\text{pK}_a \approx 2,1$). Relata-se que apenas o diânion e o monoânion de fluoresceína sejam fluorescentes efetivamente (com respectivos rendimentos quânticos de 0,93 e 0,37) – e tais formas não são as predominantes em soluções mais ácidas. A lactona, por outro lado, é uma forma totalmente não fluorescente.

Com base nas informações acima, pressupõe-se que o menor rendimento da FS no adesivo SE (Figura 22E) esteja relacionado à presença do monômero ácido 10-MDP. Nesse caso, formas menos fluorescentes da FS teriam surgido/predominado, quando da dispersão desse corante no adesivo SE fluido (não polimerizado) – ainda que essa resina em si não contenha solvente, com exceção do próprio HEMA, para facilitar a dissociação e a protonação dos dispersantes. Convém mencionar que, embora julgemos que o 10-MDP atribua caráter ácido ao adesivo SE, não é conhecido o valor de pH desse. A empresa fabricante divulga apenas o pH do *primer* SE ($\approx 2,0$), que possui água como solvente, além de HEMA, o que viabiliza a realização da medida.

Os achados da MCVL preliminar (dados qualitativos) também serviram para complementar aqueles da espectroscopia de fotoluminescência (dados quantitativos). O

aumento gradual na intensidade de vermelho (no caso de amostras com RB; Figura 21) ou verde (amostras com FS; Figura 22) em função do aumento da concentração de corante em MP e SE confirma que não ocorre supressão de fluorescência associada à concentração de corante nesses polímeros – o que vai ao encontro dos resultados espectroscópicos nos Gráficos 5 e 8.

6.4 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (MCVL) DA INTERFACE DENTINA-ADESIVO

6.4.1 Aspectos gerais da fluorescência na interface dentina-adesivo

A julgar pela relação concentração-intensidade, a RB mostrou-se um corante mais versátil do que a FS na avaliação morfológica da interface dentina-adesivo. Com concentrações mais baixas daquele corante foi possível evidenciar a distribuição espacial tanto do sistema adesivo convencional, MP (Figura 24B), quanto do autocondicionante, SE (Figura 24E), na interface. A propósito, resultados satisfatórios na avaliação morfológica foram obtidos com o uso de concentrações de RB significativamente inferiores às aquelas apontadas em estudos passados (D'ALPINO et al., 2006c; FRANCISCONI et al., 2009; SAMPAIO et al., 2011).

No adesivo MP, a FS a 0,5 mg/mL (Figura 25A) pode ser uma alternativa à RB a 0,1 mg/mL (Figura 24B) para a avaliação da interface dentina-MP via MCVL. Porém, é preciso levar em conta que concentrações mais baixas de corantes são preferíveis, uma vez que faltam evidências do efeito desses agentes fluorescentes sobre propriedades das resinas adesivas (D'ALPINO et al., 2006b; WANG et al., 2016). Otimizando-se os parâmetros de varredura, o adesivo SE preparado com FS a 0,5 mg/mL (Figuras 26A e 26B) também apresentou sinal suficiente para ser evidenciado na interface de adesão.

Uma vantagem particular da MCVL é a flexibilidade na otimização de certos parâmetros, de acordo com o corante (tipo e concentração) e a morfologia e composição da amostra (PAWLEY, 2000; GARINI; YOUNG; MCNAMARA, 2006; SANDERSON et al., 2014). Tal flexibilidade vem a calhar na análise de amostras heterogêneas, como a dentina, onde inúmeros fatores podem causar variabilidade na intensidade da fluorescência, como, por exemplo, a diluição do agente fluorescente durante a aplicação do adesivo marcado na dentina úmida. Em geral, procura-se, para cada amostra heterogênea, uma combinação balanceada de

parâmetros-chave (ex.: intensidade do laser e ganho no tubo fotomultiplicador), que resulte em ótimo sinal e pouco ruído de fundo nas imagens. Note que, enquanto as interfaces nas Figuras 24A, 24B, 24D e 24E puderam ser registradas com parâmetros considerados equilibrados (10–17% de intensidade de laser e 600–700 V no tubo fotomultiplicador), interfaces fracamente coradas como nas Figuras 24C e 24F requereram intensidade de laser aumentada de 30% e ganho no fotomultiplicador na faixa de 800 V.

Aumentar o ganho (tensão no fotomultiplicador) ajuda a amplificar sinais fracos, mas também amplifica o ruído de fundo, que compromete a qualidade da imagem (PAWLEY, 2006). Além disso, aumentar a quantidade de energia de excitação para lidar com amostras fracamente coradas pode levar ao fotobranqueamento. Para evitar fotobranqueamento durante a varredura a laser, abordagens que incluem o uso de concentrações ótimas de corante, a diminuição da intensidade do laser e do tempo de exposição devem ser priorizadas.

6.4.2 Aspectos morfológicos e possíveis artefatos

As características morfológicas da interface dentina-adesivo dependem, dentre outros fatores, do modo de desmineralização de cada tipo de sistema adesivo, bem como da maneira como seus monômeros funcionais interagem com o substrato dentinário (PASHLEY et al., 2011; VAN MEERBEEK et al., 2011). Assim, o que vemos com o auxílio da MCVL é, em grande parte, reflexo do mecanismo de adesão dos agentes de união utilizados. Para interpretar propriamente nossos resultados microscópicos, é importante ter em mente certas implicações das abordagens adesivas convencional e autocondicionante.

Sistemas adesivos convencionais – categoria na qual se enquadra MP – requerem, como primeiro passo do protocolo adesivo, o tratamento da superfície de dentina com gel de ácido fosfórico a 35–37% (VAN MEERBEEK et al., 2003). Nessa concentração, tal ácido é capaz de desmineralizar cerca de 5–8 μm da superfície dentinária, expondo sua rede de fibrilas de colágeno que, após o enxágue, fica suspensa em água (PASHLEY et al., 2011). O gel de ácido fosfórico também dissolve detritos (a lama dentinária ou *smear layer*) que obliteram a embocadura dos túbulos dentinários (Figura 29).

Nota: Visão superior de superfície dentinária desmineralizada com ácido fosfórico a 37%, mostrando a rede de colágeno exposta e a embocadura de túbulos dentinários livre de detritos. Inseto: alta ampliação de fibrilas colágenas (75 nm de diâmetro) separadas por espaços interfibrilares por onde o adesivo deve penetrar.

Fonte: PASHLEY et al., 2011.

Figura 29 - Microscopia eletrônica de varredura de dentina desmineralizada

Parte da água presente nos espaços interfibrilares será, então, substituída por um sistema monomérico que, ao sofrer polimerização *in situ*, cria uma estrutura imbricada conhecida como camada híbrida (parte de natureza dentinária, parte polimérica). A porção de adesivo que penetra nos túbulos dentinários e é polimerizada forma os prolongamentos ou *tags* de resina. No caso de um sistema convencional de três passos, como MP, o segundo passo (após o condicionamento ácido) é a aplicação do *primer* – solução rica em monômeros hidrofílicos (ex.: HEMA) e solvatados que facilitam a infiltração do adesivo na dentina desmineralizada – e, por fim (terceiro passo), a aplicação do adesivo propriamente dito, rico em monômeros hidrofóbicos (ex.: BisGMA) responsáveis pela polimerização cruzada e formação de um polímero rígido (VAN LANDUYT et al., 2007; PASHLEY et al., 2011).

Haja vista as características descritas acima, o sistema MP deve produzir padrões morfológicos como os observados com o auxílio da RB (Figuras 24A) e da FS (Figura 25A): uma camada de adesivo espessa que transita para uma base difusa (camada híbrida, mais evidente na Figura 24A) e longas e numerosas *tags* de resina. A região da camada híbrida costuma ser mais bem visualizada, quando o *primer* é marcado com corante fluorescente, como demonstrou Bim Júnior (2013). Vale recordar que, no presente estudo, apenas os adesivos foram marcados, para limitar o número de fatores com impacto nos resultados.

Sistemas autocondicionantes, por outro lado, dispensam o condicionamento prévio da dentina com ácido fosfórico (VAN MEERBEEK et al., 2003). Eles possuem monômeros

ácidos que desmineralizam e infiltram a superfície de dentina simultaneamente (TAY et al., 2002; MOSZNER; SALZ; ZIMMERMANN, 2005). O padrão de desmineralização depende fortemente do pH dos componentes autocondicionantes. Com um pH de 2, o *primer* SE é capaz de atuar em cerca de 1 μm de profundidade em dentina (VAN MEERBEEK et al., 2011). Com o aumento da profundidade, os monômeros ácidos do *primer* são gradualmente tamponados pelo conteúdo mineral do substrato (hidroxiapatita), perdendo a capacidade de desmineralização. Segundo Van Meerbeek et al. (2011), um sistema como o SE não possui acidez suficiente para dissolver/remover a *smear plug* da embocadura dos túbulos dentinários com eficiência. Assim, a formação de *tags* de resina típicas (longas e numerosas) não é esperada via de regra.

Nas interfaces criadas com o adesivo SE marcado com RB (Figuras 24D–F), observam-se *tags* de resina que, embora esparsas, parecem relativamente longas (algumas com mais de 10 μm) em se tratando de uma abordagem autocondicionante moderada (pH $\approx$ 2). Isso chama a atenção para a possível ocorrência de falsos positivos associados à lixiviação de RB (D’ALPINO et al., 2006a, 2006b). Quando o adesivo marcado com RB é aplicado na dentina previamente desmineralizada, mistura-se com o *primer* e água ali presentes e, conseqüentemente, as moléculas de corante se difundem nessa mistura. Uma vez que essas moléculas tenham atingido a base da camada híbrida, é possível que parte delas lixivie do domínio resinoso para estruturas dentinárias úmidas/ hidratadas adjacentes – posto que a RB é muito hidrossolúvel. Como os monômeros ácidos em SE podem dissolver, parcialmente, a *smear plug*, é admissível que moléculas de RB dispersas em água transitem mais facilmente para o interior dos túbulos dentinários do que o próprio adesivo marcado, cuja viscosidade é bem maior que a da água. Assim, naquelas imagens (Figuras 24D–F), a presença de RB nos túbulos dentinários pode não corresponder, exatamente, à distribuição do adesivo SE.

Em contrapartida, interfaces criadas com o uso do adesivo SE marcado com FS mostram esporádicas *tags* de resina com menos de 5 μm de comprimento cada (Figuras 26A e 26B) – características que, talvez, estejam dentro do esperado para uma abordagem autocondicionante moderada. Por outro lado, padrões morfológicos aparentemente atípicos foram observados em algumas fotomicrografias (como nas Figuras 26C e 26D), especialmente quando do uso de objetiva de 100 $\times$. Na Figura 26D, as setas cheias indicam estruturas em forma de gota/vesícula com cerca de 2–5 μm de diâmetro. É possível que essas gotas representem resíduos de água na dentina desmineralizada ou fases aquosas (ricas em

água e pobres em monômeros hidrofóbicos) oriundas de separação de fases, quando da infiltração da resina hidrofóbica (*i.e.*, o adesivo SE propriamente dito). Nota-se que o interior de várias gotas não é fluorescente, o que pode significar duas coisas: (a) a FS presente no adesivo não/pouco se difundiu para tal região; (b) a FS se difundiu, porém seu comportamento fotofísico foi afetado devido à mudança de ambiente químico. Nesse último caso, considerar-se-ia que o pH no interior das gotas coincidiu com aquele em que a FS prevalece em sua forma não fluorescente, a lactona (ver Figura 28). Essas hipóteses são válidas, todavia, se os resultados observados na Figura 26 não se relacionarem com eventual falha de material e/ou erros operacionais.

6.5 MEDIDAS DE GRAU DE CONVERSÃO

Uma vez que o adesivo tenha infiltrado a dentina desmineralizada, a formação da camada híbrida só se efetivará se houver adequada polimerização. Nesse sentido, espera-se que a adição de agentes fluorescentes ao adesivo – para os fins experimentais aqui discutidos – não interfira no mecanismo de polimerização, nem afete as propriedades do polímero formado (D’ALPINO et al., 2006b). Se isso ocorrer, os padrões morfológicos observados via MVCL podem ser dúbios.

Adesivos odontológicos à base de metacrilatos podem ser polimerizados *in situ* (*i.e.*, em substrato dentário) em cerca de 10 s, gerando um polímero rígido com alto teor de ligações cruzadas, que serve de elo entre o dente e o material restaurador resinoso (YE et al., 2007). Esses sistemas monoméricos sofrem polimerização via adição de radicais livres (JAKUBIAK et al., 2003; KWON et al., 2012). A espécie reativa (*i.e.*, o radical livre) interage com o grupo polimerizável do metacrilato, quebrando a ligação π (pi) da dupla de carbono e criando um novo radical, o qual permitirá a propagação da reação (Figura 30).

Figura 30 - Estágios de iniciação (A) e propagação (B) da polimerização do metacrilato de metila ($C_5H_8O_2$) através de adição de radicais livres

Um dos sistemas iniciadores mais comuns na polimerização de metacrilatos odontológicos envolve o uso de (a) um composto sensível à luz (*photosensitizer*), como a canforoquinona, e (b) uma amina terciária como agente redutor (COOK; CHEN, 2011). Sem pormenorizar, a excitação com luz azul (≈ 468 nm) dispõe a canforoquinona num estado excitado (triplete), que interage com a amina via transferência de elétron seguida de próton (H^+), gerando dois tipos de radicais livres (Figura 31). O radical da amina é, nesse caso, o principal responsável pela iniciação da polimerização dos metacrilatos.

Fonte: Adaptação de Kwon et al. (2012).

Figura 31 - Formação de radicais livres por sistema fotoiniciador à base de canforoquinona (CQ) e amina (2-[N,N-dimetilamino-metacrilato de metilo [DMAEMA]) por irradiação de luz visível

Na pesquisa odontológica, a avaliação de GC, que se refere à porcentagem de monômeros convertidos numa amostra, tem sido frequentemente adotada no estudo da cinética de polimerização de metacrilatos (STANSBURY; DICKENS, 2001; MALACARNE-ZANON et al., 2009; LEITUNE et al., 2013; GE et al., 2016). Levando-se em conta o papel de fatores estruturais, tais como linearidade da cadeia, funcionalidade e copolimerização, o GC representa apenas uma parte do complexo processo de polimerização (YE et al., 2007). Todavia, há evidências de que o GC está fortemente relacionado às propriedades mecânicas do polímero e à quantidade de monômeros e radicais residuais na amostra (PARK et al., 2010; SPENCER et al., 2010).

Nossos resultados indicam que, em concentração $\leq 0,5$ mg/mL, os corantes fluorescentes RB e FS não afetam, estatisticamente, o GC dos adesivos MP e SE. Isso sugere, dentre outras coisas, que não ocorrem interações contraproducentes entre esses corantes e os iniciadores (nos adesivos) com impacto na geração de radicais livres – especialmente daqueles derivados dos iniciadores. Além do mais, os resultados desmistificam a ideia criada de que esses corantes podem atrapalhar a polimerização por competir com os iniciadores no que diz respeito à absorção de luz (D'ALPINO et al., 2006a; ARAÚJO et al., 2013). Haja vista a alta intensidade das unidades fotopolimerizadoras disponíveis (alegadamente de 1.200 mW/cm^2 a da utilizada nesse estudo), a energia luminosa gerada durante a fotoativação das amostras resinosas deve ser mais do que suficiente para excitar a canforoquinona (ou outro iniciador) dispersa nos sistemas monoméricos. Note que, em adesivos experimentais, a quantidade de canforoquinona representa cerca de apenas 0,5% da massa do adesivo (na ordem de 10^{-5} mol/g) (YE et al., 2009; GE et al., 2015). Como a quantidade de corante fluorescente no adesivo também deve ser baixa, consideramos pouco provável que a adição de um fluoróforo – mesmo a FS, cujo máximo de excitação se equipara ao da canforoquinona – prejudique a quantidade de luz disponível para a fotoativação.

Conforme indica a eq. (2) na página 65, o cálculo de CG se baseia na diferença existente entre as razões R_d e R_a . Para haver conversão, tem-se que $R_d < R_a$. Nesse caso, pressupõe-se que $R_d < R_a$ seja consequência da redução na concentração de duplas ligações de carbono na amostra em decorrência da polimerização dos metacrilatos. Qualquer fator externo que venha a alterar a proporção R_d ou R_a de uma amostra deve ser ponderado, quando do cálculo de GC (RUEGGEBERG; HASHINGER; FAIRHURST, 1990). Rodaminas e fluoresceínas, por exemplo, apresentam múltiplos anéis aromáticos em suas moléculas (Figura 4). Uma vez adicionadas a adesivos à base de BisGMA, deve-se atentar para possível

acréscimo na absorbância em $\approx 1.608 \text{ cm}^{-1}$. A absorbância nesse número de onda se relaciona, a princípio, com a quantidade de BisGMA – cuja molécula apresenta dois grupos aromáticos (Apêndice A) – na amostra resinosa e é utilizada como denominador de R_d (no caso da amostra polimerizada) ou R_a (amostra não polimerizada). Os resultados no Apêndice C mostram que as diferenças entre as médias de R_a dos adesivos puros (controles) e suas respectivas versões modificadas com RB ou FS não são significantes estatisticamente. Em outras palavras, as quantidades de corante adicionado em MP e SE não foram suficientes para causar aumento significativo na absorbância em 1.608 cm^{-1} , logo, não houve comprometimento dos dados espectroscópicos utilizados no cálculo de GC.

Cabe mencionar que a absorbância em $\approx 1.715 \text{ cm}^{-1}$, referente ao grupo carbonila, tem sido utilizada, alternativamente, como referência interna de normalização (GUO et al., 2009; ABEDIN et al., 2016) – especialmente quando o monitoramento da absorbância em 1.608 cm^{-1} é inviável.

6.6 MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO

A adição de corantes fluorescentes a resinas adesivas, destinada à avaliação morfológica da interface dentina-adesivo, não deve afetar, via de regra, a físico-química de superfícies no processo de adesão (D'ALPINO et al., 2006b). Caso contrário, os padrões morfológicos registrados seriam questionáveis.

Vimos que o principal mecanismo de adesão à dentina (e também ao esmalte) se baseia num processo de troca, no qual os minerais removidos dos tecidos dentários duros são substituídos por monômeros resinosos que, após a polimerização, tornam-se imbricados nas estruturas aderentes. A etapa de infiltração de monômeros é primária para a obtenção de ótima adesão micromecânica e resistência adesiva (MARSHALL et al., 1997; NISHITANI et al., 2006; LIU et al., 2011). Para que a infiltração seja bem-sucedida, é preciso que os monômeros funcionais e os reticulantes apresentem, em conjunto, boa molhabilidade na dentina desmineralizada úmida (ROSALES et al., 1999; VAN LANDUYT et al., 2007; AGUILAR-MENDOZA et al., 2008; MARSHALL et al., 2010).

Molhabilidade é a tendência de um líquido molhar uma superfície sólida (ATTAL; ASMUSSEN; DEGRANGE, 1994). Embora não possua unidade física associada, ela pode ser representada/inferida pelo ângulo formado entre a superfície do líquido (gota) e a interface

líquido-sólido, denominado ângulo de contato (θ). Se o espalhamento é completo (ótima molhabilidade), o AC tende a zero e o líquido adquire forma de filme sobre a superfície. O aferimento de AC no ponto sólido-líquido-ar pelo método ADSA-P é uma das formas mais simples de se obter informações sobre o espalhamento de líquidos em superfícies sólidas (SPELT et al., 1987).

Nossos resultados mostraram que a adição de RB ou FS (nas concentrações investigadas) nos adesivos MP e SE não afeta o AC observado em superfícies padronizadas de PMMA. Ressaltamos que o AC foi aferido após 8 s, quando o adesivo ainda estava se espalhando sobre a superfície de PMMA, e após 30 s, quando a fase líquida já se encontrava em maior equilíbrio com a sólida. Qualquer generalização a respeito da molhabilidade das resinas marcadas, porém, deve ser feita com cautela, pois os testes foram realizados sob superfícies padronizadas de PMMA em vez da dentina humana, o substrato natural onde os adesivos são aplicados.

Como os valores de AC dependem não somente da tensão superficial do líquido, mas também da topografia superficial e energia superficial do substrato sólido, a utilização de superfícies sólidas homogêneas, lisas e não porosas é ideal (WEGE et al., 2002). Por isso, optamos pela utilização de blocos padronizados de PMMA em vez de amostras de dentina. A dentina humana é heterogênea e apresenta rugosidade, porosidade (capilaridade) e umidade, caracterizando-se como um substrato não ideal para a realização da medida de AC pelo método ADSA-P (WEGE et al., 2003). A Figura 32 mostra como o substrato dentinário é irregular a nível microscópico.

Fonte: Wege et al. (2003).

Figura 32 - Microscopia eletrônica de varredura de superfícies dentinárias após (a) desgaste com lixa de abrasiva e (b) desgaste seguido de condicionamento com ácido fosfórico

Ainda que superfícies de dentina cortadas/planificadas (ver Figura 14) tivessem sido utilizadas como fase sólida nesse experimento, estariam longe de representar, rigorosamente, o substrato natural sobre o qual o adesivo MP ou SE é aplicado. Esse substrato corresponde a uma rede de colágeno completa ou parcialmente exposta (*i.e.*, a dentina desmineralizada), infiltrada pelo *primer* e na qual se encontram, ainda, água e resíduos minerais – todos esses componentes em concentrações desconhecidas. Nessas condições mais realísticas, aferir o AC contrariaria as bases teóricas que norteiam a viabilidade do teste.

6.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÉTODO DE DISPERSÃO DE CORANTES

Tem sido difícil encontrar na literatura instruções detalhadas sobre a dispersão de corantes fluorescentes em diferentes tipos de sistemas adesivos (D'ALPINO et al., 2006a). A forma mais simples de marcar um material resinoso é dispersar um corante de baixo peso molecular, normalmente um pó fino, no sistema monomérico (AOKI, 2014). A homogeneização do sistema pode ser conseguida com o uso de um agitador tipo “Vortex” por exemplo. Isso pode ser de fácil execução quando da marcação de sistemas monoméricos diluídos em solventes orgânicos, tais como etanol, acetona ou clorofórmio, porque muitos corantes são prontamente solúveis em tais solventes (D'ALPINO et al., 2006b; KHALILZADEH; GHORBANZADEH; MOGHIMI, 2008; ARRAIS et al., 2009). No entanto, a adição de um corante diretamente a sistemas monoméricos viscosos e não solvatados pode ser problemática. As resinas adesivas marcadas nesse estudo consistem em misturas de metacrilato hidrofóbicas, viscosas e isentas de solventes (VAN LANDUYT et al., 2007; PASHLEY et al., 2011). Num estudo piloto (dados não publicados), alíquotas de adesivo MP ou SE foram transferidas para pequenos recipientes onde havia certa quantidade de RB (correspondendo a uma concentração de 0,5 mg/mL). Após agitação em agitador tipo “Vortex” e, por fim, em um agitador orbital, aglomerados de corantes nas amostras, aderidos às paredes internas dos tubos, ainda podiam ser observados (Figura 33).

Figura 33 - Tubo contendo mistura incompleta de adesivo com rodamina B

A adição de um solvente como o etanol aos adesivos puros, para facilitar a dispersão do corante, não era uma opção aqui, porque isso poderia afetar o grau de conversão, a estrutura e propriedades mecânicas das resinas (YE et al., 2007). Para forçar a dispersão de RB nos adesivos, uma broca esférica adaptada à peça de mão de turbina odontológica foi empregada como um agitador mecânico poderoso (até 20.000 rpm). Com o uso desse aparato, não foram observados, a olho nu, aglomerados de RB nas amostras de resina e/ou nas paredes dos tubos após alguns minutos de agitação.

Em contraste com o método de marcação no qual quantidades de corante são adicionadas diretamente ao frasco de adesivo fornecido pelo fabricante (D'ALPINO et al., 2006b; ARRAIS et al., 2009), utilizamos um método semidireto de dispersão para medir as massas de RB/FS em escala abaixo do miligrama. Alíquotas diminutas de soluções de etanol contendo RB ou FS foram transferidas para tubos de ensaio. O solvente serviu apenas como meio para o transporte de massas específicas de corante, sendo completamente evaporado antes da adição dos adesivos. Usando esse método, baixos volumes de resina fluida ($\approx 1,0$ mL) puderam ser marcados com RB/FS em concentrações muito baixas, como 0,004 mg/mL. As massas de corante necessárias para marcar amostras de 1,0 mL em concentrações tão baixas (de corante) não poderiam ser diretamente aferidas numa balança analítica, devido à limitação de resolução. As duas vantagens desse método são, portanto, homogeneização apropriada e economia de materiais de consumo caros, como os adesivos em questão.

6.8 PERSPECTIVAS

Vimos que o fato de corantes fluorescentes serem meramente dispersos em *primers* e adesivos gera dúvidas sobre a localização de componentes individuais na interface de adesão. Resultados inovadores poderiam ser obtidos, se o fluoróforo fosse integrado à estrutura de monômeros de interesse, seja como grupo funcional, seja no meio da cadeia de carbono. Outro possível avanço envolve o uso ou desenvolvimento de fluoróforos capazes de atuar como iniciadores, gerando radicais livres fluorescentes que acabem integrados na estrutura do polímero formado. O uso de adesivos-modelo seria ideal para a realização de novos estudos envolvendo essas ideias.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A menor faixa de concentrações de RB nos adesivos MP e SE, na qual é possível produzir imagens satisfatórias da interface dentina-adesivo via MCVL, situa-se entre 0,1–0,02 mg/mL. Já o corante FS deve ser adicionado a esses adesivos a pelo menos 0,5 mg/mL para produzir níveis de fluorescência satisfatórios na interface de adesão.

Em linhas específicas, concluímos que:

- a. os espectros de emissão e de excitação da RB e da FS nos adesivos MP e SE foram influenciados pelo meio polimérico e pela concentração de corante de modo geral – especialmente no que se refere ao deslocamento do máximo comprimento de onda de emissão/excitação;
- b. o fenômeno de supressão de fluorescência não ocorre em amostras polimerizadas dos adesivos MP e SE contendo elevadas concentrações de RB ou FS, ao contrário do que se observou em soluções etanólicas desses corantes;
- c. a fluorescência da FS, sensível ao pH do meio, pode ser notavelmente menor no adesivo autocondicionante, a depender da concentração de corante utilizada;
- d. a adição de RB ou FS em concentração $\leq 0,5$ mg/mL aos adesivos MP e SE não afeta o grau de conversão de cada adesivo;
- e. a adição de RB ou FS em concentração $\leq 0,5$ mg/mL aos adesivos MP e SE não afeta a molhabilidade (avaliada por medida de ângulo de contato) de cada adesivo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abedin F, Ye Q, Song L, Ge X, Camarda K, Spencer P. Effect of partition of photo-initiator components and addition of iodonium salt on the photopolymerization of phase-separated dental adhesive. *JOM*. 2016;68(4):1090-9.
- Aguilar-Mendoza JA, Rosales-Leal JI, Rodríguez-Valverde MA, González-López S, Cabrerizo-Vílchez MA. Wettability and bonding of self-etching dental adhesives. *Dent Mater*. 2008;24(7):994-1000.
- Aoki H. Fluorescence microscopy techniques for the structural analysis of polymer materials. In: Thomas S, Grohens Y, Jyotishkumar P. Characterization of polymer blends. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2014. p. 609-24.
- Araújo CTP, Prieto LT, Oliveira DCRS, Coppini EK, Lima AF, Silva WJ, et al. Influence of fluorescent dye on mechanical properties of adhesive systems. *Int J Adhes Adhes*. 2013;47:129-33.
- Arrais CAG, Miyake K, Rueggeberg FA, Pashley DH, Giannini M. Micromorphology of resin/dentin interfaces using 4th and 5th generation dual-curing adhesive/cement systems: a confocal laser scanning microscope analysis. *J Adhes Dent*. 2009;11(1):15-26.
- Attal JP, Asmussen E, Degrange M. Effects of surface treatment on the free surface energy of dentin. *Dent Mater*. 1994;10(4):259-64.
- Barcellos DC, Fonseca BM, Pucci CR, Cavalcanti B das N, Persici EDS, Gonçalves SE de P. Zn-doped etch-and-rinse model dentin adhesives: Dentin bond integrity, biocompatibility, and properties. *Dent Mater*. 2016;32(7):940-50.
- Beija M, Afonso CAM, Martinho JMG. Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem Soc Rev*. 2009;38(8):2410.
- Bernas T, Robinson JP, Asem EK, Rajwa B. Loss of image quality in photobleaching during microscopic imaging of fluorescent probes bound to chromatin. *J Biomed Opt*. 2005;10(6):64015.
- Betrissey E, Rizcalla N, Krejci I, Ardu S. Caries diagnosis using light fluorescence devices: VistaProof and DIAGNOdent. *Odontology*. 2014;102(2):330-5.
- Bim Junior, Odair. Estratégias para adição de rodamina B em sistemas adesivos [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2013.
- Bitter K, Paris S, Mueller J, Neumann K, Kielbassa AM. Correlation of scanning electron and confocal laser scanning microscopic analyses for visualization of dentin/adhesive interfaces in the root canal. *J Adhes Dent*. 2009a;11(1):7-14.
- Bitter K, Paris S, Pfuertner C, Neumann K, Kielbassa AM. Morphological and bond strength evaluation of different resin cements to root dentin. *Eur J Oral Sci*. 2009b;117(3):326-33.

- Buchalla W. Comparative fluorescence spectroscopy shows differences in noncavitated enamel lesions. *Caries Res.* 2005;39(2):150-6.
- Claxton NS, Fellers TJ, Davidson MW. Confocal microscopy. *Encyclopedia of medical devices and instrumentation*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2006.
- Cook WD, Chen F. Enhanced photopolymerization of dimethacrylates with ketones, amines, and iodonium salts: the CQ system. *J Polym Sci Part A Polym Chem.* 2011;49(23):5030-41.
- Croce AC, Bottiroli G. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. *Eur J Histochem.* 2014;58(4).
- D'Alpino PHP, Pereira JC, Svizero NR, Rueggeberg FA, Pashley DH. Use of fluorescent compounds in assessing bonded resin-based restorations: a literature review. *J Dent.* 2006a;34(9):623-34.
- D'Alpino PHP, Pereira JC, Svizero NR, Rueggeberg FA, Pashley DH. Factors affecting use of fluorescent agents in identification of resin-based polymers. *J Adhes Dent.* 2006b;8(5):285-92.
- D'Alpino PHP, Pereira JC, Svizero NR, Rueggeberg F a, Carvalho RM, Pashley DH. A new technique for assessing hybrid layer interfacial micromorphology and integrity: two-photon laser microscopy. *J Adhes Dent.* 2006c;8(5):279-84.
- Demchenko AP. Sensing inside living cells and tissues. In: Demchenko AP, editor. *Introduction to fluorescence sensing*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2009. p. 455-506.
- Dempsey GT, Vaughan JC, Chen KH, Bates M, Zhuang X. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat Methods.* 2011;8(12):1027-36.
- Diaspro A, Robello M. Two-photon excitation of fluorescence for three-dimensional optical imaging of biological structures. *J Photochem Photobiol B.* 2000;55(1):1-8.
- Ding PGF, Matzer ARAH, Wolff D, Mente J, Pioch T, Staehle HJ, et al. Relationship between microtensile bond strength and submicron hiatus at the composite-dentin interface using CLSM visualization technique. *Dent Mater.* 2010;26(3):257-63.
- Ding PGF, Wolff D, Pioch T, Staehle HJ, Dannewitz B. Relationship between microtensile bond strength and nanoleakage at the composite-dentin interface. *Dent Mater.* 2009;25(1):135-41.
- Dörfer CE, Staehle HJ, Wurst MW, Duschner H, Pioch T. The nanoleakage phenomenon: influence of different dentin bonding agents, thermocycling and etching time. *Eur J Oral Sci.* 2000;108(4):346-51.
- Drummen GPC. Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques: illuminating biological and biomedical research. *Molecules.* 2012;17(12):14067-90.
- Foreman PC. The excitation and emission spectra of fluorescent components of human dentine. *Arch Oral Biol.* 1980;25(10):641-7.

- Foxton RM, Melo L, Stone DG, Pilecki P, Sherriff M, Watson TF. Long-term durability of one-step adhesive-composite systems to enamel and dentin. *Oper Dent*. 2008;33(6):651-7.
- Francisconi LF, Graeff MSZ, de Moura Martins L, Franco EB, Mondelli RFL, Francisconi PAS, et al. The effects of occlusal loading on the margins of cervical restorations. *J Am Dent Assoc*. 2009;140(10):1275-82.
- Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability-A literature review. *Dent Mater*. 2016;32(2):e41-53.
- Garini Y, Young IT, McNamara G. Spectral imaging: principles and applications. *Cytom A*. 2006;69A(8):735-47.
- Ge X, Ye Q, Song L, Laurence JS, Misra A, Spencer P. Probing the dual function of a novel tertiary amine compound in dentin adhesive formulations. *Dent Mater*. 2016;32(4):519-28.
- Ge X, Ye Q, Song L, Misra A, Spencer P. Visible-light initiated free-radical/cationic ring-opening hybrid photopolymerization of methacrylate/epoxy: polymerization kinetics, crosslinking structure, and dynamic mechanical properties. *Macromol Chem Phys*. 2015;216(8):856-72.
- Ghauharali RI, Brakenhoff GJ. Fluorescence photobleaching-based image standardization for fluorescence microscopy. *J Microsc*. 2000;198(2):88-100.
- Gonçalves MST. Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes. *Chem Rev*. 2009;109(1):190-212.
- Gratton E, vandeVen MJ. Laser sources for confocal microscopy. In: Pawley JB, editor. *Handbook of biological confocal microscopy*. Boston, MA: Springer US; 2006. p. 80-125.
- Griffiths B, Watson T, Sherriff M. The influence of dentine bonding systems and their handling characteristics on the morphology and micropermeability of the dentine adhesive interface. *J Dent*. 1999;27(1):63-71.
- Grobler SR, Oberholzer TG, Rossouw RJ, Grobler-Rabie A, Van Wyk Kotze TJ. Shear bond strength, microleakage, and confocal studies of 4 amalgam alloy bonding agents. *Quintessence Int*. 2000;31(7):501-8.
- Guo X, Peng Z, Spencer P, Wang Y. Effect of initiator on photopolymerization of acidic, aqueous dental model adhesives. *J Biomed Mater Res A*. 2009;90(4):1120-7.
- Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, et al. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J Biomed Mater Res*. 2003;66B(1):287-98.
- Hiraoka Y, Shimi T, Haraguchi T. Multispectral imaging fluorescence microscopy for living cells microscope system designs for multispectral imaging. *Cell Struct Funct*. 2002;27(5):367-74.
- Hoorfar M, Neumann AW. Recent progress in Axisymmetric Drop Shape Analysis (ADSA). *Adv Colloid Interface Sci*. 2006;121(1-3):25-49.

- Ishikawa-Ankerhold HC, Ankerhold R, Drummen GPC. Advanced fluorescence microscopy techniques - FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*. 2012;17(12):4047-132.
- Jakubiak J, Allonas X, Fouassier JP, Sionkowska A, Andrzejewska E, Linden LÅ, et al. Camphorquinone-amines photoinitiating systems for the initiation of free radical polymerization. *Polymer (Guildf)*. 2003;44(18):5219-26.
- Johnson I. The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies. 11th ed. Life Technologies Corporation; 2010.
- Khalilzadeh J, Ghorbanzadeh AM, Moghimi A. Influence of dyes doped in solid state polymeric matrices as spectral converters on efficiency of a flash-lamp pumped Nd:YAG laser. *Opt Mater (Amst)*. 2008;30(10):1527-30.
- Klonis N, Sawyer WH. Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution. *J Fluoresc*. 1996;6(3):147-57.
- Krejci I, Schüpbach P, Balmelli F, Lutz F. The ultrastructure of a compomer adhesive interface in enamel and dentin, and its marginal adaptation under dentinal fluid as compared to that of a composite. *Dent Mater*. 1999;15(5):349-58.
- Kristoffersen AS, Erga SR, Hamre B, Frette Ø. Testing fluorescence lifetime standards using two-photon excitation and time-domain instrumentation: rhodamine B, coumarin 6 and lucifer yellow. *J Fluoresc*. 2014;24(4):1015-24.
- Kubin RF, Fletcher AN. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *J Lumin*. 1982;27(4):455-62.
- Kwok DY, Neumann AW. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Adv Colloid Interface Sci*. 1999;81(3):167-249.
- Kwon T-Y, Bagheri R, Kim YK, Kim K-H, Burrow MF. Cure mechanisms in materials for use in esthetic dentistry. *J Investig Clin Dent*. 2012;3(1):3-16.
- Lakowicz JR. Fluorophores. In: Lakowicz JR, editor. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston, MA: Springer US; 2006a. p. 63-95.
- Lakowicz JR. Fluorescence sensing. In: Lakowicz JR, editor. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston, MA: Springer US; 2006b. p. 623-73.
- Lakowicz JR. Introduction to fluorescence. In: Lakowicz JR, editor. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston, MA: Springer US; 2006c. p. 1-26.
- Lakowicz JR. Solvent and environmental effects. In: Lakowicz JR, editor. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston, MA: Springer US; 2006d. p. 205-35.
- Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston, MA: Springer US; 2006e.
- Lakowicz JR. Quenching of fluorescence. In: Lakowicz JR, editor. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston, MA: Springer US; 2006f. p. 277-330.

- Langer A, Ilie N. Dentin infiltration ability of different classes of adhesive systems. *Clin Oral Investig*. 2013;17(1):205-16.
- Lee K, Povlich LK, Kim J. Recent advances in fluorescent and colorimetric conjugated polymer-based biosensors. *Analyst*. 2010;135(9):2179.
- Leitune VCB, Collares FM, Trommer RM, Andrioli DG, Bergmann CP, Samuel SMW. The addition of nanostructured hydroxyapatite to an experimental adhesive resin. *J Dent*. 2013;41(4):321-7.
- Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res*. 2011;90:953-68.
- Malacarne-Zanon J, Pashley DH, Agee KA, Foulger S, Alves MC, Breschi L, et al. Effects of ethanol addition on the water sorption/solubility and percent conversion of comonomers in model dental adhesives. *Dent Mater*. 2009;25(10):1275-84.
- Marshall GWJ, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent*. 1997;25(6):441-58.
- Marshall SJ, Bayne SC, Baier R, Tomsia AP, Marshall GW. A review of adhesion science. *Dent Mater*. 2010;26(2):e11-6.
- Matsumoto H, Kitamura S, Araki T. Applications of fluorescence microscopy to studies of dental hard tissue. *Front Med Biol Eng*. 2000;10(4):269-84.
- Mondal PP, Diaspro A. General Fluorescence Imaging Techniques. In: Mondal PP, Diaspro A. *Fundamentals of fluorescence microscopy: exploring life with light*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014a. p. 135-47.
- Mondal PP, Diaspro A. Molecular physics of fluorescent markers. In: Mondal PP, Diaspro A. *Fundamentals of fluorescence microscopy: exploring life with light*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014b. p. 95-107.
- Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater*. 2005;21(10):895-910.
- Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*. 1982;16(3):265-73.
- Nakabayashi N, Saimi Y. Bonding to Intact Dentin. *J Dent Res*. 1996;75(9):1706-15.
- Nishitani Y, Yoshiyama M, Donnelly AM, Agee KA., Sword J, Tay FR, et al. Effects of resin hydrophilicity on dentin bond strength. *J Dent Res*. 2006;85(11):1016-21.
- Oleari C. Chromaticity Diagram from Newton to the CIE 1931 Standard System. In: Oleari C, editor. *Standard colorimetry: definitions, algorithms and software*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015. p. 237-51.
- Paddock SW. An introduction to confocal imaging. In: Paddock SW, editor. *Confocal microscopy*. New Jersey: Humana Press; 1999. p. 1-34.

- Park J, Ye Q, Topp EM, Misra A, Kieweg SL, Spencer P. Effect of photoinitiator system and water content on dynamic mechanical properties of a light-cured bisGMA/HEMA dental resin. *J Biomed Mater Res A*. 2010;93(4):1245-51.
- Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011;27(1):1-16.
- Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent*. 2007;20(1):7-20.
- Pawley J. The 39 steps: a cautionary tale of quantitative 3-D fluorescence microscopy. *Biotechniques*. 2000;28(5):884-6, 888.
- Pawley JB. Points, pixels, and gray levels: digitizing image data. In: Pawley JB, editor. *Handbook of biological confocal microscopy*. Boston, MA: Springer US; 2006. p. 59-79.
- Pioch T, Jakob H, Garcia-Godoy F, Gotz H, Dorfer CE, Staehle HJ. Surface characteristics of dentin experimentally exposed to hydrofluoric acid. *Eur J Oral Sci*. 2003;111(4):359-64.
- Pioch T, Kobaslija S, Schagen B, Götz H. Interfacial micromorphology and tensile bond strength of dentin bonding systems after NaOCl treatment. *J Adhes Dent*. 1999;1(2):135-42.
- Pioch T, Stotz S, Staehle HJ, Duschner H. Applications of confocal laser scanning microscopy to dental bonding. *Adv Dent Res*. 1997;11(4):453-61.
- Ramesh Kumar KR, Shanta Sundari KK, Venkatesan A, Chandrasekar S. Depth of resin penetration into enamel with 3 types of enamel conditioning methods: A confocal microscopic study. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2011;140(4):479-85.
- Reisfeld R, Yariv E, Minti H. New developments in solid state lasers. *Opt Mater (Amst)*. 1997;8(1):31-6.
- Robertson T, Bunel F, Roberts M. Fluorescein derivatives in intravital fluorescence imaging. *Cells*. 2013;2(3):591-606.
- Rosales JI, Marshall GW, Marshall SJ, Watanabe LG, Toledano M, Cabrerizo M, et al. Acid-etching and Hydration Influence on Dentin Roughness and Wettability. *J Dent Res*. 1999;78(9):1554-9.
- Rueggeberg FA, Hashinger DT, Fairhurst CW. Calibration of FTIR conversion analysis of contemporary dental resin composites. *Dent Mater*. 1990;6(4):241-9.
- Sampaio PCP, de Almeida Júnior AA, Francisconi LF, Casas-Apayco LC, Pereira JC, Wang L, et al. Effect of conventional and resin-modified glass-ionomer liner on dentin adhesive interface of Class I cavity walls after thermocycling. *Oper Dent*. 2011;36(4):403-12.
- Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014;2014(10):pdb.top071795.

- Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, et al. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater.* 1994a;10(4):236-40.
- Sano H, Shono T, Takatsu T, Hosoda H. Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. *Oper Dent.* 1994b;19(2):59-64.
- Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(2):136-51.
- Santini A, Miletic V. Quantitative micro-Raman assessment of dentine demineralization, adhesive penetration, and degree of conversion of three dentine bonding systems. *Eur J Oral Sci.* 2008;116(2):177-83.
- Sauer M, Hofkens J, Enderlein J. Basic principles of fluorescence spectroscopy. In: Sauer M, Hofkens J, Enderlein J. *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2011. p. 1-30.
- Sauro S, Osorio R, Watson TF, Toledano M. Assessment of the quality of resin-dentin bonded interfaces: an AFM nano-indentation, μ TBS and confocal ultramorphology study. *Dent Mater.* 2012;28(6):622-31.
- Sauro S, Pashley DH, Mannocci F, Tay FR, Pilecki P, Sherriff M, et al. Micropermeability of current self-etching and etch-and-rinse adhesives bonded to deep dentine: a comparison study using a double-staining/confocal microscopy technique. *Eur J Oral Sci.* 2008;116(2):184-93.
- Sauro S, Toledano M, Aguilera FS, Mannocci F, Pashley DH, Tay FR, et al. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. *Dent Mater.* 2010;26(4):368-79.
- Scaduto RC, Grottyhann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J.* 1999;76(1):469-77.
- Schäferling M. The art of fluorescence imaging with chemical sensors. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012;51(15):3532-54.
- Schüpbach P, Krejci I, Lutz F. Dentin bonding: effect of tubule orientation on hybrid-layer formation. *Eur J Oral Sci.* 1997;105(4):344-52.
- Semwogerere D, Weeks ER. Confocal microscopy. In: Wnek GE, Bowlin GL, editors. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*. 2nd ed. CRC Press; 2008. p. 705-14.
- Setiawan D, Kazaryan A, Martoprawiro MA, Filatov M. A first principles study of fluorescence quenching in rhodamine B dimers: how can quenching occur in dimeric species? *Phys Chem Chem Phys.* 2010;12(37):11238-44.
- Sidhu SK, Pilecki P, Cheng PC, Watson TF. The morphology and stability of resin-modified glass-ionomer adhesive at the dentin/resin-based composite interface. *Am J Dent.* 2002;15:129-36.

- Sidhu SK, Watson TE. Interfacial characteristics of resin-modified glass-ionomer materials: a study on fluid permeability using confocal fluorescence microscopy. *J Dent Res*. 1998;77(9):1749-59.
- Singh S, Kanetkar VR, Sridhar G, Muthuswamy V, Raja K. Solid-state polymeric dye lasers. *J Lumin*. 2003;101(4):285-91.
- Sjöback R, Nygren J, Kubista M. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*. 1995;51(6):L7-21.
- So PTC, Dong CY, Masters BR, Berland KM. Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annu Rev Biomed Eng*. 2000;2(1):399-429.
- Song A, Zhang J, Zhang M, Shen T, Tang J. Spectral properties and structure of fluorescein and its alkyl derivatives in micelles. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2000;167(3):253-62.
- Specht EA, Braselmann E, Palmer AE. A critical and comparative review of fluorescent tools for live cell imaging. *Annu Rev Physiol*. 2017;79(1):annurev-physiol-022516-034055.
- Spelt JK, Rotenberg Y, Absolom DR, Neumann AW. Sessile-drop contact angle measurements using axisymmetric drop shape analysis. *Colloids and Surfaces*. 1987;24(2-3):127-37.
- Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res*. 2002;62(3):447-56.
- Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, et al. Adhesive/Dentin Interface: The Weak Link in the Composite Restoration. *Ann Biomed Eng*. 2010;38(6):1989-2003.
- Stansbury J, Dickens S. Determination of double bond conversion in dental resins by near infrared spectroscopy. *Dent Mater*. 2001;17(1):71-9.
- Stephens DJ, Allan VJ. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science*. 2003;300(5616):82-6.
- Stokes G. On the change of refrangibility of light. *Phil Trans R Soc Lond*. 1852;142:463-562.
- Tay FR, King NM, Chan K, Pashley DH. How can nanoleakage occur in self-etching adhesive systems that demineralize and infiltrate simultaneously? *J Adhes Dent*. 2002;4(4):255-69.
- Tay FR, Pashley DH, Hiraishi N, Imazato S, Rueggeberg FA, Salz U, et al. Tubular occlusion prevents water-treeing and through-and-through fluid movement in a single-bottle, one-step self-etch adhesive model. *J Dent Res*. 2005;84(10):891-6.
- Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldini S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer - A review. *Dent Mater*. 2013;29(10):999-1011.

- Toledano M, Osorio E, Aguilera FS, Sauro S, Cabello I, Osorio R. In vitro mechanical stimulation promoted remineralization at the resin/dentin interface. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014;30:61-74.
- Toledano M, Sauro S, Cabello I, Watson T, Osorio R. A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dent Mater.* 2013;29(8):e142-52.
- Valeur B, Berberan-Santos MN. Introduction. In: Valeur B, Berberan-Santos MN. *Molecular fluorescence* [Internet]. 2nd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2012a. p. 1-30.
- Valeur B, Berberan-Santos MN. Characteristics of fluorescence emission. In: Valeur B, Berberan-Santos MN. *Molecular fluorescence*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2012b. p. 53-74.
- Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials.* 2007;28(26):3757-85.
- Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent.* 2003;28(3):215-35.
- Van Meerbeek B, Dhem A, Goret-Nicaise M, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. *J Dent Res.* 1993;72(2):495-501.
- Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater.* 2011;27(1):17-28.
- Wagner A, Wendler M, Petschelt A, Belli R, Lohbauer U. Bonding performance of universal adhesives in different etching modes. *J Dent.* 2014;42(7):800-7.
- Wagner B. The use of coumarins as environmentally-sensitive fluorescent probes of heterogeneous inclusion systems. *Molecules.* 2009;14(1):210-37.
- Wang L, Bim O Júnior, Lopes AC, Francisconi-Dos-Rios LF, Maenosono RM, D'Alpino PH, et al. Waterinteraction and bond strength to dentin of dye-labelled adhesive as a function of the addition of rhodamine B. *J Appl Oral Sci.* 2016;24(4):317-24.
- Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(7):995-1022.
- Waters JC. Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *J Cell Biol.* 2009;185(7):1135-48.
- Watson T. Fact and artefact in confocal microscopy. *Adv Dent Res.* 1997;11(4):433-41.
- Watson TF. A Confocal optical microscope study of the morphology of the tooth/restoration interface using scotchbond 2 dentin adhesive. *J Dent Res.* 1989;68(6):1124-31.

- Watson TF, Azzopardi A, Etman M, Cheng PC, Sidhu SK. Confocal and multi-photon microscopy of dental hard tissues and biomaterials. *Am J Dent*. 2000;13(Spec No):19D-24.
- Watson TF, Boyde A. The use of fluorescent markers for studying the distribution of a dentine bonding agent between a composite restoration and tooth. *Clin Mater*. 1987a;2(1):45-53.
- Watson TF, Boyde A. Tandem scanning reflected light microscopy: a new method for in vitro assessment of dental operative procedures and restorations. *Clin Mater*. 1987b;2(1):33-43.
- Watson TF, Boyde A. Tandem scanning reflected light microscopy: applications in clinical dental research. *Scanning Microsc*. 1987c;1(4):1971-81.
- Watson TF, Boyde A. Confocal light microscopic techniques for examining dental operative procedures and dental materials. A status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent*. 1991;4(4):193-200.
- Watson TF, Wilmot DMJ. A confocal microscopic evaluation of the interface between Syntac adhesive and tooth tissue. *J Dent*. 1992;20(5):302-10.
- Wege HA, Aguilar JA, Rodríguez-Valverde MÁ, Toledano M, Osorio R, Cabrerizo-Vílchez MÁ. Dynamic contact angle and spreading rate measurements for the characterization of the effect of dentin surface treatments. *J Colloid Interface Sci*. 2003;263(1):162-9.
- Wege HA, Holgado-Terriza JA, Rosales-Leal JJ, Osorio R, Toledano M, Cabrerizo-Vílchez MÁ. Contact angle hysteresis on dentin surfaces measured with ADSA on drops and bubbles. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2002;206(1-3):469-83.
- Wilson SM, Bacic A. Preparation of plant cells for transmission electron microscopy to optimize immunogold labeling of carbohydrate and protein epitopes. *Nat Protoc*. 2012;7(9):1716-27.
- Wolff D, Geiger S, Ding P, Staehle HJ, Frese C. Analysis of the interdiffusion of resin monomers into pre-polymerized fiber-reinforced composites. *Dent Mater*. 2012;28(5):541-7.
- Ye Q, Park J, Topp E, Spencer P. Effect of photoinitiators on the in vitro performance of a dentin adhesive exposed to simulated oral environment. *Dent Mater*. 2009;25(4):452-8.
- Ye Q, Spencer P, Wang Y, Misra A. Relationship of solvent to the photopolymerization process, properties, and structure in model dentin adhesives. *J Biomed Mater Res A*. 2007;80A(2):342-50.
- Zheng H, Zhan X-Q, Bian Q-N, Zhang X-J. Advances in modifying fluorescein and rhodamine fluorophores as fluorescent chemosensors. *Chem Commun*. 2013;49(5):429-47.
- Zimmermann T, Rietdorf J, Pepperkok R. Spectral imaging and its applications in live cell microscopy. *FEBS Lett*. 2003;546(1):87-92.
- Zucker RM, Rigby P, Clements I, Salmon W, Chua M. Reliability of confocal microscopy spectral imaging systems: use of multispectral beads. *Cytometry A*. 2007;71(3):174-89.

APÊNDICES

APÊNDICE A – PRINCIPAIS MONÔMEROS (METACRILATOS) PRESENTES TANTO EM ADPER™ SCOTCHBOND™ MULTI-PURPOSE, COMO EM CLEARFIL™ SE BOND

HEMA (2-hidroxietil metacrilato)

- fórmula molecular: $C_6H_{10}O_3$
- massa molar: 130,14 g/mol
- monometacrilato funcional
- baixa viscosidade
- relativamente hidrofílico (melhora a infiltração dos monômeros na dentina úmida)

BisGMA (bisfenol-A glicidil metacrilato)

- fórmula molecular: $C_{29}H_{36}O_8$
- massa molar: 512,6 g/mol
- dimetacrilato reticulante (*crosslinking*)
- alta viscosidade
- hidrofóbico (baixa sorção de água)
- melhora propriedades mecânicas (dureza)

APÊNDICE B – TABELA DE CONVERSÃO DE CONCENTRAÇÕES DE RODAMINA B E FLUORESCEÍNA SÓDICA

Relação entre concentrações expressas em miligrama por mililitro (mg/mL) e milimol por mililitro (mmol/mL) para amostras marcadas com rodamina B ou fluoresceína sódica

Concentração de corante em mg/mL	Equivalente em mmol/mL para a rodamina B	Equivalente em mmol/mL para a fluoresceína sódica
0,5	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-3}$
0,1	$2,1 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$
0,02	$4,2 \times 10^{-5}$	$5,3 \times 10^{-5}$
0,004	$8,4 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-5}$

APÊNDICE C – VALIDAÇÃO DE DADOS DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A análise de variância (ANOVA) com um fator foi conduzida, tendo como variável independente a **condição experimental do adesivo Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose** e como variável dependente a **proporção R_a** (absorbância em 1.635 cm^{-1} /absorbância em 1.608 cm^{-1} ; espectros de infravermelho registrados antes da polimerização de cada amostra). Com $\alpha = 0,05$, houve diferença estatística significativa entre as médias de R_a ($F_{(8,26)} = 4,97$, $p = 0,00$). O teste post-hoc de Tukey revelou, contudo, que as médias do controle não são significativamente diferentes dos demais adesivos contendo corantes (tabela abaixo).

Médias da proporção entre absorbâncias R_a nos espectros de infravermelho do adesivo Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose puro e com diferentes concentrações de rodamina B ou fluoresceína sódica

Condição experimental do adesivo Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose	Média da proporção R_a
Controle (sem corante)	$1,630 \pm 0,004$ ^{a, b, c}
Rodamina B a 0,5 mg/mL	$1,623 \pm 0,010$ ^{a, b, c}
Rodamina B a 0,1 mg/mL	$1,612 \pm 0,015$ ^c
Rodamina B a 0,02 mg/mL	$1,619 \pm 0,009$ ^{b, c}
Rodamina B a 0,004 mg/mL	$1,634 \pm 0,006$ ^{a, b, c}
Fluoresceína sódica a 0,5 mg/mL	$1,629 \pm 0,005$ ^{a, b, c}
Fluoresceína sódica a 0,1 mg/mL	$1,640 \pm 0,003$ ^{a, b}
Fluoresceína sódica a 0,02 mg/mL	$1,642 \pm 0,009$ ^{a, b}
Fluoresceína sódica a 0,004 mg/mL	$1,647 \pm 0,010$ ^a

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

ANOVA com um fator foi conduzida, tendo como variável independente a **condição experimental do adesivo Clearfil™ SE Bond** e como variável dependente a **proporção R_a** . Com $\alpha = 0,05$, não houve diferença estatística significativa entre as médias de R_a ($F_{(8,26)} = 2,01$, $p = 0,10$). Comparação entre médias na tabela abaixo.

Médias da proporção entre absorbâncias R_a nos espectros de infravermelho do adesivo Clearfil™ SE Bond puro e com diferentes concentrações de rodamina B ou fluoresceína sódica

Condição experimental do adesivo Clearfil™ SE Bond	Média da proporção R_a
Controle (sem corante)	$1,854 \pm 0,035$ ^a
Rodamina B a 0,5 mg/mL	$1,896 \pm 0,029$ ^a
Rodamina B a 0,1 mg/mL	$1,879 \pm 0,024$ ^a
Rodamina B a 0,02 mg/mL	$1,861 \pm 0,008$ ^a
Rodamina B a 0,004 mg/mL	$1,862 \pm 0,003$ ^a
Fluoresceína sódica a 0,5 mg/mL	$1,849 \pm 0,016$ ^a
Fluoresceína sódica a 0,1 mg/mL	$1,844 \pm 0,002$ ^a
Fluoresceína sódica a 0,02 mg/mL	$1,846 \pm 0,028$ ^a
Fluoresceína sódica a 0,004 mg/mL	$1,855 \pm 0,008$ ^a

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

APÊNDICE D – RESULTADOS COMPLEMENTARES DE ÂNGULO DE CONTATO (APÓS 8 s)

Médias de ângulo de contato (°) após 8 s dos níveis do fator **adesivo**

Níveis do fator “adesivo”	Ângulo de contato (°)
Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose	22,2 ± 1,0 ^a
Clearfil™ SE Bond	24,8 ± 0,8 ^b

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Médias de ângulo de contato (°) após 8 s dos níveis do fator **tratamento**

Níveis do fator “tratamento”	Ângulo de contato (°)
Controle (sem corante)	23,7 ± 1,6 ^a
Rodamina B a 0,5 mg/mL	23,9 ± 1,5 ^a
Rodamina B a 0,1 mg/mL	23,8 ± 1,2 ^a
Rodamina B a 0,02 mg/mL	23,7 ± 1,4 ^a
Rodamina B a 0,004 mg/mL	23,8 ± 1,4 ^a
Fluoresceína sódica a 0,5 mg/mL	22,6 ± 1,7 ^b
Fluoresceína sódica a 0,1 mg/mL	23,0 ± 1,6 ^{a, b}
Fluoresceína sódica a 0,02 mg/mL	23,5 ± 1,7 ^a
Fluoresceína sódica a 0,004 mg/mL	23,2 ± 2,1 ^{a, b}

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Médias de ângulo de contato (°) após 8 s dos adesivos Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e Clearfil™ SE Bond puros e com diferentes concentrações de rodamina B ou fluoresceína sódica

Tratamento	Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose	Clearfil™ SE Bond
Controle (sem corante)	22,4 ± 0,9 ^{a, b, c}	25,0 ± 1,1 ^d
Rodamina B a 0,5 mg/mL	22,7 ± 0,9 ^{a, b, c}	25,1 ± 0,8 ^d
Rodamina B a 0,1 mg/mL	22,8 ± 0,7 ^{b, c}	24,8 ± 0,6 ^d
Rodamina B a 0,02 mg/mL	22,6 ± 0,7 ^{a, b, c}	24,9 ± 0,7 ^d
Rodamina B a 0,004 mg/mL	22,7 ± 0,9 ^{a, b, c}	25,0 ± 0,6 ^d
Fluoresceína sódica a 0,5 mg/mL	21,2 ± 0,6 ^a	23,9 ± 1,2 ^{c, d}
Fluoresceína sódica a 0,1 mg/mL	21,6 ± 0,5 ^{a, b}	24,4 ± 0,7 ^d
Fluoresceína sódica a 0,02 mg/mL	22,0 ± 0,7 ^{a, b}	25,0 ± 0,7 ^d
Fluoresceína sódica a 0,004 mg/mL	21,4 ± 1,3 ^{a, b}	25,0 ± 0,6 ^d

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

APÊNDICE E – RESULTADOS COMPLEMENTARES DE ÂNGULO DE CONTATO (APÓS 30 s)

Médias de ângulo de contato (°) após 30 s dos níveis do fator **adesivo**

Níveis do fator “adesivo”	Ângulo de contato (°)
Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose	16,5 ± 0,6 ^a
Clearfil™ SE Bond	18,7 ± 0,4 ^b

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Médias de ângulo de contato (°) após 30 s dos níveis do fator **tratamento**

Níveis do fator “tratamento”	Ângulo de contato (°)
Controle (sem corante)	17,7 ± 1,1 ^{a, b}
Rodamina B a 0,5 mg/mL	18,0 ± 1,4 ^b
Rodamina B a 0,1 mg/mL	17,7 ± 1,2 ^{a, b}
Rodamina B a 0,02 mg/mL	17,7 ± 1,0 ^{a, b}
Rodamina B a 0,004 mg/mL	17,7 ± 1,1 ^{a, b}
Fluoresceína sódica a 0,5 mg/mL	17,2 ± 1,4 ^a
Fluoresceína sódica a 0,1 mg/mL	17,4 ± 1,2 ^{a, b}
Fluoresceína sódica a 0,02 mg/mL	17,5 ± 1,2 ^{a, b}
Fluoresceína sódica a 0,004 mg/mL	17,4 ± 1,5 ^a

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Médias de ângulo de contato (°) após 30 s dos adesivos Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose e Clearfil™ SE Bond puros e com diferentes concentrações de rodamina B ou fluoresceína sódica

Tratamento	Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose	Clearfil™ SE Bond
Controle (sem corante)	16,7 ± 0,6 ^{a, b}	18,6 ± 0,5 ^c
Rodamina B a 0,5 mg/mL	16,8 ± 0,7 ^{a, b}	19,3 ± 0,6 ^c
Rodamina B a 0,1 mg/mL	16,7 ± 0,8 ^{a, b}	18,6 ± 0,4 ^c
Rodamina B a 0,02 mg/mL	16,9 ± 0,5 ^b	18,5 ± 0,4 ^c
Rodamina B a 0,004 mg/mL	16,7 ± 0,4 ^{a, b}	18,7 ± 0,3 ^c
Fluoresceína sódica a 0,5 mg/mL	15,9 ± 0,5 ^a	18,5 ± 0,4 ^c
Fluoresceína sódica a 0,1 mg/mL	16,3 ± 0,4 ^{a, b}	18,6 ± 0,1 ^c
Fluoresceína sódica a 0,02 mg/mL	16,4 ± 0,6 ^{a, b}	18,6 ± 0,3 ^c
Fluoresceína sódica a 0,004 mg/mL	16,1 ± 0,6 ^{a, b}	18,7 ± 0,3 ^c

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da adição de corantes fluorescentes a sistemas adesivos dentários

Pesquisador: Odair Bim Júnior

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37048414.3.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 841.154

Data da Relatoria: 15/10/2014

Apresentação do Projeto:

Corantes fluorescentes como a fluoresceína (FL) e a rodamina B (RB) têm sido adicionados a sistemas adesivos dentários, para a avaliação da interface dente-restauração através de microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). A determinação de uma concentração ideal desses corantes nos adesivos depende tanto de aspectos fotofísicos envolvidos na formação das imagens via MCVL, como da necessidade de preservação de propriedades físico-químicas dos sistemas adesivos. Este estudo pretende (i) estimar faixas ótimas de concentração de FL e RB em dois sistemas adesivos não simplificados, para a realização da MCVL da interface dentina-restauração, e (ii) avaliar o efeito de diferentes concentrações de FL/RB sobre o grau de conversão e o ângulo de contato desses adesivos. Os adesivos Adper Scotchbond Multi-Purpose (MP) e Clearfil SE Bond (SE) serão modificados com FL e RB separadamente e em quatro concentrações decrescentes (mg/mL): 0,50 / 0,10 / 0,02 / 0,01. O comportamento fluorescente dos adesivos corados será, então, investigado por espectroscopia de fotoluminescência e também por MCVL, para o levantamento de dados físico-químicos (quantitativos) e visuais (qualitativos). O grau de conversão dos adesivos puros e contendo FL/RB será avaliado, empregando-se espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. O ângulo de contato das resinas fluidas na composição original e na versão modificada com corantes será estimado pelo método ADSA. Espera-se que a associação entre os recursos visuais, qualitativos e quantitativos ofereça subsídios para a

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: 841.154

utilização de corantes fluorescentes em adesivos de uma maneira consistente e bem embasada.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Este estudo visa à determinação de concentrações ótimas dos corantes fluorescentes fluoresceína (FL) e rodamina B (RB) nos sistemas adesivos dentários Adper Scotchbond Multi-Purpose (MP) e Clearfil SE Bond (SE), considerando-se (I) aspectos fotofísicos envolvidos na análise da interface dente-restauração por microscopia confocal de varredura a laser e (II) a não alteração de algumas propriedades físico-químicas desses adesivos dentários.

Objetivo Secundário:

A) Registrar os espectros de fluorescência (de excitação e de emissão) dos corantes FL/RB em diferentes concentrações nos adesivos MP/SE; B) Avaliar o efeito de diferentes concentrações de FL/RB sobre o grau de conversão dos adesivos MP/SE; C) Avaliar o efeito de diferentes concentrações de FL/RB sobre o ângulo de contato/molhamento dos adesivos MP/SE.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Conforme explicado no documento "Solicitação de dispensa do TCLE" anexo, o projeto de pesquisa proposto não implica em riscos diretos, tendo em vista que não envolve seres humanos na qualidade de participante direto da pesquisa em sua totalidade ou partes dela, tampouco recrutamento de pessoas. A pesquisa envolverá somente a utilização de dentes humanos que tenham sido extraídos previamente por razões terapêuticas e, então, doados mediante um termo de doação de dentes, que também se encontra na lista de documentos anexos.

Benefícios:

Esta pesquisa visa à padronização de um método microscópico utilizado na avaliação (in vitro) da interface dente-restauração, o qual é comumente adotado no estudo e no desenvolvimento de sistemas adesivos dentários. Desta forma, seus benefícios poderão ocorrer de forma indireta, uma vez que novas pesquisas sobre o melhoramento de adesivos dentários poderão ser delineadas com base nas padronizações metodológicas propostas em nosso estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

1. O título do projeto submetido ao CEP na Plataforma Brasil é diferente do projeto de pesquisa, nas informações básicas e no projeto detalhado.

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: 841.154

2. Aceito a a dispensa do TCLE para a realização deste projeto, tendo em vista que a pesquisa não envolverá seres humanos na qualidade de participante direto da pesquisa em sua totalidade ou partes dela. A pesquisa envolverá somente a utilização de dentes humanos que tenham sido extraídos previamente por razões terapêuticas e, então, doados mediante um termo de doação de dentes, que também se encontra na lista de documentos anexos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos exigidos pelo CEP estão apresentados na Plataforma Brasil e adequados

Recomendações:

1. Sugiro deixar um título único.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado após a correção do título.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião extraordinária do CEP de 15.10.2014, 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.

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: 841.154

BAURU, 22 de Outubro de 2014

Assinado por:
Izabel Regina Fischer Rubira Bullen
(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

ANEXO B – REGIÕES APROXIMADAS DE COR NO DIAGRAMA CIE DE CROMATICIDADE

No diagrama CIE de cromaticidade, os matizes são distribuídos ao redor do perímetro do diagrama, enquanto que os cromas (saturação) aumentam da área central neutra (ponto branco) para o perímetro. A figura abaixo mostra as regiões aproximadas de cor nesse diagrama.

Fonte: Choi K, Lee J, Suk H-J. Context-based presets for lighting setup in residential space. Appl Ergon. 2016;52:222-31.