

MARINA DAMASCENO E SOUZA DE CARVALHO CHIARI

**Desenvolvimento e aplicação de partículas de silicato de cálcio para
preservação da interface adesiva**

São Paulo

2023

MARINA DAMASCENO E SOUZA DE CARVALHO CHIARI

**Desenvolvimento e aplicação de partículas de silicato de cálcio para
preservação da interface adesiva**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biomateriais e Biologia Oral) para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga

São Paulo

2023

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

Chiari, Marina Damasceno e Souza de Carvalho.

Desenvolvimento e aplicação de partículas de silicato de cálcio para preservação da interface adesiva / Marina Damasceno e Souza de Carvalho Chiari; orientador Roberto Ruggiero Braga. -- São Paulo, 2023.

245 p. : tab., fig. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Biomateriais e Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original.

1. Silicatos de cálcio. 2. Adesivos dentinários. 3. Remineralização dentária. I. Braga, Roberto Ruggiero. II. Título.

Chiari MDSC. Desenvolvimento e aplicação de partículas de silicato de cálcio para preservação da interface adesiva. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: / / 2023

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À minha família,

Por tornarem meus sonhos os seus. Por serem minha base e esteio. Por apoiarem todas as minhas escolhas sem questionamentos e permitirem que eu voasse longe.

Muito mais do que eu um dia imaginei.

Agradeço por compartilharem a jornada comigo e por serem presença constante, onde quer que eu esteja. Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pela proteção e por estar presente todos os momentos da minha vida. Por nunca ter me faltado, mesmo quando eu não o percebia. Por sempre colocar as pessoas certas em meu caminho que foram, sem dúvidas, essenciais para minha formação pessoal e profissional.

Agradeço carinhosa e especialmente à minha família: aos meus pais **Norma** e **Fernando** por me carregarem no colo e no coração. Por valorizarem a educação e terem me dado todas as oportunidades de chegar até aqui. Por se orgulharem de todas as minhas pequenas conquistas. Me espelho na história de vocês e espero poder um dia ser para os meus filhos o que vocês são para mim hoje. Ao meu irmão **Fernando**, por ser minha alma gêmea. Nossa sintonia é tão inexplicável que acredito ser impossível estarmos sob o mesmo céu por somente 28 anos. Você é meu confidente, companheiro de risadas, choros e meu primeiro melhor amigo. Obrigada pelo afago, carinho, cuidado e torcida. Eu sou porque nós somos.

Ao meu marido **Thomé**, por ter me acompanhado durante todo o percurso desde a iniciação científica até hoje. Agradeço pelo amor, compreensão e companheirismo mesmo nos momentos de instabilidade. Por sempre me proteger quando sinto medo e me incentivar a seguir em frente. Você é a presença mais constante. Mesmo quando ninguém vê. Obrigada por atravessar a tempestade comigo.

Às irmãs da vida **Anna Patsea** e **Rafaela Frigério**, por nunca me deixarem esquecer o valor da amizade. Agradeço por nos mantermos próximas e unidas independente das barreiras físicas. Ter vocês na minha vida é um privilégio. Vocês estão presentes nas minhas memórias mais queridas e vou levá-las para sempre comigo.

Aos atuais e ex **Braguetes** que dividiram comigo todas as conquistas do nosso grupo. Às doutorandas **Handially Vilela** e **Amanda Campos**, obrigada pelo companheirismo e por tornarem minha rotina mais leve. Foi lindo vê-las crescendo no meio acadêmico e me sinto orgulhosa por acompanhar essa evolução desde a iniciação científica. Agradeço aos ICs: **Beatriz Vela**, **Mariana Resende** e **Rodrigo da Silva** e espero poder vê-los seguindo o caminho da pesquisa e crescendo cada vez mais. À **Bruna Fronza** por tudo que me ensinou. Obrigada pelas risadas, choros e fofocas. Te considero como um exemplo de dedicação e sabedoria e agradeço por ter

se tornado uma amiga próxima. Ao pós doutorando **Rafael Trinca** pela disposição e ajuda todas as vezes que precisei.

Agradeço às amigas que o Departamento de Biomateriais e Biologia Oral me deu: **Luísa Brasil, Karina Félix, Mariana Reis, Marcela Rodrigues e Yvette Alania**. Obrigada por me transmitirem confiança e por terem me alegrado mesmo nos dias mais cinzas. Sou grata por nossos caminhos terem se cruzado de uma forma tão maravilhosa e por poder tê-las ter por perto sempre, independente de onde estejamos.

Agradeço ao amigo e colega de profissão **Danilo Bianchi** pela ajuda primordial no ensaio de resistência coesiva. Obrigada pela aula particular de impressão 3D, por ter me recebido gentilmente em seu consultório e despendido de um dia todo para me ajudar com a confecção digital de todas as matrizes utilizadas para esse ensaio.

Aos professores do Departamento de Biomaterais e Biologia Oral, que foram essenciais para o desenvolvimento da minha carreira acadêmica. Embora cada um de vocês tenha sua contribuição especial, vou agradecê-los em conjunto para não cometer injustiças. Meu muito obrigada a(o): **Prof. Dr. Rafael Ballester, Prof. Dr. Paulo César, Profa. Dra. Josete Meira, Prof. Dr. Fernando Nogueira, Prof. Dr. Victor Arana-Chavez, Profa. Dra. Alyne Simões, Prof. Dr. Paulo Capel, Prof. Dr. Leonardo Eloy, Prof. Dr. Igor Medeiros e Prof. Dr. Carlos Francci**.

Aos técnicos **Antônio Carlos Lascala e Douglas Nasedal** que sempre estiveram a postos para me socorrer com os equipamentos do laboratório. Obrigada pela competência, prontidão e por terem me ajudado, sempre de forma carinhosa, nas inúmeras vezes que precisei. Agradeço também às secretárias **Elidamar Guimarães e Rosa Cristina Nogueira** pela paciência, disponibilidade e agilidade para resolver todos os problemas que tive durante a toda a pós graduação.

Ao **Prof. Dr. Flávio Vichi** do **Instituto de Química da USP** por todas as contribuições em nossas pesquisas principalmente por ter me ajudado durante o processo de síntese e caracterização das partículas. Agradeço também ao técnico, **Welber**, pela disposição, prontidão e apoio.

Ao **Prof. Dr. Heitor Marques Honório** da **Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP)** pela prontidão, disponibilidade e paciência para realizar e ajudar na interpretação da estatística de todos os resultados desse projeto. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Fábio Dupart Nascimento** da **Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)** pela imensurável ajuda com os ensaios enzimáticos desse projeto. Você

apareceu num momento em que estávamos desesperançosos e me fez acreditar que existe algum certo milagre nos encontros. Não tenho como agradecer pela contribuição que no final acabou se tornando uma grande parceria. Obrigada pelo acolhimento, orientação, carinho, ensinamentos, paciência e apoio. Agradeço também por ter me apresentado ao **Prof. Dr. Ivarne Tersariol, Profa. Dra. Guacyara da Motta e Prof. Dr. Vitor de Oliveira** aos quais também sou grata pela ajuda, torcida e doçura. Agradeço também aos técnicos do seu laboratório: **Cássio, Elsa e Thaís** pelas gentilezas e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de doutorado (processo nº 2020/05986-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP).

À minha eterna casa **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, representada pelo seu diretor **Prof. Dr. Giulio Gavini**, por ter me introduzido ao mundo da Odontologia e ser responsável por toda minha formação profissional.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço especialmente ao meu orientador, **Prof. Dr. Robero Ruggiero Braga**. Obrigada por ter apostado que aquela menina de dez anos atrás tinha algum potencial. Nunca imaginei que minha vida seguiria o caminho acadêmico, mas você fez com que eu me apaixonasse pela docência e pesquisa. Obrigada por ter me guiado e caminhado comigo na área científica. Pela paciência, respeito, dedicação, amizade e por me ensinar muito além do que eu um dia imaginei. Por ter se mantido firme quando eu hesitei. Por ser um exemplo concreto de liderança e de preocupação com a evolução constante da sua equipe. Por ser inspiração e incentivo. Por confiar no meu trabalho e na minha capacidade. Por me desafiar e acreditar em mim, mesmo nas vezes que eu não acreditei. Agradeço também as inúmeras as oportunidades e conquistas que eu tive durante os anos trabalhamos juntos. Foram dez anos que estarão guardados nas minhas memórias mais doces e que vou levar comigo, com muito carinho, para a vida inteira. Muito obrigada!

“Quem elegeu a busca não pode recusar a travessia.

O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

Guimarães Rosa

RESUMO

Chiari MDSC. Desenvolvimento e aplicação de partículas de silicato de cálcio para preservação da interface adesiva [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. Versão Original.

A incorporação de partículas de vidros bioativos, silicatos de cálcio e ortofosfatos de cálcio em sistemas adesivos tem se mostrado uma estratégia efetiva para reduzir a degradação enzimática do colágeno na camada híbrida e promover a precipitação de apatita na interface adesivo-dentinária. Assim sendo, os objetivos desse projeto foram: 1) investigar o efeito de variáveis da síntese (razão entre os precursores, pH, temperatura e quantidade de surfactante) sobre as características de partículas de silicato de cálcio (SC) obtidas pelo método sol-gel. Os aglomerados de nanopartículas foram caracterizados quanto à fase obtida (difratometria de raios-x/DRX), razão entre cálcio e silício/Ca:Si (espectrometria por fluorescência de raio-x/FRX), distribuição de tamanhos (espalhamento de laser), área superficial (método BET), densidade teórica e morfologia (microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, MEV/MET); 2) avaliar o efeito da incorporação de 5% em massa destas partículas em um sistema adesivo comercial (Adper Scotchbond Multipurpose, 3M ESPE) sobre o grau de conversão imediato (GC), resistência coesiva após 24 horas e 12 meses de armazenamento em água deionizada e liberação de íons por até 60 dias em água deionizada; 3) avaliar, após 24 horas, 6 meses e 12 meses de armazenamento em fluido corporal simulado (FCS), o efeito da adição de SC ao sistema adesivo e de um pré-tratamento dentinário experimental contendo SC sobre a dureza e módulo de elasticidade do compósito, camada de adesivo, camada híbrida e dentina; 4) avaliar, após 24 horas e 12 meses de armazenamento em FCS, o efeito da adição de SC ao sistema adesivo e do pré-tratamento experimental sobre a resistência da interface adesiva ao teste de microtração (μ TBS), atividade colagenolítica das proteases (zimografia *in situ*, zimografia reversa, ensaio de hidroxiprolina e espectroscopia de fluorescência) e microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de raios-x por dispersão em energia da interface adesiva (MEV/EDS). Os resultados de GC, resistência coesiva, liberação de íons, dureza, módulo de elasticidade e μ TBS foram

submetidos a análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey para contraste entre as médias, com nível de significância de 5%. Os resultados de caracterização das partículas, zimografia *in situ*, zimografia reversa, ensaio de hidroxiprolina, espectroscopia de fluorescência e MEV/EDS das interfaces são apresentados de forma descritiva. A formação de diferentes fases de silicato de cálcio foi confirmada pelo DRX. A razão Ca:Si foi dependente da razão molar dos precursores e variou de 1,9 a 5,2. No geral, os aglomerados de partículas sintetizadas na presença de maiores quantidades de surfactante apresentaram-se menores. A densidade das partículas variou entre 3,05 e 3,62 g/cm³. Microscopicamente os materiais se apresentaram como aglomerados micrométricos de nanopartículas esféricas ou irregulares com valores de área superficial variando entre 9 e 62 m²/g. O GC não foi afetado pela presença SC no adesivo ($p > 0,05$). Para resistência coesiva, somente foram identificadas diferenças entre os materiais após 12 meses de armazenamento, no qual o adesivo contendo SC apresentou menor resultado ($p < 0,05$). O material contendo SC apresentou maiores liberações de cálcio ($p < 0,05$). Para a avaliação na interface adesiva, a presença de SC no pré-tratamento reduziu os valores de μ TBS (médias agrupadas: sem pré-tratamento/sem P: $37,0 \pm 11,2^A$, pré-tratamento sem SC/P(-): $34,7 \pm 8,3^{AB}$, pré-tratamento com SC/P(+): $30,7 \pm 9,6^B$, $p < 0,05$). Os espécimes envelhecidos apresentaram redução de 36,5% para μ TBS (médias agrupadas 24 horas: $41,9 \pm 6,5^A$, 12 meses: $26,6 \pm 2,5^B$, $p < 0,01$). A adição de SC ao adesivo ou pré-tratamento não afetou a dureza e o módulo de elasticidade do compósito. Na camada de adesivo, para 24 horas, a presença de SC no adesivo (Ad(+)) reduziu a dureza em relação ao adesivo sem SC (Ad(-)) (Ad(-): $21,3 \pm 0,9^A$; Ad(+): $16,2 \pm 1,8^B$, $p < 0,05$). Para o módulo de elasticidade, SC no adesivo (médias agrupadas Ad(-): $4,5 \pm 0,9^A$; Ad(+): $3,8 \pm 0,4^B$) ou pré-tratamento (médias agrupadas: sem P: $4,4 \pm 0,9^A$, P(-): $4,5 \pm 0,7^A$; P(+): $3,6 \pm 0,4^B$) e o tempo de armazenamento (médias agrupadas: 24 horas: $4,7 \pm 1,0^A$, 6 meses $3,9 \pm 0,5^B$, 12 meses $3,9 \pm 0,5^B$) apresentaram reduções estatisticamente significantes ($p < 0,01$). Na camada híbrida a presença de SC no adesivo e/ou pré tratamento promoveu aumentos na dureza e módulo de elasticidade após 6 ou 12 meses de envelhecimento ($p < 0,05$). Para dentina, a presença de SC no adesivo aumentou a dureza e módulo de elasticidade (médias agrupadas para dureza: Ad(-) $68,0 \pm 12,5^B$ e Ad(+)
 $71,7 \pm 12,8^A$; médias agrupadas para módulo de elasticidade: Ad(-) $17,9 \pm 3,0^B$ e Ad(+)
 $18,8 \pm 3,1^A$, $p < 0,05$). A presença de SC no pré-tratamento também foi efetiva para manutenção dos valores de dureza e

módulo de elasticidade após armazenamento, enquanto os grupos sem pré tratamento ou com P(-) apresentaram reduções estatisticamente significantes para propriedades mecânicas após 6 meses de armazenamento ($p < 0,01$). O aumento de conteúdo mineral na camada híbrida após armazenamento pode ser observado nas imagens de MEV/EDS. A zimografia *in situ* demonstrou que a presença de partículas no adesivo e/ou pré tratamento foi capaz de promover inibições enzimáticas nos dois períodos analisados. Apesar da zimografia reversa não indicado inativação enzimática e/ou proteção da gelatina contra a degradação para os grupos contendo SC, os ensaios de hidroxiprolina e espectroscopia de fluorescência para atividade de MMP-2 demonstraram que a presença de partículas no adesivo foi eficaz contra a degradação enzimática. Os resultados sugerem que a menor resistência de união da interface adesiva após o armazenamento pode estar relacionada à degradação da camada adesiva. A presença de SC no adesivo e/ou pré-tratamento pode contribuir para a longevidade da interface adesiva através da precipitação de minerais na camada híbrida e inibição da atividade enzimática.

Palavras-chave: Silicatos de cálcio. Adesivos dentinários. Remineralização dentária.

ABSTRACT

Chiari MDSC. Development and application of calcium silicate particles for adhesive interface preservation [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. Versão Original

Bioactive glasses, calcium silicates and calcium orthophosphates particles application on dental adhesives are an effective strategy to reduce collagen enzymatic degradation at the hybrid layer and to promote apatite precipitation at dentin-adhesive interface. Therefore, this project aims were: 1) investigate the effect of sol-gel synthesis variables over calcium silicate (CS) particles characteristics. Particles were characterized by the obtained phase (X-ray diffraction/XRD), calcium and silicon/Ca:Si ratio (X-ray fluorescence/FRX), size distribution (laser scattering), surface area (BET method), density and morphology (scanning and transmission electron microscopy SEM/TEM); 2) evaluate the effect of 5 wt% of particles incorporation to a commercial dental adhesive (Adper Scotchbond Multipurpose, 3M ESPE) on the degree of conversion (DC), cohesive strength after 24 hours and 12 months of deionized water storage and ions release over 60 days in deionized water; 3) evaluate, after 24 hours, 6 and 12 months of storage in simulated body fluid (SBF), the effect of adding CS to a commercial adhesive system or to an experimental pre-treatment containing CS in relation to hardness and elastic modulus of the composite, adhesive layer, hybrid layer and dentin; 4) evaluate, after 24 hours and 12 months of storage in SBF, the effect of adding CS to a commercial adhesive system or experimental pre-treatment in relation to microtensile bond strength (μ TBS), collagenolytic activity of proteases (*in situ* zymography, reverse zymography, hydroxyproline and fluorescence spectroscopy assays) and scanning electron microscopy/energy dispersive x-ray spectroscopy (SEM/EDX) of the adhesive interface. DC, cohesive strength, ions release, hardness/elastic modulus and μ TBS data were subjected to analysis of variance (ANOVA). In all cases, Tukey test was used for pair-wise comparisons. The global significance level (\pm) was set at 5%. Particles characterization, *in situ* zymography, reverse zymography, hydroxyproline and fluorescence spectroscopy assays and SEM/EDX results were descriptively presented. DRX confirmed the formation of

different calcium silicate phases. Ca:Si ratio was dependent of the precursors molar ratio and ranged from 1.9 to 5.2. In most cases, particles agglomerates synthesized with higher surfactant amounts were smaller. Particles density ranged from 3.05 to 3.62 g/cm³. The materials presented as micrometric agglomerates formed by spherical or irregular nanoparticles with surface area ranging from 9 to 62 m²/g. DC was not affected by CS presence in the adhesive ($p > 0,05$). For adhesive interface evaluation, pre-treatment containing CS presented reductions for μ TBS (pooled data: without pre-treatment/ w/o P: 37.0 ± 11.2^A , pre-treatment without CS/P(-): 34.7 ± 8.3^{AB} , pre-treatment with CS/P(+): 30.7 ± 9.6^B , $p < 0.05$). Aged specimens presented 36.5% reduction for μ TBS (pooled data for 24 hours: 41.9 ± 6.5^A , 12 months: 26.6 ± 2.5^B , $p < 0.01$). Composite hardness and elastic modulus were not affected by CS addition to the adhesive or pre-treatment. For 24 hours at the adhesive layer, CS in the adhesive (Ad(+)) reduced hardness in comparison to the adhesive without particles (Ad(-)) (Ad(-): 21.3 ± 0.9^A ; Ad(+): 16.2 ± 1.8^B , $p < 0.05$). For elastic modulus, CS in the adhesive (pooled data Ad(-): 4.5 ± 0.9^A ; Ad(+): 3.8 ± 0.4^B) or pre-treatment (w/o P: $4.4 \pm 0,9^A$, P(-): 4.5 ± 0.7^A ; P(+): 3.6 ± 0.4^B) or storage period (pooled data for 24 hours: 4.7 ± 1.0^A , 6 months 3.9 ± 0.5^B , 12 months 3.9 ± 0.5^B) presented statistically significant reductions ($p < 0.01$). At the hybrid layer CS added to the adhesive and/or pre-treatment lead to increases for hardness and elastic modulus over 6 or 12 months of storage ($p < 0.05$). For dentin, CS at added to the adhesive increased hardness and elastic modulus (pooled data for hardness: Ad(-) 68.0 ± 12.5^B e Ad(+)) 71.7 ± 12.8^A ; pooled data for elastic modulus: Ad(-) 17.9 ± 3.0^B e Ad(+)) 18.8 ± 3.1^A , $p < 0.05$). Pre-treatment containing CS was also effective for hardness and elastic modulus maintenance after aging, whereas w/o P and P(-) groups presented reductions for mechanical properties after 6 months storage ($p < 0.01$). After 12 months storage, SEM/EDX presented higher mineral content at the hybrid layer. *In situ* zymography revealed that the presence of particles in the adhesive and/or pre-treatment was able to promote enzymatic inhibition for both periods. Although reverse zymography did not indicate enzymatic inactivation and/or gelatin protection against degradation for CS containing groups, the hydroxyproline and fluorescence spectroscopy for MMP-2 activity assays demonstrated that the presence of particles in the adhesive was effective against enzymatic degradation. The results suggest that lower bond strength of the adhesive interface after storage can be related to the adhesive layer degradation. CS presence in the adhesive and/or pre-treatment

may contribute to the longevity of the adhesive interface through mineral precipitation in the hybrid layer and enzymatic activity inhibition.

Keywords: Calcium Silicate. Dental Adhesives. Tooth Remineralization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.1 - Estrutura esquemática das MMPs: (1) Estrutura básica das MMPs (2) Estrutura diferenciada da MMP-2 e MMP-9 com a presença de domínios de fibronectina (3) Estrutura da forma inativa das MMPs e (4) forma ativa após clivagem do pró-domínio e liberação do domínio catalítico (ativo). Imagem reproduzida da monografia da aluna Marina Damasceno e Souza de Carvalho Chiari, disponível em: <https://faculadefacsete.edu.br/monografia/files/original/e898db66b32da3bcc21f3b0fa0e9b2b2.pdf>.....56
- Fgura 2.1 - Estrutura cristalina em 3D (eixo x, y e z) do silicato dicálcico (Ca_2SiO_4), tricalcico (Ca_3SiO_5) e Wollastonita (CaSiO_3). As imagens foram reproduzidas do site: <https://www.mindat.org>65
- Figura 4.1 - Equipamento Vertex-70 associado à unidade de reflectância total atenuada (ambos Bruker Optik GmbH), utilizados para análise de grau de conversão.....84
- Figura 4.2 - Sequência de obtenção dos espectros do adesivo não-polimerizado e polimerizado. A: Dispensação de uma gota de adesivo sobre o cristal do ATR. B: Posicionamento de uma tira de poliéster sobre o adesivo não polimerizado. C: Recobrimento do conjunto com uma lâmina de vidro para evitar a inibição da polimerização pelo oxigênio. D: Fotoativação do adesivo.....84
- Figura 4.3 - Fluxo restaurador dos seis grupos experimentais utilizados para os ensaios de resistência de união à microtração, ensaio de nanoindentação e zimografia *in situ*.....87
- Figura 4.4 - Representação ilustrativa do ensaio de resistência de união à microtração89

Figura 4.5 - Representação ilustrativa do ensaio de nanoindentação	91
Figura 4.6 - Representação ilustrativa do ensaio de zimografia <i>in situ</i>	93
Figura 4.7 - Representação ilustrativa dos incubados contendo gelatina, MMP-2, Ad(+), Ad(-), P(-)Ad(-), P(-)Ad(+), P(+Ad(-), P(+Ad(+)) utilizados para os ensaios de zimografia reversa, hidroxiprolina e espectroscopia de fluorescência para atividade de MMP-2. Para os dois últimos ensaios foram testados incubados contendo P(-) e P(+)) isoladamente	95
Figura 5.1 - Imagens em microscópio eletrônico de varredura das partículas de silicato de cálcio sintetizadas com razão molar 2:1 e 0,6 gramas de CTAB. As imagens estão ordenadas de A a D, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1. A coluna da esquerda e da direita apresentam as imagens em menor e maior aumento, respectivamente.....	103
Figura 5.2 - Imagens em microscópio eletrônico de varredura das partículas de silicato de cálcio sintetizadas com razão molar 2:1 e 1,2 gramas de CTAB. As imagens estão ordenadas de E a H, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1. A coluna da esquerda e da direita apresentam as imagens em menor e maior aumento, respectivamente.....	105
Figura 5.3 - Imagens em microscópio eletrônico de varredura das partículas de silicato de cálcio sintetizadas com razão molar 3:1 e 0,6 gramas de CTAB. As imagens estão ordenadas de I a L, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1. A coluna da esquerda e da direita apresentam as imagens em menor e maior aumento, respectivamente.....	107
Figura 5.4 - Imagens em microscópio eletrônico de varredura das partículas de silicato de cálcio sintetizadas com razão molar 3:1 e 1,2 gramas de CTAB. As imagens estão ordenadas de M a P, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1. A coluna da esquerda e da direita apresentam as imagens em menor e maior aumento, respectivamente.....	109

Figura 5.5 - Imagens de MET das partículas de silicato de cálcio. As imagens estão ordenadas de A a F, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1	113
Figura 5.6 - Imagens de MET das partículas de silicato de cálcio. As imagens estão ordenadas de G a L, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1	114
Figura 5.7 - Imagens de MET das partículas de silicato de cálcio. As imagens estão ordenadas de M a P, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1	115
Figura 5.8 - Difratoograma das partículas após moagem (esquerda) e gráfico de distribuição do tamanho de partículas das sínteses O, P e moída (direita)	117
Figura 5.9 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura (esquerda) e microscopia eletrônica de transmissão (direita) das partículas moídas	118
Figura 5.10 - Médias e desvios-padrão para resistência de união à microtração (em MPa). São apresentadas as médias agrupadas para os fatores que apresentaram significância estatística: pré-tratamento (barras cinzas) e período de armazenamento (duas últimas barras à direita). Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)	122
Figura 5.11 - Médias e desvios-padrão para os valores de dureza (kgf/cm^2) do compósito em função do pré-tratamento, adesivo, tempo de armazenamento e distância da interface adesiva.....	125

Figura 5.12 - Médias e desvios-padrão para os valores módulo de elasticidade (GPa) do compósito em função do pré-tratamento, adesivo, período de armazenamento e distância da interface.....	129
Figura 5.13 - Médias e desvios-padrão para os valores de dureza (kgf/cm ²) do adesivo. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa para interação adesivo*tempo de armazenamento (ANOVA/teste de Tukey, p>0,05)	131
Figura 5.14 - Médias e desvios-padrão para os valores de módulo de elasticidade (GPa) do adesivo.....	133
Figura 5.15 - Médias e desvios-padrão para os valores de dureza (kgf/cm ²) da camada híbrida.....	134
Figura 5.16 - Médias e desvios-padrão para os valores de módulo de elasticidade (GPa) da camada híbrida. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, p>0,05)	137
Figura 5.17 - Médias e desvios-padrão para os valores de dureza (kgf/cm ²) da dentina em função do pré-tratamento, distância da camada híbrida e tempo de armazenamento	139
Figura 5.18 - Médias e desvios-padrão para os valores de módulo de elasticidade (GPa) da dentina em função do pré-tratamento, distância da camada híbrida e tempo de armazenamento	143

Figura 5.19 - Imagem de MEV/EDS para os grupos Ad(-) e Ad(+). Na parte superior são apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura mapeadas com cálcio indicado pela cor amarela e silício com a cor azul. Dentro de cada grupo estão apresentados na parte inferior os gráficos com a intensidade (normalizada) de cálcio (linha vermelha) e fósforo (linha preta) referente a dentina mineralizada, camada híbrida e camada de adesivo nos dois períodos de armazenamento: 24 horas (linhas pontilhadas) e 12 meses (linhas contínuas). Letras brancas indicam: C: Compósito; A: Camada de Adesivo; CH: Camada Híbrida; D: Dentina; SC: Aglomerado de partículas de silicato de cálcio. As interfaces para um mesmo grupo possuem espessuras diferentes uma vez que as análises foram realizadas em espécimes distintos 147

Figura 5.20 - Imagem de MEV/EDS para os grupos P(-)Ad(-) e P(-)Ad(+). Na parte superior são apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura mapeadas com cálcio indicado pela cor amarela e silício com a cor azul. Dentro de cada grupo estão apresentados na parte inferior os gráficos com a intensidade (normalizada) de cálcio (linha vermelha) e fósforo (linha preta) referente a dentina mineralizada, camada híbrida e camada de adesivo nos dois períodos de armazenamento: 24 horas (linhas pontilhadas) e 12 meses (linhas contínuas). Letras brancas indicam: C: compósito; A: camada de adesivo; CH: camada híbrida; D: dentina; SC: aglomerado de partículas de silicato de cálcio. As setas vermelhas indicam os locais onde os aglomerados de silicato de cálcio se desprenderam da interface adesiva. As interfaces para um mesmo grupo possuem espessuras diferentes uma vez que as análises foram realizadas em espécimes distintos 149

Figura 5.21 - Imagem de MEV/EDS para os grupos P(+)*Ad*(-) e P(+)*Ad*(+). Na parte superior são apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura mapeadas com cálcio indicado pela cor amarela e silício com a cor azul. Dentro de cada grupo estão apresentados na parte inferior os gráficos com a intensidade (normalizada) de cálcio (linha vermelha) e fósforo (linha preta) referente a dentina mineralizada, camada híbrida e camada de adesivo nos dois períodos de armazenamento: 24 horas (linhas pontilhadas) e 12 meses (linhas contínuas). Letras brancas indicam: C: compósito; A: camada de adesivo; CH: camada híbrida; D: dentina; SC: aglomerado de partículas de silicato de cálcio. As setas vermelhas indicam os locais onde os aglomerados de silicato de cálcio se desprenderam da interface adesiva. As interfaces para um mesmo grupo possuem espessuras diferentes uma vez que as análises foram realizadas em espécimes distintos..... 151

Figura 5.22 - Interface dentinária correspondente ao grupo *Ad*(-) armazenado por 24 horas. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina..... 155

Figura 5.23 - Interface dentinária correspondente ao grupo *Ad*(-) armazenado por 12 meses. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina..... 157

Figura 5.24 - Interface dentinária correspondente ao grupo Ad(+) armazenado por 24 horas. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina 159

Figura 5.25 - Interface dentinária correspondente ao grupo Ad(+) armazenado por 12 meses. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina 161

Figura 5.26 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(-)Ad(-) armazenado por 24 horas. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina 163

Figura 5.27 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(-)Ad(-) armazenado por 12 meses. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina..... 165

Figura 5.28 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(-)Ad(+) armazenado por 24 horas. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina. 167

Figura 5.29 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(-)Ad(+) armazenado por 12 meses. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina 169

Figura 5.30 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(+)Ad(-) armazenado por 24 horas. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina 171

Figura 5.31 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(+)Ad(-) armazenado por 12 meses. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina 173

Figura 5.32 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(+)**Ad(+)** armazenado por 24 horas. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina 175

Figura 5.33 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(+)**Ad(+)** armazenado por 12 meses. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina..... 177

Figura 5.34 - Análises quantitativas das Figuras 5.22 a 5.33. Na coluna da esquerda são apresentadas as análises para 24 horas de armazenamento. Na coluna da direita são apresentadas as análises para 12 meses de armazenamento. A1/A2: Ad(-); B1/B2: Ad(+); C1/C2: P(-)**Ad(-)**; D1/D2: P(-)**Ad(+)**; E1/E2: P(+)**Ad(-)**; F1/F2: P(+)**Ad(+)** 179

Figura 5.35 - Eletroforese em gel de poliacrilamida dos grupos experimentais incubados por 24 horas a 37 °C. Da esquerda para direita: Padrão de Massa Molecular; Lane 1: Gelatina, MMP-2 e Ad(-); Lane 2: Gelatina, MMP-2 e Ad(+); Lane 3: Gelatina, MMP-2 e P(-)**Ad(-)**; Lane 4: Gelatina, MMP-2 e P(-)**Ad(+)**; Lane 5: Gelatina, MMP-2 e P(+)**Ad(-)**; Lane 6: Gelatina, MMP-2 e P(+)**Ad(+)**; Lane 7: Gelatina e MMP-2; Ctr: Gelatina 181

Figura 5.36 - Eletroforese em gel de poliacrilamida dos grupos experimentais incubados por 3, 6 e 24 horas a 37 °C. Da esquerda para direita: Padrão de Massa Molecular; Lane 1: Gelatina, MMP-2 e P(-)Ad(-) incubados por 3 horas; Lane 2: Gelatina, MMP-2 e P(-)Ad(-) incubados por 6 horas; Lane 3: Gelatina, MMP-2 e P(-)Ad(-) incubados por 24 horas; Lane 4: Gelatina, MMP-2 e P(+)Ad(+) incubados por 3 horas; Lane 5: Gelatina, MMP-2 e P(+)Ad(+) incubados por 6 horas; Lane 6: Gelatina, MMP-2 e P(+)Ad(+) incubados por 24 horas; Lane 7: Gelatina e MMP-2 incubadas por 3 horas; Lane 8: Gelatina e MMP-2 incubadas por 6 horas; Lane 9: Gelatina e MMP-2 incubadas por 24 horas; Ctr: Gelatina incubada por 24 horas..... 181

Figura 5.37 - Médias e desvios-padrão para os resultados de liberação de HYP (nmol/L) em função dos incubados 182

Figura 5.38 - Médias e desvios-padrão para os resultados de espectroscopia de fluorescência para atividade de MMP-2, expressa em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF%) em função dos incubados..... 183

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1 - Grupos experimentais testados de acordo com o tipo de pré-tratamento (com ou sem partículas de SC) e de adesivo (Adper Scotchbond Multipurpose, 3M ESPE) com ou sem partícula82
- Tabela 4.2 - Métodos estatísticos empregados para a análise dos dados de grau de conversão, resistência coesiva do adesivo, liberação de íons, resistência de união à microtração e nanoindentação (módulo de elasticidade e dureza do compósito, camada adesiva, camada híbrida e dentina) de acordo com a análise de variância (ANOVA), fatores, níveis e medidas repetidas (se aplicável)97
- Tabela 5.1 - Fases encontradas no DRX, e resultados obtidos para as análises de espectrometria por fluorescência de raios-x (FRX), distribuição do tamanho de partículas (D_{50}), área superficial e densidade teórica (ρ) e morfologia das dezesseis sínteses realizadas, ordenadas de A a P, em função da razão molar dos precursores, temperatura, quantidade de CTAB e pH do meio reacional..... 101
- Tabela 5.2 - Médias e desvios-padrão para os dados de liberação de íons cálcio e silício (em ppm) no período de 7 dias (determinados em ICP-OES, $n=2$) do adesivo Adper Single Bond 2 (3M ESPE) contendo 10% em massa de partículas dos grupos E, F, H, O e P (de acordo com a Tabela 5.1) 116
- Tabela 5.3 - Resultados obtidos para as análises de FRX/ Razão Ca:Si, distribuição do tamanho de partículas (D_{10} , D_{50} , D_{90}), área superficial e densidade teórica (ρ) das partículas moídas e das sínteses O e P 118

- Tabela 5.4 - Médias e desvios-padrão para grau de conversão (em %) e resistência coesiva (após 24 horas e 12 meses de armazenamento em água) do adesivo (frasco 3, Adper Scotchbond Multipurpose, 3M ESPE) sem (Ad(-)) ou com adição 5% em massa de SC (Ad(+)), em MPa. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula em uma mesma coluna e letras minúsculas em uma mesma linha (apenas para resistência coesiva) indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 119
- Tabela 5.5 - Médias e desvios-padrão das concentrações de íons cálcio e silício (ppm) liberadas pelos grupos Ad(-) e Ad(+) por até 60 dias. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 120
- Tabela 5.6 - Porcentagens dos modos de fratura apresentados em: falha adesiva, coesiva em dentina, coesiva em resina e mista em função dos períodos de armazenamento (24 horas ou 12 meses)..... 123
- Tabela 5.7 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm^2) do compósito para interação **pré-tratamento*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 127
- Tabela 5.8 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm^2) do compósito para interação **distância da interface*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 127
- Tabela 5.9 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de módulo de elasticidade (GPa) do compósito para interação **distância da interface*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 128

- Tabela 5.10 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm²) do adesivo para a interação **adesivo*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 132
- Tabela 5.11 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm²) da camada híbrida para a interação **adesivo*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 135
- Tabela 5.12 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm²) da camada híbrida para a interação **pré-tratamento*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 135
- Tabela 5.13 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm²) da camada híbrida para a interação **pré-tratamento*adesivo**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 136
- Tabela 5.14 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm²) da dentina para a interação **pré-tratamento*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 141
- Tabela 5.15 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm²) da dentina para a interação **distância da camada híbrida*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 142

Tabela 5.16 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de módulo de elasticidade (GPa) da dentina para a interação **pré-tratamento*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 145

Tabela 5.17 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de módulo de elasticidade (GPa) da dentina para a interação **distância da camada híbrida*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

-COH	grupamento aldeído
-COOH	grupos carboxila
-NH ₂	grupamento amino
(Na,Ca)(Al,Mg) ₆ (Si ₄ O ₁₀) ₃ (OH).6H ₂ O	silicato de sódio-cálcio-alumínio-magnésio hidratado
3D	tridimensional
α-CaSiO ₃	polimorfo 1A-Wollastonita
Abz-AGPRGAGQ-EDDnp	peptídeo com supressão intramolecular de fluorescência contendo: grupo fluorescente orto-aminobenzóico - alanina-glicina-prolina-arginina-glicina-alanina-glicina-glutamina - (N-[2, 4-dinitrofenil]-etilenodiamino
ACP	fosfato de cálcio amófo
ANOVA	análise de variâncias
ATR	unidade de reflectância total atenuada
β-CaSiO ₃	2M-Parawollastonita
β-TCP	beta fosfato tricálcico
BAG 45S5	biovidro 45S5 original
BET	método Brunauer, Emmett e Teller
Bi ₂ O ₃	óxido de bismuto
BisGMA	dimetacrilato de glicidila bisfenol A
C-S-H	hidratos de silicato de cálcio
C ₂ S-β	silicato dicálcico polimorfo beta
C ₂ S-γ	silicato dicálcico polimorfo gama
C ₂ S/ Ca ₂ SiO ₄	silicato dicálcico
C ₃ S/ Ca ₃ SiO ₅	silicato tricálcico
Ca:Si	relação/proporção entre cálcio e silício
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	nitrato de cálcio tetrahidratado
Ca(OH) ₂	hidróxido de cálcio/portlandita
Ca ²⁺	íons cálcio

$\text{Ca}_2\text{AlFeO}_5$	aluminoferrita tetracálcica
$\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$	aluminato tricálcico
Ca_3SiO_5	silicato tricálcico
$\text{Ca}_5(\text{SiO}_4)_2\text{CO}_3$	espurrita
$\text{Ca}_6\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{OH})_{12} \cdot 26\text{H}_2\text{O}$	etringita
CaCl_2	cloreto de cálcio
CaCO_3	carbonato de cálcio
CaO	óxido de cálcio
$\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	monosulfoaluminato/monocarboaluminato de cálcio
Ca/P-MMP	complexos entre partículas de cálcio e MMP
CaP	ortofosfato de cálcio
CaSiO_3	wollastonita ou metassilicato de cálcio
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	sulfato de cálcio dihidratado
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHX	clorexidina
cm^{-1}	centímetros elevados a (-1)
$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$	radical alquil
CTAB/ $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$	brometo de hexadeciltrimetilamônio
Cu^{2+}	íon cobre
D_{10}	diâmetros de corte da curva de distribuição acumulada em 10%
D_{50}	mediana da distribuição do tamanho de partículas
D_{90}	diâmetros de corte da curva de distribuição acumulada em 90%
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DIC	contraste de interferência diferencial
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRX	difratometria de raios-X
EDC	1-etil-3-[3-dimetilamino-propil] carbodiimida
EDS	espectroscopia de raios-x por dispersão em energia da interface adesiva

ETOH/C ₂ H ₆ O	álcool Etílico
F ⁻	íon fluoreto
FCS	fluido corpóral simulado
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FRX	espectrometria por fluorescência de raio-x
g	grama(s)
g/cm ³	gramas divididos por centímetros cúbicos
GC	grau de conversão
GPa	gigapascal
HBSS	Hank's balanced salt solution/solução de sais balanceados de Hank
HNO ₃	ácido nítrico
HYP	hidroxiprolina
Hz	hertz
ICP-OES	espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente
IQ-USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
kDa	kilodaltons
kgf/cm ²	kilograma força dividido centímetros quadrados
kV	kilovolts
LCT	Laboratório de Caracterização Tecnológica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo
M(OR) _n	alcóóxido de metal
m ² /g	metros quadrados divididos por gramas
mA	miliamperes
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg/mL	miligramas por mililitro(s)

$\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_{16}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	aluminio-magnésio-carbonato hidratado
mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
mm/min	milímetro(s) por minuto(s)
mm^2	milímetros quadrados
mm^3/mL	milímetros cúbicos divididos por mililitro(s)
mmol/L	milimols divididos por litro(s)
MMPs	metaloproteases da matriz
mN	milinewton(s)
mol/L	mol dividido por litros
MPa	megapascal
MTA	agregado trióxido mineral
mW/cm^2	miliwatts divididos por centímetro quadrado
NaCl	cloreto de sódio
NACP	nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo
NH_4OH	hidróxido de amônio
nm	nanômetro(s)
nmol/L	nanomols divididos por litro(s)
$^\circ/\text{min}$	graus por minuto(s)
O^{2-}	íon oxigênio (ânion)
$^\circ\text{C}/\text{min}$	graus celsius por minuto(s)
OH^-	grupo funcional hidroxila
PEGDMA	polietilenoglicol dimetacrilato
pH	potencial de hidrogênio
PO_4^{3-}	fosfato
PACs	proantocianidinas
ppm	partes por milhão
psi	libra-força por polegada quadrada
ρ	densidade teórica
$\text{R}_1\text{-N=C=N-R}_2$	estrutura química das carbodiimidas
$\text{R}_1\text{-CO-NH-R}_2$	grupo amida
$\text{R}_1\text{-CO-OR}_2$	grupo éster
RNA	ácido ribonucleico
SC	silicato de cálcio

SDS	dodecil sulfato de sódio
Si-O	ligação interatômica silício-oxigênio
Si ⁴⁺	íon silício
SiO ₂	sílica
SiO ₄ ⁴⁻	tetraedro silício-oxigênio
TEOS/Si(OC ₂ H ₅) ₄	tetraetoxisilano
TGF-β1	fator de transformação de crescimento Beta-1
UAF%	unidades arbitrárias de fluorescência em porcentagem
μg	micrograma(s)
μL	microlitro(s)
μm	micrômetro(s)
μmol/L	micromolar dividido por litro(s)
Zn ²⁺	íon zinco
ZnCl ₂	cloreto de zinco
ZnO	óxido de zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
±	mais ou menos
°C	grau(s) Celsius
<	menor
≥	maior ou igual
α	letra grega alfa
β	letra grega beta
γ	letra grega gama
θ	letra grega teta
°	grau(s)
n	número de espécimes por grupo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	49
2	REVISÃO DE LITERATURA	53
2.1	VIAS DE DEGRADAÇÃO DA CAMADA HÍBRIDA.....	53
2.1.1	Degradação hidrolítica da matriz resinosa	53
2.1.2	Degradação enzimática da matriz orgânica ocasionada por MMPs e cisteíno-catepsinas	54
2.2	ALTERNATIVAS PARA A PROMOÇÃO DE ESTABILIDADE DA INTERFACE ADESIVA	57
2.2.1	Inibidores de proteases	57
2.2.2	Agentes de reticulação do colágeno	58
2.2.3	Remineralização da interface adesivo-dentinária e uso de partículas inorgânicas bioativas liberadoras de íons	60
2.3	GENERALIDADES SOBRE SILICATOS DE CÁLCIO	62
2.3.1	Síntese das partículas de silicato de cálcio	67
2.3.2	Silicatos de cálcio aplicados a Odontologia Restauradora	68
3	PROPOSIÇÃO	75
4	MATERIAL E MÉTODOS	77
4.1	SÍNTESE DE PARTÍCULAS DE SILICATO DE CÁLCIO.....	77
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS	78
4.2.1	Difratometria de raios-X (DRX)	78
4.2.2	Espectrometria por fluorescência de raios-x (FRX)	78
4.2.3	Densidade teórica	79
4.2.4	Área superficial (método BET)	79
4.2.5	Espalhamento de luz laser	80
4.2.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	80
4.2.7	Microscopia eletrônica de varredura (MET)	80
4.3	SELEÇÃO DAS PARTÍCULAS PARA AS ETAPAS SUBSEQUENTES.	80
4.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	82
4.5	CARACTERIZAÇÃO DO ADESIVO	83
4.5.1	Grau de conversão	83

4.5.2	Resistência coesiva	85
4.5.3	Liberação de íons	85
4.6	EFEITO REMINERALIZADOR SOBRE A DENTINA DESMINERALIZADA	86
4.6.1	Aspectos éticos	86
4.6.2	Manipulação dos adesivos e preparo dos espécimes	86
4.7	ANÁLISE DA INTERFACE ADESIVA: ENSAIOS MECÂNICOS E MICROESTRUTURA	88
4.7.1	Resistência de união à microtração	88
4.7.2	Avaliação do potencial remineralizador através do ensaio de nanoindentação	89
4.7.3	Microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de raios-x por dispersão em energia das interfaces (MEV/EDS)	90
4.8	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DA ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA/GELATINOLÍTICA	92
4.8.1	Zimografia <i>in situ</i>	92
4.8.2	Zimografia reversa	93
4.8.2	Ensaio de Hidroxiprolina	94
4.8.3	Espectroscopia de fluorescência para atividade de MMP-2	94
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	96
5	RESULTADOS	99
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS	99
5.1.1	Difratometria de raios-X (DRX)	99
5.1.2	Espectometria por fluorescência de raios-x (FRX), área superficial, densidade teórica e tamanho das partículas (D₅₀)	99
5.1.3	Microscopia eletrônica de varredura	100
5.1.4	Microscopia eletrônica de transmissão	111
5.2	LIBERAÇÃO DE ÍONS – AVALIAÇÃO PRELIMINAR	116
5.3	CARACTERIZAÇÃO DA PARTÍCULA APÓS MOAGEM	116
5.4	CARACTERIZAÇÃO DO ADESIVO	119
5.4.1	Grau de conversão e resistência coesiva	119
5.2.4	Liberação de íons	120
5.5	AVALIAÇÃO DA INTERFACE ADESIVA: ENSAIOS MECÂNICOS E MICROESTRUTURA	121

5.5.1	Resistência de união à microtração	121
5.5.2	Nanoindentação	123
5.5.2.1	<i>Compósito</i>	123
5.5.2.2	<i>Camada de adesivo</i>	131
5.5.2.3	<i>Camada híbrida</i>	133
5.5.2.4	<i>Dentina</i>	137
5.5.3	Microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de raios-x por dispersão em energia das interfaces (MEV/EDS)	146
5.6	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA	153
5.6.1	Zimografia <i>in situ</i>	153
5.6.2	Zimografia reversa	180
5.6.3	Ensaio de hidroxiprolina	182
5.6.4	Espectroscopia de fluorescência para atividade de MMP-2	183
6	DISCUSSÃO	185
6.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE SILICATO DE CÁLCIO	185
6.2	CARACTERIZAÇÃO DO ADESIVO QUANTO ÀS SUAS PROPRIEDADES FÍSICAS, MECÂNICAS E LIBERAÇÃO IÔNICA.....	187
6.3	PROPRIEDADES MECÂNICAS DA INTERFACE ADESIVA	189
6.4	ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	193
6.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	195
7	CONCLUSÃO	197
	REFERÊNCIAS	199
	APÊNDICE	231
	ANEXO	243

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais requisitos para longevidade de restaurações adesivas é uma união efetiva e duradoura aos tecidos dentais (1). A camada híbrida formada pela infiltração dos monômeros presentes no sistema adesivo entre as fibrilas colágenas da dentina desmineralizada é o principal mecanismo responsável por esta união (2). Entretanto, os sistemas adesivos atuais são incapazes de promover completa infiltração monomérica nos espaços nanométricos da malha colágena (1, 3, 4), restando espaços preenchidos por água entre as fibrilas colágenas desprotegidas (3-5). O colágeno desmineralizado está sujeito à ação de proteases que somada à hidrólise da matriz resinosa são responsáveis pela perda da integridade na interface adesivo-dentinária ao longo do tempo (6).

As proteases encontradas na matriz dentinária são divididas de acordo com seu mecanismo catalítico em duas subclasses: metaloproteases da matriz (MMPs) e cisteíno-catepsinas (7, 8). Vários métodos têm sido propostos para inibir a ação das MMPs (9) ou aumentar a infiltração monomérica entre as fibrilas de colágeno (9-14), reduzindo assim a degradação da camada híbrida. Íons metálicos (Zn^{2+} , F^- , Cu^{2+}) são capazes de estabelecer ligações a sítios específicos das MMPs e induzir a alterações conformacionais que promovem sua inativação (inibição não-competitiva) (15, 16). Agentes reticuladores externos (crosslinkers) capazes de promover a formação de ligações cruzadas covalentes na malha de colágeno reduzem a susceptibilidade à ação de colagenases. Adicionalmente, estes compostos são capazes de se ligar aos sítios ativos das proteases, reduzindo sua mobilidade ou convertendo grupos carboxila ($-COOH$) em amidas ($R_1-CO-NH-R_2$) carregadas positivamente (17-20). Diferentes reticuladores foram estudados, dentre eles o glutaraldeído (21-23), a carbodiimida (22, 24-26), protoantocianidinas (13, 27, 28), clorexidina (29-31), riboflavina-5-fosfato (13), bromelina (32), quitosana modificada por metacrilato (33) e polifenóis (34, 35).

A precipitação de apatita no interior da camada híbrida é outra estratégia que tem se mostrado eficaz para proteger as fibrilas colágenas contra a atividade colagenolítica (36, 37). Silicatos de cálcio (38, 39), ortofosfatos de cálcio (40) e vidros bioativos (41-43) foram testados como fontes de íons cálcio (Ca^{2+}) que, em associação

com o fosfato presente nos fluídos fisiológicos, têm potencial para promover a precipitação de apatita nos espaços interfibrilares preenchidos por água ou nas regiões com infiltração monomérica incompleta. Adicionalmente, a precipitação mineral é fundamental para que ocorra recuperação das propriedades mecânicas da dentina desmineralizada e inativação das proteases endógenas ativadas pelo condicionamento ácido da dentina durante o procedimento adesivo (8), fatores que em conjunto promoveriam maior longevidade a interface adesiva. Essas partículas liberadoras de íons foram avaliadas como aditivos em sistemas adesivos comerciais (44) e experimentais (36, 41, 45-48). Adicionalmente, suspensões contendo partículas liberadoras de íons foram avaliadas como *primers*, aplicados após o condicionamento ácido da superfície dentinária (38, 49).

Silicatos de cálcio têm uma ampla aplicação em Endodontia por apresentarem características favoráveis quanto ao selamento, liberação iônica, propriedades antimicrobianas e por terem um papel importante na sinalização celular que induzirá a formação de dentina reparadora e reacional (50). Estas partículas foram incorporadas a sistemas adesivos experimentais e proporcionaram a manutenção dos valores de resistência da união à microtração, deposição mineral e menor nanoinfiltração após seis meses de envelhecimento em FCS (39). Outro estudo demonstrou que adesivos experimentais contendo partículas derivadas do silicato de cálcio modificadas por beta fosfato tricálcico (β -TCP) ou por β -TCP, óxido de zinco (ZnO) e ácido poliacrílico foram capazes de aumentar o módulo da camada híbrida após três meses em FCS, sugerindo remineralização (51). Outro estudo do mesmo grupo confirmou esses resultados ao demonstrar que um adesivo experimental contendo partículas de cimento Portland modificadas com β -TCP e ZnO foi capaz de reduzir a degradação do colágeno após quatro semanas de armazenamento em saliva artificial (52).

Partículas liberadoras de íons também foram avaliadas na forma de suspensões aplicadas à dentina desmineralizada, previamente à aplicação do adesivo (*primers* ou pré-tratamentos). O uso de um pré-tratamento experimental contendo partículas de agregado trióxido mineral (MTA) resultou em maior integridade na parede gengival das restaurações feitas *in vitro*, em relação ao grupo controle após seis meses em FCS. Possivelmente, a deposição de apatita no interior dos túbulos dentinários nos grupos tratados com a suspensão de MTA, verificada por MEV, reduziu a permeabilidade e, conseqüentemente, a degradação da interface (38).

Materiais à base de silicatos de cálcio contendo aglomerados de partículas nanométricas (por volta de 80 nm) (53) ou micrométricas (entre 2 μm e 7 μm) (54) foram desenvolvidos para uso em Endodontia. Apesar dos resultados promissores demonstrados em alguns estudos, a aplicação de aglomerados micrométricos de partículas de silicato de cálcio em sistemas adesivos comerciais ou como pré-tratamentos e avaliação a longo prazo das propriedades mecânicas das interfaces restauradas com esses materiais foi pouco explorada. Além disso, ainda há uma escassez de estudos que investiguem a capacidade inibitória enzimática dessas partículas.

Frente ao exposto, o presente estudo teve como objetivo sintetizar aglomerados micrométricos nanoestruturados de silicato de cálcio com alta área superficial e incorporá-los ao procedimento adesivo como uma etapa adicional (na forma de um pré-tratamento) ou diretamente a um sistema adesivo comercial. Seus efeitos sobre interfaces adesivas foram avaliados após 24 horas e 12 meses, em relação a suas propriedades mecânicas e inibição enzimática. O intuito foi promover maior longevidade para a interface adesiva através da remineralização (recuperação das propriedades mecânicas) e inativação enzimática da camada híbrida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VIAS DE DEGRADAÇÃO DA CAMADA HÍBRIDA

2.1.1 Degradação hidrolítica da matriz resinosa

A deterioração da interface adesiva é resultado da hidrólise da matriz orgânica polimérica devido à sorção de água através de uma rede nanométrica de porosidades da camada híbrida, o que ocasiona a plastificação (ou seja, afastamento) das cadeias poliméricas, resultando em áreas com fibrilas colágenas desprotegidas e uma redução das propriedades mecânicas da interface adesiva (55-57). Adicionalmente, os metacrilatos utilizados nas formulações dos sistemas adesivos apresentam grupos éster ($R_1-CO-OR_2$), amida ($R_1-CO-NH-R_2$) e uretano que estão susceptíveis à hidrólise catalisada por ácidos, bases ou enzimas, como as esterases secretadas por microorganismos e presentes nos fluídos corporais (saliva, fluído gengival e intratubular) (56, 58-60).

A degradação hidrolítica dos diferentes adesivos está diretamente relacionada à sua composição química (57-59). Sistemas adesivos autocondicionantes ou de condicionamento total contêm monômeros hidrofílicos ou ácidos que formam interfaces semipermeáveis, permitindo o trânsito de água. Os adesivos de passo único, por apresentarem alta hidrofília, apresentam degradação hidrolítica do componente resinoso mais rápida do que os demais (58, 61, 62).

Sistemas adesivos de condicionamento ácido total e três passos ou sistemas de dois passos autocondicionantes são considerados padrão-ouro na odontologia adesiva (63). Uma razão para a maior longevidade de restaurações realizadas utilizando estes sistemas é o fato de apresentarem um componente hidrofóbico, livre de solventes, que é aplicado sobre o *primer* hidrofílico e apresenta hidrólise em uma velocidade relativamente menor do que componentes com maior conteúdo de monômeros hidrofílicos (64-66). Entretanto, durante a penetração do adesivo, devido a profundidade de condicionamento (no caso dos sistemas de três passos) e o

excesso de água que compete com os monômeros hidrofílicos do *primer*, a infiltração resinosa na malha colágena é comprometida (3, 67). Sendo assim, na camada híbrida, a água residual excessiva pode causar separação de fases dos componentes do sistema adesivo (68, 69) reduzindo as propriedades mecânicas e longevidade da interface adesiva (55, 70).

2.1.2 Degradação enzimática da matriz orgânica ocasionada por MMPs e cisteíno-catepsinas

O colágeno tipo I corresponde à maior parte da substância orgânica presente na estrutura da dentina. Diferentes enzimas são responsáveis pela degradação do colágeno desmineralizado, sendo divididas em classes distintas de acordo com seu mecanismo colagenolítico: metaloproteases da matriz (MMPs) e cisteíno-catepsinas. Essas enzimas são sintetizadas e secretadas principalmente na forma inativa, também chamada de proenzima ou zimógeno (71). As cisteíno-catepsinas são produzidas nos lisossomos e estão envolvidas em diversos processos fisiológicos de remodelamento e reparação tecidual, bem como processos inflamatórios patológicos (por exemplo, artrite reumatoide) (9).

As MMPs são a classe enzimática mais estudada, sendo subdivididas em seis grupos de acordo com sua estrutura e substrato de interação. As de interesse em Odontologia são as colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18) e gelatinases (MMP-2 e MMP-9). As MMPs dos mamíferos possuem um domínio (“sítio”) catalítico responsável pela degradação do colágeno (Figura 1.1 (1)). As MMP-2 e MMP-9, encontradas em suas formas inativas na dentina mineralizada, apresentam domínios de fibronectina tipo II no sítio de ligação, responsáveis pela mediação com o colágeno (Figura 1.1 (2)). Em sua estrutura existe ainda um pró-domínio auto-inibitório que contém resíduos de cisteína (indicados com a letra “C”) que apresentam ligação ao sítio catalítico mediada por íons zinco. Quando o tecido dentinário é desmineralizado por ácidos bacterianos ou durante o procedimento adesivo, ocorre remoção do pró-domínio da estrutura rompendo sua ligação com íon zinco e ocasionando uma alteração conformacional (Figura 1.1 (3)/(4)). Dessa forma, o sítio ativo da enzima torna-se disponível para degradar os substratos (14, 15). As MMPs são denominadas

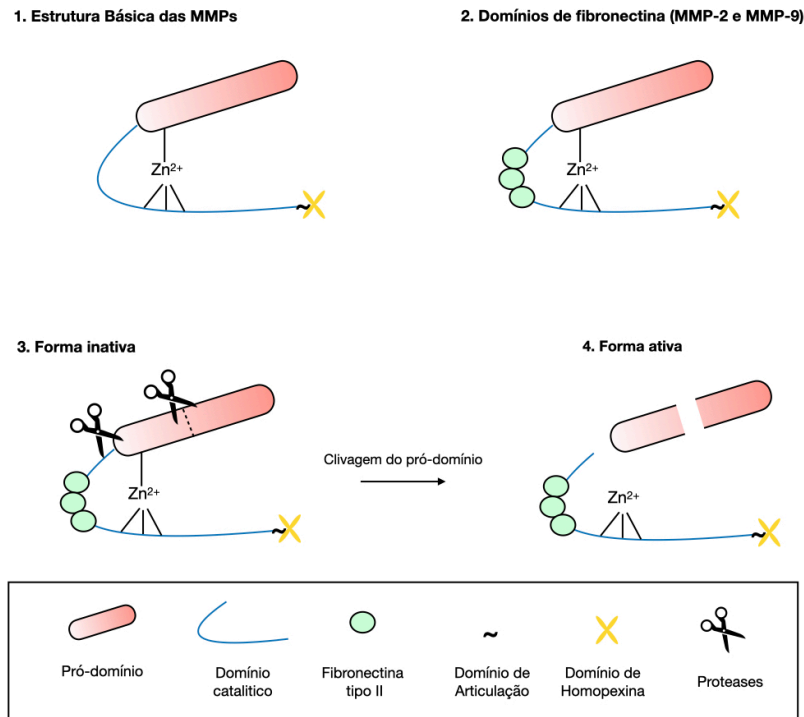
enzimas zinco-dependentes, pois apesar do íon zinco ter-se desligado do pró-domínio, ele se mantém ligado ao domínio catalítico, sendo esta uma condição essencial para que as metaloproteases exerçam sua função colagenolítica (Figura 1.1 (4)).

Existem evidências que comprovam atividade colagenolítica mediada por MMP-2 e MMP-9 na dentina previamente tratada tanto com sistemas de condicionamento ácido total quanto com adesivos autocondicionantes (72). Os *primers* autocondicionantes também podem ativar essas enzimas (73). Geralmente, a degradação se inicia na porção mais profunda da camada híbrida, principalmente daquelas infiltradas incompletamente pela resina (74). Dessa forma, a difusão das MMPs progride para as regiões mais superficiais da dentina ligada à resina, aumentando as porosidades na camada híbrida (75).

As cisteíno-catepsinas degradam o colágeno tipo I em regiões específicas (10). Por exemplo, cisteíno-catepsinas do tipo B e L clivam colágeno nas extensões telopeptídicas não-helicoidais (11), enquanto a catepsina K atua sobre a região helicoidal tripla do colágeno (12). As cisteíno proteases também podem ativar a fosfatase ácida, uma enzima importante envolvida na reabsorção dentinária (13).

Existe um consenso entre os autores que a degradação do colágeno ocorre de maneira mais intensa com a utilização de sistemas adesivos de condicionamento ácido total, uma vez que a aplicação de ácido fosfórico (pH 0,1-0,4) desmineraliza completamente a dentina e em maior profundidade (3 - 6 μ m) deixando as fibrilas de colágeno expostas e mais suscetíveis à degradação enzimática (76). Por outro lado, adesivos autocondicionantes moderados ($1 < \text{pH} < 2$) e fracos ($\text{pH} \geq 2$) não expõem totalmente as fibrilas colágenas e mantém parte da camada de esfregaço na matriz dentinária. Sendo assim, a degradação apresentada por esses sistemas é menor quando comparada aos sistemas de condicionamento ácido total (77, 78).

Figura 1.1 - Estrutura esquemática das MMPs: (1) Estrutura básica das MMPs (2) Estrutura diferenciada da MMP-2 e MMP-9 com a presença de domínios de fibronectina (3) Estrutura da forma inativa das MMPs e (4) forma ativa após clivagem do pró-domínio e liberação do domínio catalítico (ativo). Imagem reproduzida da monografia da aluna Marina Damasceno e Souza de Carvalho Chiari, disponível em: <https://faculdefacsete.edu.br/monografia/files/original/e898db66b32da3bcc21f3b0fa0e9b2b2.pdf>



Fonte: A autora.

2.2 ALTERNATIVAS PARA A PROMOÇÃO DE ESTABILIDADE DA INTERFACE ADESIVA

2.2.1 Inibidores de proteases

Recentemente, uma revisão sistemática identificou 21 tipos diferentes de inibidores de MMPs (79). A estratégia de incorporação desses compostos no procedimento adesivo varia, podendo ser aplicados como um pré-tratamento adicional, incluídos no condicionador ácido, no *primer* ou no adesivo (9).

A clorexidina (CHX) é um agente antimicrobiano muito utilizado clinicamente para inibição de MMPs. Isso decorre da sua capacidade de se ligar à dentina desmineralizada, contribuindo para a preservação da união adesivo-dentinária (80, 81). A CHX pode ser utilizada de diferentes maneiras: após o condicionamento ácido (82, 83), incorporadas à um condicionador ácido (84, 85), na forma de *primer* (86) ou incorporadas ao adesivo (87). Sua efetividade está relacionada à concentração utilizada, com melhores resultados quando utilizada em concentrações de 0,5 a 5% em massa (82, 88-91) e ineficazes em concentrações inferiores a 0,1% (91, 92).

Íons metálicos como zinco (Zn^{2+}) e cobre (Cu^{2+}) são capazes de inibir as MMPs a partir da ligação a sítios específicos de sua estrutura, induzindo alterações conformacionais que são responsáveis pela sua inativação (15). Essa estratégia é conhecida como “inibição não-competitiva”. Adicionalmente, íons zinco também apresentam um mecanismo de “inibição competitiva” com as MMPs, ao competir pelos sítios de clivagem na estrutura do colágeno (93).

As carbodiimidas (N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) ou 1-etil-3-[3-dimetilamino-propil] carbodiimida (EDC)) apresentam-se quimicamente na forma $R_1-N=C=N-R_2$ (na qual R_1 e R_2 podem representar um grupo metil e amino, respectivamente). Elas são consideradas como agentes reticuladores de colágeno de “comprimento zero”, pois ativam os grupos carboxila em aminoácidos, o que promove a reticulação dos peptídeos do colágeno sem a necessidade de outros grupos (94). Além de promoverem reticulação, também são capazes de estabelecer ligações covalentes com as MMPs, inativando-as. A aplicação de EDC como um pré-

tratamento após o condicionamento ácido de uma superfície dentinária ou incorporada a um sistema adesivo foram estratégias que se mostraram eficazes na inativação completa das MMP-2 e MMP-9 (95).

Antibióticos de amplo espectro como a tetraciclina e seus análogos como a doxiciclina e minociclina também foram estudados como inibidores de MMPs (96, 97). A minociclina aplicada após o condicionamento ácido foi capaz de promover a formação de interfaces adesivas com maior resistência e estabilidade de união por períodos prolongados (83). A doxiciclina também é eficaz para inativação enzimática quando encapsulada em nanotúbulos e incorporada aos adesivos (98). Ambos apresentam propriedades quelantes catiônicas e são capazes de regular negativamente a expressão do RNA mensageiro de MMPs, bloqueando efetivamente sua atividade (22, 99)

Os polifenóis, cloreto de benzalcônio e polímero de metacrilato de amônio quaternário também demonstraram potencial de inibição de enzimática e melhor qualidade da camada híbrida (27, 100-103). Recentemente, o dimetilsulfóxido (DMSO) foi proposto como um solvente em odontologia adesiva, sendo miscível em solventes orgânicos, água e monômeros resinosos (104). Quando aplicado à dentina como pré-tratamento, apresentou um notável efeito inibitório sobre a ação das MMPs (105).

2.2.2 Agentes de reticulação do colágeno

Os agentes reticuladores (*crosslinkers*) promovem a formação de ligações covalentes intra e intermoleculares na malha colágena, reduzindo sua susceptibilidade à degradação enzimática (18, 19). Adicionalmente, estes compostos são capazes de inativar os sítios ativos das proteases dentinárias, reduzindo sua mobilidade ou alterando sua estrutura. São geralmente incorporados ao condicionador ácido ou utilizados na forma de *primers* aplicados após o condicionamento (106).

O glutaraldeído é uma molécula alifática composta por cinco átomos de carbono e um grupamento aldeído (-COH) em cada extremidade. Os grupos aldeído se ligam aos grupos amino (-NH₂) presentes no colágeno (106). Apesar de contribuírem para a preservação da interface adesiva sua aplicação clínica é limitada devido à sua toxicidade (22).

A carbodiimida (EDC), como descrito previamente, inibe a atividade enzimática e tem apresentado resultados promissores, com tempos de aplicação clinicamente aceitáveis (24-26) e baixa citotoxicidade (22).

Os polifenóis são reticuladores naturais obtidos, por exemplo, a partir de extratos de sementes de uva ou de chá verde. As proantocianidinas (PACs) são derivadas dos polifenóis, pertencentes a um grupo de flavonóides de metabólitos vegetais. Os mecanismos de reticulação promovidos por proantocianidinas (PACs) incluem ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com o aminoácido prolina estrutural do colágeno em níveis intra e interfibrilares (107). As PACs promovem estabilização das fibrilas colágenas e melhora da sua resistência contra ação enzimática, tendo uma aplicação promissora, principalmente no âmbito clínico (108).

A clorexidina, já amplamente utilizada como agente antimicrobiano na Odontologia, foi testada em duas formas distintas: digluconato de clorexidina (31) e clorexidina-metacrilato (30). A camada híbrida formada com a aplicação prévia de digluconato de clorexidina apresentou maior resistência de união quando comparada ao controle (sem pré-tratamento) (31). Já a clorexidina-metacrilato foi incorporada a um *primer* experimental com a premissa de copolimerização com os outros monômeros e demonstrou melhorar a estabilidade da camada híbrida após 12 meses de armazenamento em água destilada (30).

Outros reticuladores estudados que apresentam mecanismos de ação distintos são: riboflavina 5-fosfato, bromelina e quitosana modificado com metacrilato. A riboflavina 5-fosfato produz radicais livres por foto-oxidação, é capaz de melhorar a penetração do adesivo na camada híbrida, aumentando a rigidez da matriz colágena (13). A bromelina é uma enzima que promove aumento da energia de superfície da dentina melhorando, conseqüentemente, a infiltração monomérica (32). A quitosana modificada com metacrilato altera eletrostaticamente as fibrilas de colágeno, aumentando as ligações entre a resina e a dentina (109).

2.2.3 Remineralização da interface adesivo-dentinária com o uso de partículas inorgânicas liberadoras de íons

O termo remineralização se refere ao processo pelo qual íons cálcio e fósforo provenientes de uma fonte externa se depositam na estrutura dental, ligando-se à matriz colágena ou, idealmente, sendo incorporados às fibrilas colágenas, o que resultará, além do ganho mineral, no reforço mecânico do tecido (110, 111). Partículas capazes de liberar íons Ca^{2+} representam uma alternativa para a redução da degradação na interface adesiva através da precipitação de apatita nos poros do adesivo, na camada híbrida e na dentina subjacente desmineralizada e não infiltrada pelo sistema adesivo, promovendo ganho mineral e proteção das fibrilas contra a degradação enzimática (36, 37). A capacidade de inibição da degradação de colágeno pode, além de outros fatores, também pode envolver a formação de complexos Ca/P-MMP com alto peso molecular que imobilizam as collagenases (112).

Os vidros bioativos são utilizados na maior parte dos estudos que avaliam o efeito da precipitação mineral a partir de fontes externas sobre a longevidade da interface adesiva. Dentre os vidros utilizados estão o Biovidro 45S5 original (BAG 45S5) (36, 45), vidros dopados com cobre (113), fluoreto (41) e zinco (42) ou tratados com ácido poliacrílico (114). Amostras de dentina desmineralizada infiltradas com um adesivo experimental contendo partículas de BAG 45S5 (<20 μm) apresentaram menor degradação enzimática em relação ao material controle (sem partículas) após quatro semanas de armazenamento em saliva artificial (36). Além da inibição enzimática, adesivos experimentais contendo partículas de BAG 45S5 dopados ou não com policarboxilato de zinco (<20 μm) promoveram aumento significativo das propriedades mecânicas da interface adesiva, redução na micropermeabilidade e formação de mineral na interface adesiva após armazenamento de três meses em FCS, em comparação ao adesivo controle (42).

Partículas de ortofosfato de cálcio (CaP), apesar de serem amplamente estudadas em compósitos restauradores, foram menos exploradas como aditivos em sistemas adesivos. Após três meses de armazenamento em saliva artificial, amostras de dentina desmineralizada infiltradas com um sistema adesivo autocondicionante contendo nanoaglomerados de fosfato de cálcio amorfo (ACP) apresentaram remineralização nas partes mais profundas da camada híbrida (115).

A incorporação de outras fases de CaP em adesivos experimentais também foram testadas em associação com silicatos de cálcio (51, 52, 116). Partículas derivadas de silicato de cálcio (<20 µm) modificadas por β-TCP ou por β-TCP, óxido de zinco (ZnO) e ácido poliacrílico aumentaram o módulo de elasticidade da camada híbrida após envelhecimento, sugerindo a ocorrência de remineralização (51). Adesivos experimentais formulados com partículas de cimento Portland modificadas com β-TCP e ZnO reduziram a degradação do colágeno após quatro semanas de armazenamento em saliva artificial (52). Amostras de dentina infiltradas por adesivos experimentais contendo de partículas de cimento Portland (<30 µm) modificadas por filossilicatos (constituído por hidróxido de silicato de sódio-cálcio-alumínio-magnésio hidratado, [(Na,Ca)(Al,Mg)₆(Si₄O₁₀)₃(OH).6H₂O]) ou filossilicatos e hidrotalcita (constituída por alumínio-magnésio-carbonato hidratado, [Mg₆Al₂(CO₃)(OH)₁₆.4H₂O]) foram capazes de manter os valores de resistência à microtração, apresentar deposição mineral e menor nanoinfiltração após seis meses de armazenamento em FCS (39). Por fim, um estudo no qual foi avaliada o efeito da adição de 0,5, 1 ou 2 % em massa de Wollastonita (CaSiO₃, 70±30 µm) a um adesivo experimental verificou um aumento na microdureza e deposição mineral na superfície do adesivo após 7 e 28 dias de armazenamento em FCS. Além disso, houve manutenção da resistência de união à microtração após um ano de armazenamento (117).

As partículas de silicato de cálcio também foram aplicadas *in vitro* na superfície dentinária condicionada como um pré-tratamento. Uma suspensão contendo MTA comercial foi aplicado por 30 segundos à dentina após o condicionamento ácido, lavada e, em seguida, foi aplicado um sistema adesivo comercial convencional de dois passos. Após seis meses de armazenamento em FCS sob pressão pulpar simulada, foi observado maior integridade das margens da restauração e formação de apatita no interior dos túbulos dentinários, sugerindo remineralização para o grupo tratado com MTA (38).

2.3 GENERALIDADES SOBRE SILICATOS DE CÁLCIO

O silício é um elemento não metálico do grupo 14 (família do carbono) na tabela periódica (118). Na natureza, o silício se associa ao oxigênio, sendo denominado de silicato. Ele pode ser encontrado sob a forma de sílica (SiO_2) ou ainda associado a outros elementos como alumínio e cálcio, sendo considerados os principais constituintes das rochas, areias e seus produtos de decomposição (119). A unidade fundamental dos silicatos consiste em 4 ânions de oxigênio (O^{2-}) posicionados nos vértices de um tetraedro regular, coordenados por um cátion de silício (Si^{4+}). Pelo conceito de eletronegatividade de Pauling, metade das ligações interatômicas estabelecidas entre os íons Si-O apresentam caráter iônico devido as cargas opostas e a outra metade tem caráter covalente devido à interpenetração da nuvem eletrônica. O tetraedro $(\text{SiO}_4)^{4-}$ pode se ligar a outros agrupamentos semelhantes, possibilitando um grande número de configurações estruturais, podendo apresentar tetraedros independentes (nesossilicatos), arranjos de grupos tetraédricos múltiplos (sorossilicatos), cadeias simples/duplas (inossilicatos), arranjos duplos/faixas (sorossilicatos), folhas (filossilicatos) ou estruturas tridimensionais (tectossilicatos) (120).

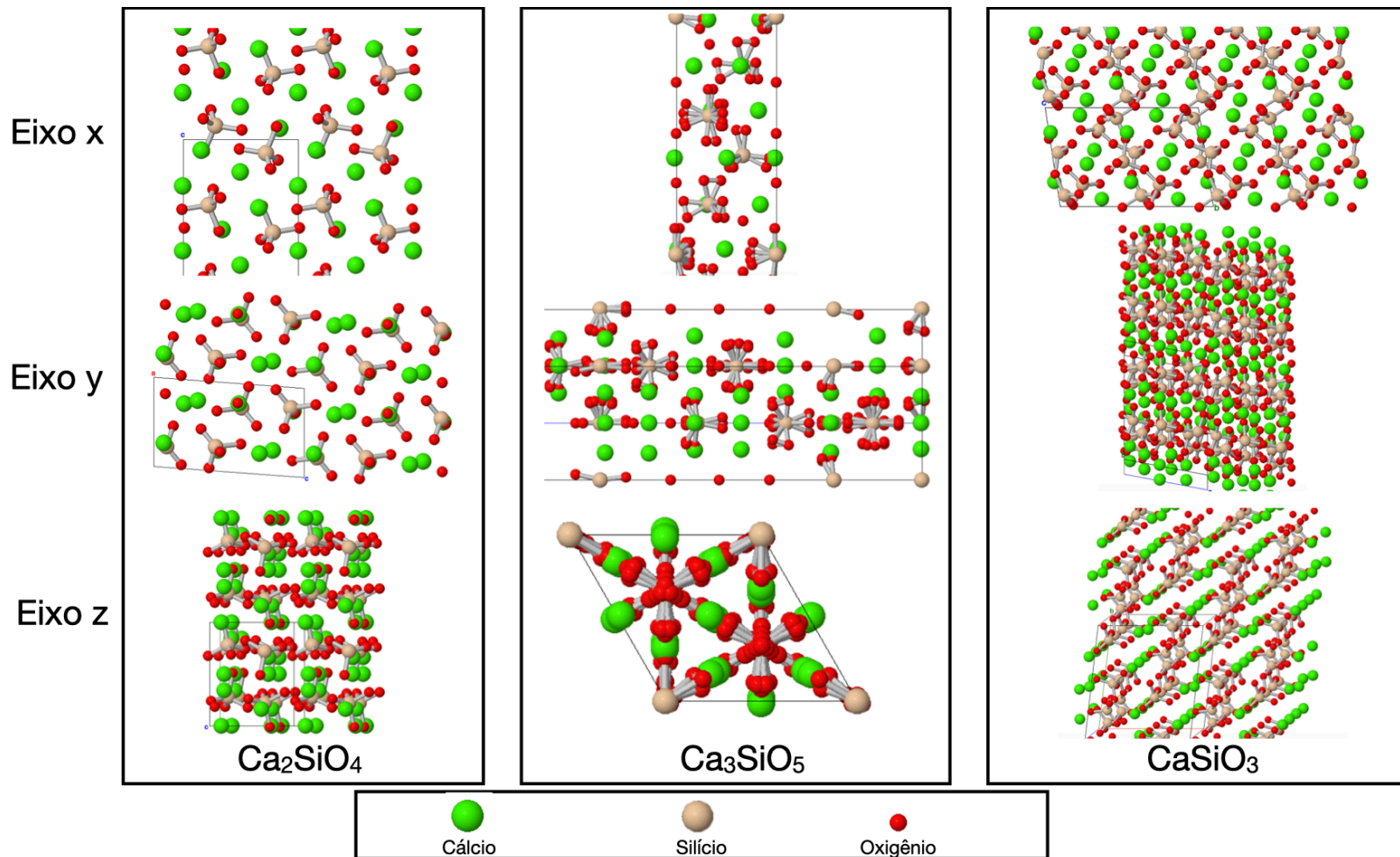
Os silicatos dicálcicos (Ca_2SiO_4 ou C_2S) são conhecidos na mineralogia como larnita ou belita (denominação dada à solução sólida das duas fases de silicato dicálcico). Estruturalmente (Figura 2.1) são compostos por arranjos tetraédricos $(\text{SiO}_4)^{4-}$ ligados e coordenados entre si por intermédio de íons cálcio (Ca^{2+}) (121). Os tetraedros $(\text{SiO}_4)^{4-}$ estão dispostos isoladamente (nesossilicatos) e os íons O^{2-} não são compartilhados pelos tetraedros entre si (120). Dentro desse arranjo, os íons Ca^{2+} podem estar coordenados por sete ou oito ânions O^{2-} (122). Os cristais de C_2S apresentam morfologia arredondada e cinco polimorfos bem definidos e reversíveis. O polimorfismo origina estruturas cristalinas diferentes que recebem as denominações: α (monoclínico), α'_H (ortorrômbico), α'_L (ortorrômbico), β (monoclínico) e γ (ortorrômbico) (121). As fases β e γ são obtidas em baixas temperaturas, enquanto as fases α , α'_H , α'_L são obtidas em altas temperaturas (123, 124). Os polimorfos podem se transformar de um para outro através da mudança na simetria do cristal, desordem dos tetraedros $(\text{SiO}_4)^{4-}$ e mudanças na posição dos cátions Ca^{2+} (121). C_2S - γ , é obtido em baixas temperatura e estável a temperatura ambiente, podendo se transformar na

fase α'_L , α'_H e α quando existe elevação da temperatura a aproximadamente 870 °C, 1.160 °C e 1.450 °C, respectivamente. Já o resfriamento dessas fases a 670 °C resulta na formação da fase β , monoclinica metaestável de estrutura cristalina semelhante ao mineral larnita, sendo a mais comumente encontrada no cimento Portland. Entretanto, caso a fase $C_2S-\beta$ não seja estabilizada durante o resfriamento, os polimorfos α e α' se revertem ao polimorfo original $C_2S-\gamma$ estável (123).

Os silicatos tricálcicos (Ca_3SiO_5 ou C_3S) também possuem uma série de polimorfos e recebem o nome de genérico de alita. Assim como o C_2S , possui tetraedros $(SiO_4)^{4-}$ independentes (nesossilicato) unidos por cátions intersticiais de Ca^{2+} . Em geral, esses cristais são morfologicamente tabulares apresentando, na maioria das vezes, uma seção hexagonal. Em sua forma pura, o C_3S apresenta uma série de transições de fases reversíveis quando submetido a variações de temperatura começando com as fases triclinicas (T1, T2 e T3) obtidas em temperaturas mais baixas (entre 620 °C e 920 °C), sendo as mais estáveis em temperatura ambiente (125). A partir de 980 °C, começam-se a se formar as fases monoclinicas (M1, M2 e M3), sendo M3 obtida a partir da elevação de temperatura a 1060 °C (126, 127). Em 1070 °C pode ser identificada a formação de uma última fase romboédrica. Apesar de serem diferentes polimorfos, não existem grandes variações na estrutura cristalina (125). O C_3S é um dos constituintes essenciais do cimento Portland, apresentando importante papel na reação de presa e nas suas propriedades mecânicas (128).

O metassilicato de cálcio, conhecido como Wollastonita ($CaSiO_3$), é um mineral natural e apresenta-se morfologicamente como cristais aciculares. Sua estrutura cristalina apresenta tetraedros $(SiO_4)^{4-}$ distorcidos que se dispõem estruturalmente em cadeias simples (inossilicatos) e camadas de octaedros que dividem as arestas entre si, ou seja, há um compartilhamento de oxigênios entre dois tetraedros (129). São descritos três tipos de estruturas cristalinas diferentes. O polimorfo 1A-Wollastonita ($\alpha-CaSiO_3$) apresenta estrutura triclinica e cristais agulhados, decorrentes das transformações em baixas temperaturas. A 2M-Parawollastonita ($\beta-CaSiO_3$), dificilmente encontrada na natureza, apresenta uma estrutura monoclinica e com aspecto prismático em baixas temperaturas. A última forma polimórfica, 7M-Pseudowollastonita ($CaSiO_3$) apresenta-se como cristais em formato de prismas curtos ou fibras e estrutura triclinica, porém passível de transformação para pseudo-ortorrômbicas a altas temperaturas (130).

Figura 2.1 - Estrutura cristalina em 3D (eixo x, y e z) do silicato dicálcico (Ca_2SiO_4), tricalcico (Ca_3SiO_5) e Wollastonita (CaSiO_3). As imagens foram reproduzidas do site: <https://www.mindat.org>



Fonte: A autora.

2.3.1 Síntese das partículas de silicatos de cálcio

Diferentes métodos são descritos na literatura para a síntese de partículas de silicato de cálcio. Dentre eles destacam-se a co-precipitação (131), síntese hidrotermal (132, 133), combustão (134-136) e sol-gel (137-139). Independentemente do método, as partículas são originadas a partir da associação de uma fonte de silício (sílica pirogênica ou tetraetoxisilano/TEOS) e uma fonte de cálcio (acetato ou nitrato de cálcio).

O processo sol-gel é uma técnica de síntese química muito utilizada na preparação de cerâmicas, permitindo a formação de nanopartículas com alta homogeneidade e composição controlada empregando temperaturas relativamente baixas (136, 140, 141). O processo de síntese sol-gel envolve reações de polimerização de precursores de um alcóxido de metal $M(OR)_n$, onde M representa o elemento formador da rede, como o silício (Si^{4+}), e o R um radical alquil (C_nH_{2n+1}) (142). Esses precursores, geralmente dissolvidos em um solvente, sofrem reações de hidrólise e condensação. Entretanto, estudos realizados nos anos 80 e 90 relataram dificuldades em relação à hidrólise de alcóxidos, resultando em compostos com baixa homogeneidade (143, 144), pois os alcóxidos metálicos utilizados na época eram sólidos pouco solúveis e não-voláteis (142). Uma alternativa para contornar essa situação foi a utilização de sais metálicos na forma de nitratos (137). Os nitratos são menos estáveis do que cloretos ou sulfatos; com isso, o ânion é mais facilmente removido por decomposição térmica. Embora sais de acetato também possam ser usados, eles não se degradam termicamente de maneira limpa, deixando resíduos carbonáceos (142). Após sua obtenção, os sóis são submetidos a tratamento térmico de calcinação em temperaturas relativamente baixas (abaixo de 1000 °C) para obtenção partículas de silicato, o que contribui para reduzir o custo do processo em relação a outras rotas de síntese (145, 146).

2.3.2 Silicatos de cálcio na Odontologia Restauradora

O desenvolvimento de materiais à base de silicato de cálcio para aplicação odontológica ganhou impulso em 1995 com a introdução do MTA, utilizado como um cimento retrobturador (147). Entretanto, o cimento Portland, amplamente utilizado na construção civil, teve seu primeiro uso com finalidade Endodôntica reportado em 1878 (148). Dentre as características dos materiais à base de silicato de cálcio, destacam-se a biocompatibilidade (149), bioindutividade (150), atividade antibacteriana (151), bom vedamento marginal, tempo de presa aceitável e características físicas e mecânicas compatíveis com a utilização como material reparador de perfurações/reabsorções radiculares e pulpotomia (152). Sua fabricação envolve o aquecimento do calcário a 1400 °C com adição de argila. O produto obtido, denominado clínquer, passa por um processo de moagem com sulfato de cálcio dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dando origem ao produto final (153). Os constituintes do cimento Portland são silicato tricálcico (Ca_3SiO_5), silicato dicálcico (Ca_2SiO_4), aluminato tricálcico ($\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$) e aluminoferrita tetracálcica ($\text{Ca}_2\text{AlFeO}_5$). O Ca_3SiO_5 , é o componente em maior proporção, responsável por sua presa e resistência inicial. O Ca_2SiO_4 origina hidratos de silicato de cálcio (C-S-H) e portlandita ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), sendo responsável pelo desenvolvimento da resistência a longo prazo (154). A variação da proporção ou do tamanho de partículas entre os quatro componentes principais originou cinco tipos distintos (tipo I ao V) de cimento Portland (152, 155), sendo o tipo I mais utilizado em Odontologia (156).

O MTA é um cimento de silicato de cálcio desenvolvido a partir do cimento Portland tipo I com adição de óxido de bismuto (Bi_2O_3) para fornecer radiopacidade. Sua primeira versão, fabricada pela Dentsply Sirona Endodontics (Tulsa, Ok, EUA) recebeu o nome de ProRoot MTA ou Gray MTA (cinza) e foi, por anos, o único cimento hidráulico de silicato de cálcio disponível comercialmente. Posteriormente, foi desenvolvido o White ProRoot MTA (branco, Denstply Sirona, EUA). Entretanto, apesar de ainda representarem o padrão-ouro, outros cimentos hidráulicos à base de silicato de cálcio foram desenvolvidos com o intuito de reduzir o tempo de presa, facilitar a manipulação, reduzir o risco de lavagem em um ambiente úmido (ou seja, em casos de capeamento pulpar direto), melhorar a radiopacidade e o alto custo das formulações originais (50).

Por serem capazes induzir a formação de barreira mineralizada, esses materiais obtiveram resultados positivos em casos de pulpotomia e tratamento endodôntico de dentes decíduos (157, 158). Para pulpotomia, tanto o MTA branco quanto cinza promoveram a formação de uma barreira mineralizada espessa, enquanto o controle feito com formocresol induziu a formação de uma camada dentinária fina e pouco mineralizada (157). Como capeador pulpar indireto, um estudo recente mostrou a capacidade indutiva para formação de dentina e redução de colônias bacterianas após 6 meses de aplicação em lesões cariosas profundas (159).

Devido a sua capacidade de induzir reparo ou regeneração de tecidos mineralizados e de promover um bom selamento, esses materiais também são utilizados como tratamento para perfurações radiculares (160-164), apicigênese (165, 166), apicificação (167), cimento obturador associado a guta percha (50) e em retrobturações (50). Nessas situações os silicatos apresentam maior biocompatibilidade do que outros materiais utilizados para as mesmas finalidades como hidróxido de cálcio (para tratamento de perfuração radicular, apicigênese e apicificação), amálgama, cimentos de ionômero de vidro ou óxido de zinco, material restaurador intermediário (IRM, Densply Sirona, EUA) e, nos casos de retrobturação, resina composta ou também cimento de ácido etoxibenzóico (SuperEBA, Harry J. Bosworth, IL, EUA) (168). Entretanto, a maior efetividade como retrobturador dos cimentos de silicato de cálcio frente a outros materiais ainda é controversa e necessita de maiores investigações. Enquanto alguns estudos demonstram maior taxa de sucesso quando MTA é associado a técnica micro-cirúrgica (169) ou maior taxa de cura em comparação com materiais resinosos (170) outros estudos não observam diferenças estatísticas entre a utilização de MTA ou SuperEBA e IRM como materiais retrobturadores (171, 172).

A reação de presa dos cimentos de silicato de cálcio envolve a hidratação das partículas, promovendo a dissociação dos seus componentes. Os produtos originados pela re-precipitação são diferentes fases de hidrato de silicato de cálcio (C-S-H) tais com o gel poroso coloidal de C-S-H e cristais aciculares de C-S-H, além de cristais romboédricos de hidróxido de cálcio (portlandita, $\text{Ca}(\text{OH})_2$), cristais agulhados de etringita ($\text{Ca}_6\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{OH})_{12} \cdot 26\text{H}_2\text{O}$) e monosulfoaluminato ou monocarboaluminato de cálcio ($\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). O C-S-H poroso transforma-se em uma rede sólida em até 6 horas. Entretanto, a presa final requer vários dias (50).

Um material com melhores propriedades mecânicas e tempo de presa reduzido foi desenvolvido comercialmente o com a proposta de ser um substituto dentinário nas porções coronais e radicular (Biodentine™, Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França) (173). Diferentemente do MTA, o Biodentine™ é indicado como material restaurador para lesões dentinárias, restaurador temporário de lesões em esmalte, material intermediário em “técnica sanduíche” de restaurações amplas e/ou profundas, restaurações cervicais ou radiculares profundas além de capemento pulpar direto, indireto, tratamento de perfurações e apicificação radicular (174). A composição do material consiste em um pó contendo Ca_3SiO_5 , Ca_2SiO_4 , carbonato de cálcio (CaCO_3), óxido de ferro e zircônio. A diminuição no tempo de presa é promovida pela utilização de partículas de menor tamanho e pela presença de cloreto de cálcio (CaCl_2) no líquido, fazendo com que o tempo de reação seja de 9 a 12 minutos (174-176).

Os cimentos de silicato de cálcio são capazes de promover a nucleação de fosfatos de cálcio e a formação de uma camada de apatita após imersão em diferentes FCS (177-182), *in vitro* (177, 183-185) e *in vivo* (186-188) além de auxiliarem na diferenciação de células-tronco mesenquimais (189, 190) e na viabilidade de proliferação dos osteoblastos (191). A adesão, crescimento e diferenciação celular se relacionam com a composição química, a topografia/morfologia externa e presença de apatita na superfície do cimento que, devido a sua alta reatividade, oferece muitas trocas iônicas de Ca^{2+} , Si^{4-} e fosfato (PO_4^{3-}) (liberação e captação) com fluídos corporais (191). Dessa forma, esses materiais podem nuclear apatita e/ou seus precursores em sua superfície, desempenhando um papel positivo como promotor de diferenciação celular e indutor de reparação tecidual, osteogênese e cementogênese (181, 187, 188, 192-194).

Além da liberação de Ca^{2+} e Si^{4-} os íons hidroxila (OH^-), proveniente do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ originado após hidratação, dissociação e re-precipitação dos componentes do MTA, promove um aumento de pH capaz de promover uma ação antimicrobiana contra patógenos comumente associados a infecções endodônticas como *E. fecalis* (195). A atividade antimicrobiana e bacteriostática proveniente da alcalinização promovida pelos silicatos de cálcio, bem como hidróxido de cálcio, possivelmente se relaciona com a desnaturação proteica e promove danos ao DNA e membrana citoplasmática desses microorganismos (196).

Como capeadores pulparem diretos, os silicatos de cálcio apresentam efeitos positivos nas células-tronco e estromais da polpa dentária (194, 197), sendo capazes de induzir a formação de tecido mineralizado em animais (198) e em terceiros molares humanos sadios (199-201). Foi demonstrado a formação de barreira mineralizada *in vivo* histologicamente (199, 201) e por avaliação clínica direta (202). A liberação de Ca^{2+} foi considerada por muitos anos o fator principal para o sucesso do capeamento pulpar uma vez que, em conjunto com o fosfato presente nos fluídos biológicos (sangue, exsudato, plasma e fluído dentinário), desencadearia a precipitação de apatita sobre o substrato (182, 190, 203, 204). Entretanto, a nucleação de fosfato de cálcio também pode indicar a ocorrência de expressão gênica para que as células pulparem se diferenciem e promovam a formação de tecido mineralizado (188, 193). O Biodentine™, quando aplicado sobre células da polpa dentária humana, induziu a formação precoce de focos mineralizados, provavelmente devido à modulação da secreção do fator de transformação de crescimento Beta-1 (TGF- β 1) das células pulparem. O ProRoot MTA originou resultados semelhantes (205). Outro estudo *in vivo* comprovou que tanto o Biodentine™ quanto o ProRoot MTA induziram reparo do tecido pulpar e a formação de barreira mineralizada (206). Além de capeador pulpar direto, um estudo clínico aleatorizado concluiu que, quando utilizado como capeador pulpar indireto, os materiais a base de silicato de cálcio induziram maior formação de dentina e reduziram as colônias bacterianas após seis meses obtendo taxas de sucesso de 90,3% (159). Outro estudo clínico aleatorizado comparativo entre Biodentine™, MTA e hidróxido de cálcio como capeadores pulparem diretos demonstrou que, apesar de não haver diferenças significativas entre os materiais, após 12 meses o MTA e hidróxido de cálcio apresentaram taxa de falha de 13,6% enquanto nenhum insucesso foi verificado com o Biodentine™ (207). Resultados semelhantes foram apresentados em outros ensaios clínicos aleatorizados e estudos de boca dividida (208, 209).

Um material fotopolimerizável contendo silicato de cálcio (cimento Portland, 30-40% em massa), óxido de cálcio, vidro de estrôncio, sulfato de bário, sílica, zirconato de bário (1 – 10%, em massa) em uma matriz resinosa (dimetacrilato de glicidila bisfenol A/BisGMA e polietilenoglicol dimetacrilato/PEGDMA, 10 – 30% em massa) foi introduzido para uso clínico (210). O TheraCal LC (Bisco Inc., Schaumburg, IL, EUA) é um cimento de silicato de cálcio modificado por resina para ser utilizado em

capeamentos pulparem diretos e indiretos que pode ser fotopolimerizado em até 1,7 mm de espessura (211, 212). Apesar de apresentar uma liberação significativamente inferior de íons Ca^{2+} quando comparados com Biodentine™ (211, 213), esse material também permitiu a deposição de fosfato de cálcio em sua superfície quando imerso em solução salina (213). Essa menor liberação é vinculada tanto ao fato das partículas estarem aprisionadas em uma matriz polimérica quanto à solubilidade inferior desse material em relação ao hidróxido de cálcio e ao MTA (214). Uma desvantagem em relação aos outros materiais é sua baixa radiopacidade, inferior ao exigido pela norma ISO 6976 (91). Quando aplicado *in vivo* após pulpotomia em cães, foi observado a formação de uma barreira mineralizada em apenas 33% dos dentes avaliados. Em comparação com dois cimentos de MTA o TheraCal LC produziu as respostas pulparem mais desfavoráveis, produzindo extensa reação inflamatória pulpar. O estudo atribuiu esse resultado a composição da matriz monomérica que apresenta citotoxicidade para polpa (215). Outro estudo realizado em primatas demonstrou a formação de barreira mineralizada muito mais frequente em dentes com exposição pulpar tratada com TheraCal LC quando em comparação com os capeados com hidróxido de cálcio e ionômero de vidro (216). Entretanto, ainda há controvérsias quanto à sua efetividade. Enquanto um estudo clínico aleatorizado mostrou que o TheraCal LC é tão eficiente como capeador direto quanto o hidróxido de cálcio (217) outro estudo clínico concluiu que o Biodentine™ ou ProRoot MTA são mais confiáveis para o capeamento pulpar e que o uso de TheraCal LC não está recomendado para casos de pulpotomia (218).

A adição de partículas de silicato de cálcio a sistemas adesivos foi pouco explorada. A bioatividade exibida pelos silicatos desempenha um papel importante na mineralização da camada híbrida (219-222). Como demonstrado previamente, a incorporação de silicatos a adesivos experimentais foi capaz de aumentar o módulo de elasticidade, promover deposição mineral, redução da nanoinfiltração e degradação colágena e manutenção dos valores de resistência de união à microtração a curto prazo (38, 39, 51, 52, 117). Entretanto, a avaliação dessas interfaces a longo prazo e o potencial inibidor das partículas frente a degradação enzimática ainda necessita de maiores investigações. Além disso, a incorporação de partículas de silicato de cálcio a sistemas adesivos comerciais de três passos e/ou como pré-tratamento da dentina não foi explorada.

Frente ao exposto, o presente estudo teve como propósito sintetizar aglomerados nanoestruturados de silicato de cálcio que, quando utilizados como um pré-tratamento e/ou adicionados a um sistema adesivo comercial de três passos, promoveriam a liberação de cálcio em concentrações suficientes para promover a precipitação de apatita e proteger o colágeno da degradação enzimática, contribuindo para melhorar a qualidade e a estabilidade da interface adesiva a longo prazo.

3 PROPOSIÇÃO

Como base no exposto, o presente estudo teve como objetivos:

- Investigar o efeito de diferentes variáveis de síntese sobre as características de partículas de SC obtidas pelo método sol-gel;
- Avaliar o efeito da incorporação destas partículas em um sistema adesivo comercial sobre o grau de conversão, resistência coesiva e liberação de íons;
- Avaliar o efeito da incorporação de SC ao procedimento adesivo, através da adição das partículas a um dos componentes de um sistema adesivo comercial de três passos e/ou como pré-tratamento, sobre a resistência de união à microtração e características microestruturais da interface adesiva após 24 horas e 12 meses de armazenamento em FCS;
- Avaliar o efeito da incorporação de SC ao procedimento adesivo sobre as propriedades mecânicas (dureza e módulo de elasticidade) da interface adesiva após 24 horas, 6 e 12 meses de armazenamento em FCS;
- Avaliar o efeito da incorporação de SC ao procedimento adesivo sobre a atividade enzimática de MMPs após 24 horas e 12 meses de armazenamento em FCS.

Foi testada a hipótese nula que a presença de partículas de SC no componente adesivo e/ou a utilização de um pré-tratamento com SC não interfere na qualidade da interface adesiva a longo prazo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DE PARTÍCULAS DE SILICATO DE CÁLCIO

A síntese das partículas de silicato de cálcio foi realizada pelo método sol-gel com *template* de surfactante. As variáveis avaliadas, definidas com base em estudos preliminares (Apêndice A), foram: (1) pH do meio reacional (ácido ou alcalino), (2) massa de surfactante adicionada (0,6 ou 1,2 g), (3) relação Ca:Si (2:1 e 3:1) e (4) temperatura da síntese (24 °C ou 80 °C). Na síntese em meio ácido, o pH da solução foi ajustado em 6 pela adição de ácido nítrico 0,5 mol/L (HNO₃), enquanto na síntese em meio alcalino o pH da solução foi ajustado em 10, a partir adição de hidróxido de amônio (NH₄OH) (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil). Em um erlenmeyer de vidro contendo 288 mL de água deionizada MiliQ, o pH e a temperatura de síntese foram ajustados. Sob agitação magnética, foi adicionado o surfactante brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB, C₁₉H₄₂BrN, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA). Após completa dissolução do surfactante, com auxílio de uma pipeta graduada (5 mL) e pêra de sucção, tetraetoxisilano (TEOS, Si(OC₂H₅)₄, Sigma-Aldrich Inc.) foi gotejado na solução contendo CTAB. Em seguida, foi adicionado o nitrato de cálcio tetra hidratado (Ca(NO₃)₂.4H₂O, Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda).

A solução foi mantida em uma capela de exaustão por 2 horas sob agitação magnética nas temperaturas de 24 °C ou 80 °C. Após o período de agitação, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente e, em seguida, mantida a 6 °C por 48 horas. O sobrenadante foi removido através da ebulição da solução a 60 °C por 24 horas seguido por 48 horas em 120 °C. Para remoção do surfactante, o produto da reação foi calcinado em uma mufla (Forno para anéis 3P-S 3000, EDG Equipamentos e Controles, São Carlos, Brasil) por 4 horas a 800 °C (taxa de aquecimento: 5 °C/min) até completa eliminação do composto.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

4.2.1 Difractometria de raios-X (DRX)

A difratometria de raios-X foi realizada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). Esta análise teve como objetivo identificar as fases de silicato de cálcio obtidas nas sínteses. A difratometria foi realizada com radiação $\text{CuK}\alpha$ com filtro de níquel sob 40 kV e 30 mA em um equipamento com geometria $\theta/2\theta$ (MultiFlex, Rigaku Corp., Tóquio, Japão). As leituras foram feitas de forma contínua entre os ângulos de 10° a 60° , com intervalos de $0,05^\circ$ e $2^\circ/\text{min}$. A identificação das fases foi realizada através o software Match! - Phase Analysis using Powder Diffraction (Crystal Impact, Bonn, Alemanha).

4.2.2 Espectrometria por fluorescência de raios-x (FRX)

A espectrometria por fluorescência de raios-x foi realizada no Laboratório de Caracterização Tecnológica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (LCT, Poli-USP) para quantificar a porcentagem de cálcio e silício presente nas amostras (aproximadamente 1 g). A calibração utilizada para o espectrômetro de fluorescência de raios-X (Zetium, Malvern Panalytical, Reino Unido) foi a STD-1 (Standardless), indicado para detectar e quantificar os elementos químicos compreendidos entre o flúor e o urânio. Os valores foram normalizados a 100%. Os dados obtidos por essa análise foram utilizados para calcular a razão cálcio:silício (Ca:Si) das partículas.

4.2.3 Densidade teórica

A densidade teórica das partículas foi determinada em um picnômetro a hélio (Ultracyc 1200e, Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, EUA). Os valores de densidade foram calculados através da média aritmética de três leituras, utilizando uma amostra com aproximadamente 1 g em uma célula de 5 mL. As análises foram realizadas em temperatura ambiente (23 °C). Após 10 minutos de purga, realizada para remoção de gases adsorvidos na superfície das partículas, foi iniciada a injeção de gás hélio até a pressão máxima de 14 psi no compartimento de amostra. O volume da amostra foi calculado pela diferença entre o volume nominal do compartimento e o volume de gás hélio que efetivamente foi utilizado para preenchê-lo. Em seguida, a densidade da amostra foi calculada utilizando-se o seu valor de massa, previamente determinada com precisão de 0,001 g (modelo XS105 DualRange, Mettler-Toledo Ind. E Com. Ltda., Barueri, SP, Brasil).

4.2.4 Área superficial (método BET)

A determinação da área superficial foi realizada no IQ-USP a partir das isotermas de adsorção de nitrogênio e método BET (Brunauer, Emmett e Teller) (223) com o auxílio do software NOVWin (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, EUA). Antes da leitura, a amostra foi pesada (aproximadamente 0,15 g) e submetida a um período de degassificação por três horas a 300 °C. Posteriormente, a amostra foi lida e as isotermas de adsorção com 40 pontos geradas foram utilizados para o cálculo da área superficial.

4.2.5 Espalhamento de luz laser

A distribuição de tamanhos das partículas e os valores de mediana (D_{50}) foram determinados através da técnica de espalhamento de luz laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido), realizada no LCT, Poli-USP. Previamente à análise, o pó foi disperso em álcool isopropílico por 1 minuto em ultrassom e em seguida injetado no equipamento para leitura.

4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Aproximadamente 0,2 g de amostra foram espalhados em uma fita adesiva de carbono aplicada sobre um suporte metálico e recobertos com platina. A morfologia das partículas foi observada utilizando o detector de elétrons retroespalhados (Quanta FEG600, FEI co., Hillsboro, Oregon, EUA). As análises foram realizadas no LCT, Poli-USP.

4.2.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As partículas foram dispersas em álcool isopropílico e, após 24 horas, 20 μ L do sobrenadante foram pipetados sobre uma grade de níquel (#200) recoberta com uma película de poli(vinil formal). As grades foram secas durante 7 dias a 23 °C e observadas ao microscópio (JEOL, modelo JEM-2100, Tóquio, Japão) em 80 kV. As análises foram realizadas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

4.3 SELEÇÃO DAS PARTÍCULAS PARA AS ETAPAS SUBSEQUENTES

As cinco condições de síntese que resultaram em partículas com as menores

medianas (D_{50}) e maiores razões Ca:Si (sínteses E, F, H, O e P, Tabela 5.1) foram incorporadas a um adesivo comercial (Adper Single Bond 2, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) na proporção de 10 % em massa, com o objetivo de avaliar a liberação de íons cálcio e silício. Corpos de prova em forma de disco (5x1 mm, n=2) dos adesivos contendo 10% em massa de cada uma das cinco partículas de SC foram confeccionados e armazenados por 15 minutos a seco a 37 °C. Em seguida, os corpos de prova foram imersos individualmente em 5 mL de água deionizada, mantendo-se constante a razão entre o volume do corpo de prova e solução em 3 mm³/mL (224) e armazenados a 37 °C por 7 dias. As concentrações iônicas de cálcio e silício foram determinadas por espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES Radial, Spectro Arcos/AMETEK Materials Analysis Division, Mahwah, NJ, EUA). Inicialmente, foram construídas curvas de calibração para os íons cálcio, com pontos entre 1 e 20 ppm, utilizando-se soluções-padrão (SpecSol Quimlab, Jacareí, SP, Brasil) em diferentes diluições. Previamente à análise, as soluções foram filtradas e acidificadas com 5 µL de HNO₃. As leituras de cálcio e silício foram feitas separadamente, utilizando diferentes emissões espectrais (317,93 e 288,158 nm, respectivamente).

Os resultados indicaram que as partículas obtidas nas sínteses O e P apresentaram as maiores liberações de cálcio e silício (Tabela 5.2). Por serem sínteses análogas (ou seja, com a mesma razão molar dos precursores, temperatura e quantidade de surfactante/CTAB, diferindo apenas o pH do meio reacional), essas partículas foram misturadas e utilizadas nas etapas subsequentes. Com o objetivo de reduzir o tamanho dos aglomerados de nanopartículas, foi feita a moagem das partículas em um moinho de bolas (Retsch MM400, Haan, North Rhine-Westphalia, Alemanha). Foram utilizados frascos metálicos contendo aproximadamente 3 g de material. Seguiu-se a proporção de 1 g de material para 20 g de elementos de moagem (esferas de zircônia com diâmetros de 2 mm e 5 mm) (225). O processo de moagem foi realizado com frequência de 10 Hz por 90 segundos. Após a moagem as partículas foram novamente caracterizadas para DRX, FRX, área superficial, espalhamento de luz laser, MEV e MET.

4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

A seleção do sistema adesivo comercial utilizado (Adper Scotchbond Multipurpose¹, 3M ESPE) e a adição de 5% em massa de SC ao componente “Adhesive”/frasco 3 do sistema foram definidas com base em estudos preliminares (Apêndice C). A adição de SC ao adesivo (frasco 3, Adhesive) foi feita pesando-se o adesivo em um eppendorf âmbar e, em seguida, adicionando-se as partículas. Inicialmente, tentou-se adicionar as partículas ao *primer* (frasco 2) do sistema adesivo; porém, foi observado que estas aglutinavam após a mistura. Além da adição do SC ao adesivo, foi avaliado o pré-tratamento da dentina condicionada com ácido fosfórico com uma solução contendo 95% álcool etílico (C₂H₆O, EtOH) (226, 227) e 5% em massa de partículas. Os componentes foram pesados em um eppendorf e misturados em um misturador tipo vortex por 1 minuto (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). Todos os materiais foram manipulados imediatamente antes da sua aplicação. As condições experimentais avaliadas estão descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Grupos experimentais de acordo com o pré-tratamento e adesivo

Grupo	Pré-Tratamento	Sistema Adesivo
Ad(-)	-	Adper Scotchbond Multipurpose
Ad(+)	-	Adper Scotchbond Multipurpose contendo 5% SC
P(-)Ad(-)	EtOH	Adper Scotchbond Multipurpose
P(-)Ad(+)		Adper Scotchbond Multipurpose contendo 5% SC
P(+Ad (-)	EtOH + 5% SC	Adper Scotchbond Multipurpose
P(+Ad(+)		Adper Scotchbond Multipurpose contendo 5% SC

Fonte: A autora.

¹ Composição disponível no Apêndice C

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO ADESIVO

4.5.1 Grau de conversão

O grau de conversão (GC, n=5) do frasco 3/Adhesive contendo ou não SC (Ad(+) e Ad(-), respectivamente) foi determinado através de espectroscopia no infravermelho médio (Vertex 70; Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemanha, Figura 4.1) associado a uma unidade de refletância total atenuada (Platinum ATR, modelo A225/QHP, Bruker Optik GmbH, Figura 4.1). Uma gota do adesivo foi dispensada sobre o cristal do ATR, com um espaçador de 0,3 mm utilizado para padronizar a espessura de material (Figura 4.2 A). O espectro do material não-polimerizado foi obtido pela co-adição de 16 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} . Após a obtenção do espectro não-polimerizado, uma tira de poliéster foi posicionada sobre o adesivo (Figura 4.2 B) e coberta por uma lâmina de vidro para evitar a inibição da polimerização pelo oxigênio (Figura 4.2 C). O aparelho fotopolimerizador foi colocado em contato direto com a lâmina e a fotoativação foi realizada por 40 segundos (1000 mW/cm^2 , Valo Grand Cordless, Ultradent, UT, EUA, Figura 4.2 D), sendo um novo espectro coletado um minuto após a fotopolimerização.

O GC foi calculado utilizando-se a razão entre a altura das bandas correspondentes à ligação dupla de carbono alifática (1637 cm^{-1}) e ligações de carbono no anel aromático (1610 cm^{-1} , utilizadas como referência interna), usando a seguinte equação:

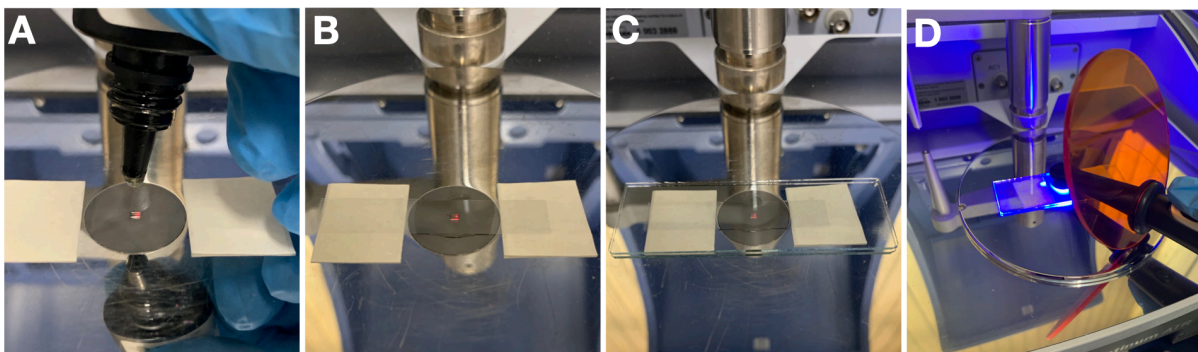
$$GC = \left[1 - \frac{\left(\frac{1637 \text{ cm}^{-1}}{1610 \text{ cm}^{-1}} \right)_{\text{polimerizado}}}{\left(\frac{1637 \text{ cm}^{-1}}{1610 \text{ cm}^{-1}} \right)_{\text{não polimerizado}}} \right] \times 100$$

Figura 4.1 - Equipamento Vertex-70 associado a unidade de refletância total atenuada (ambos Bruker Optik GmbH), utilizados para análise de grau de conversão



Fonte: A autora.

Figura 4.2 - Sequência de obtenção dos espectros do adesivo não-polimerizado e polimerizado. A: Dispensação de uma gota de adesivo sobre o cristal do ATR. B: Posicionamento de uma tira de poliéster sobre o adesivo não polimerizado. C: Recobrimento do conjunto com uma lâmina de vidro para evitar a inibição da polimerização pelo oxigênio. D: Fotoativação do adesivo



Fonte: A autora.

4.5.2 Resistência coesiva

Para a análise da resistência coesiva, corpos de prova do “frasco 3/*Adhesive*” contendo ou não SC (Ad(+)) e Ad(-), respectivamente) foram produzidos em moldes de silicone em forma de ampulheta (n=10) medindo 8 mm de comprimento, 2 mm de largura, 1 mm de espessura, com área de estrangulamento de 1 mm². Os espécimes foram fotoativados por 40 segundos em cada uma das superfícies e armazenados por 24 horas ou 12 meses a 37 °C em água deionizada, sendo a solução trocada semanalmente. Após armazenamento, os espécimes foram fixados com cola de cianoacrilato (Loctite Super Bonder Gel, Henkel, São Paulo, Brasil) a um jig de Geraldelli (Odeme Dental Research, Luzerna, Santa Catarina, Brasil). O conjunto foi posicionado em uma máquina de ensaios universal (modelo 5565, Instron Corp, Canton MA, EUA) e submetido a uma força de tração a 1 mm/min.

4.5.3 Liberação de íons

Corpos-de-prova em forma de disco (5x1 mm, n=5) do frasco 3/*Adhesive* contendo ou não SC (Ad(+)) e Ad(-)) foram confeccionados e armazenados por 15 minutos a seco a 37 °C. Em seguida, os corpos de prova foram imersos individualmente em 5 mL de água deionizada, mantendo-se constante a razão entre o volume do corpo de prova e solução em 3 mm³/mL (224) e armazenados a 37 °C por 60 dias. A cada 15 dias, os corpos de prova foram imersos em novos tubos falcon preenchidos com água deionizada e a solução do período anterior foi coletada para análise. Para determinar as concentrações de cálcio e silício liberadas pela suspensão utilizada no pré-tratamento da dentina, 30 µL do pré-tratamento contendo partículas de SC (P(+)) foram diluídos em 5 mL de água deionizada deionizada e armazenados por 15, 30, 45 e 60 dias (n=5). As concentrações iônicas de cálcio e silício foram determinadas conforme descrito no item 4.3.

4.6 EFEITO REMINERALIZADOR SOBRE A DENTINA DESMINERALIZADA

4.6.1 Aspectos éticos

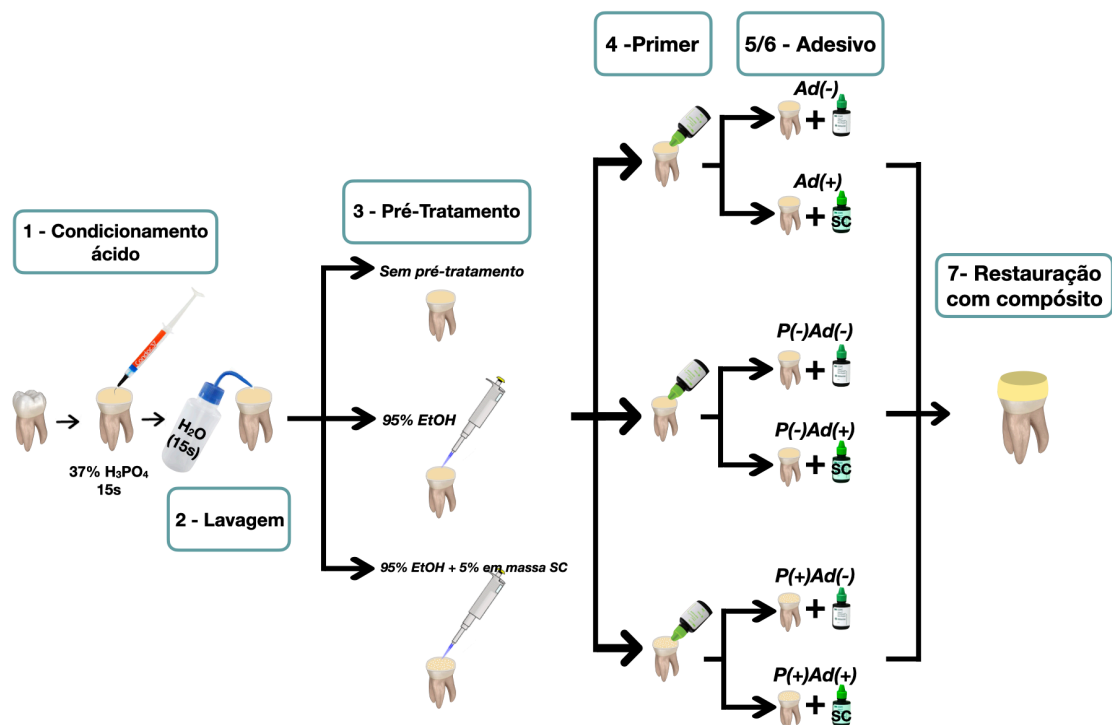
O presente projeto foi registrado na Plataforma Brasil (<http://plataformabrasil.saude.gov.br>), avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) recebendo o número CAAE: 38741220.3.0000.0075 (ANEXO A). Após aprovação, os dentes foram coletados por meio de doação do Biobanco de Dentes da FOUSP. Os dentes ficaram armazenados até o momento da sua utilização em potes plásticos, devidamente identificados, em freezer -20 °C. Durante a realização da pesquisa, todo o material biológico, tubos falcon, embalagens plásticas e equipamentos de proteção individual que tenham entrado em contato material biológico foram tratados e descartados como lixo hospitalar.

4.6.2 Manipulação dos adesivos e preparo dos espécimes

Terceiros molares humanos tiveram suas raízes limpas e as superfícies oclusais planificadas 5 mm acima da junção cimento-esmalte com discos de lixa de carbeto de silício granulação 180 e 320 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) em uma politriz metalográfica (EcoMet 3000 e AutoMet 2000, Buehler) sob refrigeração. A camada de esfregaço foi padronizada com o uso de discos de carbeto de silício de granulação 600 por 30 segundos (Buehler). O protocolo restaurador (Figura 4.3) obedeceu à sequência: 1) condicionamento de toda a superfície dentinária com ácido fosfórico a 37% (Condac 37, FGM, Joinville, SC, Brasil) por 15 segundos; 2) enxague com água deionizada por 15 segundos e remoção do excesso de água utilizando papel absorvente; 3) nos grupos com pré-tratamento, 30 µL da solução de EtOH com ou sem 5% SC foram pipetados sobre a superfície condicionada e agitados por 20 segundos (Point Brush, SDI, Bayswater, Australia), seguido pela aplicação de um jato de ar suave para remoção do solvente, de modo a manter a superfície dentinária

visualmente úmida; 4) aplicação ativa durante 10 segundos de uma gota do *primer* do sistema adesivo sobre a dentina, seguida de aplicação de um jato de ar por 5 segundos, deixando a dentina com aspecto brilhante e homogêneo 5) aplicação de uma gota de adesivo (contendo ou não SC), seguida pela aplicação um jato de ar suave pra homogeneizar o adesivo na superfície; 6) repetição do último passo, seguido de fotopolimerização da camada adesiva por 40 segundos (Valo Grand Cordless, Ultradent) e 7) colocação de três incrementos horizontais de 1,5 mm de espessura do compósito Z350 (cor A3B, 3M ESPE) sendo cada incremento fotopolimerizado por 40 segundos (Valo Grand Cordless, Ultradent).

Figura 4.3 - Fluxo restaurador dos seis grupos experimentais utilizados para os ensaios de resistência de união à microtração, ensaio de nanoindentação e zimografia *in situ*



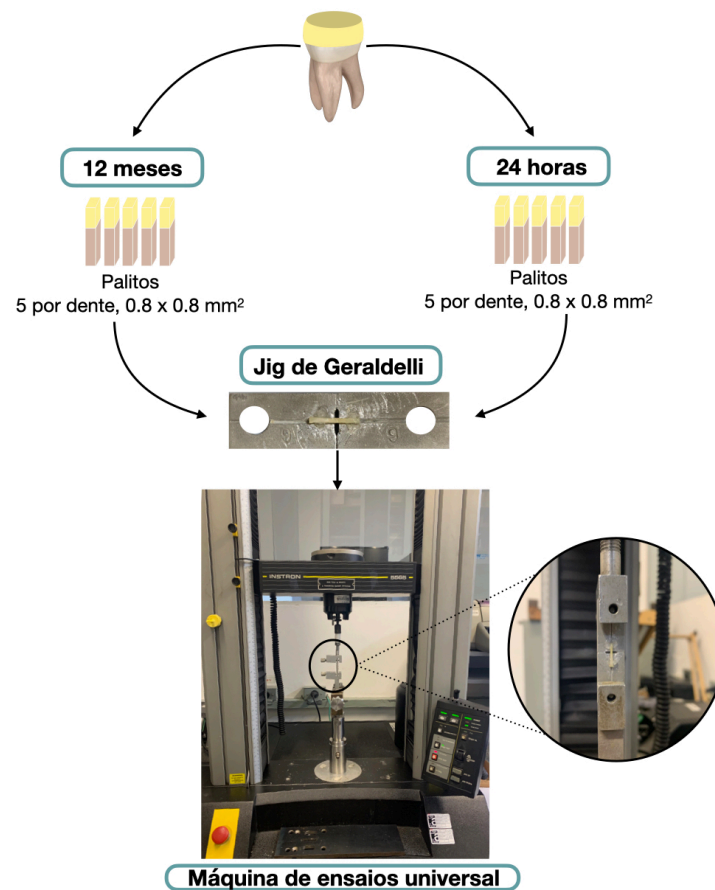
Fonte: A autora.

4.7 ANÁLISE DA INTERFACE ADESIVA: ENSAIOS MECÂNICOS E MICROESTRUTURA

4.7.1 Resistência de união à microtração

Os dentes restaurados (n=5) foram armazenados em 15 mL de FCS a 37 °C por 24 horas. Em seguida, os dentes tiveram suas raízes planificadas e foram seccionados perpendicularmente à interface adesiva usando um disco diamantado em baixa velocidade sob refrigeração (Buehler-Series 15 LC Diamond, Buehler) para a obtenção de espécimes em formato de palito (0,8x0,8 mm²). Para cada dente, cinco palitos foram testados após 24 horas e outro conjunto de cinco palitos após 12 meses de armazenamento em FCS a 37 °C. O FCS foi preparado conforme descrito por Kokubo e Takadama (228) e trocado semanalmente. Os espécimes foram fixados com cola de cianoacrilato (Loctite Super Bonder Gel, Henkel) a um jig de Geraldelli (Odeme Dental Research). O conjunto foi posicionado em uma máquina de ensaios universal (modelo 5565, Instron Corp) e submetido a uma força de tração a 1 mm/min (Figura 4.4). Após a fratura, a interface foi observada em estereomicroscópio (modelo SZ61, Olympus, Tóquio, Japão) e classificada de acordo com seu modo de fratura em falha adesiva, coesiva (em dentina ou compósito) ou mista. A área da secção transversal dos palitos foi mensurada com um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm (Dick Smith Electronics, Sidney, Australia). A resistência nominal máxima (em MPa) foi calculada dividindo-se a força registrada no momento da ruptura de cada palito pela sua área da secção transversal dos corpos de prova. A média dos valores de resistência dos palitos originados de um mesmo dente foi calculada. Assim, cada um dos dentes foi considerado uma unidade amostral.

Figura 4.4 - Representação ilustrativa do ensaio de resistência de união à microtração



Fonte: A autora.

4.7.2 Avaliação do potencial remineralizador através do ensaio de nanoindentação

Trinta terceiros molares humanos (n=6) foram preparados conforme descrito na seção 4.6.2 (Figura 4.3). Após 24 horas de armazenamento em 15 mL de FCS a 37 °C, todos os dentes tiveram suas raízes planificadas e foram seccionados longitudinalmente em fatias com 1,5 mm de espessura usando um disco diamantado em baixa velocidade sob refrigeração (Isomet 5000, Buehler). As fatias foram embutidas em resina acrílica (JET, Classico, São Paulo, SP, Brasil) e tiveram suas superfícies polidas com lixas de carvão de silício granulação 600, 800, 1200, 1500,

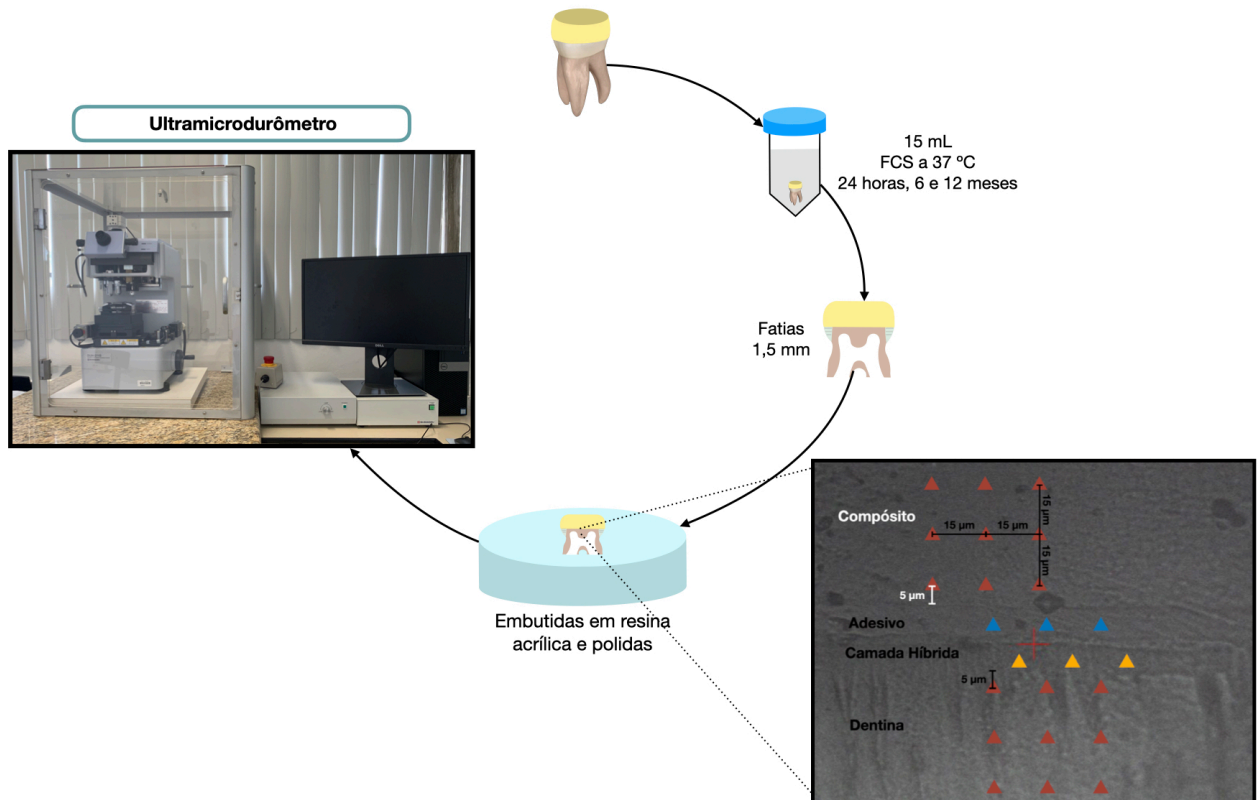
2500 e 4000 (Buehler). A mesma fatia foi avaliada no ensaio de nanoindentação após 24 horas, 6 e 12 meses de armazenamento em 15 mL de FCS a 37 °C. O FCS foi manipulado e trocado semanalmente. Para a avaliação da dureza e do módulo de elasticidade foi utilizado um ultramicrodurômetro (DUH 211S, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) com um edentador piramidal Berkovich. Foi utilizado o modo *load-unload*, com força máxima de indentação de 5 mN, mantida por 5 segundos. Nas regiões correspondentes ao compósito e à dentina subjacente à camada híbrida, foram realizadas três linhas de indentações com três indentações cada, perpendiculares à interface adesiva. A distância entre indentações foi padronizada em $15 \pm 1 \mu\text{m}$. A primeira das três indentações foi localizada a 5 μm acima do adesivo (para o compósito) e 5 μm abaixo da camada híbrida (para a dentina), sendo a média das três indentações realizadas em uma mesma profundidade utilizadas para análise estatística. Na camada de adesivo e na camada híbrida foram realizadas três indentações ao longo da interface, com 15 μm de distância entre elas, sendo a média dessas três indentações utilizadas para a análise estatística (Figura 4.5).

4.7.3 Microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de raios-x por dispersão em energia das interfaces (MEV/EDS)

A remineralização dentinária também foi avaliada observada através de microscopia eletrônica de varredura por espectroscopia dispersiva de raios-x (MEV/EDS) das interfaces adesivas. Uma fatia representativa de cada grupo armazenada 12 meses, proveniente dos dentes utilizados para o ensaio de nanoindentação, foi polida com lixas de carbetto de silício granulação 2500, 4000 e discos de feltro impregnados com pastas diamantadas 1 μm e, sequencialmente, 0,5 μm (Buehler). Para avaliação de 24 horas, outro conjunto de seis dentes foi preparado, embutido em resina acrílica e polido conforme descrito previamente. Os discos de acrílico foram secos por 24 horas a 37 °C e recobertos com platina. As interfaces adesivo-dentinárias foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura utilizando detector de elétrons retroespalhados (Quanta 650 - FEG, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). A quantificação (intensidade normalizada) de cálcio e fósforo na dentina mineralizada, camada híbrida e camada de adesivo foi realizada ao longo de

uma linha de 15 μm com captação de 100 pontos utilizando EDS (Quantax 4030 e Xflash 6-60, Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha).

Figura 4.5 - Representação ilustrativa do ensaio de nanoindentação



Fonte: A autora.

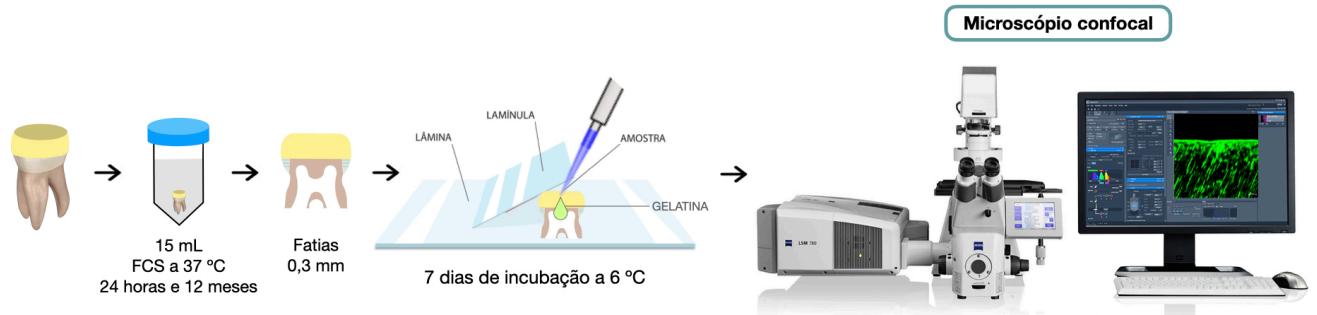
4.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DA ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA/GELATINOLÍTICA

4.8.1 Zimografia *in situ*

Outro conjunto de 30 terceiros molares humanos foram selecionados (n=5) e preparados conforme descrito na seção 4.6.2 (Figura 4.3). Os dentes restaurados foram armazenados em 15 mL de FCS a 37 °C por 24 horas e, em seguida, tiveram suas raízes planificadas e foram cortados no sentido ocluso-cervical em fatias de 300 µm de espessura de modo a expor a interface adesiva (Isomet 5000, Buehler). Para cada um dos dentes, duas fatias foram testadas após 24 horas e outras duas após 12 meses de armazenamento em FCS a 37° C. O FCS foi manipulado e trocado semanalmente. As fatias foram polidas manualmente com lixas de carbetto de silício granulação 1200 e 2400 (Buehler) até que se obtivessem amostras com 300 µm de espessura. A zimografia *in situ* foi realizada com gelatina conjugada com fluoresceína como substrato para gelatinases (EnzChek Gelatinolytic/Collagenolytic Assay Kit, E-12055, Thermo Fisher Scientific Inc.) conforme descrito em Mazzoni *et al.* (74). Uma solução estoque (1 mg/mL) de gelatina conjugada com fluoresceína foi preparada pela adição de 1 mL de água deionizada aos frascos contendo o substrato liofilizado, aquecida em banho maria por 10 minutos a 50 °C. Posteriormente, alíquotas de 10 µL foram transferidas para tubos eppendorfs e armazenados a -20 °C até o uso. Previamente ao ensaio, a solução alíquotada foi diluída 1:10 em tampão contendo cloreto de sódio (NaCl) 150 mmol/L, CaCl₂ 5 mmol/L, Tris-HCl 50 mmol/L e pH 8,0. As fatias foram posicionadas em lâminas de vidro e, em seguida, 20 µL de gelatina fluorescente foram pipetados sobre cada fatia. O conjunto foi recoberto com uma lamínula e selado com esmalte. As lâminas foram protegidas da luz e incubadas a 6 °C por 7 dias. A hidrólise do substrato de gelatina conjugado com fluoresceína, indicativo de atividade gelatinolítica endógena, foi analisada por microscópio confocal multi-photon (Zeiss, LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Seções ópticas de 12 µm de espessura foram adquiridas a partir de diferentes planos focais. As imagens foram analisadas, quantificadas e processadas através da utilização do software ZEN 2010 software (Carl Zeiss). A representação do ensaio de zimografia *in situ* está

apresentado na Figura 4.6.

Figura 4.6 - Representação ilustrativa do ensaio de zimografia *in situ*



Fonte: A autora.

4.8.2 Zimografia reversa

A atividade inibitória dos adesivos e pré-tratamentos sobre a atividade gelatinolítica de MMP-2 foi avaliada por zimografia reversa. 5 μ L de MMP-2 (25 μ mol/L) (colagenase de *Clostridium histolyticum* Tipo IV, Sigma-Aldrich Inc.) foram incubados em tampão (Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, CaCl₂ 5 mmol/L, cloreto de zinco (ZnCl₂) 1 μ mol/L, pH 7,5) com 50 μ g de gelatina (10 mg/mL) a 37 °C por 24 horas. 10 μ L dos adesivos (Ad(-) e Ad(+)) ou de suas combinações com pré-tratamentos (P(-)Ad(-), P(-)Ad(+), P(+Ad(-), P(+Ad(+)) foram adicionados às soluções previamente à incubação (Figura 4.7). Para verificação da degradação/efeito protetor das partículas de SC quando adicionadas ao adesivo e pré-tratamento foi realizada uma curva de tempo de hidrólise do substrato (3, 6 e 24 horas) dos grupos P(-)Ad(-) e P(+Ad(+).

Após a incubação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poli-acrilamida a 10% com dodecil sulfato de sódio (SDS) em condições não redutoras (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). O padrão de massa molecular variou de 10 a 180 kDa (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc.). As proteínas foram coradas Coomassie Blue R-250 por 2 horas e descoradas em solução contendo 50% de metanol, 10% de ácido acético e 40% de água deionizada.

4.8.3 Ensaio de Hidroxiprolina

A verificação da concentração de hidroxiprolina (HYP) liberada pelas amostras (indicativo da degradação do colágeno pela MMP-2) foi determinada por ELISA (Human hydroxyproline ELISA Kit, Bt Lab, Zhejiang, China). Esse método se baseia no princípio de que cerca de 10% do colágeno tipo I (principal constituinte orgânico da matriz de dentina) é constituído por este aminoácido não essencial (229-232), que por sua vez inexistente ou existe em concentrações muito baixas em outras proteínas (229). Para realização do ensaio, 5 μL de MMP-2 (25 $\mu\text{mol/L}$, Sigma-Aldrich Inc.) (colagenase de *Clostridium histolyticum* Tipo IV, Sigma-Aldrich Inc.) foram incubados em tampão (Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, CaCl_2 5 mmol/L, ZnCl_2 1 $\mu\text{mol/L}$ em pH 7,5) com 50 μg de gelatina (10 mg/mL) a 37 °C por 24 horas. 10 μL dos adesivos (Ad(-) e Ad(+)), dos pré-tratamentos (P(-) e P(+)) ou de suas combinações (P(-)Ad(-), P(-)Ad(+), P(+Ad(-), P(+Ad(+)) foram adicionados as soluções previamente à incubação (Figura 4.7). Após incubação a concentração de HYP liberada foi quantificada utilizando o kit de ELISA (Human hydroxyproline ELISA Kit, Bt Lab, Zhejiang, China), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Os valores de absorbância foram mensurados em espectrofotômetro com comprimento de onda fixo em 450 nm (VERSA Max Microplate Reader, Molecular Devices, Califórnia, EUA). Uma curva padrão com concentrações conhecidas de hidroxiprolina (150, 300, 600, 1200, 2400 nmol/L) foi feita simultaneamente. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

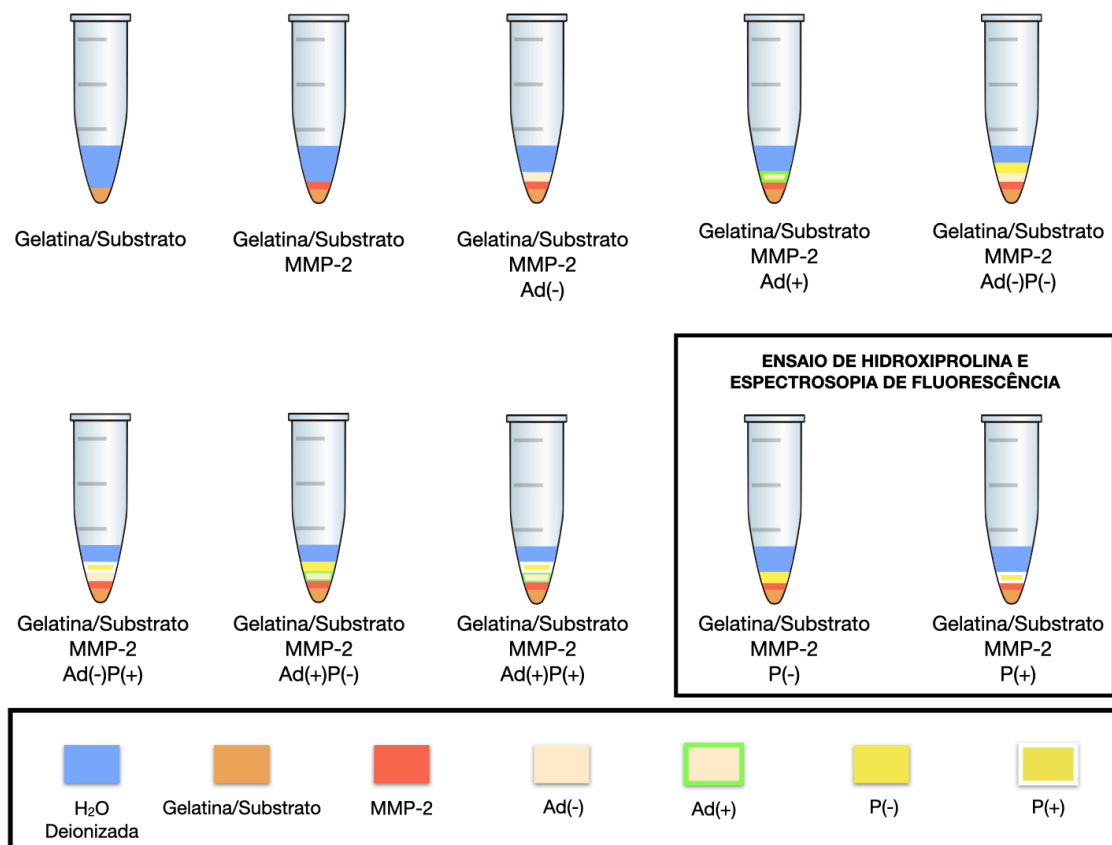
4.8.4 Espectroscopia de fluorescência para atividade de MMP-2

O ensaio de cinética enzimática utilizando substrato com fluorescência apagada intramolecularmente (peptídeo Abz-AGPRGAGQ-EDDnp) foi realizado em microplaca de fundo preto com 96 poços. Em cada poço foram pipetados em duplicata 200 μL de solução contendo: 5 μL de MMP-2 (25 $\mu\text{mol/L}$, Sigma-Aldrich Inc.), 23 μL tampão de ativação para MMP-2 (Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, CaCl_2 5 mmol/L, ZnCl_2 1 $\mu\text{mol/L}$, pH 7,5) e 1 μL da solução de substrato (240 mmol/L). 10 μL

dos adesivos (Ad(-) e Ad(+)), pré-tratamentos (P(-) e P(+)) ou suas combinações (P(-)Ad(-), P(-)Ad(+), P(+Ad(-), P(+Ad(+)) foram adicionados as soluções e o conjunto foi incubado por 24 horas a 37 °C.

Durante a reação de hidrólise proteolítica, o substrato com fluorescência apagada intramolecularmente é clivado, liberando a molécula fluorescente que pode assim ser quantificada no ambiente de ensaio. As medidas de fluorescência emitidas foram realizadas em um fluorímetro (Fluorescence Spectrophotometer F-7000, Hitachi High-Tech, Tóquio, Japão) à 37 °C (CB-8-30E Cooling Bath, Heto Lab Equipment, Allerød, Dinamarca) com comprimento de onda de excitação fixado em 320 nm e emissão em 420 nm e repetição de aquisição dos espectros a cada 10 segundos. Os valores obtidos foram utilizados para calcular a porcentagem da atividade da MMP-2 em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF%).

Figura 4.7 - Representação ilustrativa dos incubados contendo gelatina, MMP-2, Ad(+), Ad(-), P(-)Ad(-), P(-)Ad(+), P(+Ad(-), P(+Ad(+)) utilizados para os ensaios de zimografia reversa, hidroxiprolina e espectroscopia de fluorescência para atividade de MMP-2. Para os dois últimos ensaios foram testados incubados contendo P(-) e P(+)) isoladamente



Fonte: A autora.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os conjuntos de dados foram submetidos ao teste de aderência à curva normal (teste de Shapiro-Wilk) e de homogeneidade de variância (teste de Levene). Os resultados de grau de conversão, resistência coesiva do adesivo, liberação de íons, resistência de união à microtração e nanoindentação (módulo de elasticidade e dureza do compósito, camada adesiva, camada híbrida e dentina) foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) de acordo com a Tabela 4.9 e complementados por teste de Tukey para contraste entre as médias. Em todos os casos, foi adotado o nível de significância de 5%. Os resultados das análises de zimografia *in situ*, zimografia reversa, ensaio de hidroxiprolina e espectroscopia de fluorescência para atividade de MMP-2 são apresentados de forma descritiva.

Tabela 4.2 - Métodos estatísticos empregados para a análise dos dados de grau de conversão, resistência coesiva do adesivo, liberação de íons, resistência de união à microtração e nanoindentação (módulo de elasticidade e dureza do compósito, camada adesiva, camada híbrida e dentina) de acordo com a análise de variâncias (ANOVA), fatores, níveis e medidas repetidas (se aplicável)

Ensaio	ANOVA	Fator(es)	Níveis	Medidas Repetidas
Grau de conversão	Um fator	Material	Dois níveis: Ad(-) e Ad(+)	-
Resistência coesiva do adesivo	Dois fatores	Material	Dois níveis: Ad(-) e Ad(+)	-
		Período de armazenamento	Dois níveis: 24 horas e 12 meses	
Liberação de íons	Dois fatores	Material	Dois níveis: Ad(-) e Ad(+)	Período de armazenamento
		Período de armazenamento	Quatro níveis: 15, 30, 45 e 60 dias	
Resistência de união à microtração	Três fatores	Material	Dois níveis: Ad(-) e Ad(+)	Período de armazenamento
		Pré-tratamento	Três níveis: sem pré-tratamento, P(-) e P(+)	
		Período de armazenamento	Dois níveis: 24 horas e 12 meses	
Módulo de elasticidade e dureza do compósito e da dentina	Quatro fatores	Material	Dois níveis: Ad(-) e Ad(+)	Período de armazenamento
		Pré-tratamento	Três níveis: sem pré-tratamento, P(-) e P(+)	
		Período de armazenamento	Três níveis: 24 horas, 6 meses e 12 meses	
		Distância da interface	Três níveis: 5, 20 e 35 µm	
Módulo de elasticidade e dureza da camada adesiva da e camada híbrida	Três fatores	Material	Dois níveis: Ad(-) e Ad(+)	Período de armazenamento
		Pré-tratamento	Três níveis: sem pré-tratamento, P(-) e P(+)	
		Período de armazenamento	Três níveis: 24 horas, 6 meses e 12 meses	

Fonte: A autora.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

5.1.1 Difractometria de raios-X (DRX)

As fases presentes em cada síntese são apresentadas na Tabela 5.1. Os difratogramas são apresentados nas Figuras 1, 2, 3 e 4 do Apêndice B. De forma geral, foram obtidas misturas de fases. Em todas as sínteses foi identificada a formação de silicato dicálcico (β -Ca₂SiO₄, belita) com picos de máxima intensidade entre 32,05° - 32,61° (Joint Committee on Powder Diffraction Standards/ JCPDS nº 29-0371). A formação de outros compostos também foi identificada na ordem de maior para menor prevalência: Ca₃SiO₅ (silicato tricálcico/alita, picos característicos em 29,43°, 32,60° e 34,37°, 65°, JCPDS nº 49-0442), óxido de cálcio (CaO, picos característicos em 32,2°, 37,34° e 53,85°, JCPDS nº 37-1497), hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂, picos característicos em 17,19°, 34,09°, 36,45°, JCPDS nº 72-0156) e espurrita (Ca₅(SiO₄)₂CO₃, picos característicos em 33,14°, 33,57° e 33,85°, JCPDS nº 13-0496).

A razão molar dos precursores alterou a relação largura/meia altura dos picos. Este efeito foi mais evidente para os materiais sintetizados na razão molar 2:1, os quais apresentaram picos de menor intensidade, exceto para síntese realizada a 24 °C, pH básico e 1,2 gramas de CTAB.

5.1.2 Espectrometria por fluorescência de raios-x (FRX), área superficial, densidade teórica e tamanho (D₅₀) das partículas

Os dados obtidos pelas análises de FRX, densidade e tamanho de partículas são apresentados na Tabela 5.1. Foi observada uma boa correlação entre razão Ca:Si

utilizada na síntese e a proporção destes elementos nas partículas, com exceção dos grupos A e F. O grupo F, embora sintetizado com razão molar 2:1, originou as partículas com a maior proporção Ca:Si.

De modo geral, as sínteses realizadas com razão molar 2:1 apresentaram valores menores para D_{50} . Para as sínteses realizadas com uma mesma razão molar, a maior quantidade de CTAB reduziu o tamanho de partícula. O pH teve efeito evidente para sínteses realizadas com 0,6 g de CTAB a 80 °C, nas quais partículas menores foram identificadas nas sínteses realizadas em meio ácido em ambas as razões molares.

Os valores de área superficial variaram entre 33 e 62 m²/g. Não foi possível identificar correlação entre a razão molar dos precursores, quantidade de CTAB e temperatura com os valores de área superficial. Entretanto, o pH parece ser influente para as sínteses realizadas a 80 °C, nas quais o meio ácido originou partículas com maior área superficial em relação as sínteses análogas em meio básico.

A densidade das partículas variou entre 3,05 e 3,62 g/cm³ sendo que a maioria apresentou densidade compreendida entre 3,05 e 3,34 g/cm³, valores comparáveis aos relatados para o Ca₂SiO₄ (3,28 g/cm³) (233), Ca₃SiO₅ (3,15 g/cm³) (234) e CaO (3,35 g/cm³) (235).

5.1.3 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens em MEV das partículas obtidas na síntese (previamente à moagem) são apresentadas nas Figuras 5.1 a 5.4 e a descrição das morfologias observadas é apresentada na Tabela 5.4. No geral, houve formação de aglomerados micrométricos de diferentes tamanhos, formados por nanopartículas esféricas ou irregulares. Em alguns casos (Figuras 5.1 D e Figuras 5.3 K e L), houve formação de partículas aciculares recobrimdo esses aglomerados.

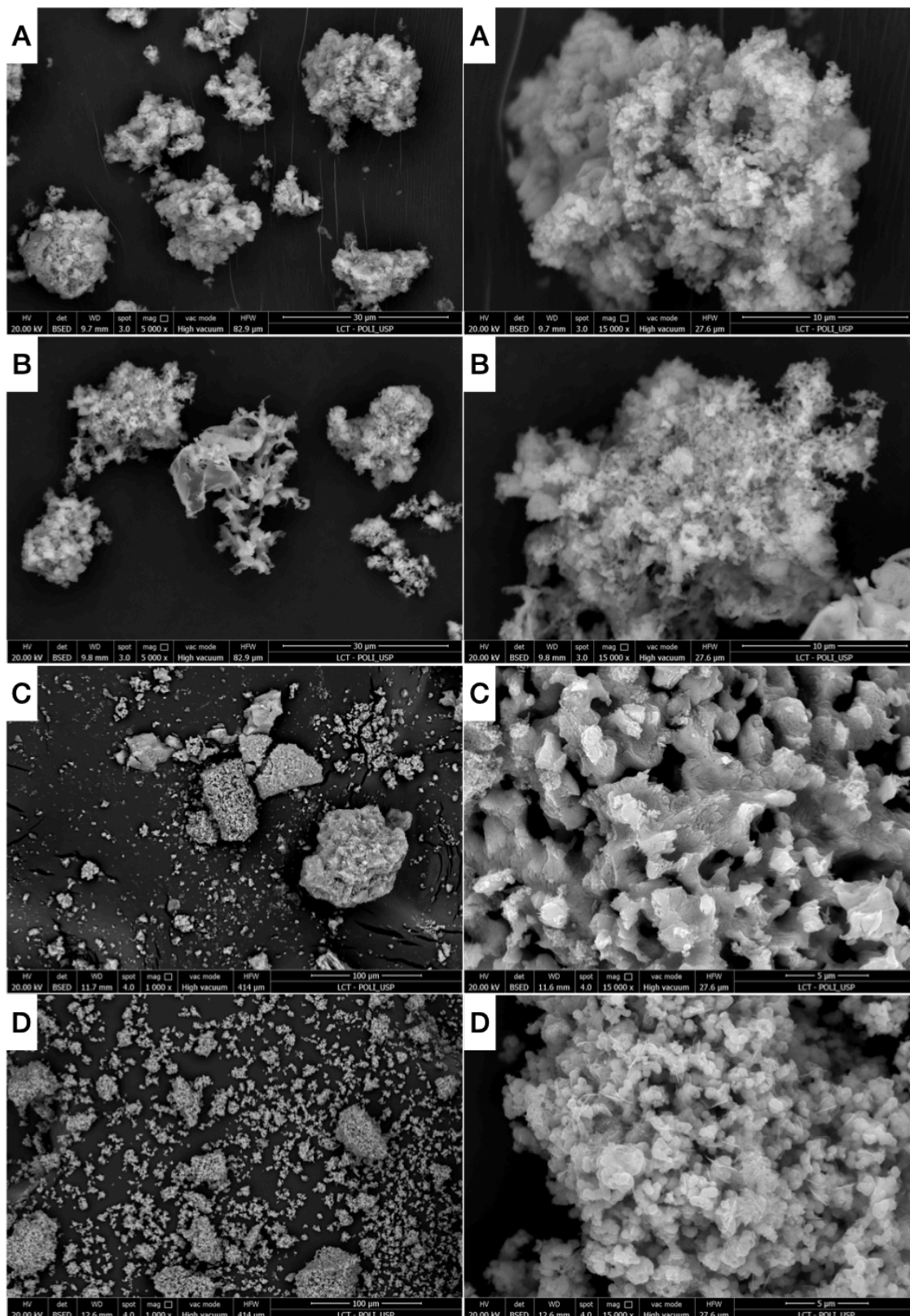
Tabela 5.1 - Fases encontradas no DRX, e resultados obtidos para as análises de espectrometria por fluorescência de raios-x (FRX), distribuição do tamanho de partículas (D_{50}), área superficial e densidade teórica (ρ) e morfologia das dezesseis sínteses realizadas, ordenadas de A a P, em função da razão molar dos precursores, temperatura, quantidade de CTAB e pH do meio reacional

Grupo	Razão Molar	°C	CTAB (g)	pH	Fases	Razão Ca:Si	D_{50} (μm)	Área superficial (m^2/g)	ρ (g/cm^3)	Morfologia das partículas
A	2:1	24	0,6	6	Ca_2SiO_4 $\text{Ca}(\text{OH})_2$	2,3	13	38	3,07	Aglomerados de nanopartículas esféricas e irregulares
B	2:1	24	0,6	10	Ca_2SiO_4 $\text{Ca}(\text{OH})_2$	2,6	13	14	3,34	
C	2:1	80	0,6	6	Ca_2SiO_4 Ca_3SiO_5 $\text{Ca}_5(\text{SiO}_4)\text{CO}_3$	2,5	13	9	3,10	Partículas micrométricas com superfície irregular e porosa
D	2:1	80	0,6	10	Ca_2SiO_4	2	29	38	3,56	Partículas esféricas parcialmente fusionadas, recobertas por partículas com formato agulhado
E	2:1	24	1,2	6	Ca_2SiO_4	1,9	10	41	3,10	Aglomerados de partículas irregulares
F	2:1	24	1,2	10	Ca_2SiO_4 CaO	5,2	11	62	3,11	
G	2:1	80	1,2	6	Ca_2SiO_4 Ca_3SiO_5	1,9	12	41	3,62	Aglomerados de partículas esféricas de tamanhos variados
H	2:1	80	1,2	10	Ca_2SiO_4 Ca_3SiO_5	2,1	10	15	3,54	Aglomerados porosos
I	3:1	24	0,6	6	Ca_2SiO_4	2,1	17	43	3,22	Aglomerados micrométricos de formato irregular
J	3:1	24	0,6	10	Ca_2SiO_4 CaO	4,4	21	10	3,16	Aglomerados de nanopartículas esféricas regulares
K	3:1	80	0,6	6	Ca_2SiO_4 Ca_3SiO_5 $\text{Ca}(\text{OH})_2$	2,8	16	43	3,05	Aglomerados de partículas esféricas irregulares tamanhos variados recobertas por partículas com formato agulhado
L	3:1	80	0,6	10	Ca_2SiO_4 $\text{Ca}(\text{OH})_2$	3,3	36	11	3,06	

Grupo	Razão Molar	°C	CTAB (g)	pH	Fases	Razão Ca:Si	D ₅₀ (µm)	Área superficial (m ² /g)	ρ (g/cm ³)	Morfologia das partículas
M	3:1	24	1,2	6	Ca ₂ SiO ₄ CaO	2,8	18	33	3,21	Aglomerados porosos de partículas esféricas irregulares de tamanhos variados
N	3:1	24	1,2	10	Ca ₂ SiO ₄ aO	2,9	16	41	3,19	
O	3:1	80	1,2	6	Ca ₂ SiO ₄ , Ca ₃ SiO ₅	3,3	11	49	3,16	
P	3:1	80	1,2	10	Ca ₂ SiO ₄ , Ca ₃ SiO ₅	3,3	10	19	3,23	

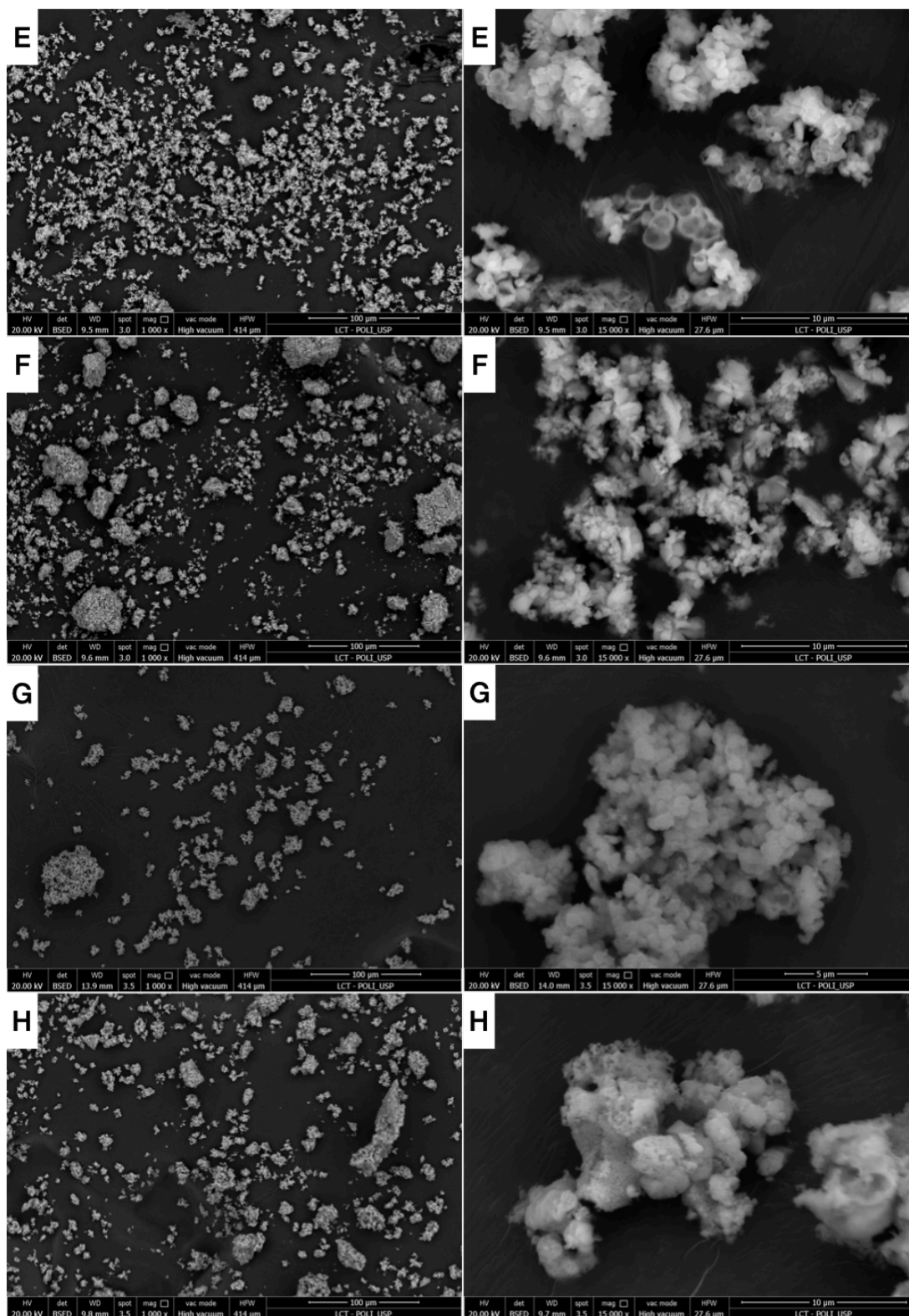
Fonte: A autora.

Figura 5.1 - Imagens em microscópio eletrônico de varredura das partículas de silicato de cálcio sintetizadas com razão molar 2:1 e 0,6 gramas de CTAB. As imagens estão ordenadas de A a D, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1. A coluna da esquerda e da direita apresentam as imagens em menor e maior aumento, respectivamente



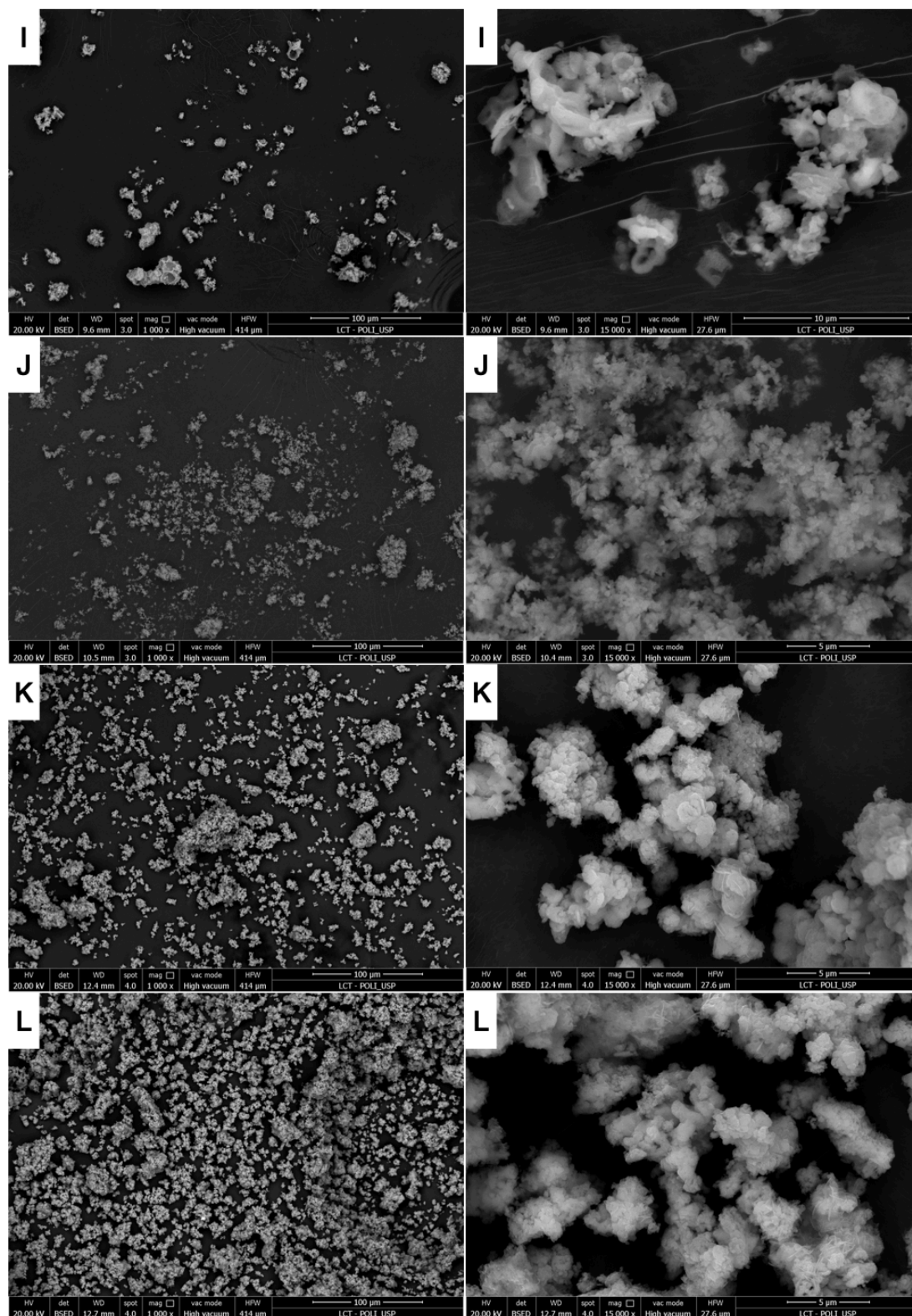
Fonte: A autora.

Figura 5.2 - Imagens em microscópio eletrônico de varredura das partículas de silicato de cálcio sintetizadas com razão molar 2:1 e 1,2 gramas de CTAB. As imagens estão ordenadas de E a H, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1. A coluna da esquerda e da direita apresentam as imagens em menor e maior aumento, respectivamente



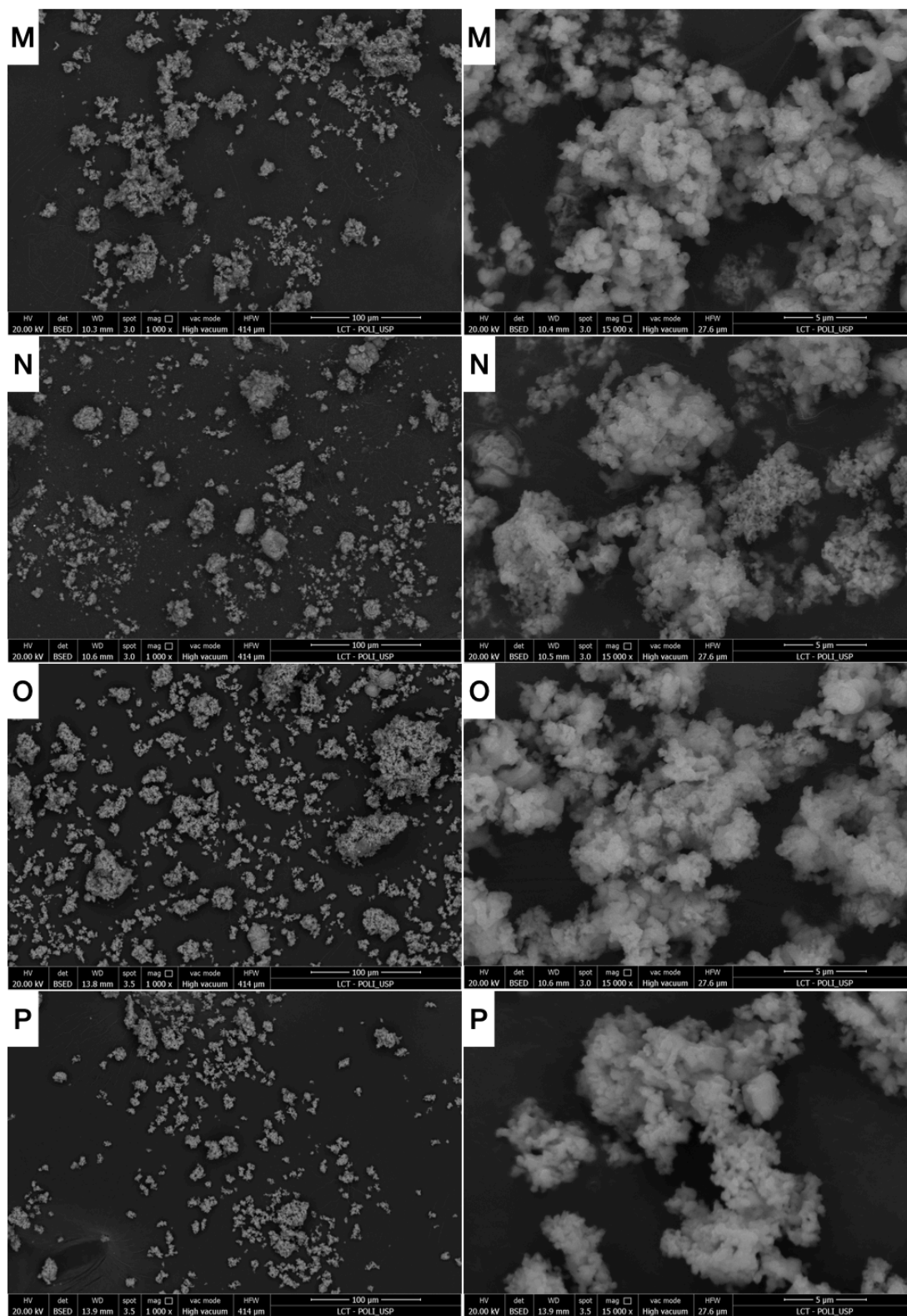
Fonte: A autora.

Figura 5.3 - Imagens em microscópio eletrônico de varredura das partículas de silicato de cálcio sintetizadas com razão molar 3:1 e 0,6 gramas de CTAB. As imagens estão ordenadas de I a L, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1. A coluna da esquerda e da direita apresentam as imagens em menor e maior aumento, respectivamente



Fonte: A autora.

Figura 5.4 - Imagens em microscópio eletrônico de varredura das partículas de silicato de cálcio sintetizadas com razão molar 3:1 e 1,2 gramas de CTAB. As imagens estão ordenadas de M a P, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1. A coluna da esquerda e da direita apresentam as imagens em menor e maior aumento, respectivamente

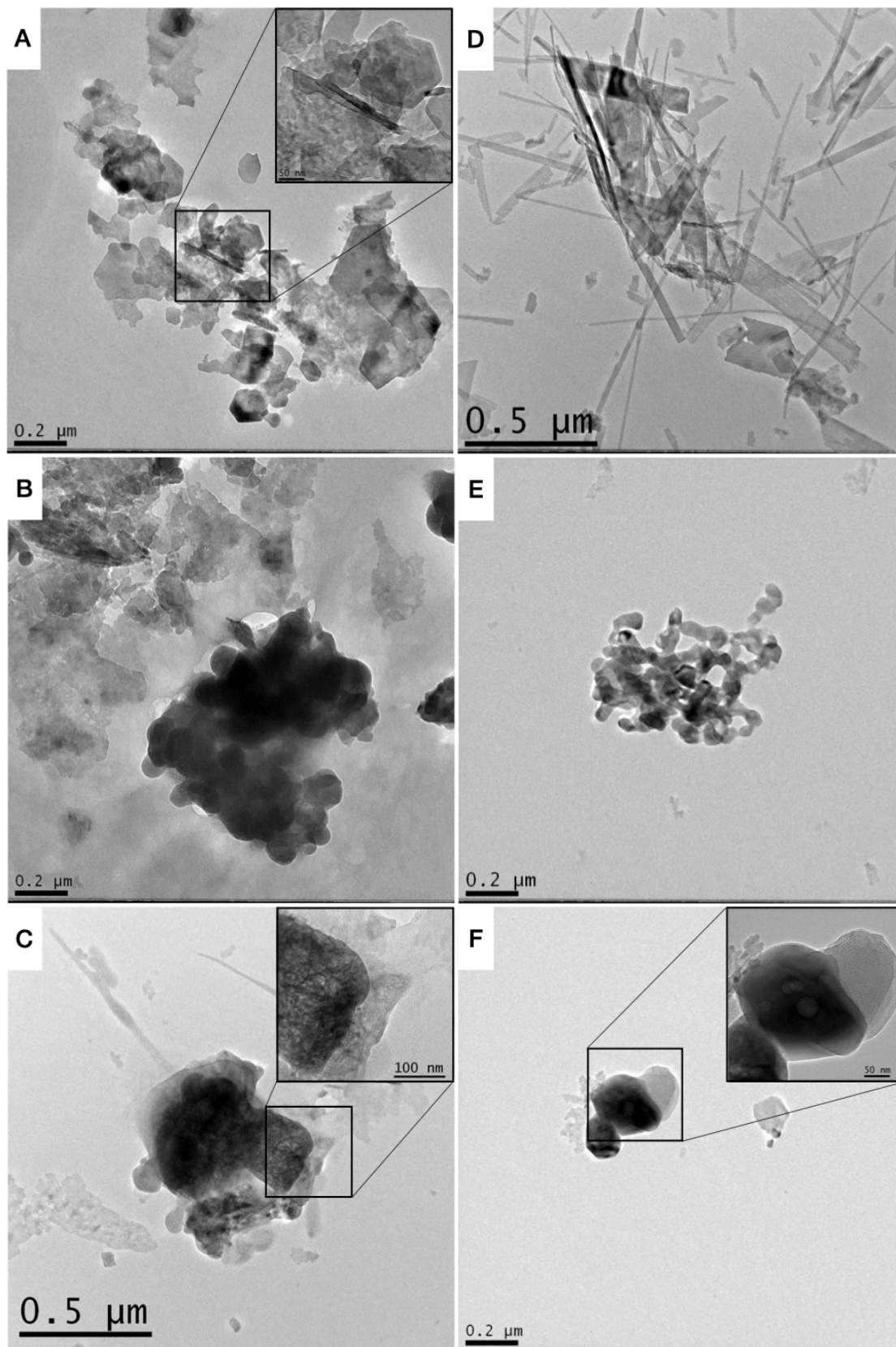


Fonte: A autora.

5.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

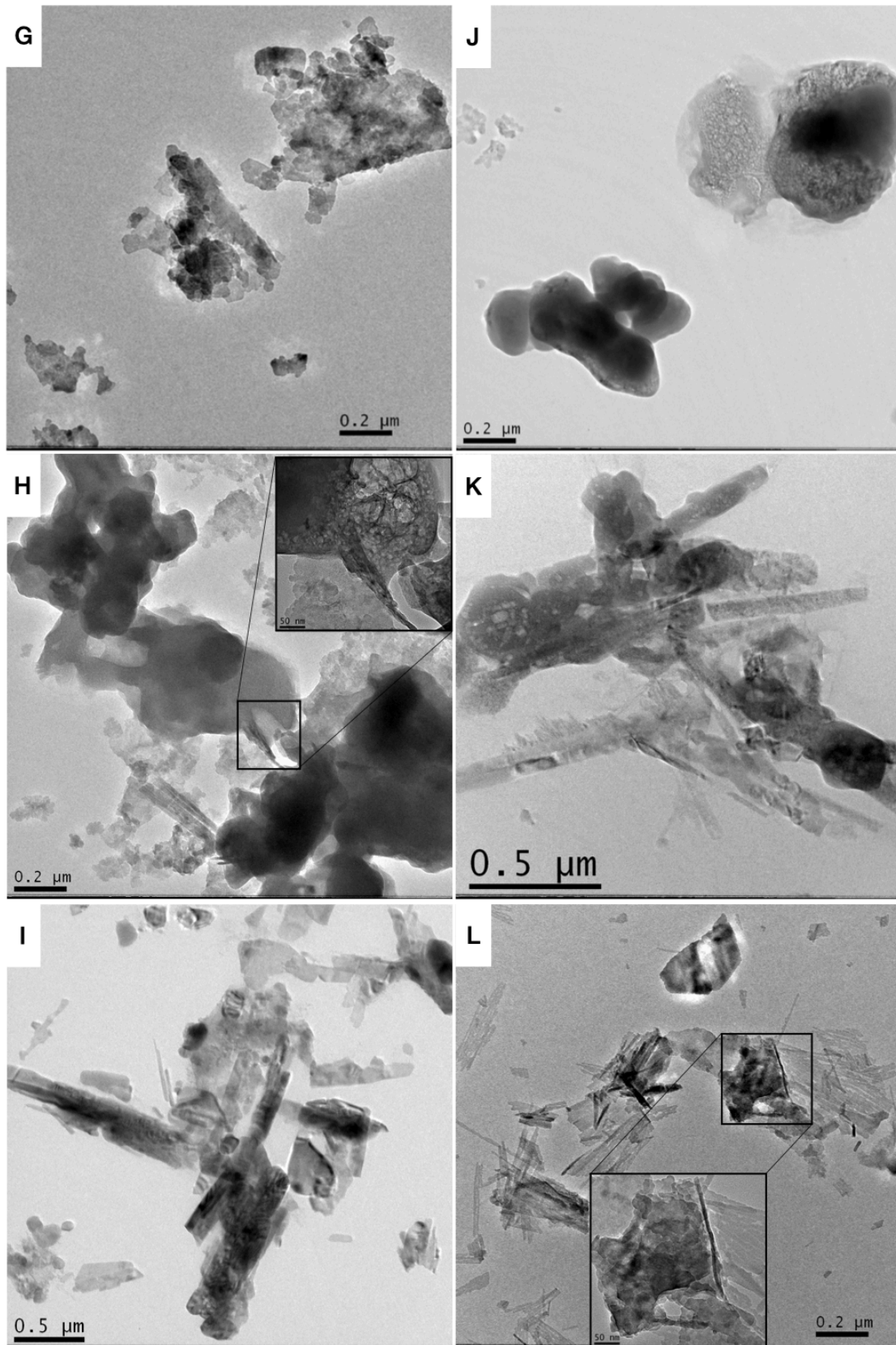
As imagens em MET que apresentam o aspecto morfológico das nanopartículas que compõem os aglomerados obtidos nas sínteses (previamente à moagem) estão apresentadas nas Figuras 5.5 a 5.7. Independentemente das condições de síntese, foi possível constatar que as estruturas formadas são cristalinas e porosas. No geral, todas as sínteses originaram aglomerados de diferentes tamanhos com bordas bem delimitadas e irregulares, compostos por nanopartículas com tamanhos variados fusionadas. As áreas mais eletrodensas indicam regiões com maior aglomeração de nanopartículas. Assim como apresentado na microscopia eletrônica de varredura, as sínteses D, I, K e L apresentaram partículas aciculares, indicando a formação de fases distintas.

Figura 5.5 - Imagens de MET das partículas de silicato de cálcio sintetizadas. As imagens estão ordenadas de A a F, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1



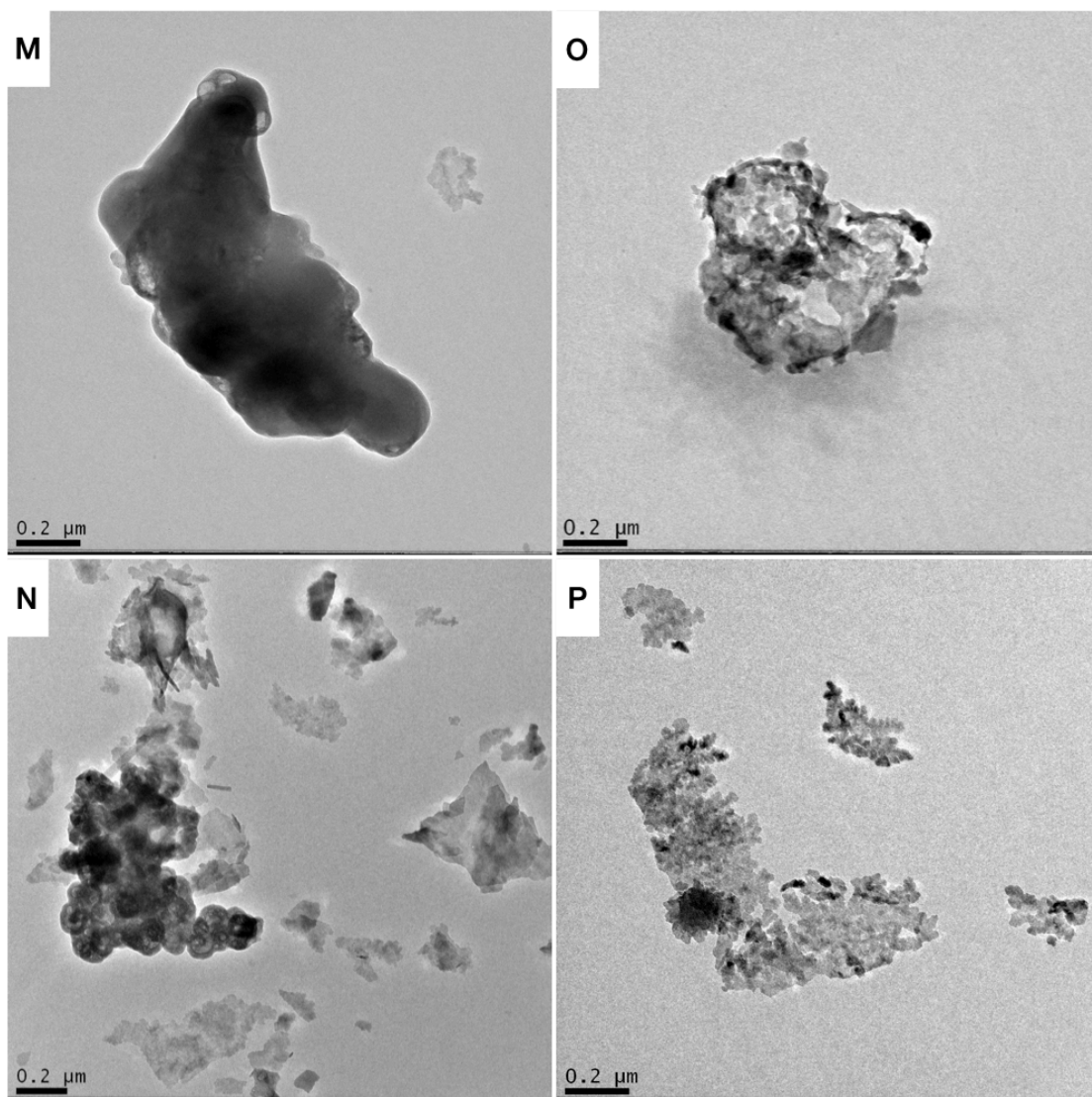
Fonte: A autora.

Figura 5.6 - Imagens de MET das partículas de silicato de cálcio sintetizadas. As imagens estão ordenadas de G a L, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1



Fonte: A autora.

Figura 5.7 - Imagens de MET das partículas de silicato de cálcio sintetizadas. As imagens estão ordenadas de M a P, seguindo a mesma ordem de grupos apresentada na Tabela 5.1



Fonte: A autora.

5.2 LIBERAÇÃO DE ÍONS – AVALIAÇÃO PRELIMINAR

As concentrações de cálcio e silício liberadas após 7 dias de armazenamento de corpos de prova do adesivo Single Bond 2 (3M ESPE) contendo 10% em massa das partículas de SC estão apresentadas na Tabela 5.2, juntamente com a razão Ca:Si nas partículas e o que foi detectado em solução. O intervalo de valores para os íons cálcio foi mais amplo do que o registrado para o silício (respectivamente, 9,0-18,8 ppm e 3,6-4,3 ppm). Os grupos com as menores razões Ca:Si (E e H) liberaram as menores concentrações de cálcio. Os materiais que possuíam partículas com razões Ca:Si maiores foram capazes de liberar concentrações de cálcio até duas vezes superiores em relação aos materiais com partículas dos grupos E e H.

Tabela 5.2 - Médias e desvios-padrão para os dados de liberação de íons cálcio e silício (em ppm) no período de 7 dias (determinados em ICP-OES, n=2) do adesivo Adper Single Bond 2 (3M ESPE) contendo 10% em massa de partículas dos grupos E, F, H, O e P (de acordo com a Tabela 5.1)

Grupo	Ca:Si (partícula)	Cálcio	Silício	Ca:Si (meio de imersão)
E	1,9	9,0 (2,3)	3,9 (0,6)	2,3
F	5,2	17,7 (3,8)	4,3 (0,2)	4,1
H	2,1	9,1 (0,5)	4,1 (1,5)	2,2
O	3,3	18,8 (8,4)	4,3 (1,7)	4,4
P	3,3	12,6 (1,1)	3,6 (0,7)	3,5

Fonte: A autora.

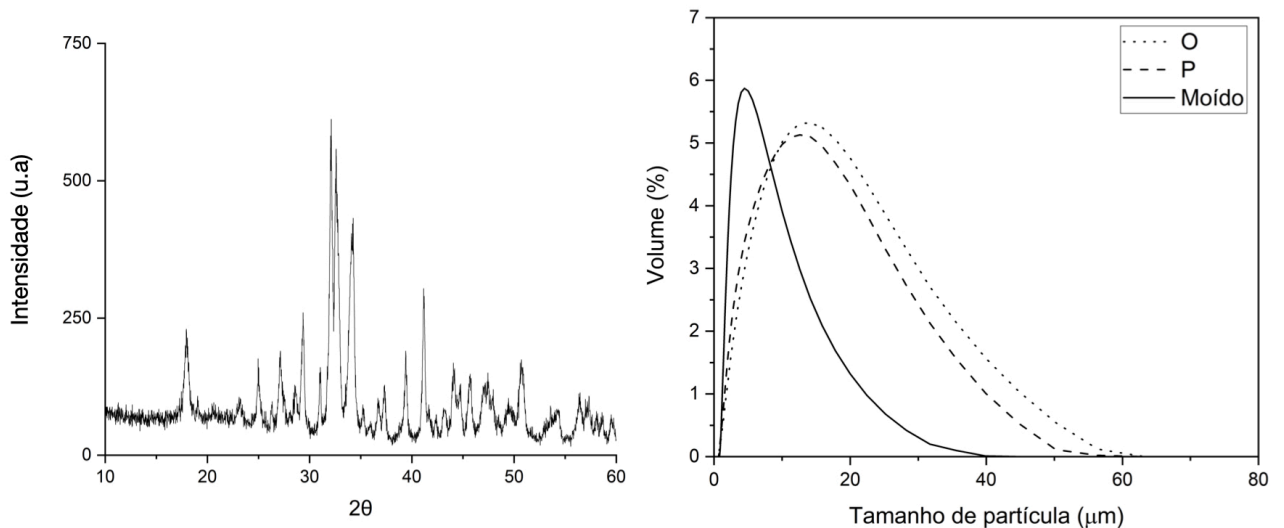
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA PARTÍCULA APÓS MOAGEM

As partículas de SC que apresentaram maior liberação de cálcio (grupos O e P), por serem sínteses análogas diferindo apenas quanto ao pH do meio reacional, foram misturadas, moídas, novamente caracterizadas e utilizadas para todos os outros ensaios. Assim como as partículas primárias das sínteses O e P (Figura apêndice 2), o a difratometria de raios-x indicou a presença de silicato dicálcico e

tricálcico (Ca_2SiO_4 e Ca_3SiO_5) diferindo apenas na intensidade dos picos, que se apresentaram menores em relação àqueles dos difratogramas das amostras pré moagem (Figura 5.8). Esse resultado era esperado uma vez que a moagem não deveria interferir ou modificar as fases de silicato formadas originalmente. Os dados obtidos pelas análises de FRX, tamanho do aglomerado de partículas e área superficial e densidade são apresentados na Tabela 5.3. Não houve diferença para razão Ca:Si das partículas moídas em comparação com as partículas O e P originais. Entretanto, a moagem se mostrou efetiva para a redução do tamanho dos aglomerados, evidenciada pelo deslocamento da curva de distribuição do tamanho de partículas apresentada da Figura 5.8 e o aumento da área superficial. A distribuição de tamanhos também se apresentou mais estreita do que a das partículas originais. O valor de densidade também se manteve semelhante ao das sínteses originais.

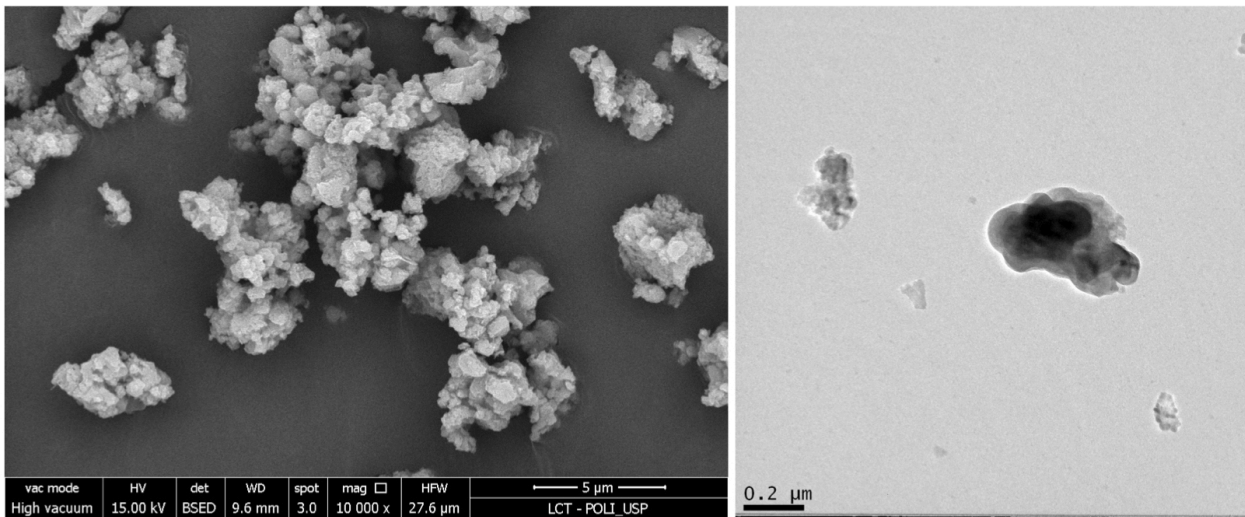
A morfologia dos aglomerados das partículas após a moagem observada em MEV e MET é apresentada na Figura 5.9. É possível observar aglomerados porosos de diferentes tamanhos, formados por partículas irregulares com bordas lisas e bem definidas, no geral a morfologia semelhante à dos pós originais, porém, com aglomerados menores.

Figura 5.8 - Difratograma da síntese moída (esquerda) e gráfico de distribuição do tamanho de partículas das sínteses O, P e moída (direita)



Fonte: A autora.

Figura 5.9 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura (esquerda) e microscopia eletrônica de transmissão (direita) das partículas moídas



Fonte: A autora.

Tabela 5.3 - Resultados obtidos para as análises de FRX, Razão Ca:Si, distribuição do tamanho de (D_{10} , D_{50} , D_{90}), área superficial e densidade teórica (ρ) das partículas moídas e das sínteses O e P

Grupo	Razão Ca:Si	D_{10} (μm)	D_{50} (μm)	D_{90} (μm)	Área Superficial (m^2/g)	ρ (g/cm^3)
Moído	3,3	2	5	14	55	3,02
Síntese O	3,3	3	11	30	49	3,16
Síntese P	3,3	3	10	26	19	3,23

Fonte: A autora.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO ADESIVO

5.4.1 Grau de conversão e resistência coesiva

As médias e desvios-padrão para grau de conversão e resistência coesiva do adesivo (frasco 3/Adesivo, Adper Scotchbond Multipurpose, 3M ESPE) sem (Ad(-)) ou com adição 5% em massa de SC (Ad(+)) são apresentadas na Tabela 5.4. Para o grau de conversão, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p>0,05$), indicando que a adição de 5% em massa de partículas de silicato de cálcio não interferiu na reação de polimerização. A ausência de diferença estatisticamente significativa também foi observada entre os grupos para resistência coesiva inicial ($p>0,05$). Após 12 meses de armazenamento não foram observadas reduções estatisticamente significantes para um mesmo grupo. Entretanto, o adesivo sem partículas (Ad(-)) apresentou-se estatisticamente superior em relação ao adesivo com partículas (Ad(+)).

Tabela 5.4 - Médias e desvios-padrão para grau de conversão (em %) e resistência coesiva (após 24 horas e 12 meses de armazenamento em água) do adesivo (frasco 3, Adper Scotchbond Multipurpose, 3M ESPE) sem (Ad(-)) ou com adição 5% em massa de SC (Ad(+)), em MPa. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula em uma mesma coluna e letras minúsculas em uma mesma linha (apenas para resistência coesiva) indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)

Material	Grau de conversão (%)	Resistência coesiva (MPa)	
		24 horas	12 meses
Ad(-)	69,1 (2,4) A	44,3 (8,0) Aa	38,9 (8,9) Aa
Ad(+)	69,8 (0,6) A	39,0 (5,8) Aa	31,8 (4,9) Ba

Fonte: A autora.

5.4.2 Liberação de íons

As médias e os desvios-padrão para as concentrações de cálcio e silício liberadas pelos adesivo (frasco 3/Adhesive, Adper Scotchbond Multipurpose, 3M ESPE) sem (Ad(-)) ou com adição 5% em massa de SC (Ad(+)) ao longo de 60 dias são apresentadas nas Tabela 5.5. As concentrações iônicas de cálcio e silício liberadas pelo pré-tratamento foram significativamente superiores em relação aos outros grupos (cálcio: 110-132 ppm, silício: 16-20 ppm), portanto, esses dados não foram incluídos na análise estatística. Para liberação de íons cálcio, ambos os fatores (material e tempo de armazenamento) e a interação entre eles foram significantes ($p < 0,05$). Para o grupo Ad(-), concentrações baixas de cálcio foram detectadas aos 15 e 60 dias. Uma vez que o material não continha cálcio em sua composição é possível inferir esses valores referem-se à contaminação das amostras, algo comum para o íon avaliado. Aos 15 dias, o grupo contendo 5% de SC apresentou valores estatisticamente superiores a todas as demais condições analisadas, as quais foram semelhantes entre si.

A concentrações de silício liberadas foram inferiores às de cálcio, independentemente do grupo ou período analisado e não foram detectadas diferenças entre os grupos ou entre os períodos de armazenamento.

Tabela 5.5 - Médias e desvios-padrão das concentrações de íons cálcio e silício (ppm) liberadas pelos grupos Ad(-) e Ad(+) por até 60 dias. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)

Dias	Cálcio		Silício	
	Ad(-)	Ad(+)	Ad(-)	Ad(+)
15	0,10 (0,17) B	23,05 (6,99) A	0,10 (0,10) A	0,01 (0,02) A
30	n/d	5,21 (1,33) B	0,08 (0,08) A	0,03 (0,06) A
45	n/d	3,18 (0,39) B	0,03 (0,02) A	n/d
60	0,11 (0,07) B	3,55 (1,26) B	n/d	0,02 (0,03) A

n/d: não detectado

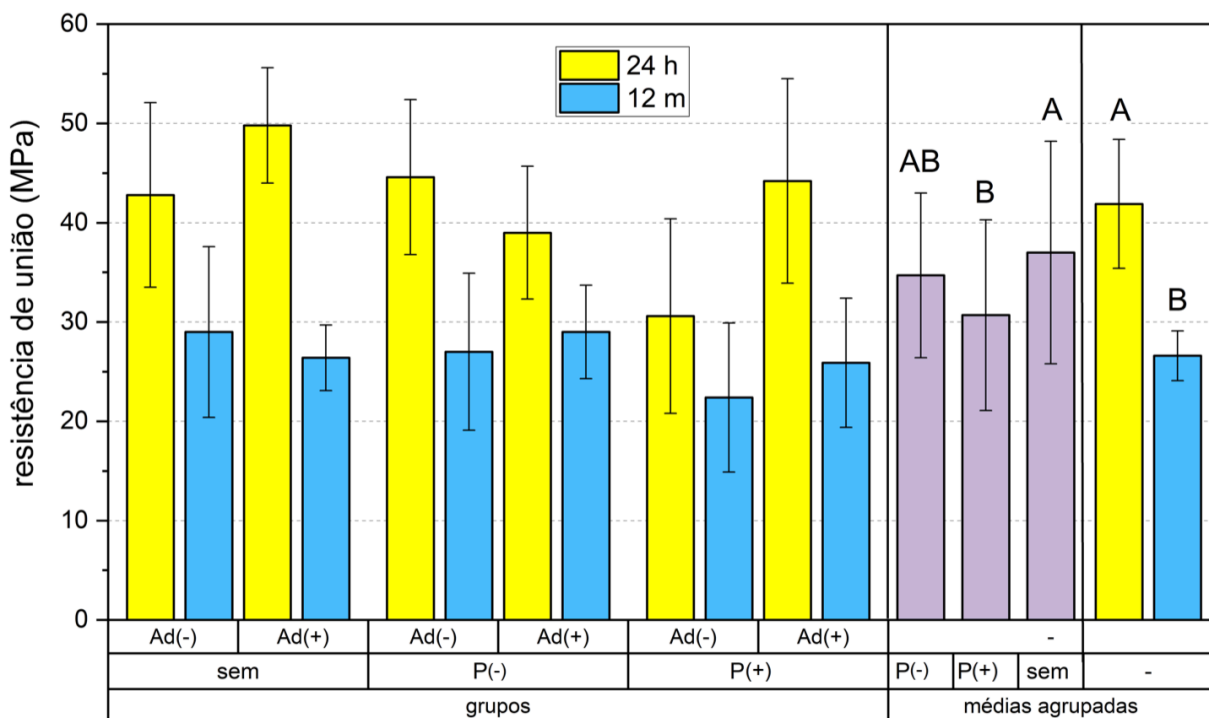
Fonte: A autora.

5.5 AVALIAÇÃO DA INTERFACE ADESIVA: ENSAIOS MECÂNICOS E MICROESTRUTURA

5.5.1 Resistência de união à microtração

As médias e o desvios-padrão para os resultados de resistência de união à microtração após 24 horas e 12 meses de armazenamento são apresentados na Figura 5.10. Dentre os três fatores avaliados (pré-tratamento, adesivo e período de armazenamento), apenas o **pré-tratamento** e o **período de armazenamento** foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Os grupos que não receberam pré-tratamento apresentaram média agrupada estatisticamente superior em relação aos grupos que receberam pré-tratamento com SC, enquanto os grupos tratados apenas com EtOH (P(-)) apresentaram a média agrupada semelhante a ambos. O envelhecimento dos corpos de prova por 12 meses provocou reduções estatisticamente significantes na resistência de união, da ordem de 36,5%.

Figura 5.10 - Médias e desvios-padrão para resistência de união à microtração (em MPa). São apresentadas as médias agrupadas para os fatores que apresentaram significância estatística: pré-tratamento (barras cinzas) e período de armazenamento (duas últimas barras à direita). Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)



Fonte: A autora.

O modo de fratura (falha adesiva, coesiva em resina ou em dentina e mista) dos palitos submetidos ao ensaio de resistência de união à microtração em função dos grupos e períodos de armazenamento, está apresentado na Tabela 5.6. Independente do grupo e do envelhecimento, os maiores percentuais de fratura foram de origem mista, seguido pelas falhas adesivas. Para 24 horas houve uma porcentagem baixa de falhas coesivas, porém é possível observar uma modificação do perfil de fratura após armazenamento, no qual existe uma tendência de redução das falhas mistas e adesivas e aumento das falhas coesivas em dentina e, principalmente, em resina.

Tabela 5.6 - Porcentagens dos modos de fratura apresentados em: falha adesiva, coesiva em dentina, coesiva em resina e mista em função dos períodos de armazenamento (24 horas ou 12 meses)

Grupos	Modo de Falha			
	Adesiva	Coesiva em Dentina	Coesiva em Resina	Mista
Ad(-) 24 horas	34,5	-	-	65,5
Ad(-) 12 meses	25,0	15,6	12,5	46,9
Ad(+) 24 horas	25,7	11,7	2,9	60,0
Ad(+) 12 meses	30,0	10,0	5,0	55,0
P(-)Ad(-) 24 horas	34,4	9,4	-	56,3
P(-)Ad(-) 12 meses	28,1	21,9	12,5	37,5
P(-) Ad(+) 24 horas	28,6	5,7	-	65,7
P(-)Ad(+) 12 meses	23,3	11,5	23,3	41,9
P(+) Ad(-) 24 horas	54,5	3,0	-	42,5
P(+)Ad(-) 12 meses	29,3	3,0	5,9	61,8
P(+) Ad(+) 24 horas	22,9	5,7	-	71,4
P(+)Ad(+) 12 meses	30,4	4,4	2,2	63,0

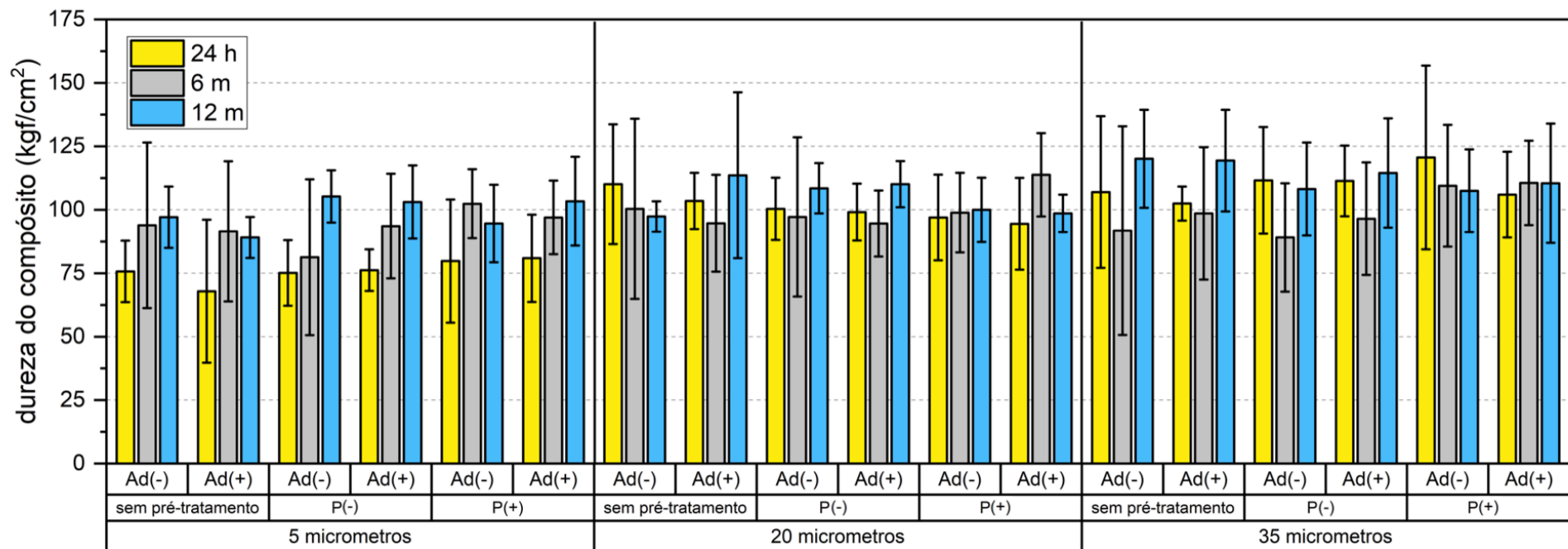
Fonte: A autora.

5.5.2 Nanoindentação

5.5.2.1 Compósito

As médias e o desvios-padrão de dureza do compósito a diferentes distâncias da interface adesiva em função do pré-tratamento, adesivo e período de armazenamento, são apresentados na Figura 5.11.

Figura 5.11- Médias e desvios-padrão para os valores de dureza (kgf/cm²) do compósito em função do pré-tratamento, adesivo, tempo de armazenamento e distância da interface adesiva



Fonte: A autora.

As interações **pré-tratamento*tempo de armazenamento** e **distância da interface*tempo de armazenamento** foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). As demais interações não foram significantes.

Para a interação **pré-tratamento*tempo de armazenamento** (Tabela 5.7), de modo geral, o pré-tratamento não afetou a dureza do compósito em nenhum dos períodos de armazenamento. Porém, foi detectado um aumento estatisticamente significativo entre 6 meses e 12 meses para a condição P(-).

Tabela 5.7 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm^2) do compósito para interação **pré-tratamento*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)

Pré-Tratamento	Tempo de armazenamento		
	24 horas	6 meses	12 meses
Sem P	94,4 (17,9) AB	95,3 (3,6) AB	105,7 (13,2) AB
P(-)	94,7 (16,4) AB	92,0 (6,0) B	108,1 (3,9) A
P(+)	96,3 (15,5) AB	105,0 (6,8) AB	102,3 (5,9) AB

Fonte: A autora.

Em relação à interação **distância da interface*tempo de armazenamento** (Tabela 5.8), foi observado que o compósito apresentou um aumento estatisticamente significativo da dureza próximo à interface ($5 \mu\text{m}$) entre 24 horas e 6 meses. Para as demais distâncias, a dureza do compósito se manteve estável durante todo o período de armazenamento.

Tabela 5.8 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm^2) do compósito para interação **distância da interface*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)

Distância da interface	Tempo de armazenamento		
	24 horas	6 meses	12 meses
$5 \mu\text{m}$	76,1 (4,6) C	93,3 (7,0) B	99,0 (3,5) AB
$20 \mu\text{m}$	100,9 (5,5) AB	99,9 (7,1) AB	99,6 (8,9) AB
$35 \mu\text{m}$	99,0 (3,5) AB	104,5 (9,9) AB	113,2 (2,5) A

Fonte: A autora.

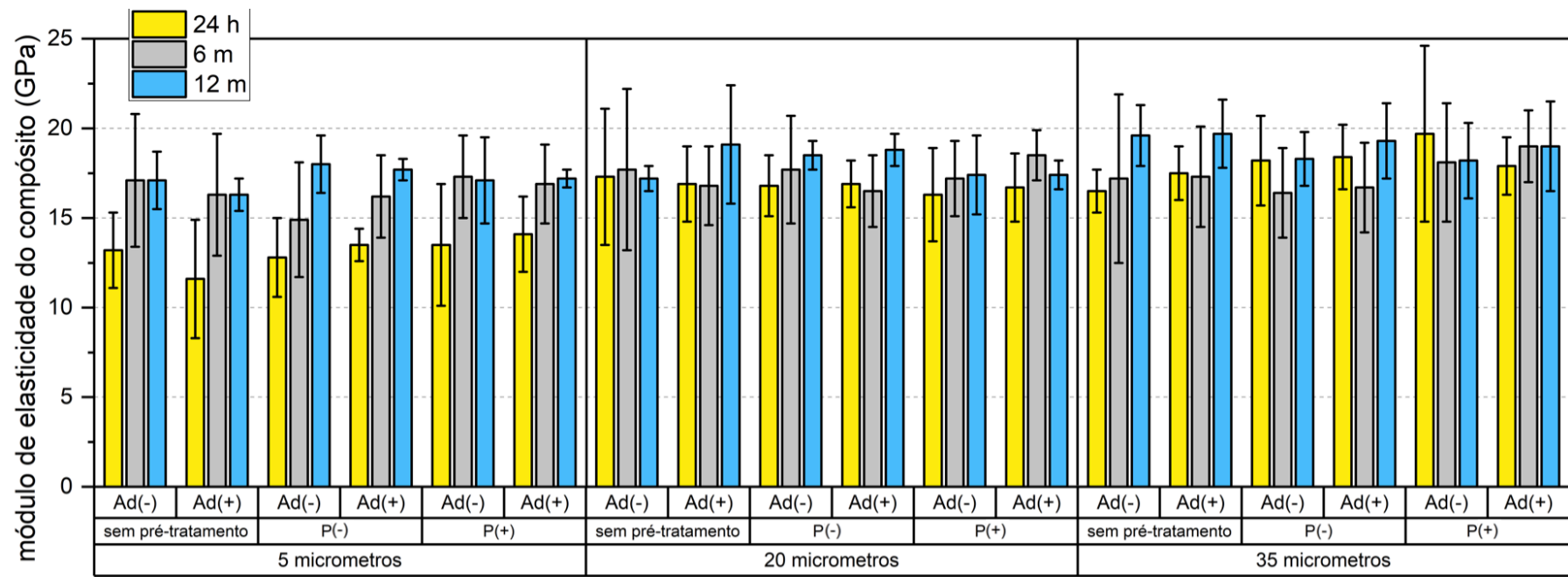
As médias e o desvios-padrão de módulo de elasticidade do compósito para os quatro fatores em estudo são apresentados na Figura 5.12. Apenas a distância da interface e o tempo de armazenamento foram estatisticamente significantes ($p < 0,01$). A interação **distância da interface*tempo de armazenamento** também foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$) e as médias agrupadas são apresentadas na Tabela 5.9. Semelhante ao descrito para dureza, foi observado um aumento estatisticamente significativo do módulo próximo à interface (5 μm) entre 24 horas e 6 meses. Para as demais distâncias, a dureza do compósito se manteve estável durante todo o período de armazenamento. Aos 12 meses, o módulo de elasticidade do compósito a 5 μm da interface foi estatisticamente menor do que a 35 μm .

Tabela 5.9 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de módulo de elasticidade (GPa) do compósito para interação **distância da interface*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)

Distância da interface	Tempo de armazenamento		
	24 horas	6 meses	12 meses
5 μm	13,2 (0,9) C	16,5 (0,9) B	17,3 (0,6) B
20 μm	16,8 (0,3) B	17,4 (0,7) AB	17,5 (1,0) AB
35 μm	17,3 (0,6) B	18,1 (1,1) AB	19,0 (0,3) A

Fonte: A autora.

Figura 5.12 - Médias e desvios-padrão para os valores módulo de elasticidade (GPa) do compósito em função do pré-tratamento, adesivo, período de armazenamento e distância da interface

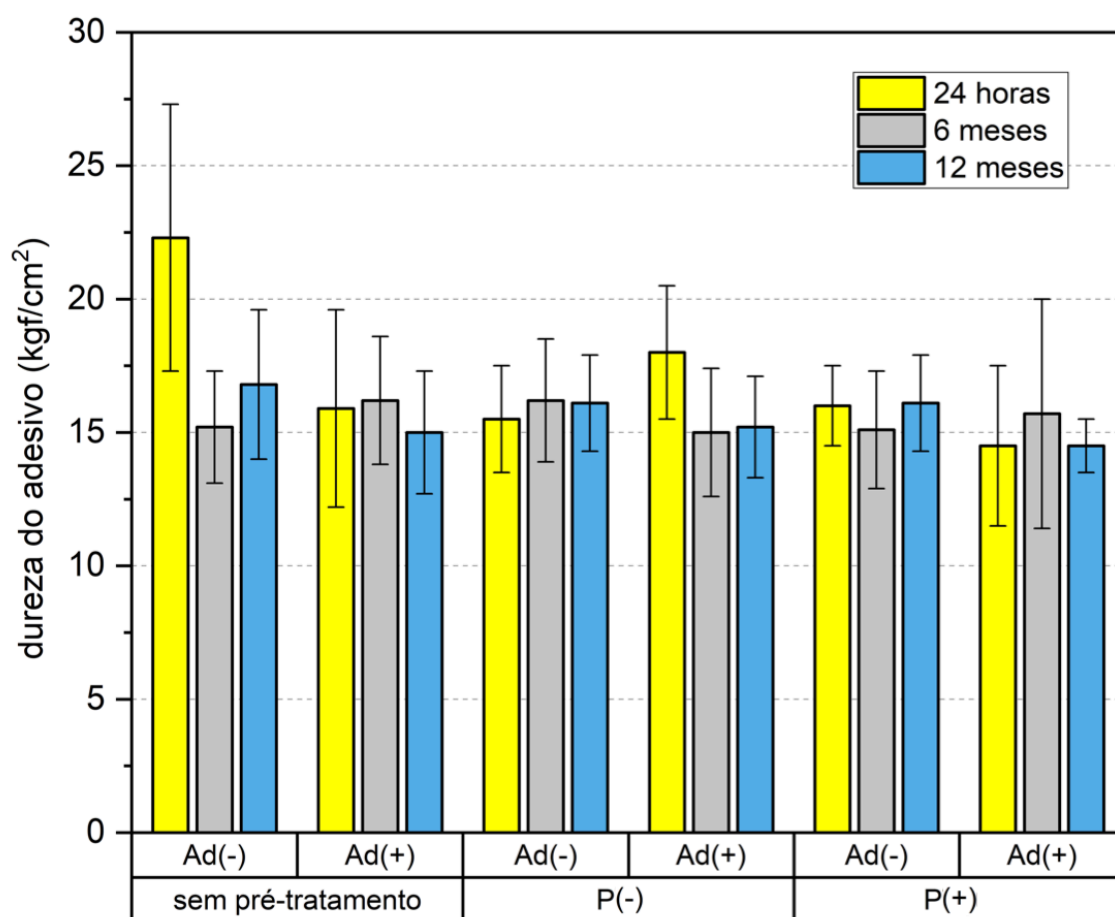


Fonte: A autora.

5.5.2.2 Camada de adesivo

As médias e os desvios-padrão de dureza do adesivo em função do pré-tratamento, presença de SC no adesivo e ao período de armazenamento são apresentados na Figura 5.13.

Figura 5.13 - Médias e desvios-padrão para os valores de dureza (kgf/cm^2) do adesivo em função do pré-tratamento, adesivo, tempo de armazenamento e distância da interface adesiva



Fonte: A autora.

Apenas a interação **adesivo*tempo de armazenamento** (Tabela 5.10) foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A presença de partículas no adesivo resultou em menor dureza apenas após 24 horas. Após 6 e 12 meses apenas o

adesivo sem partículas apresentou redução estatisticamente significativa na dureza (24 - 27%), enquanto a dureza do adesivo com partículas se manteve estável.

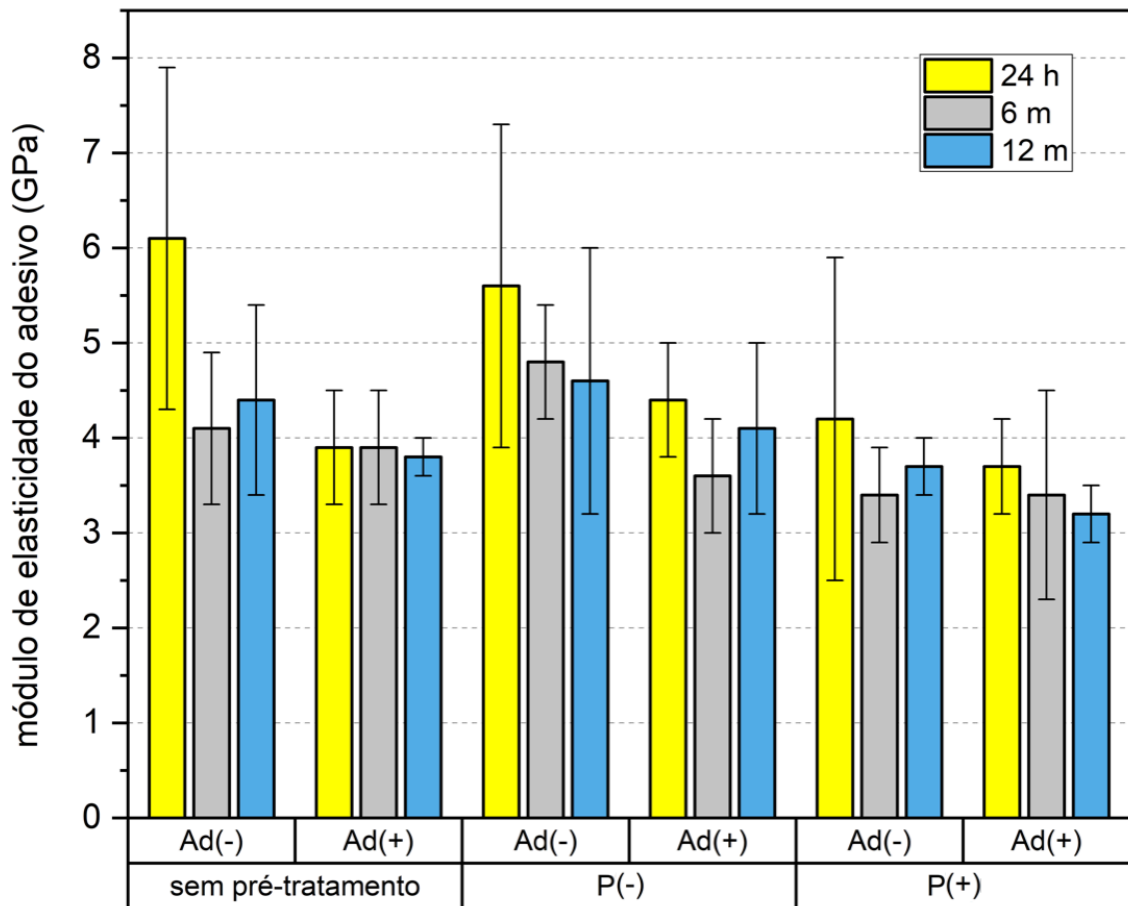
Tabela 5.10 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm²) do adesivo para a interação **adesivo*tempo de armazenamento** Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)

Adesivo	Tempo de armazenamento		
	24 horas	6 meses	12 meses
Sem Partícula	21,3 (0,9) A	15,5 (0,6) B	16,3 (0,4) B
Com Partícula	16,2 (1,8) B	15,6 (0,6) B	14,8 (0,4) B

Fonte: A autora.

As médias e os desvios-padrão do módulo de elasticidade do adesivo são apresentados na Figura 5.14. Os fatores **adesivo**, **pré-tratamento** e **tempo de armazenamento** foram estatisticamente significantes ($p<0,01$). A presença de SC reduziu o módulo de elasticidade da camada de adesivo (Ad(-): $4,50\pm0,9^A$; Ad(+): $3,8\pm0,4^B$). O pré-tratamento com partículas também reduziu o módulo da camada de adesivo em relação aos grupos que não receberam pré-tratamento ou receberam o tratamento sem partículas (sem pré-tratamento: $4,4\pm0,9^A$; P(-): $4,5\pm0,7^A$; P(+): $3,6\pm0,4^B$). Foi observada redução no módulo de elasticidade do adesivo entre 24 horas ($4,7\pm1,0^A$) e 6 meses ($3,9\pm0,5^B$). Entre 6 e 12 meses ($3,9\pm0,5^B$) não houve alteração.

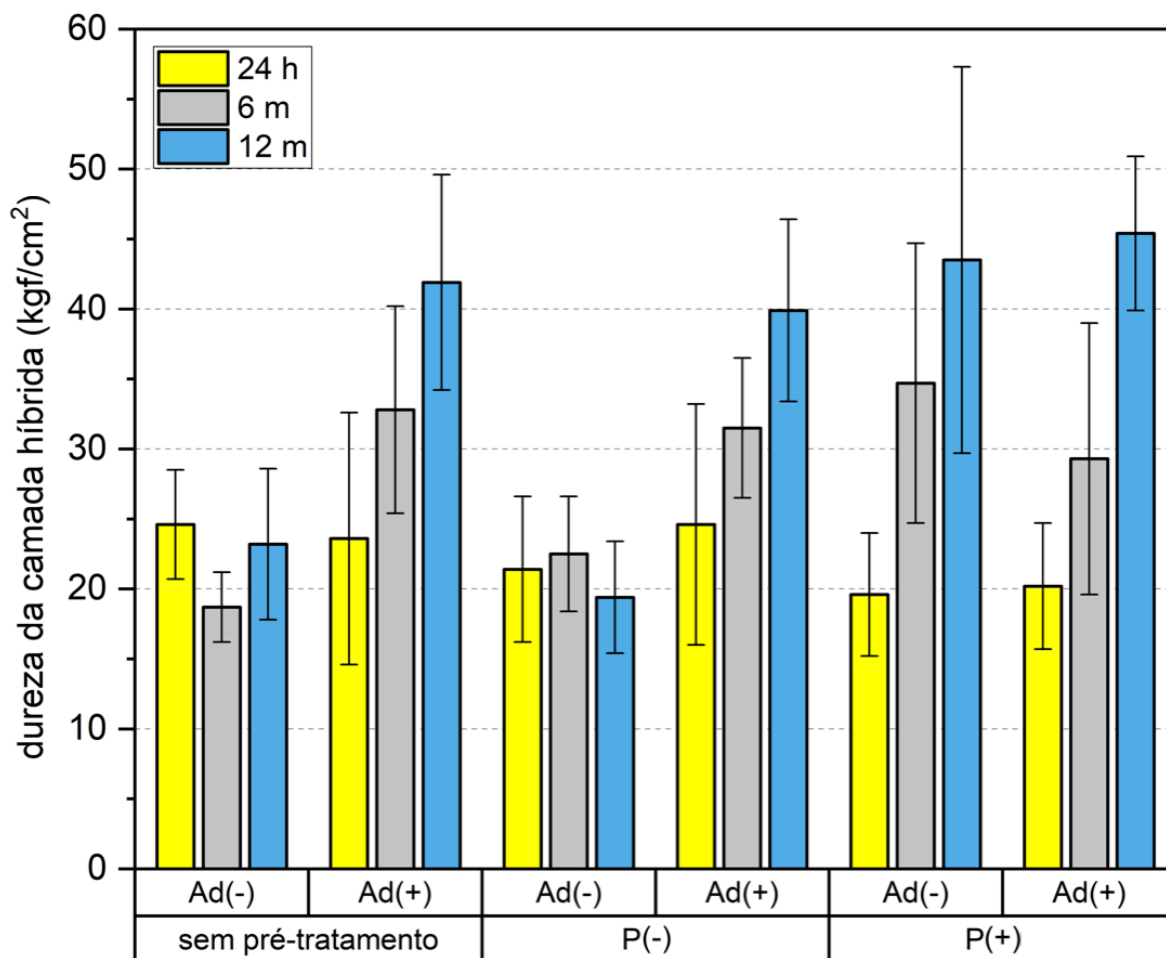
Figura 5.14 - Médias e desvios-padrão para os valores de módulo de elasticidade (GPa) do adesivo



Fonte: A autora.

5.5.2.3 Camada híbrida

As médias e o desvios-padrão de dureza da camada híbrida são apresentados na Figura 5.15.

Figura 5.15 - Médias e desvios-padrão para os valores de dureza (kgf/cm²) da camada híbrida

Fonte: A autora.

As interações **adesivo*tempo de armazenamento**, **pré-tratamento*tempo de armazenamento** e **pré-tratamento*adesivo** foram estatisticamente significantes ($p < 0,01$). Para a interação **adesivo*tempo de armazenamento** (Tabela 5.11), o uso do adesivo com partículas resultou em maior dureza da camada híbrida após 12 meses.

Tabela 5.11 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm²) da camada híbrida para a interação **adesivo*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, p>0,05)

Adesivo	Tempo de armazenamento		
	24 horas	6 meses	12 meses
Sem Partícula	21,9 (2,5) D	25,3 (8,4) BCD	28,7 (13,0) BC
Com Partícula	22,7 (2,3) CD	31,1 (1,8) B	42,4 (2,8) A

Fonte: A autora.

De forma semelhante, para interação **pré-tratamento*tempo de armazenamento** (Tabela 5.12) a camada híbrida dos grupos que receberam pré-tratamento contendo SC apresentaram valor de dureza estatisticamente superior aos demais tratamentos após 12 meses.

Tabela 5.12 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm²) da camada híbrida para a interação **pré-tratamento*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, p>0,05)

Pré-Tratamento	Tempo de armazenamento		
	24 horas	6 meses	12 meses
Sem P	24,1 (0,7) BCD	25,2 (10,0) BCD	31,8 (13,2) B
P(-)	23,0 (2,2) CD	27,0 (6,3) BCD	29,6 (14,5) BC
P(+)	19,9 (0,4) D	32,0 (3,8) B	44,5 (5,9) A

Fonte: A autora.

Para a interação **pré-tratamento*adesivo** (Tabela 5.13), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os adesivos apenas para os grupos que receberam pré-tratamento com SC. Para as outras condições de pré-tratamento (sem pré-tratamento ou P(-)), a utilização do adesivo contendo SC resultou em valores de dureza da camada híbrida estatisticamente mais altos.

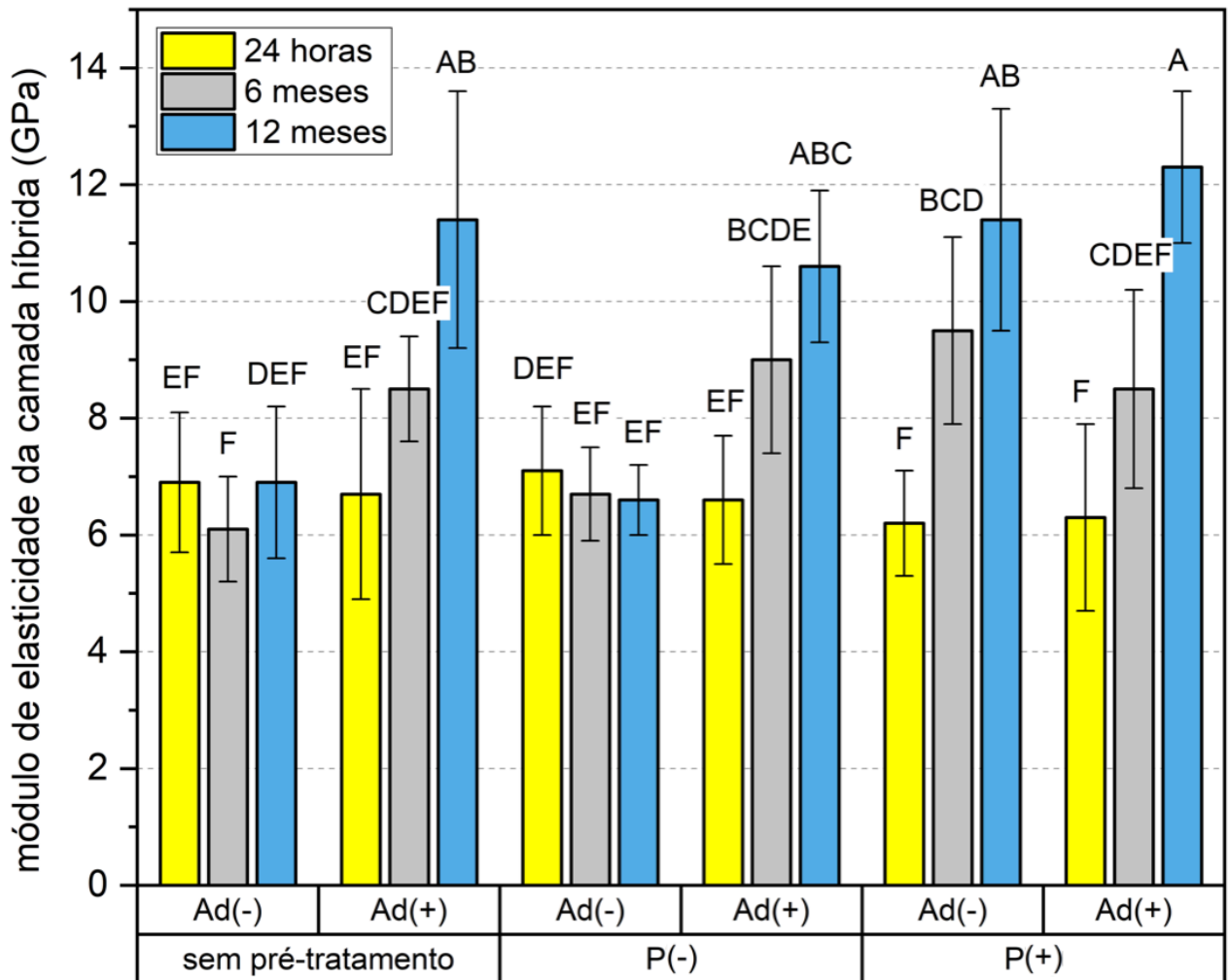
Tabela 5.13 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm^2) da camada híbrida para a interação **pré-tratamento*adesivo**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)

Pré-Tratamento	Adesivo	
	Sem Partícula	Com Partícula
Sem P	22,1 (3,1) B	32,8 (9,1) A
P(-)	21,1 (1,6) B	32,0 (7,7) A
P(+)	32,6 (12,1) A	31,6 (12,8) A

Fonte: A autora.

As médias e o desvios-padrão de módulo de elasticidade da camada híbrida são apresentados na Figura 5.16. A interação **adesivo*pré-tratamento*tempo de armazenamento** foi estatisticamente significativa ($p<0,01$). Os grupos Ad(-) e P(-)Ad(-) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ao longo dos períodos. Os grupos Ad(+) e P(+)Ad(+) apresentaram o aumento estatisticamente significativo entre 6 meses e 12 meses (34% e 45%, respectivamente). O grupo P(+)Ad(-) apresentou aumento estatisticamente significativo entre 24 horas e 6 meses (35%) e o grupo P(-)Ad(+), entre 24 horas e 12 meses (38%).

Figura 5.16 - Médias e desvios-padrão para os valores de módulo de elasticidade (GPa) da camada híbrida. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)

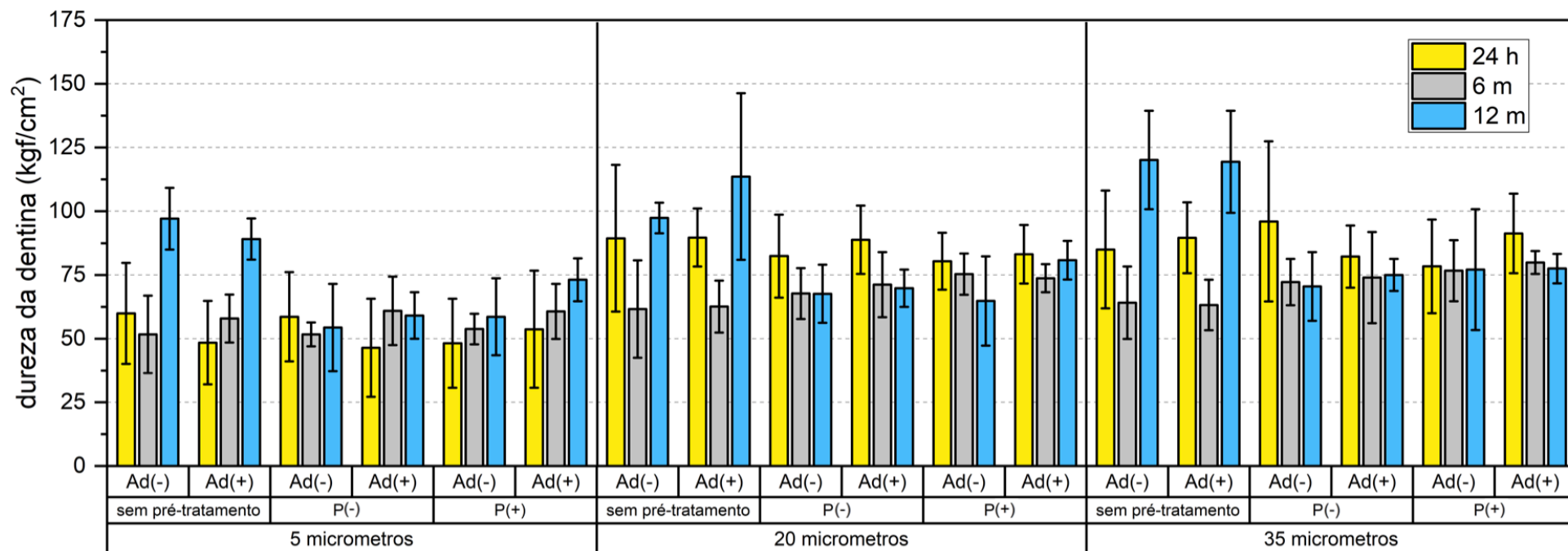


Fonte: A autora.

5.5.2.4 Dentina

As médias e o desvios-padrão da dureza da dentina são apresentados na Figura 5.17.

Figura 5.17 - Médias e desvios-padrão para os valores de dureza (kgf/cm²) da dentina em função do pré-tratamento, distância da camada híbrida e tempo de armazenamento



Fonte: A autora.

As interações **pré-tratamento*tempo de armazenamento** ($p < 0,05$) e **distância da camada híbrida*tempo de armazenamento** ($p < 0,01$) foram estatisticamente significantes. Considerando o fator **adesivo** isoladamente foi observado que os grupos restaurados com adesivo contendo partículas de SC apresentaram valores de dureza estatisticamente superiores em relação àqueles sem SC (respectivamente, $71,7 \pm 12,8^A$ e $68,0 \pm 12,5^B$).

A interação **pré-tratamento*tempo de armazenamento** (Tabela 5.14) demonstrou que apenas os grupos que não receberam pré-tratamento ou que foram tratados somente com a solução de EtOH sofreram redução estatisticamente significativa nos valores de dureza entre 24 horas e 6 meses.

Tabela 5.14 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm^2) da dentina para a interação **pré-tratamento*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)

Pré-Tratamento	Tempo de armazenamento		
	24 horas	6 meses	12 meses
Sem P	77,1 (18,1) AB	60,1 (4,7) D	65,9 (7,7) CD
P(-)	76,7 (19,7) A	66,3 (8,5) CD	66,8 (7,9) BCD
P(+)	72,5 (17,4) ABC	70,0 (10,3) ABCD	72,0 (8,6) ABC

Fonte: A autora.

Para a interação **distância da camada híbrida*tempo de armazenamento** (Tabela 5.15) as indentações mais próximas à camada híbrida, apresentaram valores de dureza estatisticamente inferiores em relação às outras duas profundidades nos períodos de 24 horas e 6 meses. Após 12 meses, a dureza da dentina adjacente à camada híbrida se mostrou estatisticamente semelhante à dentina subjacente.

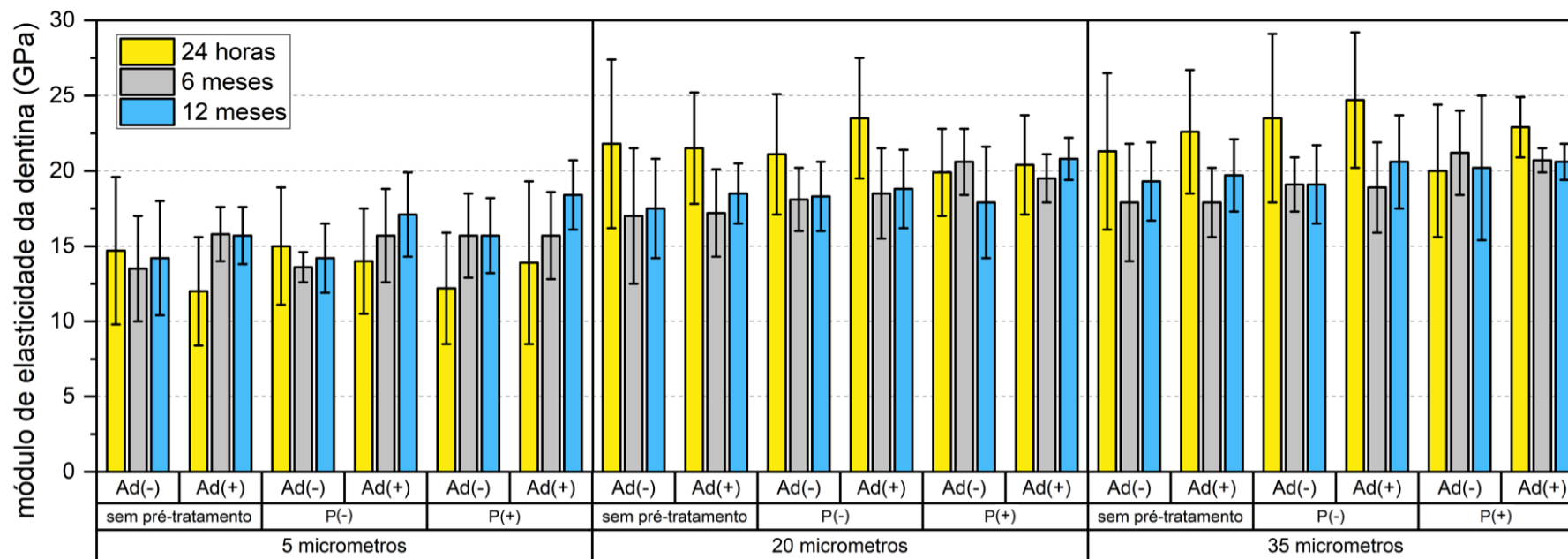
Tabela 5.15 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de dureza (kgf/cm^2) da dentina para a interação **distância da camada híbrida*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)

Distância da camada híbrida	Tempo de armazenamento		
	24 horas	6 meses	12 meses
5 μm	52,6 (5,8) D	56,1 (21,6) D	60,6 (7,5) CD
20 μm	85,5 (4,1) A	68,8 (5,7) BC	69,9 (5,7) BC
35 μm	88,1 (6,0) A	71,9 (7,1) B	74,4 (3,6) B

Fonte: A autora.

As médias e o desvios-padrão do módulo de elasticidade da dentina são apresentados na Figura 5.18.

Figura 5.18 - Médias e desvios-padrão para os valores de módulo de elasticidade (GPa) da dentina em função do pré-tratamento, distância da camada híbrida e tempo de armazenamento



Fonte: A autora.

Assim como observado para a dureza, as interações **pré-tratamento*tempo de armazenamento** ($p < 0,01$) e **distância da camada híbrida*tempo de armazenamento** ($p < 0,01$) foram estatisticamente significantes. Em relação ao fator adesivo, novamente os grupos restaurados com adesivo contendo SC apresentam valores de módulo de elasticidade estatisticamente maiores em relação aos que não contém SC na formulação do adesivo (respectivamente, $18,8 \pm 3,1^A$ e $17,9 \pm 3,0^B$, $p < 0,05$).

Para a interação **pré-tratamento*tempo de armazenamento** (Tabela 5.16), foram verificadas reduções nos valores de módulo de elasticidade da dentina após os primeiros 6 meses de armazenamento nos grupos que não receberam pré-tratamento ou que foram tratados com solução contendo apenas EtOH.

Tabela 5.16 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de módulo de elasticidade (GPa) da dentina para a interação **pré-tratamento*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)

Pré-Tratamento	Tempo de armazenamento		
	24 horas	6 meses	12 meses
Sem P	19,0 (2,2) AB	16,5 (1,7) C	17,5 (2,1) BC
P(-)	20,3 (4,6) A	17,3 (2,2) BC	18,0 (2,2) BC
P(+)	18,2 (4,2) ABC	18,9 (2,5) AB	18,9 (2,0) AB

Fonte: A autora.

A análise da interação **distância da camada híbrida*tempo de armazenamento** (Tabela 5.17) permitiu identificar que para qualquer período de armazenamento os valores de módulo de elasticidade da dentina mais distante da camada híbrida (20 e 35 μm) são estatisticamente semelhantes e maiores em relação aos encontrados a 5 μm . Porém, apenas na distância de 5 μm houve um aumento estatisticamente significativo no módulo de elasticidade, da ordem de 16%, entre 24 horas e 12 meses. Nas camadas mais distantes foram verificadas reduções estatisticamente significantes entre 24 horas e 12 meses de armazenamento.

Tabela 5.17 - Médias agrupadas e desvios-padrão dos valores de módulo de elasticidade (GPa) da dentina para a interação **distância da camada híbrida*tempo de armazenamento**. Valores seguidos de uma mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)

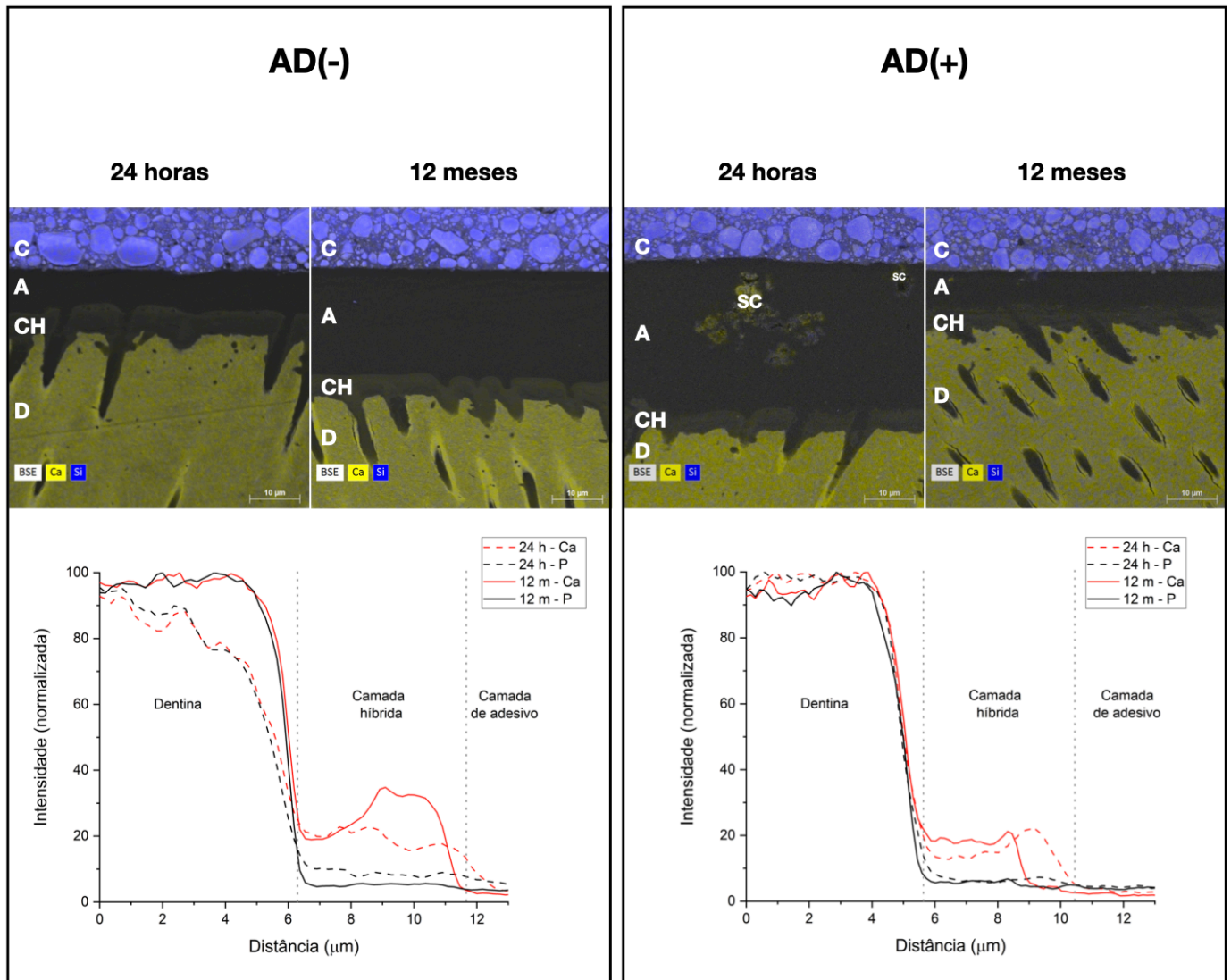
Distância da camada híbrida	Tempo de armazenamento		
	24 horas	6 meses	12 meses
5 μm	13,7 (1,2) E	15,0 (2,6) DE	15,9 (1,6) D
20 μm	21,3 (1,3) AB	18,5 (1,4) C	18,6 (1,2) C
35 μm	22,5 (1,7) A	19,3 (1,2) BC	19,9 (0,7) BC

Fonte: A autora.

5.5.3 Microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de raios-x por energia dispersiva (MEV/EDS)

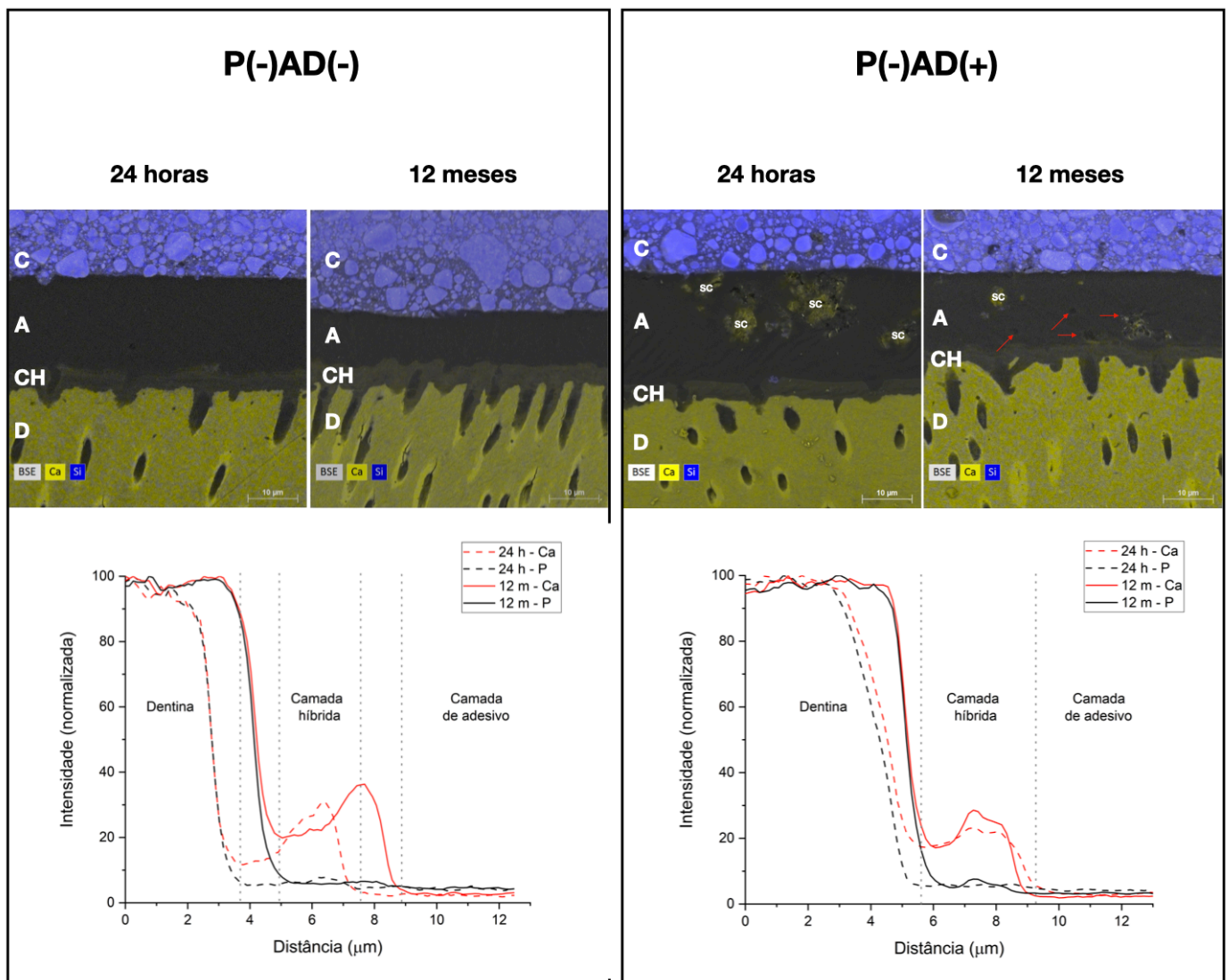
Imagens da interface adesiva após armazenamento de 24 horas ou 12 meses observadas em MEV/EDS são apresentadas nas Figuras 5.19 a 5.21. Em 24 horas foi possível observar para todos os grupos que continham partículas de SC no pré-tratamento e/ou adesivo a presença de aglomerados irregulares e de tamanhos variados, marcados em amarelo (cálcio) na interface adesiva. Em 12 meses nos grupos P(-)Ad(+) e P(+Ad(+) observa-se a presença de poros, indicando a impressão negativa de aglomerados de SC que provavelmente se desprenderam da interface durante o preparo da amostra ou ao longo do tempo de armazenamento. O aumento de conteúdo mineral pode ser verificado pela da quantificação (intensidade normalizada) de cálcio e fósforo na dentina mineralizada, camada híbrida e camada de adesivo ao longo de uma linha de 15 μm . De forma geral, todos os grupos apresentaram aumento nas intensidades dos sinais de cálcio na camada híbrida após 12 meses, independentemente da presença de SC no pré-tratamento e/ou adesivo. Entretanto, para os grupos P(-)Ad(+), P(+Ad(-) e P(+Ad(+) é possível observar, além de maior conteúdo de cálcio tanto em 24 horas quanto após 12 meses, uma maior intensidade do fósforo na camada híbrida após armazenamento, indicativo da formação de apatita.

Figura 5.19 - Imagem de MEV/EDS para os grupos Ad(-) e Ad(+). Na parte superior são apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura mapeadas com cálcio indicado pela cor amarela e silício com a cor azul. Dentro de cada grupo estão apresentados na parte inferior os gráficos com a intensidade (normalizada) de cálcio (linha vermelha) e fósforo (linha preta) referente a dentina mineralizada, camada híbrida e camada de adesivo nos dois períodos de armazenamento: 24 horas (linhas pontilhadas) e 12 meses (linhas contínuas). Letras brancas indicam: C: Compósito; A: Camada de Adesivo; CH: Camada Híbrida; D: Dentina; SC: Aglomerado de partículas de silicato de cálcio. As interfaces para um mesmo grupo possuem espessuras diferentes uma vez que as análises foram realizadas em espécimes distintos



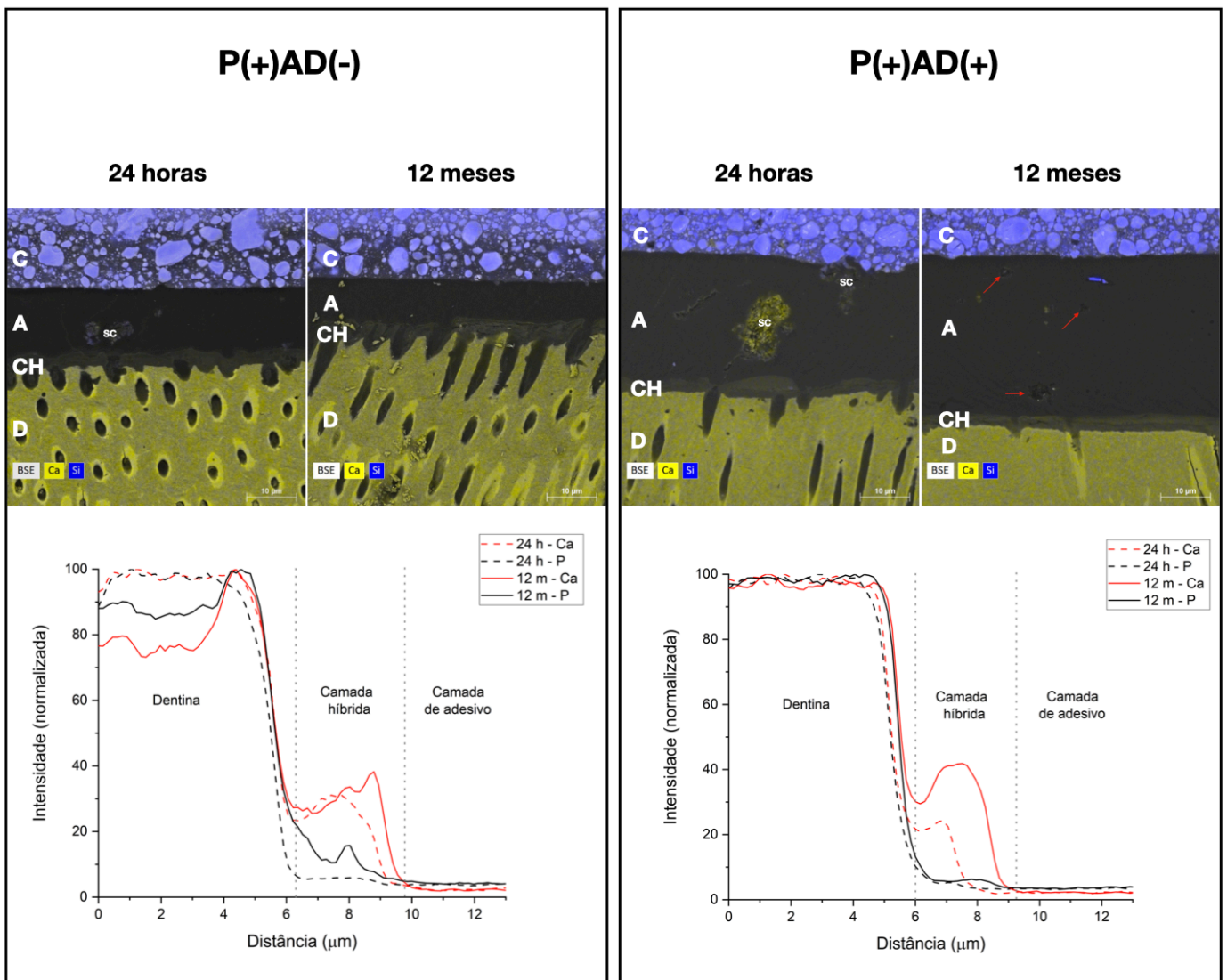
Fonte: A autora.

Figura 5.20 - Imagem de MEV/EDS para os grupos P(-)Ad(-) e P(-)Ad(+). Na parte superior são apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura mapeadas com cálcio indicado pela cor amarela e silício com a cor azul. Dentro de cada grupo estão apresentadas na parte inferior os gráficos com a intensidade (normalizada) de cálcio (linha vermelha) e fósforo (linha preta) referente a dentina mineralizada, camada híbrida e camada de adesivo nos dois períodos de armazenamento: 24 horas (linhas pontilhadas) e 12 meses (linhas contínuas). Letras brancas indicam: C: compósito; A: camada de adesivo; CH: camada híbrida; D: dentina; SC: aglomerado de partículas de silicato de cálcio. As setas vermelhas indicam os locais onde os aglomerados de silicato de cálcio se desprenderam da interface adesiva. As interfaces para um mesmo grupo possuem espessuras diferentes uma vez que as análises foram realizadas em espécimes distintos



Fonte: A autora.

Figura 5.21 - Imagem de MEV/EDS para os grupos P(+)*Ad*(-) e P(+)*Ad*(+). Na parte superior são apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura mapeadas com cálcio indicado pela cor amarela e silício com a cor azul. Dentro de cada grupo estão apresentados na parte inferior os gráficos com a intensidade (normalizada) de cálcio (linha vermelha) e fósforo (linha preta) referente a dentina mineralizada, camada híbrida e camada de adesivo nos dois períodos de armazenamento: 24 horas (linhas pontilhadas) e 12 meses (linhas contínuas). Letras brancas indicam: C: compósito; A: camada de adesivo; CH: camada híbrida; D: dentina; SC: aglomerado de partículas de silicato de cálcio. As setas vermelhas indicam os locais onde os aglomerados de silicato de cálcio se desprenderam da interface adesiva. As interfaces para um mesmo grupo possuem espessuras diferentes uma vez que as análises foram realizadas em espécimes distintos



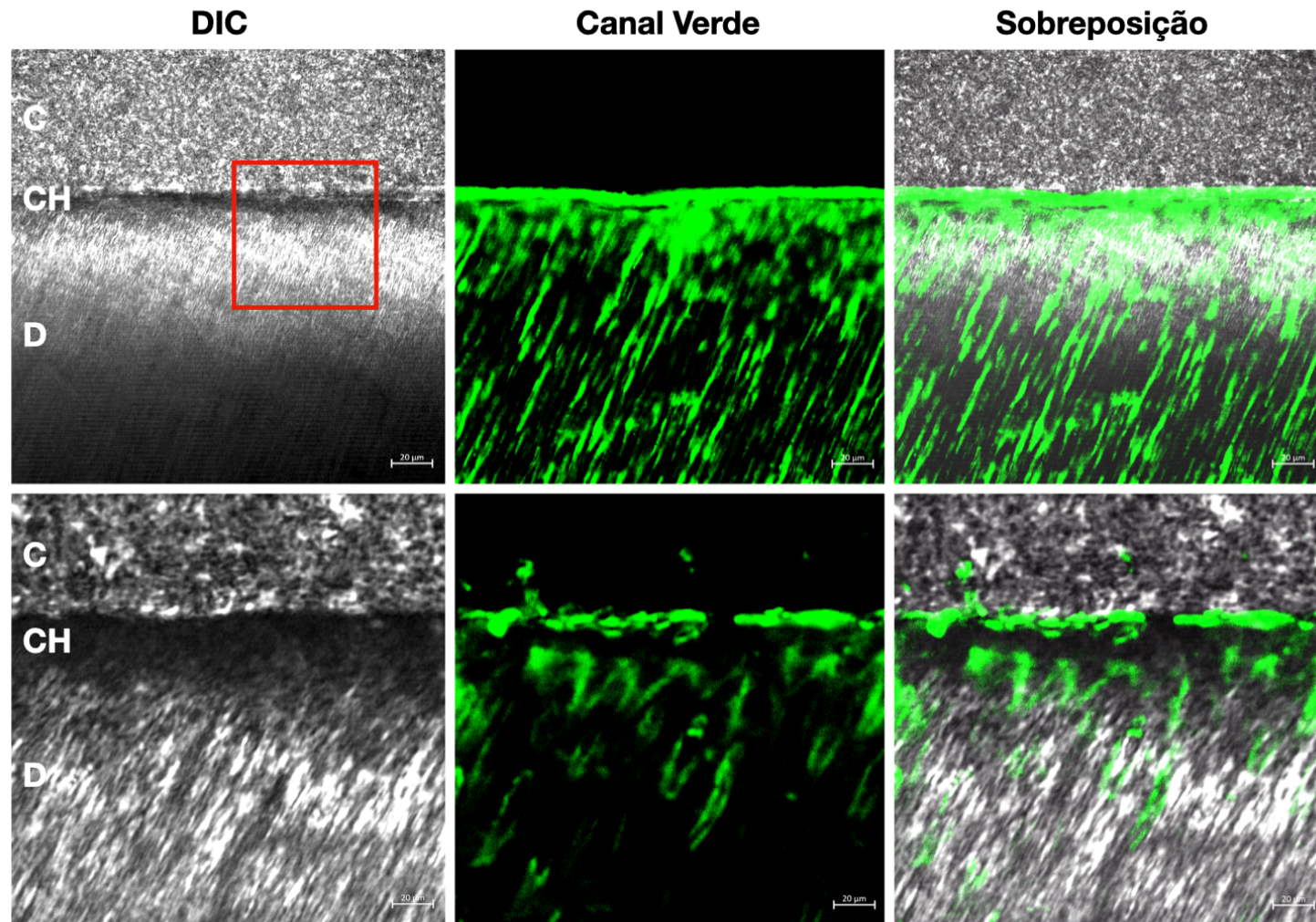
Fonte: A autora.

5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA

5.6.1 Zimografia *in situ*

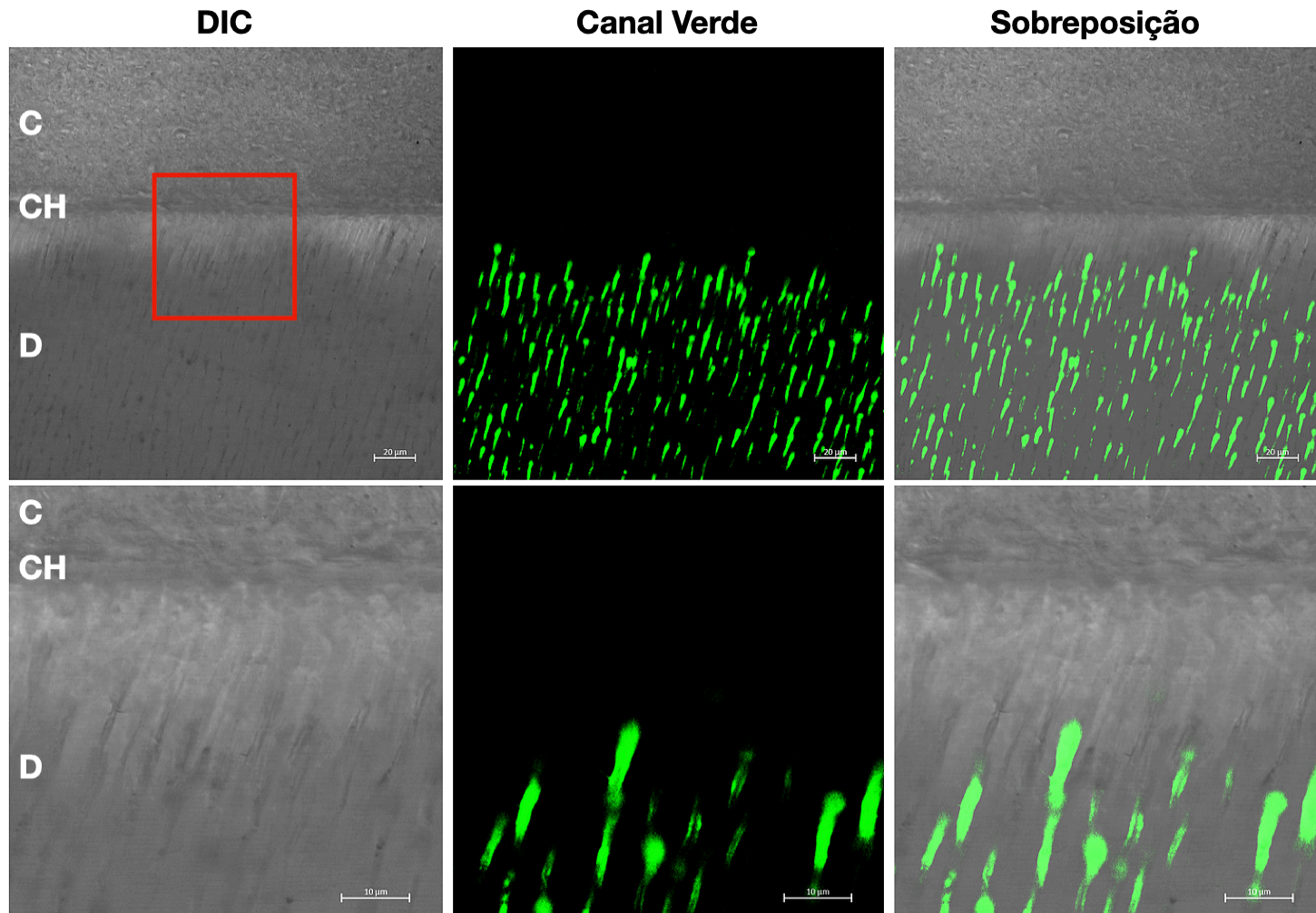
As imagens de 24 horas para zimografia *in situ* são apresentadas nas Figuras 5.22, 5.24, 5.26, 5.28, 5.30 e 5.32. Após 24 horas, foi possível verificar inibição da atividade gelatinolítica na região da camada híbrida e dentina subjacente para os grupos Ad(+), P(-)Ad(+) e P(+)Ad(+), sendo maior no último grupo. A presença de partículas somente no pré-tratamento não foi capaz de promover total inibição enzimática nas duas regiões; entretanto, é possível observar uma redução na atividade gelatinolítica para o grupo P(+)Ad(-) quando comparado com os grupos Ad(-) e P(-)Ad(-), os quais não mostraram capacidade inibitória. As imagens de 12 meses para zimografia *in situ* são apresentadas nas Figuras 5.23, 5.25, 5.27, 5.29, 5.31 e 5.33. Todos os grupos apresentaram reduções na fluorescência, indicando menor atividade enzimática, como é verificado na quantificação 3D apresentados na Figura 5.34. Dentre os grupos contendo SC, aqueles com partículas no adesivo (P(-)Ad(+), P(+)Ad(+) e Ad(+)) apresentaram inibição quase total da atividade gelatinolítica na região de camada híbrida e na dentina subjacente. Entretanto, a presença de partículas somente no pré-tratamento (grupo P(+)Ad(-)) não foi capaz de promover completa inibição enzimática em ambas as regiões, assim como já verificado nas primeiras 24 horas. Por fim, os controles Ad(-) e P(-)Ad(-) apresentaram as maiores fluorescências na dentina subjacente, portanto, não apresentaram capacidade inibitória enzimática.

Figura 5.22 - Interface dentinária correspondente ao grupo Ad(-) armazenado por 24 horas. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina



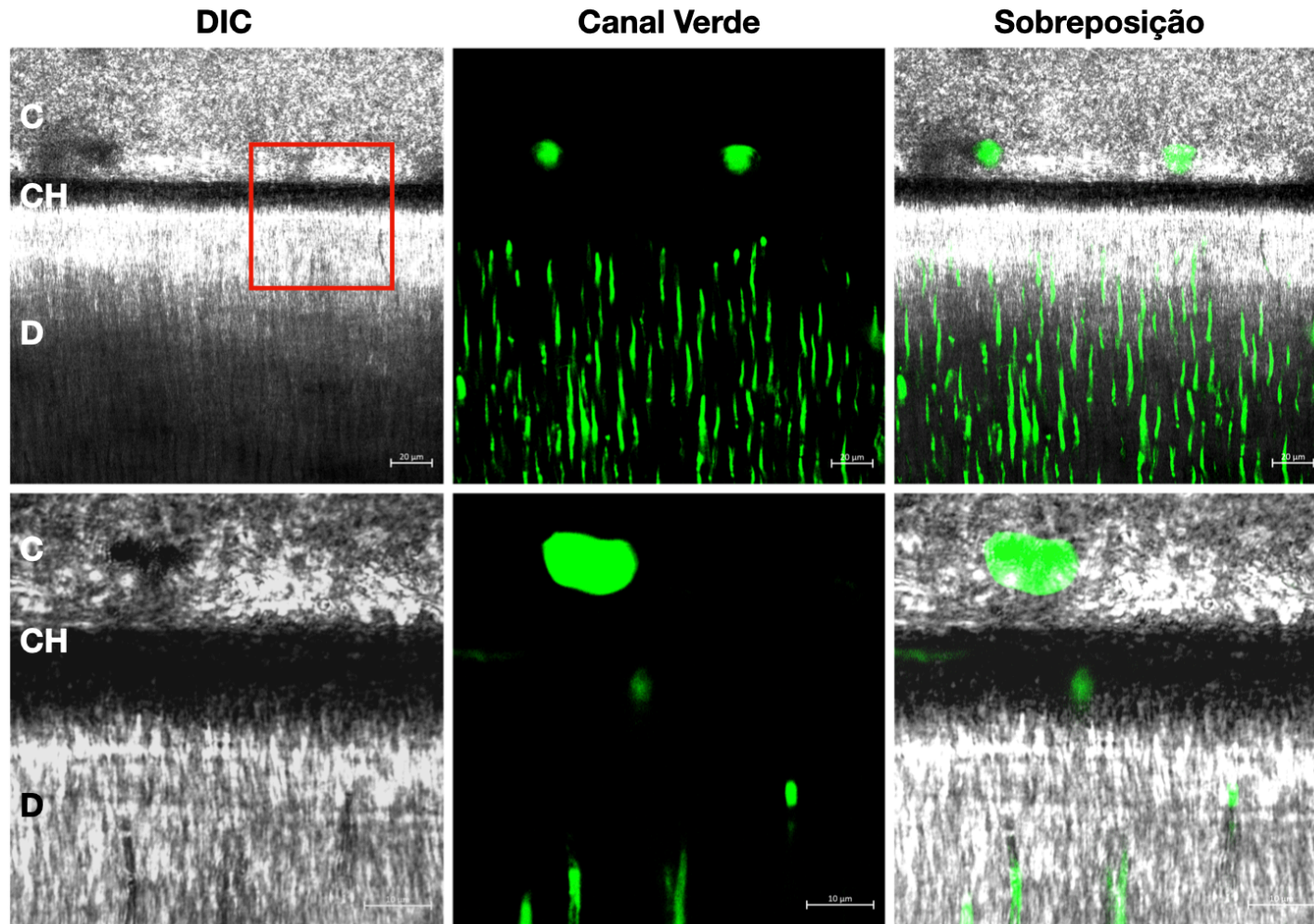
Fonte: A autora.

Figura 5.23 - Interface dentinária correspondente ao grupo Ad(-) armazenado por 12 meses. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina



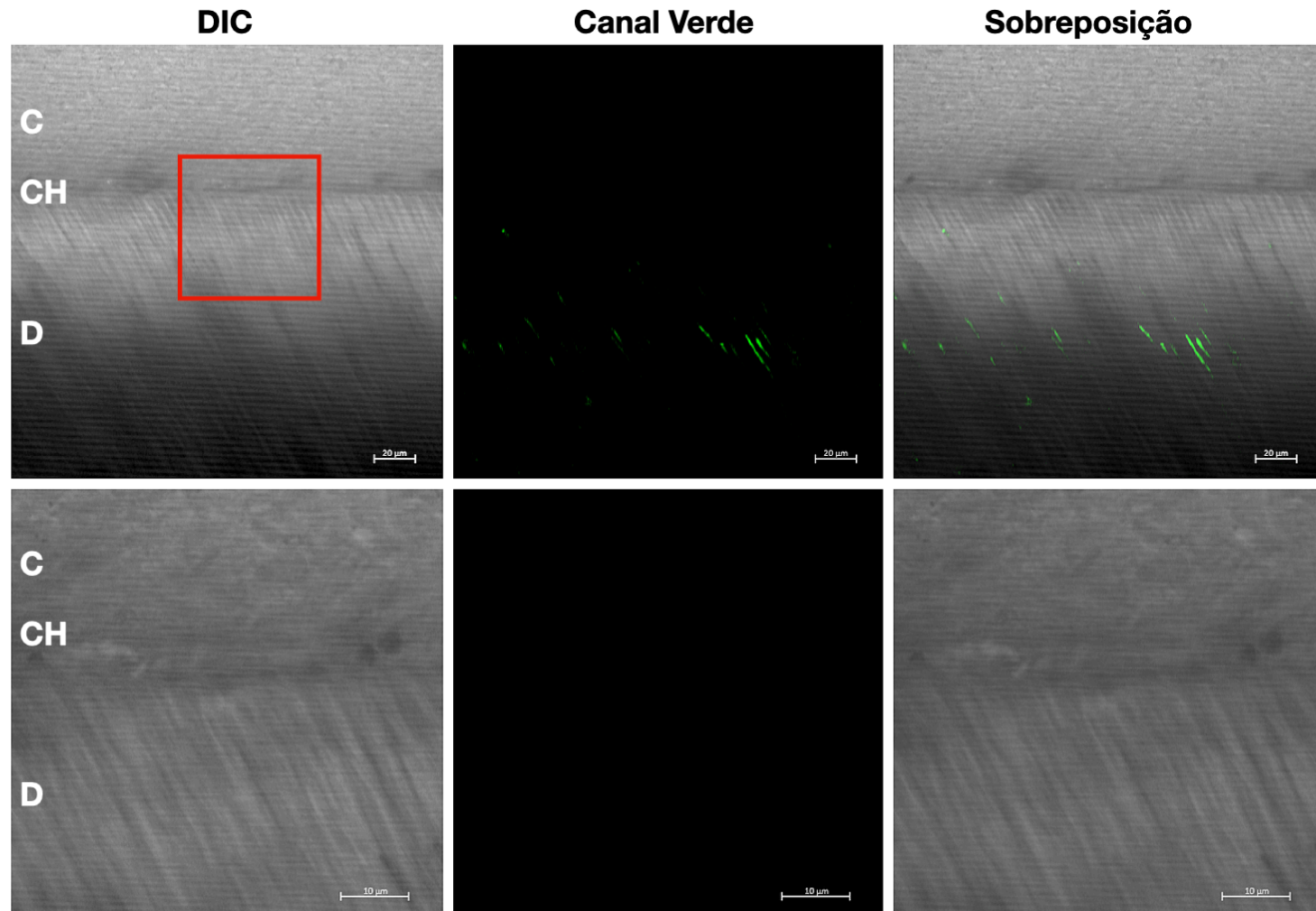
Fonte: A autora.

Figura 5.24 - Interface dentinária correspondente ao grupo Ad(+) armazenado por 24 horas. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina



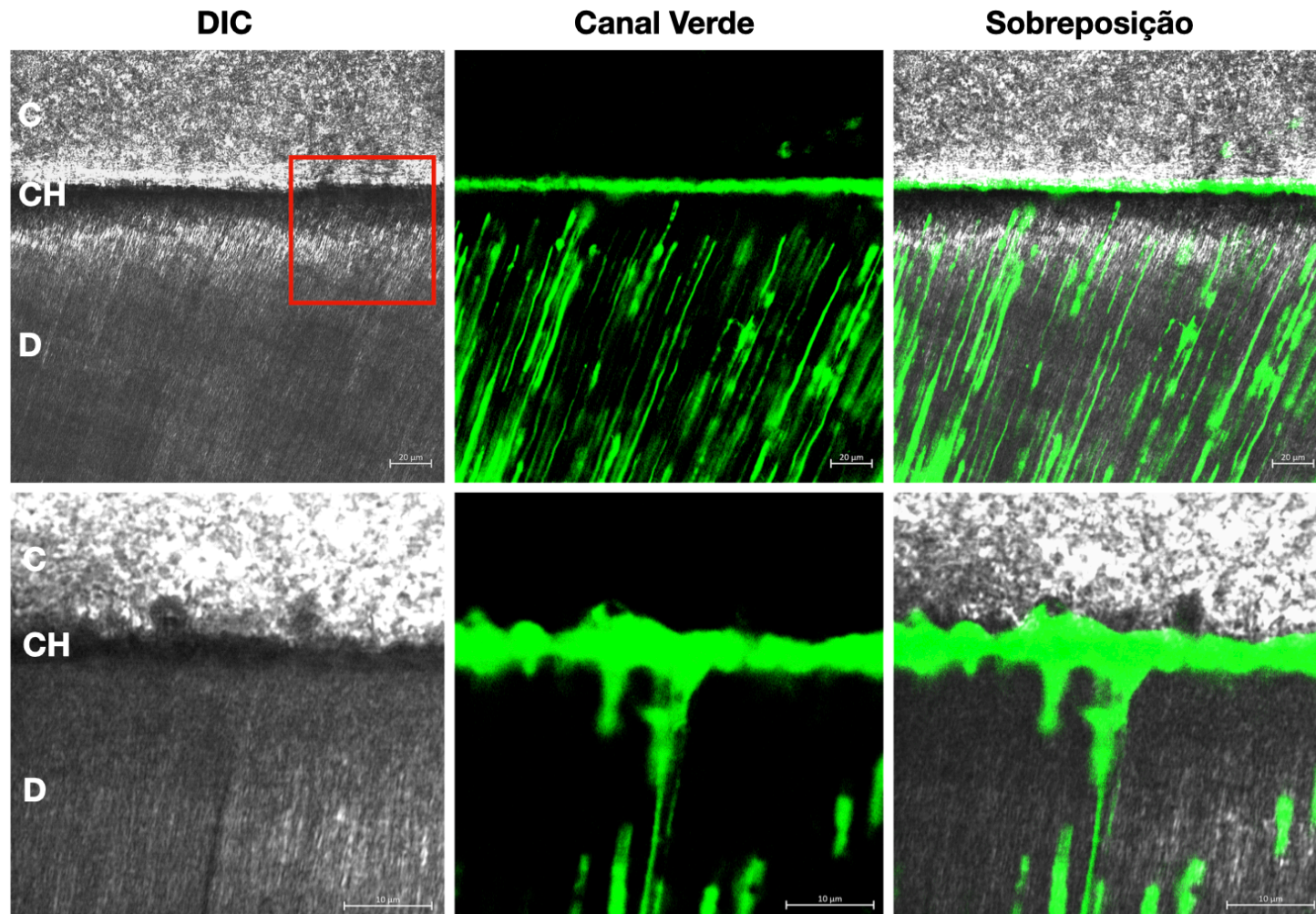
Fonte: A autora.

Figura 5.25 - Interface dentinária correspondente ao grupo Ad(+) armazenado por 12 meses. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina



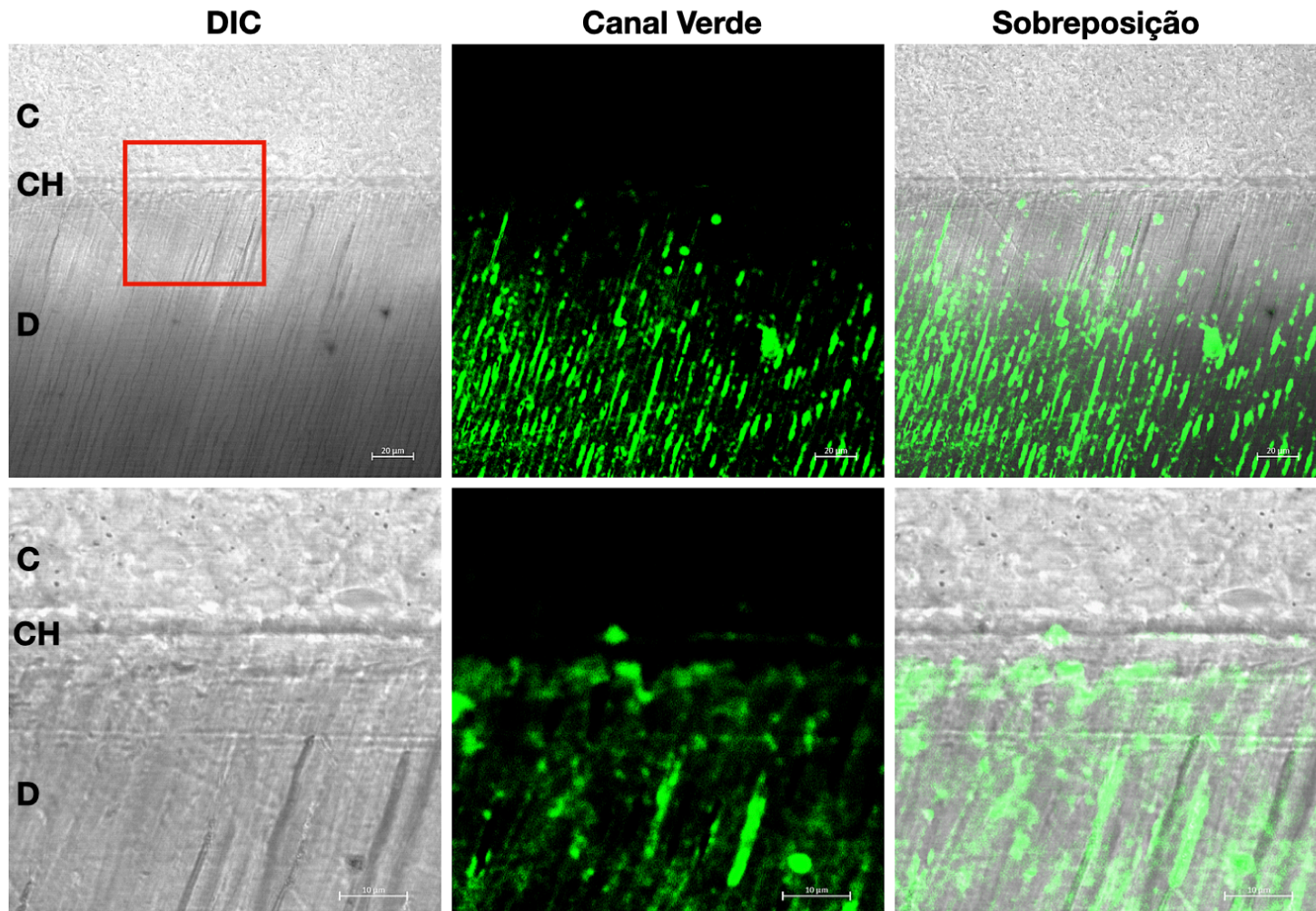
Fonte: A autora.

Figura 5.26 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(-)Ad(-) armazenado por 24 horas. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina



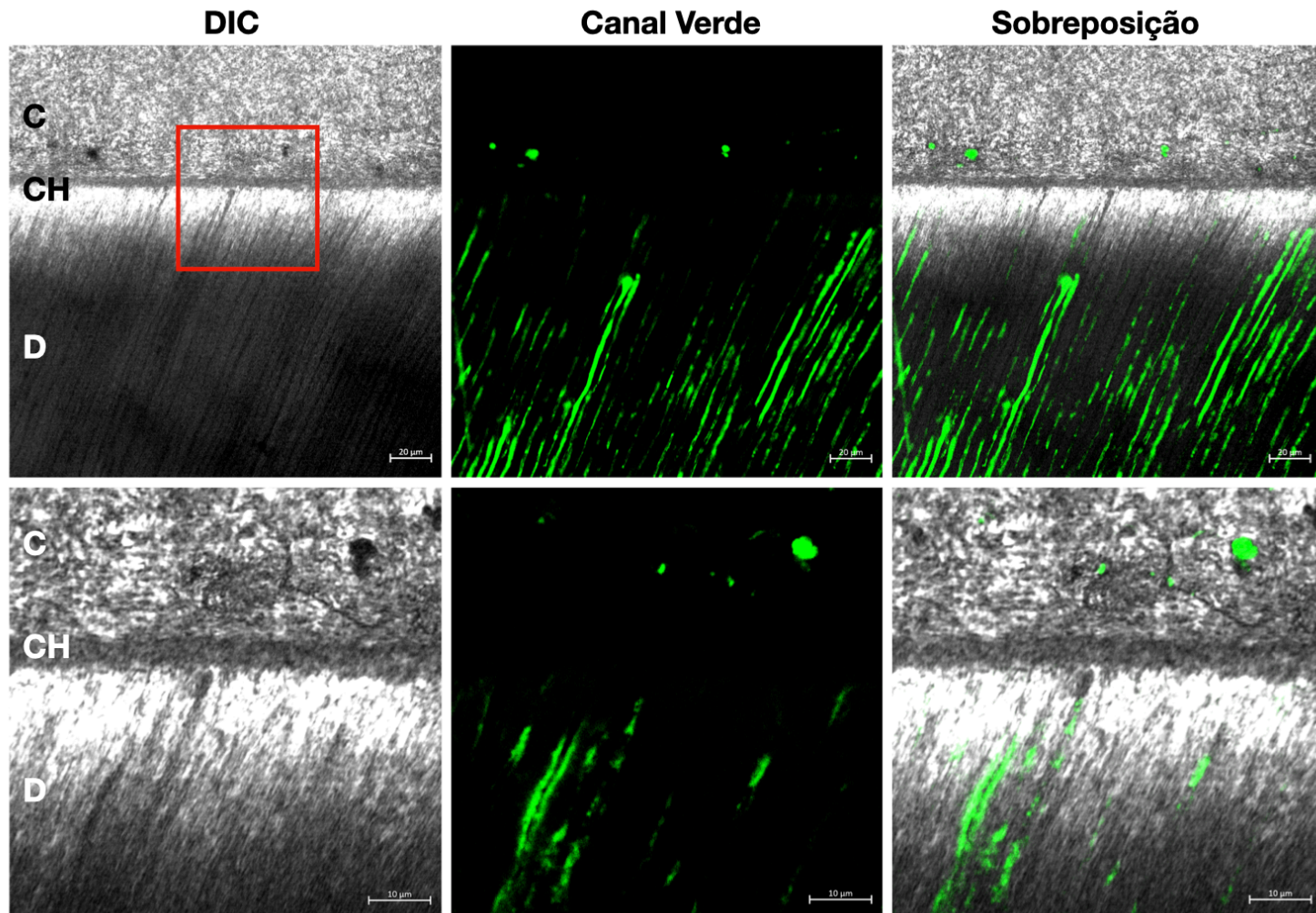
Fonte: A autora.

Figura 5.27 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(-)Ad(-) armazenado por 12 meses. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina



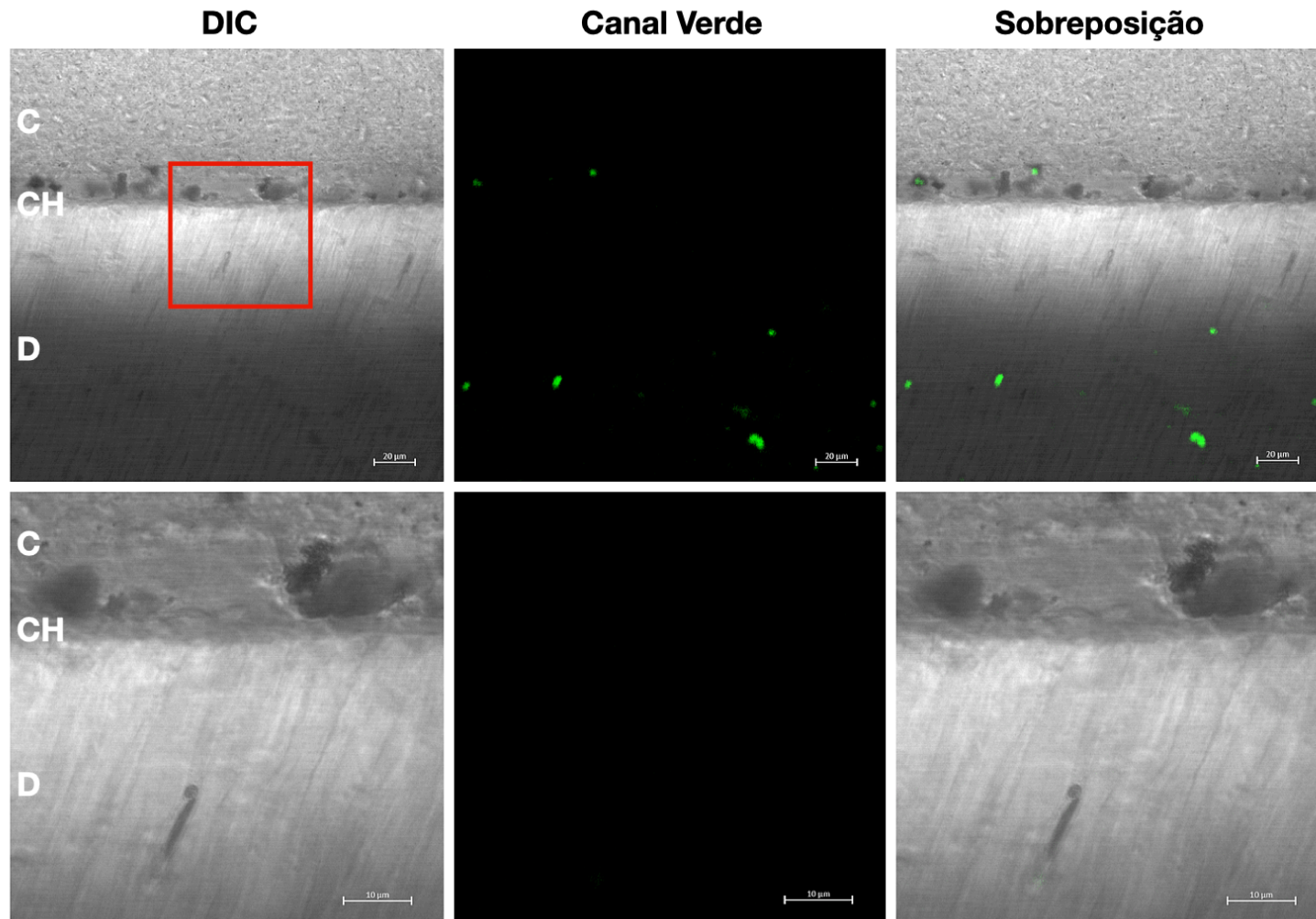
Fonte: A autora.

Figura 5.28 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(-)Ad(+) armazenado por 24 horas. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina



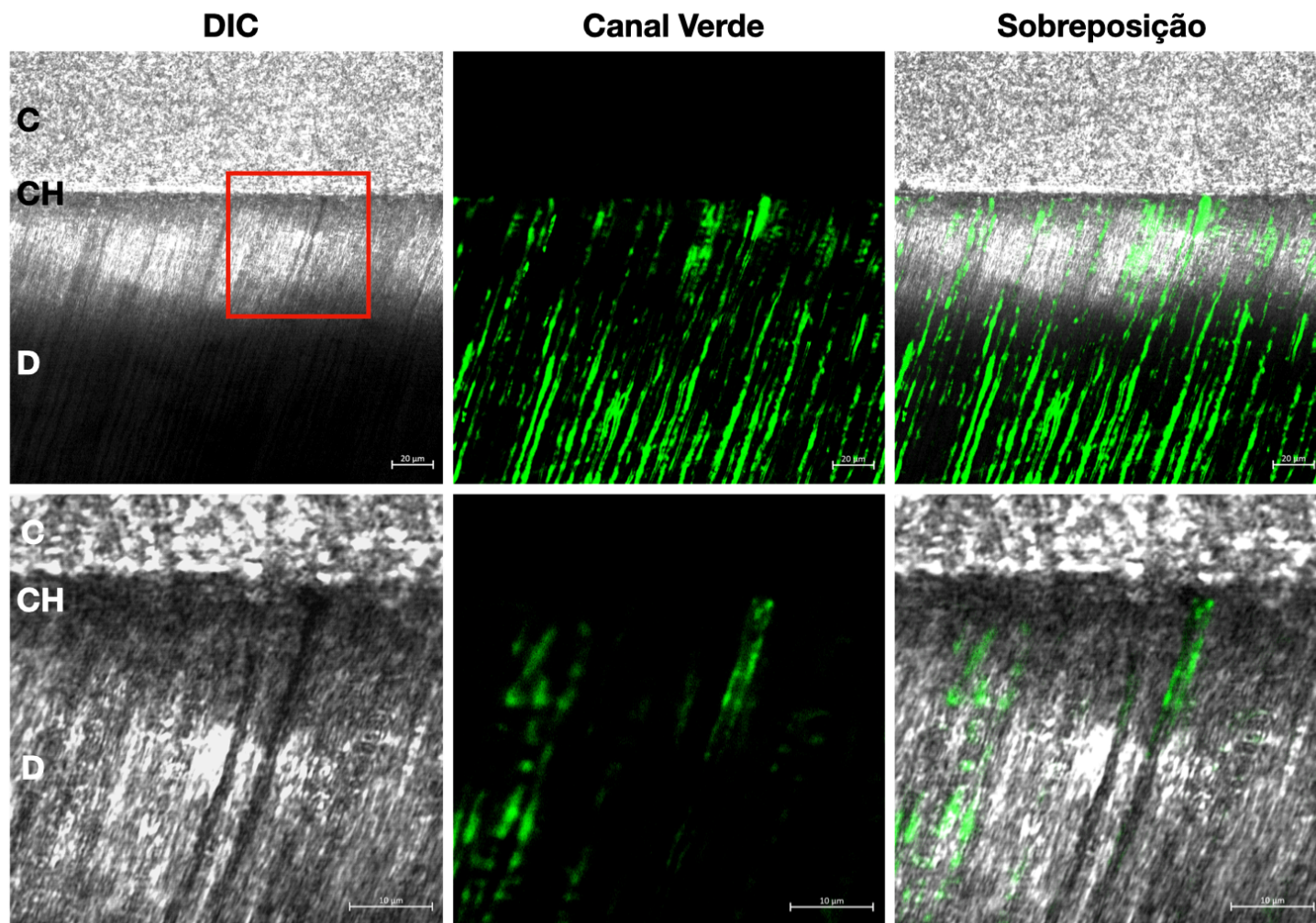
Fonte: A autora.

Figura 5.29 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(-)Ad(+) armazenado por 12 meses. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina



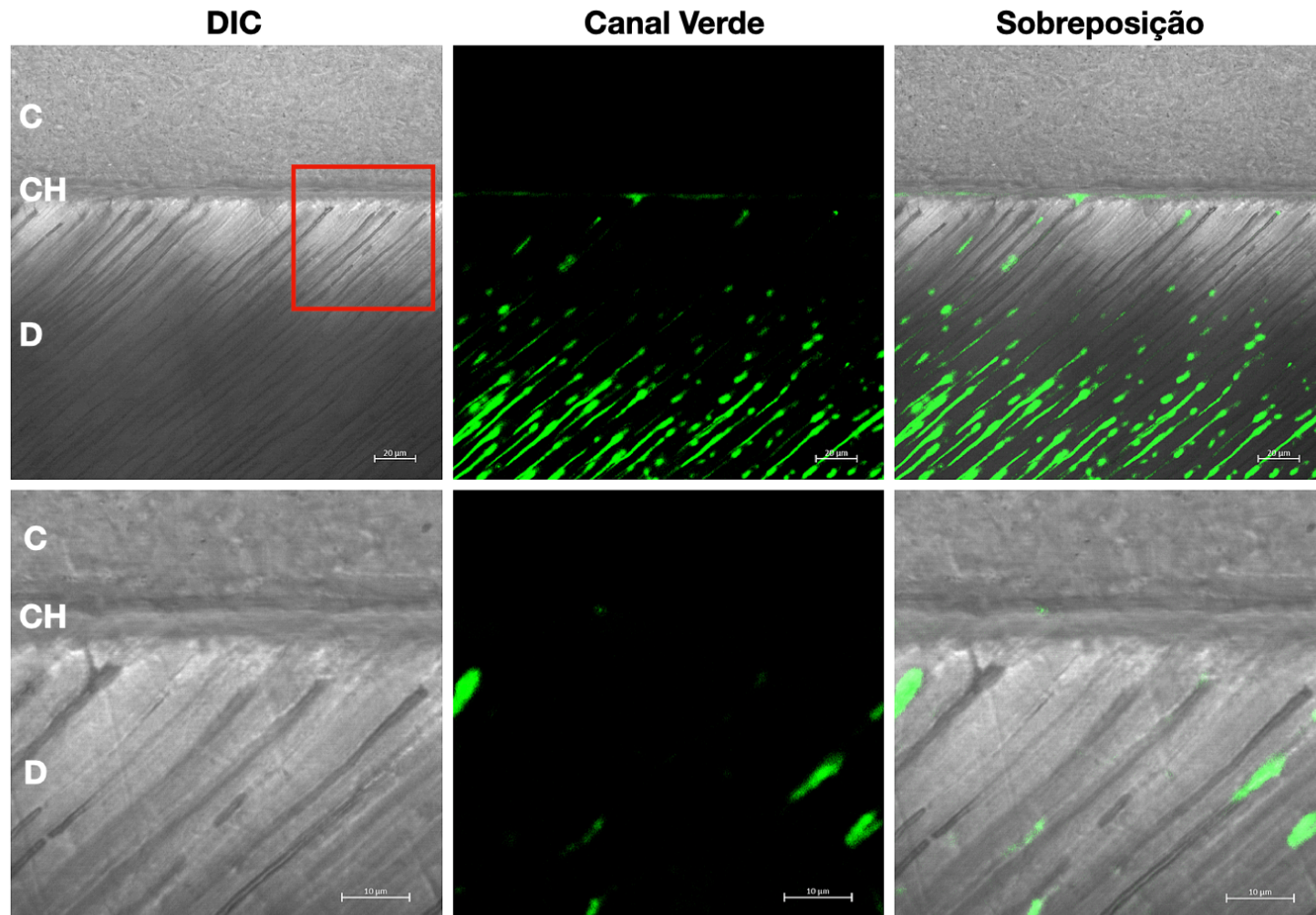
Fonte: A autora.

Figura 5.30 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(+)*Ad*(-) armazenado por 24 horas. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina



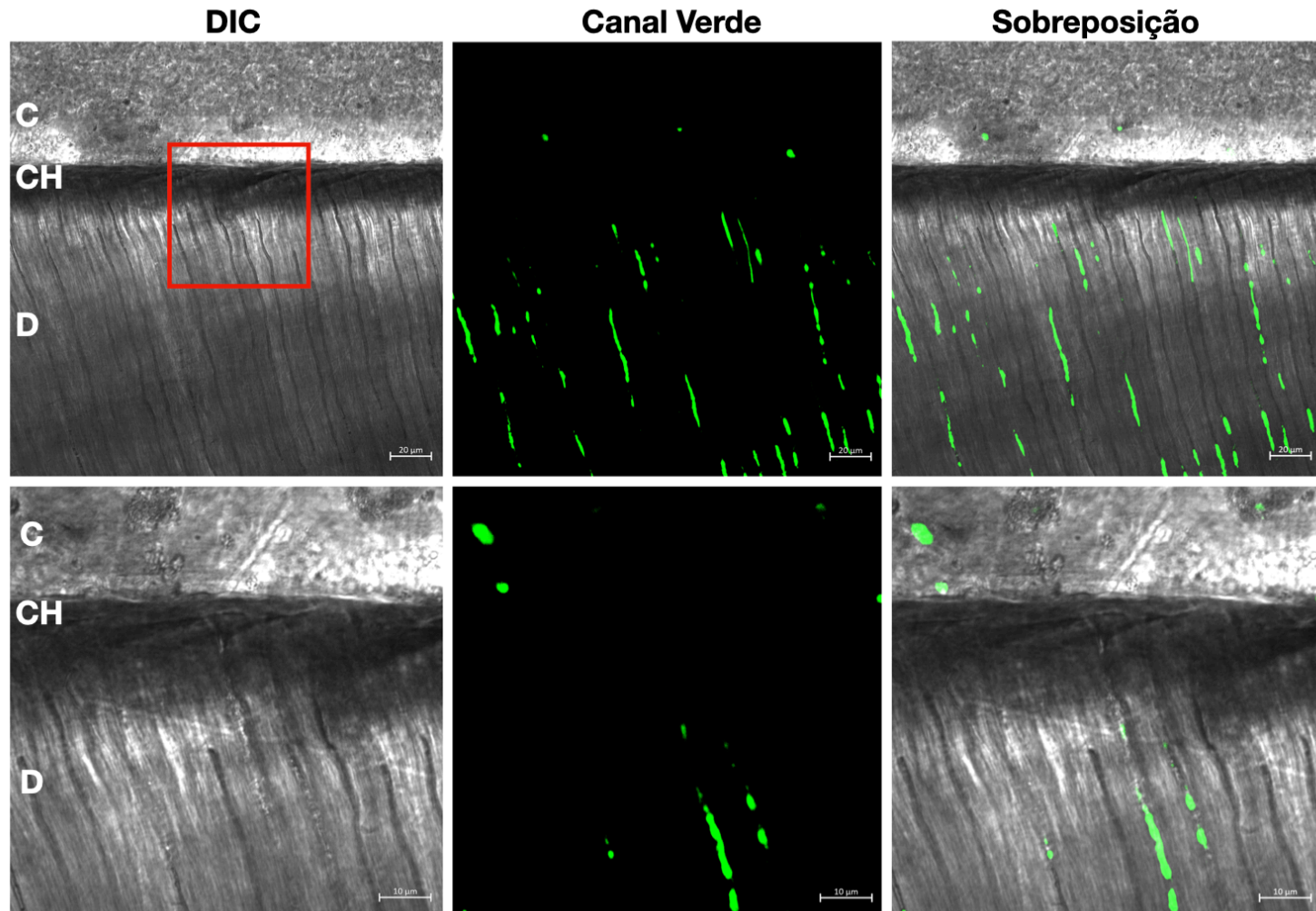
Fonte: A autora.

Figura 5.31 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(+)/Ad(-) armazenado por 12 meses. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina



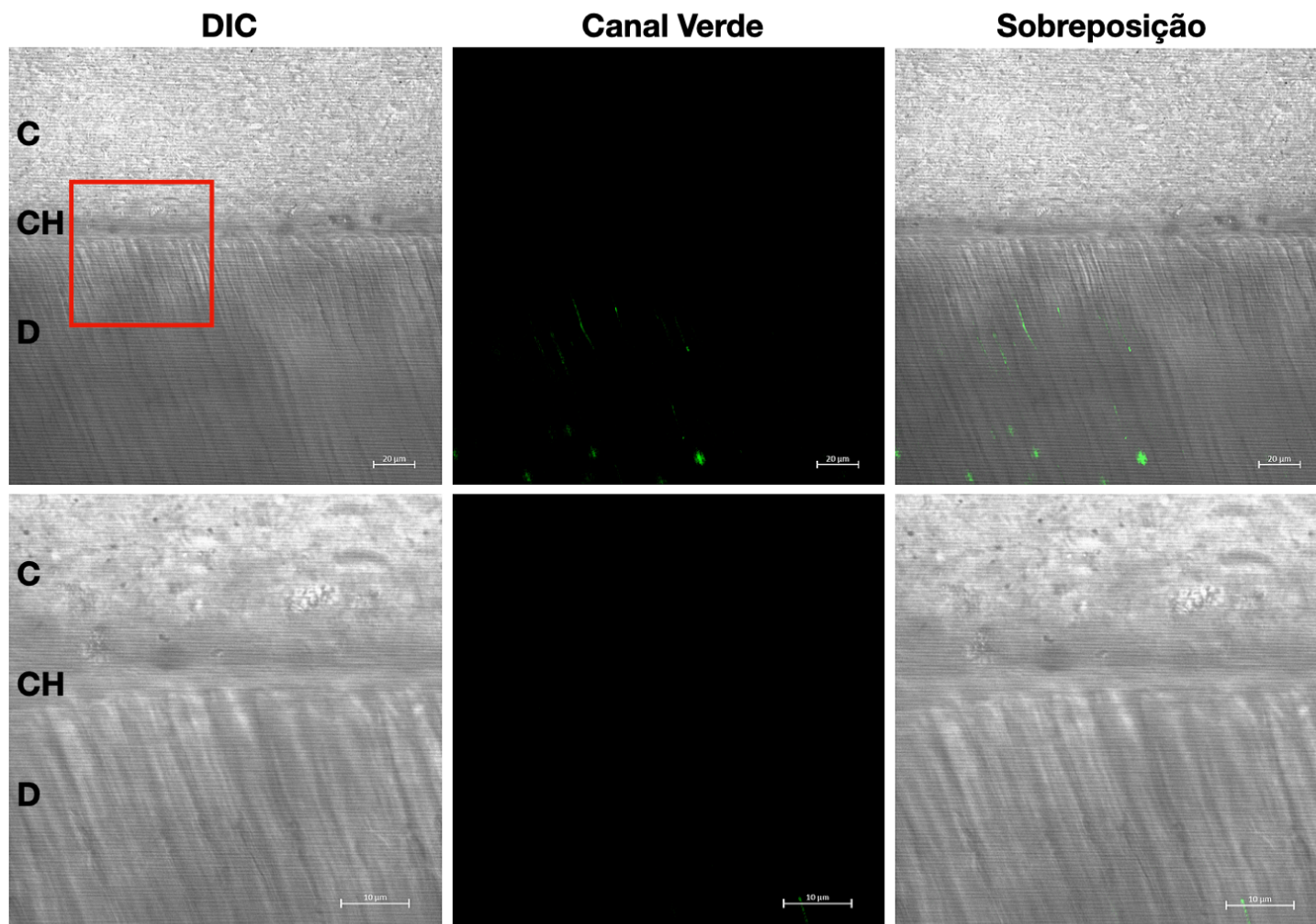
Fonte: A autora

Figura 5.32 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(+)/Ad(+) armazenado por 24 horas. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina



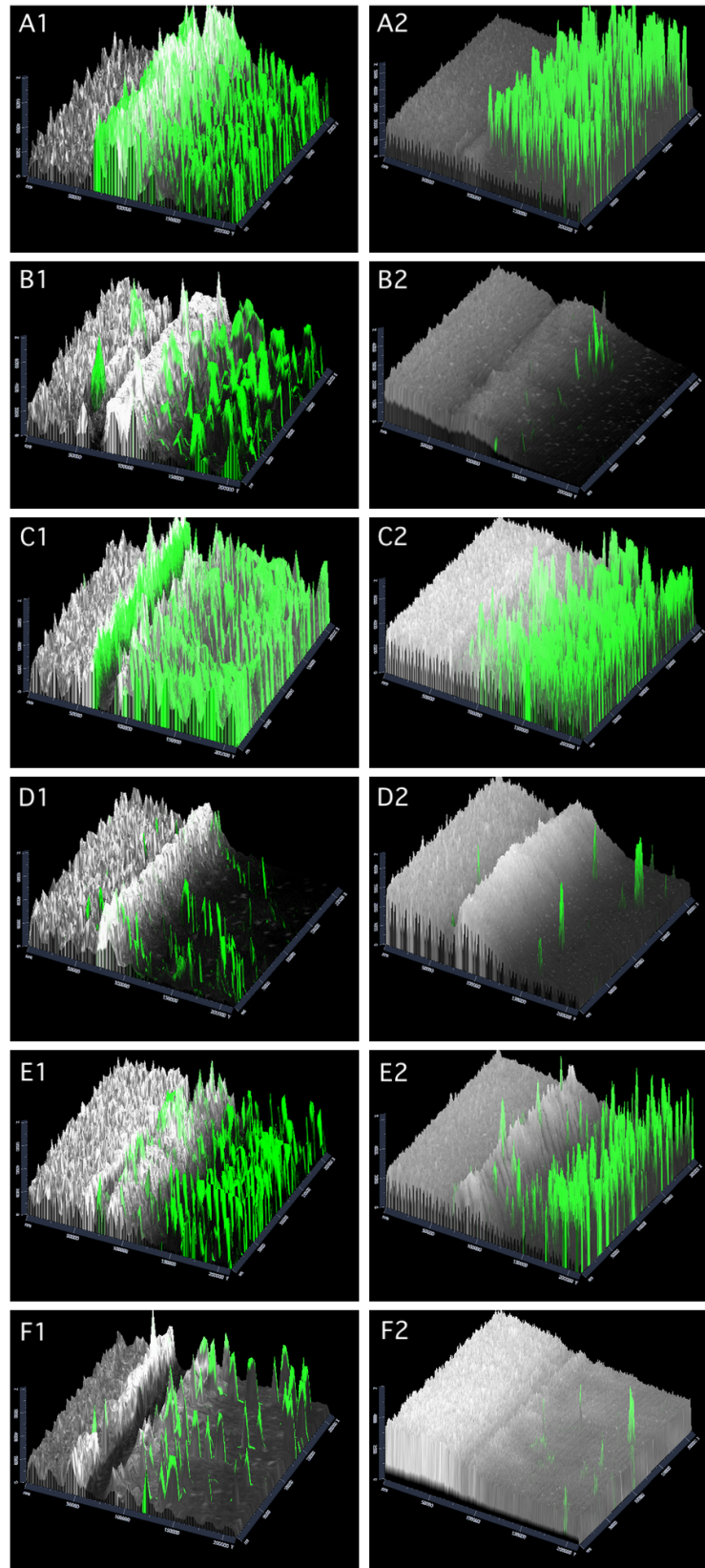
Fonte: A autora.

Figura 5.33 - Interface dentinária correspondente ao grupo P(+)^{Ad}(+) armazenado por 12 meses. Menor aumento na primeira linha e maior aumento na segunda linha. Coluna da esquerda: contraste de interferência diferencial (DIC). Coluna do centro: imagem adquirida no canal verde apresentando fluorescência nos túbulos dentinários e na camada híbrida. Coluna da direita: canal verde e DIC sobrepostos. O quadrado vermelho indica o local correspondente a imagem em maior aumento. As letras indicam: C: compósito; CH: camada híbrida e D: dentina



Fonte: A autora.

Figura 5.34 - Análises quantitativas das Figuras 5.22 a 5.33. Na coluna da esquerda são apresentadas as análises para 24 horas de armazenamento. Na coluna da direita são apresentadas as análises para 12 meses de armazenamento. A1/A2: Ad(-); B1/B2: Ad(+); C1/C2: P(-)Ad(-); D1/D2: P(-)Ad(+); E1/E2: P(+)Ad(-); F1/F2: P(+)Ad(+)

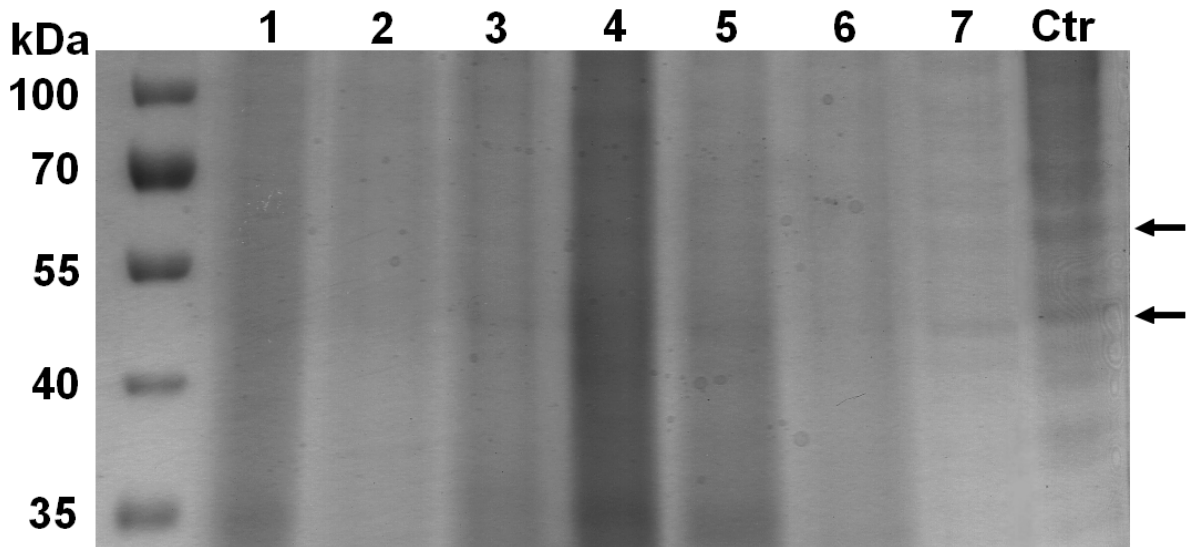


Fonte: A autora.

5.6.2 Zimografia reversa

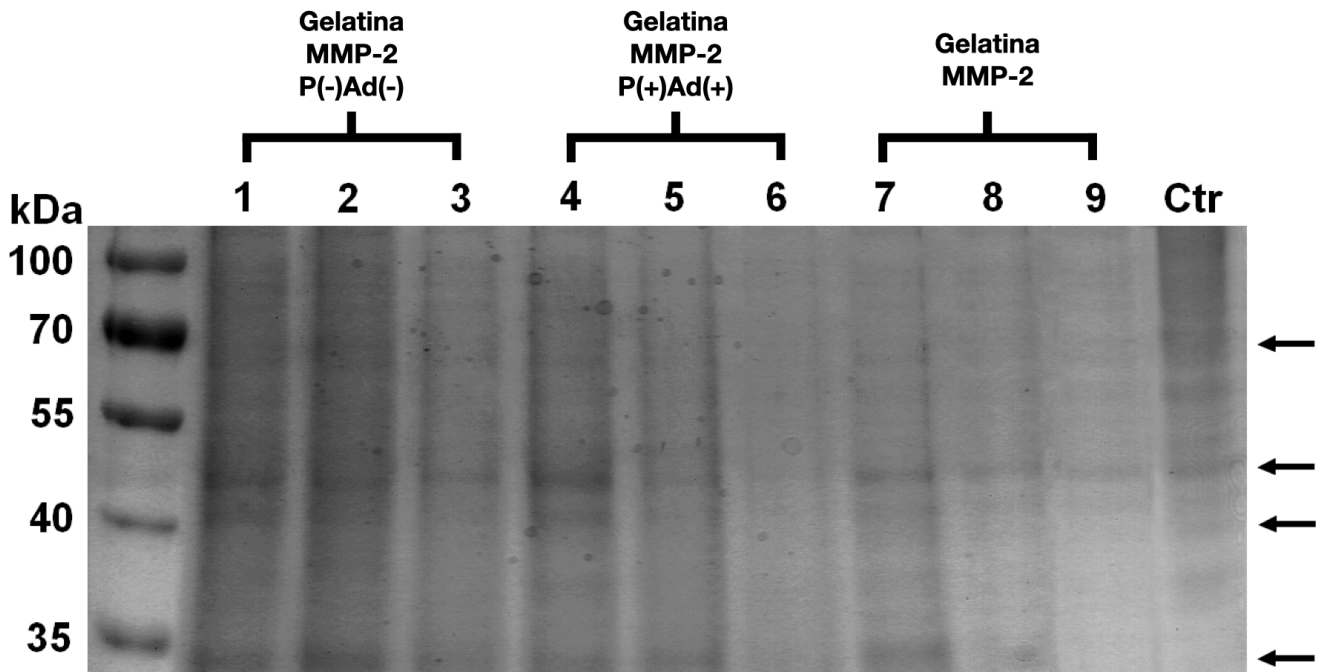
O gel contendo os incubados de 24 horas esta apresentado na Figura 5.35. Para todos os incubados contendo grupos experimentais (lanes 1 a 6), independentemente da presença de partículas de SC no adesivo e/ou pré-tratamento, é possível detectar a hidrólise completa da gelatina e ausência de bandas, semelhante ao apresentado na incubação de gelatina com MMP-2 (lane 7). Quando não há incubação com MMP-2 (Lane Ctr) é verificada manutenção de sua estrutura sendo possível verificar a presença de bandas com massas moleculares variando entre 40-55 kDa e 55-70 kDa (setas). A Figura 5.36 apresenta progressivamente a hidrólise da gelatina quando incubada com MMP-2 e P(-)Ad(-), P(+)Ad(+) em três tempos distintos de incubação: 3, 6 e 24 horas. Como controle negativo foi avaliada a incubação de gelatina somente com MMP-2 nos três períodos. Novamente não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais P(-)Ad(-) e P(+)Ad(+), bem como entre estes e o controle negativo. Em 3 horas de incubação, a gelatina ainda havia sido hidrolisada parcialmente, sendo possível verificar nas lanes 1, 4 e 7 a presença de três bandas (setas pretas): duas entre 40 e 55 kDa e uma última próxima dos 35 kDa. Entretanto, é possível observar redução na demarcação dessas bandas no período 6 horas (lanes 2, 5 e 8) até hidrólise completa do substrato, comprovada pela ausência das bandas após o armazenamento por 24 horas (lanes 3, 6 e 9).

Figura 5.35 - Eletroforese em gel de poliacrilamida dos grupos experimentais incubados por 24 horas a 37 °C. Da esquerda para direita: Padrão de Massa Molecular; Lane 1: Gelatina, MMP-2 e Ad(-); Lane 2: Gelatina, MMP-2 e Ad(+); Lane 3: Gelatina, MMP-2 e P(-)Ad(-); Lane 4: Gelatina, MMP-2 e P(-)Ad(+); Lane 5: Gelatina, MMP-2 e P(+Ad(-); Lane 6: Gelatina, MMP-2 e P(+Ad(+); Lane 7: Gelatina e MMP-2; Ctr: Gelatin



Fonte: A autora.

Figura 5.36 - Eletroforese em gel de poliacrilamida dos grupos experimentais incubados por 3, 6 e 24 horas a 37 °C. Da esquerda para direita: Padrão de Massa Molecular; Lane 1: Gelatina, MMP-2 e P(-)Ad(-) incubados por 3 horas; Lane 2: Gelatina, MMP-2 e P(-)Ad(-) incubados por 6 horas; Lane 3: Gelatina, MMP-2 e P(-)Ad(-) incubados por 24 horas; Lane 4: Gelatina, MMP-2 e P(+Ad(+) incubados por 3 horas; Lane 5: Gelatina, MMP-2 e P(+Ad(+) incubados por 6 horas; Lane 6: Gelatina, MMP-2 e P(+Ad(+) incubados por 24 horas; Lane 7: Gelatina e MMP-2 incubadas por 3 horas; Lane 8: Gelatina e MMP-2 incubadas por 6 horas; Lane 9: Gelatina e MMP-2 incubadas por 24 horas; Ctr: Gelatina incubada por 24 horas

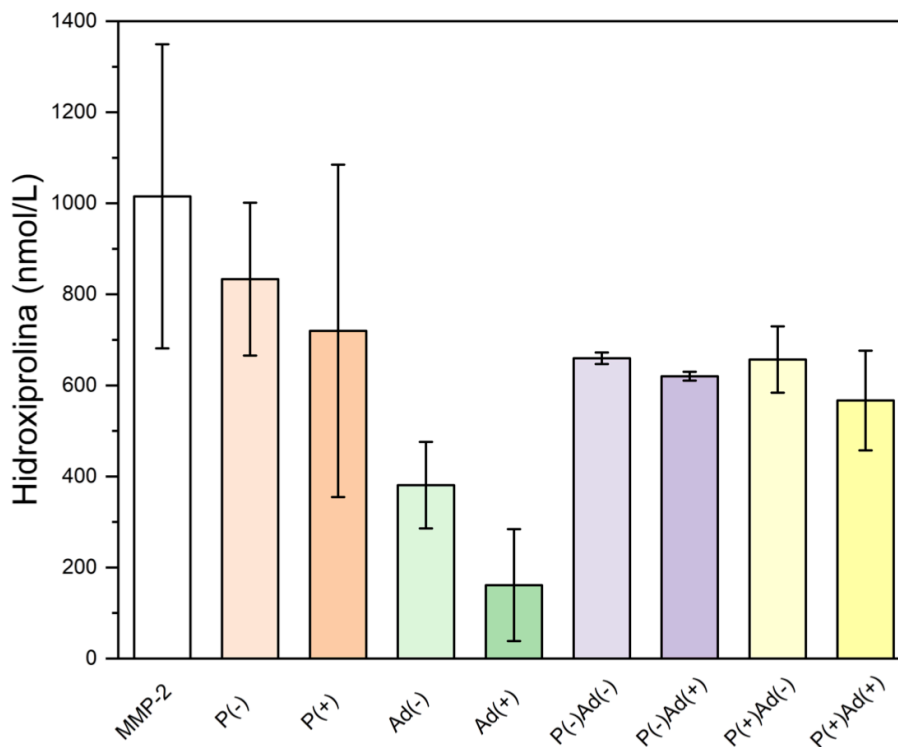


Fonte: A autora.

5.6.3 Ensaio de hidroxiprolina

As concentrações de hidroxiprolina liberadas (em nmol/L) em função dos tratamentos são apresentadas na Figura 5.37. Dentre os tratamentos, os pré-tratamentos testados isoladamente permitiram as maiores liberações de HYP. Entretanto, a presença de partículas no pré-tratamento reduziu a proteólise da gelatina comparado com seu análogo sem SC (P(-): 18% e P(+): 29%, em relação ao controle). Os incubados contendo adesivo sem ou com partículas foram os grupos que apresentaram as maiores inibições em relação ao controle, sendo novamente verificada maior inibição para o material contendo SC (Ad(-): 63% e Ad(+): 84%). Os grupos contendo incubados que associaram pré-tratamentos e adesivos apresentaram comportamentos semelhantes, reduzindo a liberação de HYP entre 35% e 44%. Dentre eles, a presença de partículas no pré-tratamento e no adesivo, P(+)/Ad(+), foi a que promoveu a maior inibição na liberação de HYP.

Figura 5.37 - Médias e desvios-padrão para os resultados de liberação de HYP (nmol/L) em função dos incubados

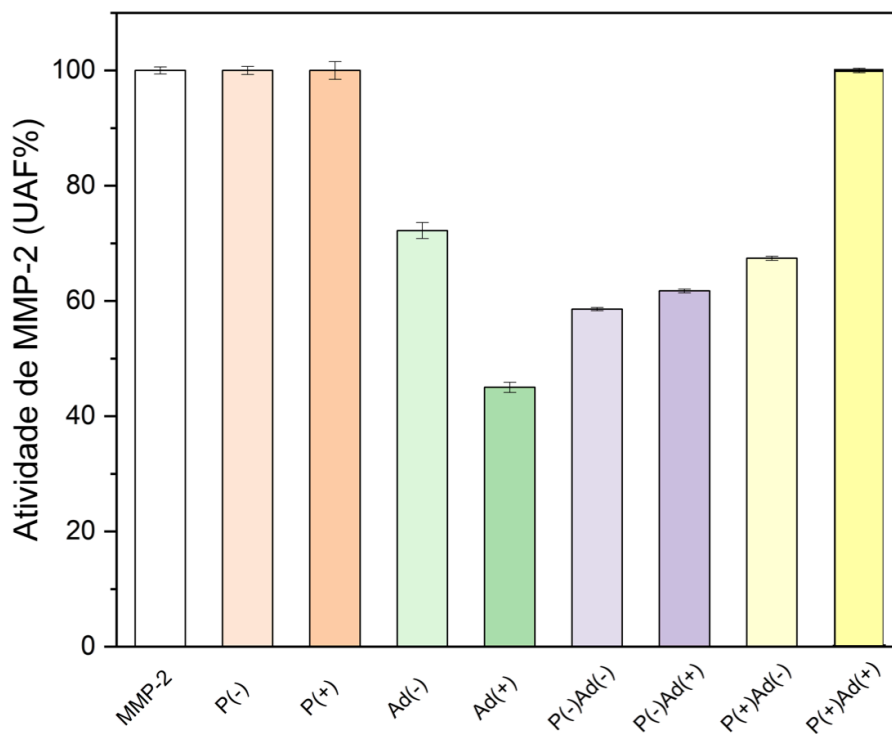


Fonte: A autora.

5.6.4 Espectroscopia de fluorescência para atividade de MMP-2

A porcentagem de atividade de MMP-2 (UAF%) em função dos tratamentos é apresentada na Figura 5.38. Os incubados contendo os pré-tratamentos isoladamente (P(-) e P(+)) e a combinação P(+) $\text{Ad}(+)$ não foram capazes de inibir a atividade enzimática, apresentando porcentagens de fluorescência iguais ao incubado controle (gelatina e MMP-2), indicativo da hidrólise do substrato. Os grupos contendo adesivo isoladamente ($\text{Ad}(-)$ e $\text{Ad}(+)$) apresentaram menor hidrólise do substrato em relação ao incubado controle, sendo que presença de partículas promoveu maior redução na fluorescência comparado com seu análogo sem SC ($\text{Ad}(-)$: 28% e $\text{Ad}(+)$: 55% de redução em relação ao controle). Os outros grupos contendo associações de pré-tratamento e adesivo com e sem partículas (P(-) $\text{Ad}(-)$, P(-) $\text{Ad}(+)$, P(+) $\text{Ad}(-)$) apresentaram comportamentos semelhantes, reduzindo a fluorescência entre 38% e 41%.

Figura 5.38 - Médias e desvios-padrão para os resultados de espectroscopia de fluorescência para atividade de MMP-2, expressa em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF%) em função dos incubados



Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

6.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE SILICATO DE CÁLCIO

Na primeira etapa desse estudo foi descrita a síntese de partículas de silicato de cálcio por um método sol-gel com *template* de surfactante. Essa rota de síntese é uma alternativa eficiente para obtenção de partículas homogêneas em baixas temperaturas (54, 140, 236, 237). A síntese de partículas de silicato de cálcio pelo método sol-gel tem sido explorada na indústria odontológica para produção de materiais utilizados em Endodontia (54, 145, 146, 238, 239). As fases identificadas no DRX, principalmente silicato dicálcico e tricálcico, são semelhantes às reportadas em outros estudos (54, 239-241). A mistura de fases ocorre devido à proximidade energética e térmica para a formação das diferentes fases e polimorfos (123, 126, 127). Adicionalmente, a estrutura cristalina dos compostos se altera com a estequiometria inicial entre os precursores e com temperatura de calcinação, dando origem à formação dos diferentes polimorfos (242). De fato, a maior oferta de cálcio no meio resultou na formação de compostos com maior razão Ca:Si.

A química envolvida na formação de partículas de silicato de cálcio a partir do método sol-gel é baseada em reações de polimerização dos precursores nas quais são originadas suspensões coloidais estáveis de partículas, chamadas sóis. A reação inicial é a hidrólise catalítica do TEOS seguida pela sua reação de condensação (243). O TEOS é comumente utilizado como fonte de silício por ser atóxico, de fácil manuseio e custo inferior em relação a outros precursores, como o tetrametoxisilano (TMOS) (244). Entretanto, a hidrólise do TEOS é lenta em soluções neutras e faz-se necessário o uso de um catalisador ácido (nesse estudo ácido nítrico) ou alcalino (nesse estudo hidróxido de amônio) e maior temperatura de síntese (245). Como estas variáveis de síntese têm apenas o intuito de catalisar a hidrólise do TEOS, não foram observadas diferenças entre as partículas em decorrência da variação de pH ou temperatura do meio de imersão. Entretanto, para as sínteses com menor quantidade de CTAB, a temperatura de 80 °C e o meio ácido originaram partículas menores e com maior área superficial. Essa associação de parâmetros pode ter tornado o silício mais eletrofílico, aumentando a nucleação e, conseqüentemente, formando partículas menores (246).

O método sol-gel apresenta como inconveniente a aglomeração das partículas (247, 248). Dessa forma, a incorporação de um surfactante faz-se necessária para contornar essa limitação. Diferentes surfactantes poliméricos são utilizados nessa rota de síntese (247-249). As sínteses realizadas na presença de um tensoativo catiônico, como CTAB, promovem a formação de partículas menores e mais esféricas em comparação a sínteses realizadas sem surfactante (138, 250, 251). No presente estudo, a quantidade de CTAB foi a variável com maior influência sobre o tamanho de partícula. Ao comparar sínteses análogas, foi evidente a redução no tamanho do aglomerado quando a quantidade de CTAB dobrou. Para as sínteses O e P utilizadas nas fases subsequentes do estudo, o D_{50} reduziu de 16 μm e 36 μm para 11 μm e 10 μm , respectivamente. Isso acontece porque as partículas primárias são aprisionadas dentro das micelas de CTAB durante a reação, o que impede a fusão cristais vizinhos. Após a calcinação, as micelas e os resíduos carbonáceos do CTAB são eliminados e as partículas mantêm seu formato esférico (247).

Alguns estudos avaliando parâmetros de síntese relataram a obtenção de nanopartículas (53, 250, 251). Esses resultados devem ser analisados com cautela, pois são provenientes de medições de partículas individuais feitas em imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura. Porém, é possível observar que essas nanopartículas compõem aglomerados micrométricos. Neste estudo foi verificada a formação de aglomerados porosos com medianas semelhantes a partículas sintetizadas em outros estudos (39, 51, 54, 117). A formação de aglomerados porosos está relacionada à fase gel e à calcinação final. A fase gel é formada no início da secagem do sol, na qual existe uma rede de nanopartículas em meio a um aprisionamento de solvente. Durante o tratamento térmico o solvente é completamente removido, porém a estrutura porosa é mantida (54). Áreas superficiais altas permitem uma maior liberação iônica, o que seria favorável para o processo remineralizador. Inicialmente, as nanopartículas interagem por meio de ligações secundárias (forças de van der Waals); porém, durante o processo de calcinação, a alta energia provoca a condensação da estrutura de sílica, estabelecendo ligações primárias (252). As partículas primárias podem se unir superficialmente ou se fundir umas as outras (54, 253). No presente estudo, as partículas das sínteses selecionadas passaram por moagem, que foi efetiva para redução do tamanho de aglomerado,

obtenção de maior área superficial e estreitamento na distribuição de tamanhos quando comparados com as sínteses originais (O e P).

6.2 CARACTERIZAÇÃO DO ADESIVO QUANTO ÀS SUAS PROPRIEDADES FÍSICAS, MECÂNICAS E LIBERAÇÃO IÔNICA

Na segunda etapa desse estudo, as partículas de silicato de cálcio sintetizadas e moídas foram adicionadas ao componente adesivo de um sistema adesivo comercial de três passos. Estes sistemas adesivos são considerados como padrão-ouro em termos de durabilidade e manutenção da estabilidade da interface adesiva (63). A adição de partículas não comprometeu o grau de conversão do adesivo. Isso pode ser explicado por dois motivos: a baixa concentração de partículas no adesivo e a pequena espessura da amostra utilizada na análise em FTIR. Alguns estudos relatam redução no grau de conversão em decorrência do aumento do conteúdo de partículas de carga no material (254-256). Este efeito é atribuído à incompatibilidade entre os índices de refração das partículas de carga e da matriz orgânica resinosa (257), interferindo na transmissão da luz (258). A pequena diferença entre os índices de refração dos silicatos de cálcio (Ca_2SiO_4 : 1,6 – 1,7 e Ca_3SiO_5 : 1,7) (259) e da matriz orgânica (1,5 - 1,6)(255) não comprometeu a disponibilidade de luz no durante a fotoativação, mantendo alta conversão para todos os grupos. Isso permitiu que um estudo adicionasse até 52,5% em massa de partículas de cimento Portland a um adesivo experimental sem que houvesse comprometimento do grau de conversão (260). O grau de conversão dos sistemas adesivos está diretamente relacionada a suas propriedades mecânicas e estabilidade hidrolítica (261). Como a presença de partículas não interferiu no grau de conversão do adesivo, as diferenças observadas nos demais ensaios não podem ser atribuídas à qualidade da rede polimérica.

Após 12 meses de armazenamento, resistência coesiva dos adesivos sofreu reduções de 12% (sem partículas) e 19% (com partículas). Essa redução não foi estatisticamente significativa para nenhum dos materiais; porém, foi suficiente para que o adesivo com partículas apresentasse um valor de resistência coesiva estatisticamente inferior ao controle após 12 meses. Embora o BisGMA seja

relativamente hidrofóbico, também pode absorver água por meio de ligações de polares tipo éter ou hidroxila (262). Adicionalmente, a hidroxila do 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), também presente no frasco 3, facilita a penetração de água nos adesivos (263, 264). Quando imersa em meio aquoso, a matriz resinosa é permeável o suficiente para promover hidratação das partículas. Ao longo do tempo, a dissolução superficial das partículas associada à ausência de união química com matriz orgânica podem originar defeitos no material que, além de representarem regiões com baixa resistência coesiva, originam novas vias para o trânsito de fluídos (265). De fato, adesivos contendo partículas de biovidro e MTA apresentaram maior sorção de água quando comparados com o controle (263). Possivelmente, a associação destes fatores promoveu maior hidrólise do adesivo com partículas, reduzindo sua resistência coesiva.

A liberação acumulada de íons Ca^{2+} em um período de 60 dias foi de 35 ppm enquanto a liberação de Si^{4+} de 0,06 ppm. Outros estudos que utilizaram partículas de silicato de cálcio em sistemas adesivos experimentais não avaliaram a liberação iônica desses materiais (51, 117, 260, 263, 266, 267). A liberação de Ca^{2+} de um material comercial à base de silicato de cálcio contendo 30 a 40% em massa de cimento Portland (Theracal LC, Bisco), foi de $23,9 \pm 1,0$ ppm em água deionizada por até 28 dias (50). Quando comparados com adesivos dopados com outras fontes de íons, por exemplo nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo (NACP), os valores reportados para liberação de Ca^{2+} desse estudo são inferiores. A liberação de Ca^{2+} num período de 30 a 42 dias reportada para NACP é de aproximadamente 84,2 e 280,6 ppm, respectivamente). Entretanto, a porcentagem de partículas adicionadas ao material é oito vezes superior (40% em massa) em relação à utilizada no presente estudo. Ademais, o menor tamanho de partícula (116 nm) e o meio de imersão é ácido (pH 4) também favoreceram a maior liberação (268, 269). No presente estudo, as maiores concentrações iônicas foram liberadas nos primeiros 15 dias, possivelmente devido à dissolução das partículas na superfície da amostra (270). Entre 30 e 60 dias, não foram observadas diferenças nas concentrações liberadas. Outros cimentos e materiais para uso endodôntico à base de silicato de cálcio também apresentam maiores liberações nas primeiras 3 horas de avaliação, atingindo um platô a partir do sétimo dia que se manteve até o final do ensaio (28 dias) (50, 178).

Os valores obtidos para liberação de Si^{4+} são inferiores em relação às concentrações liberadas de íons cálcio. Isso também foi observado nas concentrações liberadas pelo pré-tratamento e corrobora com o resultado de estudos prévios (271-274). Esses resultados podem ser explicados pela estrutura cristalina das partículas de silicato de cálcio. Enquanto os íons cálcio ocupam os interstícios, o silício faz parte da unidade fundamental e estrutural dos silicatos de cálcio, coordenando arranjos tetraédricos com quatro ânions de oxigênio (O^{2-}). As ligações interatômicas estabelecidas entre os íons Si-O apresentam caráter iônico e covalente, sendo tipicamente consideradas como ligações fortes (120, 121). Dessa forma o silício apresenta maior dificuldade de ser removido do arcabouço cristalino, o que implica na sua menor liberação. Deve-se ressaltar que a comparação entre diferentes estudos dos resultados de liberação de íons é limitada pelas diferenças metodológicas, principalmente em relação à composição, volume, regime de troca e processamento do meio de imersão, dimensões do corpo de prova e equipamento utilizado para análise.

6.3 PROPRIEDADES MECÂNICAS DA INTERFACE ADESIVA

Na terceira parte desse estudo, terceiros molares humanos receberam a aplicação do adesivo contendo ou não 5% em massa de partículas de SC. Previamente à aplicação do sistema adesivo, a dentina condicionada foi pré-tratada com uma suspensão alcóolica contendo ou não 5% de SC. A ausência de pré-tratamento foi utilizada como controle. Todos os grupos avaliados apresentaram reduções estatisticamente significantes nos valores de μTBS após 12 meses, independentemente da presença de partículas no adesivo. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que utilizaram partículas bioativas e relataram redução nos valores de μTBS após três meses (42, 116) ou seis meses de armazenamento (39, 51, 266).

Independentemente do período de armazenamento e do adesivo utilizado, os grupos que receberam o pré-tratamento com partículas apresentaram menores valores μ TBS quando comparados com grupos que não receberam pré-tratamento ou que foram tratados somente com a suspensão alcoólica. Tais reduções também foram observadas em espécimes armazenados por seis meses em tampão fosfato, quando quando partículas de biovidro foram aplicadas como pré-tratamento sobre a dentina desmineralizada (45). Uma possível hipótese para explicar a redução na resistência de união com o pré-tratamento seria a ocorrência de precipitação mineral no interior da camada híbrida, aumentando seu módulo de elasticidade. Aumentos no módulo reduzem a capacidade de deformação durante o ensaio mecânico e aumentam a magnitude das tensões na interface, o que provocaria o seu rompimento sob cargas mais baixas (266, 275) .

As propriedades mecânicas da interface adesiva podem ser aferidas através do ensaio de nanoindentação, que fornece valores de dureza e módulo de elasticidade. Esse ensaio permite fazer inferências sobre variações no conteúdo mineral ao longo da interface compósito - interface adesiva - dentina (276). De modo geral, os valores de dureza e módulo de elasticidade do compósito estão de acordo com outros estudos (277-279). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos e nem nos diferentes períodos de imersão. Entretanto, observou-se que as indentações mais próximas à camada adesiva apresentaram menor dureza e módulo de elasticidade no período inicial de 24 horas. Esta região pode ser considerada uma “zona de transição” entre a camada adesiva, constituída em parte por monômeros hidrofílicos monofuncionais e não reforçada por carga inorgânica, para um compósito que possui fase orgânica altamente reticulada e elevado conteúdo de partículas de reforço. Para os períodos seguintes, a dureza e o módulo das indentações realizadas a 5 μ m da camada de adesivo foram iguais ao das outras profundidades provavelmente pelo aumento da conversão monomérica pós-cura, que compensaria eventuais diferenças na estrutura do polímero (280-282). A manutenção das propriedades mecânicas do compósito após 12 meses corrobora com os resultados de resistência coesiva, nos quais também não foram notadas reduções estatisticamente significantes após armazenamento; porém, não concorda com outros estudos que demonstraram reduções significantes inclusive em períodos de tempo mais curtos. Entretanto, estes estudos utilizaram como meio de armazenamento: água

deionizada, bebidas ácidas ou líquidos que simulam alimentos (food-simulating liquids/ FSL) que, diferentemente do FCS, promovem erosão do material acelerando sua a degradação (282-285). A ausência de degradação também pode estar relacionada à uma área exposta pequena, uma vez que a fatia estava embutida em resina acrílica com somente uma face em contato com o meio.

Embora a dureza inicial da camada de adesivo tenha sido reduzida pela presença das partículas, após seis e 12 meses a presença de partículas contribuiu para a sua estabilidade. Uma possível explicação seja a ocorrência de precipitação mineral na superfície da camada de adesivo. Por outro lado, o módulo de elasticidade do adesivo sofreu redução estatisticamente significativa após seis meses, independentemente da presença de partículas ou do pré-tratamento. O efeito do armazenamento sobre as propriedades mecânicas dos adesivos dentais está bem documentado (286-290). A degradação hidrolítica é mais severa em adesivos do que em compósitos devido à presença de monômeros hidrofílicos (290, 291). A presença de partículas no adesivo ou no pré-tratamento reduziu o módulo de elasticidade. A dissolução superficial das partículas associada à ausência de união química com a matriz orgânica (265), além de originarem defeitos no material, permitem um maior trânsito de fluidos, tornando a degradação da camada de adesivo mais severa. As partículas depositadas na superfície da dentina após o pré-tratamento com SC também podem difundir na matriz orgânica do adesivo, com consequências semelhantes às observadas para o adesivo com partículas.

A análise dos resultados da nanoindentação na camada híbrida mostra que em nenhum dos grupos houve redução na dureza ou no módulo de elasticidade após armazenamento prolongado. Isso sugere que a camada de adesivo é o elemento mais fraco da interface (292). A presença de partículas de silicato de cálcio no pré-tratamento e/ou adesivo promoveu aumento nas propriedades mecânicas da camada híbrida após 12 meses. Esses resultados são suportados pelo EDS das interfaces, no qual foi possível observar aumentos significativos de Ca^{2+} e PO_4^{3-} para esses grupos e, principalmente para o grupo P(+)/Ad(+). Outros estudos observaram resultados semelhantes após armazenamento entre três e dez meses, em interfaces adesivas constituídos por adesivos contendo com partículas de silicato de cálcio modificado por β -TCP ou β -TCP e óxido de zinco e ácido poliacrílico (51), cimento de Portland tipo I (267), cimento Portland tipo I misturadas com β -TCP (266). É importante salientar que,

apesar utilização de partículas de silicato de cálcio em adesivos ter sido estudada, sua aplicação como pré-tratamento dentinário não havia sido explorada em relação às propriedades mecânicas da interface adesiva, camada híbrida e dentina subjacente. Os resultados desse estudo sugerem que o pré-tratamento com SC foi efetivo para recuperação de propriedades mecânicas da camada híbrida.

A partir dos resultados é possível inferir que a interface adesiva é semipermeável, permitindo que o trânsito de fluídos carregue os íons Ca^{2+} da camada de adesivo para a camada híbrida, possibilitando a precipitação mineral (265). Os cristalitos incorporados ao tecido preenchem espaços anteriormente preenchidos por água, protegendo as fibrilas colágenas do ataque enzimático e tornando este substrato mais resistente a ataques ácidos subsequentes (293). Ademais, o Ca^{2+} liberado pelas partículas presentes no pré-tratamento pode ser capaz de estabelecer ligações com grupos carregados negativamente como $-\text{R}-\text{COO}^-$ e PO_4^{3-} presentes na matriz dentinária desmineralizada, deslocando a água confinada entre as fibrilas colágenas, o que facilitaria a penetração de monômeros adesivos hidrofóbicos (275). Simultaneamente, a possível alcalinização do meio, proveniente do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ originado após hidratação, dissociação e re-precipitação dos silicatos, possibilitaria a condensação de sílica no colágeno desmineralizado, contribuindo para o crescimento de cristais de apatita (294, 295). Dessa forma, há uma diminuição significativa de defeitos na camada híbrida, o que contribui para a sua longevidade (275).

Por fim, é importante salientar que a recuperação mineral para os grupos Ad(-) e P(-)Ad(-) decorre da precipitação dos íons presentes no FCS e, apesar de ser observada através do EDS, não foi suficiente para aumentar os valores das propriedades mecânicas da camada híbrida, mas pode ter compensado o efeito da degradação hidrolítica e/ou enzimática.

Como observado em estudos prévios, a camada de dentina adjacente à camada híbrida é parcialmente desmineralizada pelo ataque ácido e fracamente infiltrada pelo adesivo, apresentando menor dureza e módulo de elasticidade do que regiões mais profundas da dentina (267, 296). Apenas nesta região foi observado manutenção para os valores de dureza e aumento módulo de elasticidade após 6 e 12 meses. Para as regiões mais profundas foi observado redução das propriedades mecânicas. Reduções na dureza e módulo de elasticidade da dentina também foram observadas após armazenamento em água deionizada ou solução de CaCl_2 e se

devem à desmineralização (297). A utilização de FCS, poderia compensar essa desmineralização e favorecer a manutenção das propriedades da dentina através das trocas iônicas, como observado quando utilizado solução de sais balanceados de Hank (Hank's balanced salts solution, HBSS) como meio de imersão. Apesar de ambas as soluções possuírem 100 ppm de Ca^{2+} , o HBSS contém 150 ppm PO_4^{3-} contra apenas 95 ppm do FCS. Possivelmente a presença de cálcio não compensou a menor concentração de fosfato no FCS. Sendo assim, o potencial químico de dissolução continuou alto e implicou diretamente nas reduções de propriedades mecânicas da dentina (297). Entretanto, a presença de partículas de silicato de cálcio no adesivo promoveu a obtenção de maiores valores de dureza e módulo de elasticidade da dentina em relação aos grupos que não possuíam SC. A utilização de um pré-tratamento contendo silicato de cálcio foi também foi efetiva para manutenção da dureza e módulo de elasticidade após armazenamento, enquanto os outros grupos apresentaram reduções. Dessa forma, é possível inferir que a incorporação de partículas no adesivo e/ou pré tratamento influenciaram positivamente nas propriedades mecânicas da dentina.

6.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A redução nas propriedades mecânicas da dentina mais distante da interface após o armazenamento observada nos grupos que não receberam pré-tratamento ou que foram tratados apenas com a solução alcoólica apresentaram pode ser explicada pela maior atividade enzimática quando comparados com os grupos pré-tratados com partículas de silicato de cálcio. Na zimografia *in situ*, para essas interfaces, a camada híbrida mal infiltrada pelo sistema adesivo e a presença de água residual mantiveram o colágeno desmineralizado desprotegido e susceptível à ação enzimática (221), o que é observado pela presença de fluorescência, inclusive em maior intensidade, na camada híbrida e dentina subjacente. As reduções na fluorescência após armazenamento foram observadas para todos os grupos, se devem possivelmente por uma redução natural da atividade genatinolítica com o tempo (265, 298).

A inibição da MMP-2 ou proteção da gelatina pelos adesivos e pré-tratamentos contendo silicato de cálcio não foi observada no ensaio de zimografia reversa. Entretanto, em ensaios com maior sensibilidade e especificidade como o ensaio de hidroxiprolina e espectroscopia de fluorescência foi possível observar uma redução da degradação da gelatina para os incubados contendo silicato de cálcio. O ensaio de hidroxiprolina e de espectroscopia de fluorescência são utilizados como medidas indiretas para aferir a degradação colágena. No presente estudo, foi utilizado gelatina, que é uma mistura solúvel de polipeptídeos produzida pela hidrólise parcial do colágeno (299) e um substrato com supressão intramolecular de fluorescência. Os peptídeos com supressão intramolecular de fluorescência contém um grupo fluorescente orto-aminobenzóico (Abz), o grupo supressor (N-[2, 4-dinitrofenil]-etilenodiamino (EDDnp) e, entre eles, uma cadeia de aminoácidos, no caso alanina-glicina-prolina-arginina-glicina-alanina-glicina-glutamina (AGPRGAGQ). A hidrólise de qualquer ligação da cadeia peptídica entre o grupo doador e o grupo supressor gera a fluorescência (300). Para esses ensaios foi verificada supressão na degradação da gelatina a partir da adição de partículas de silicato de cálcio aos incubados, principalmente naquele contendo adesivo com SC (Ad(+)). Resultados semelhantes são apresentados em outro estudo no qual a adição de 10% em massa de partículas de biovidro 45S5 a um adesivo universal comercial obteve a menor liberação de HYP em relação aos outros grupos (controle, adesivo com partículas de biovidro 45S5 silanizadas e adesivos com partículas de biovidro dopadas com estrôncio silanizadas ou não), além de manutenção dos valores de μ TBS e precipitação mineral após 6 meses de armazenamento em tampão fosfato-salino (301). A presença de partículas no adesivo consegue, por meio de alcalinização do meio ou pela proteção das ligações peptídicas glicina-isoleucina (sítios da estrutura molecular normalmente clivados pelas MMPs) (302, 303) inibir a atuação das MMPs. A inibição direta da enzima não pode ser confirmada, uma vez que o pré-tratamento contendo silicato de cálcio isoladamente não reduziu a atividade gelatinolítica. Entretanto, a utilização de apenas uma metaloprotease e gelatina/substrato com supressão intramolecular de fluorescência torna essa avaliação limitada. As interações entre o tecido desmineralizado, colágeno, colagenases envolvidas no processo de degradação enzimática (MMP-2, -3, -8, -9, -20 e catepsinas) (304-306) e os tratamentos a base de silicato de cálcio são mais fidedignas no ensaio *in situ*. Nessa situação, a presença de silicato de cálcio no pré-tratamento e/ou adesivo foi capaz de promover inibições

tanto a curto prazo (24 horas) quanto após armazenamento prolongado, diferentemente do observado para os grupos que não possuíam partículas (Ad(-) e P(-)Ad(-)).

Diferentes mecanismos podem explicar o bom desempenho dos grupos Ad(+), P(-)Ad(+) e P(+Ad(+): (1) a precipitação de apatita nos poros da camada adesiva, na camada híbrida e na dentina subjacente protegeram as fibrilas colágenas contra a degradação enzimática (36, 37); (2) a eliminação da água residual decorrente da remineralização pode levar a inativação das MMPs (307); (3) a precipitação de uma camada rica em Si^{2+} e sua reação com íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} favoreceria a formação de complexos de alto peso molecular (Ca/P-MMPs), que restringem as atividades de MMP-2 e MMP-9 na camada híbrida (308); (4) finalmente, a possível liberação de íons hidroxila (OH^-) provenientes da fase $\text{Ca}(\text{OH})_2$ originada após hidratação, dissociação e re-precipitação dos silicatos, tornariam o meio alcalino, o que poderia desnaturar enzimas e, conseqüentemente, interferir na atividade das proteases (267, 309).

6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Os achados da presente investigação mostram que a adição de partículas de silicato de cálcio ao componente adesivo de um sistema adesivo comercial de três passos ou como pré-tratamento promoveu a precipitação mineral na camada híbrida. O aumento nas propriedades mecânicas da camada híbrida, juntamente com a de inibição de MMP, sugere que a longevidade da interface adesiva pode ser melhorada por uma modificação relativamente simples em um dos componentes do sistema adesivo ou adicionando uma etapa extra ao procedimento de colagem. Do ponto de vista clínico, a primeira opção é mais atrativa, pois dispensa um passo clínico adicional ao procedimento adesivo.

A constante exposição da interface adesiva ao FCS pode ser considerada como uma limitação do estudo, visto que a degradação da camada adesiva pode ser acelerada. Outra limitação é que a observação das interfaces feita em MEV/EDS foram realizadas em diferentes espécimes dificultando a comparação entre os períodos de armazenamento. Por fim, para os ensaios de zimografia reversa, hidroxiprolina e

espectroscopia de fluorescência, utilização de um extrato de dentina desmineralizada, contendo as collagenases presentes na matriz dentinária, poderia fornecer uma avaliação mais acurada a cerca da degradação enzimática.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados e objetivos é possível concluir que:

- Em relação à síntese das partículas de silicato de cálcio, aquelas realizadas em maiores temperaturas e com relação molar dos precursores de 3:1 promoveram a obtenção de aglomerados de partículas com maior área superficial, menor mediana do aglomerado e alta razão Ca:Si;

- A presença de partículas no adesivo não interferiu no grau de conversão e na resistência coesiva do adesivo após 24 horas. Entretanto, após 12 meses, foram observadas reduções numéricas nos valores de resistência para ambos os materiais e o adesivo com 5% em massa de partículas apresentou resistência coesiva estatisticamente menor do que o adesivo sem partículas;

- O adesivo contendo 5% em massa de SC foi capaz de liberar de íons cálcio por até 60 dias;

- Quando aplicados à dentina, a presença de partículas no pré-tratamento reduziu a resistência de união à microtração da interface adesivo-dentina. Como esperado, após 12 meses a resistência de união sofreu redução estatisticamente significativa, independentemente da condição experimental avaliada;

- Os resultados de nanoindentação confirmam o efeito negativo das partículas sobre o comportamento mecânico do adesivo e indicam que houve degradação da camada de adesivo após 6 meses de armazenamento;

- A incorporação de partículas de silicato de cálcio em um adesivo comercial e/ou como pré-tratamento promoveu a precipitação de apatita na camada híbrida e dentina adjacente, evidenciada por aumentos estatisticamente significantes nos valores de dureza e módulo de elasticidade destas regiões, bem como pela observação dos conteúdos de cálcio e fósforo (MEV/EDS);

- A presença de partículas no adesivo reduziu a atividade collagenolítica na camada híbrida e dentina subjacente após 24 horas, levando à inativação enzimática quase completa após 12 meses, conforme resultados

de zimografia *in situ*, complementados pelos ensaios de liberação de hidroxiprolina e espectroscopia de fluorescência;

- Os resultados do presente estudo sugerem que a presença de partículas de silicato de cálcio no adesivo pode contribuir para a longevidade da interface adesiva através da precipitação mineral na camada híbrida e inibição da atividade enzimática. Acredita-se que a menor resistência de união da interface adesivo-dentinária após 12 meses deva ser atribuída à degradação da camada de adesivo;

- De acordo com os resultados apresentados a hipótese nula pode ser rejeitada.

REFERÊNCIAS²

1. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater.* 2008;24(1):90-101.
2. 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.
3. Sauro S, Watson TF, Mannocci F, Miyake K, Huffman BP, Tay FR, et al. Two-photon laser confocal microscopy of micropermeability of resin-dentin bonds made with water or ethanol wet bonding. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;90(1):327-37.
4. Carvalho RM, Manso AP, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH. Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. *Dent Mater.* 2012;28(1):72-86.
5. Suppa P, Breschi L, Ruggeri A, Mazzotti G, Prati C, Chersoni S, et al. Nanoleakage within the hybrid layer: a correlative FEISEM/TEM investigation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;73(1):7-14.
6. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 2011;27(1):1-16.
7. Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjaderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, et al. Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res.* 2013;92(1):82-6.
8. Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater.* 2013;29(1):116-35.
9. Munchow EA, Bottino MC. Recent Advances in Adhesive Bonding - The Role of Biomolecules, Nanocompounds, and Bonding Strategies in Enhancing Resin Bonding to Dental Substrates. *Curr Oral Health Rep.* 2017;4(3):215-27.

² De acordo com Estilo Vancouver.

10. Munoz MA, Sezinando A, Luque-Martinez I, Szesz AL, Reis A, Loguercio AD, et al. Influence of a hydrophobic resin coating on the bonding efficacy of three universal adhesives. *J Dent.* 2014;42(5):595-602.
11. Perdigao J, Munoz MA, Sezinando A, Luque-Martinez IV, Staichak R, Reis A, et al. Immediate adhesive properties to dentin and enamel of a universal adhesive associated with a hydrophobic resin coat. *Oper Dent.* 2014;39(5):489-99.
12. Sezinando A, Luque-Martinez I, Munoz MA, Reis A, Loguercio AD, Perdigao J. Influence of a hydrophobic resin coating on the immediate and 6-month dentin bonding of three universal adhesives. *Dent Mater.* 2015;31(10):e236-46.
13. Venigalla BS, Jyothi P, Kamishetty S, Reddy S, Cherukupalli RC, Reddy DA. Resin bond strength to water versus ethanol-saturated human dentin pretreated with three different cross-linking agents. *J Conserv Dent.* 2016;19(6):555-9.
14. Gomes Franca FM, Vaneli RC, Conti Cde M, Basting RT, do Amaral FL, Turssi CP. Effect of Chlorhexidine and Ethanol Application on Long-term Push-out Bond Strength of Fiber Posts to Dentin. *J Contemp Dent Pract.* 2015;16(7):547-53.
15. de Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater.* 2000;16(2):103-8.
16. Kato MT, Bolanho A, Zarella BL, Salo T, Tjaderhane L, Buzalaf MA. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res.* 2014;93(1):74-7.
17. Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. *Dent Mater.* 2013;29(10):999-1011.
18. Bedran-Russo AK, Yoo KJ, Ema KC, Pashley DH. Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. *J Dent Res.* 2009;88(9):807-11.
19. Castellan CS, Pereira PN, Grande RH, Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent Mater.* 2010;26(10):968-73.

20. Castellan CS, Pereira PN, Viana G, Chen SN, Pauli GF, Bedran-Russo AK. Solubility study of phytochemical cross-linking agents on dentin stiffness. *J Dent.* 2010;38(5):431-6.
21. Lee J, Sabatini C. Glutaraldehyde collagen cross-linking stabilizes resin-dentin interfaces and reduces bond degradation. *Eur J Oral Sci.* 2017;125(1):63-71.
22. 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.
23. Souza IM, Araujo CS, Soares CJ, Faria ESAL. Effect of Dentin Pretreatment on Bond Strength Stability of Self-etching and Etch-and-Rinse Adhesives to Intracoronally Bleached Dentin. *J Adhes Dent.* 2016;18(4):349-54.
24. Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;94(1):250-5.
25. Mazzone A, Angeloni V, Apolonio FM, Scotti N, Tjaderhane L, Tezvergil-Mutluay A, et al. Effect of carbodiimide (EDC) on the bond stability of etch-and-rinse adhesive systems. *Dent Mater.* 2013;29(10):1040-7.
26. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Agee KA, Seseogullari-Dirihan R, Hoshika T, Cadenaro M, et al. Carbodiimide cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, in vitro. *J Dent Res.* 2012;91(2):192-6.
27. Carvalho C, Fernandes FP, Freitas Vda P, Franca FM, Basting RT, Turssi CP, et al. Effect of green tea extract on bonding durability of an etch-and-rinse adhesive system to caries-affected dentin. *J Appl Oral Sci.* 2016;24(3):211-7.
28. Liu N, Li F, Chen YJ, Zhang L, Lu S, Kang JJ, et al. The inhibitory effect of a polymerisable cationic monomer on functional matrix metalloproteinases. *J Dent.* 2013;41(11):1101-8.
29. Montagner AF, Sarkis-Onofre R, Pereira-Cenci T, Cenci MS. MMP Inhibitors on Dentin Stability: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res.* 2014;93(8):733-43.

30. Abu Nawareg M, Elkassas D, Zidan A, Abuelenain D, Abu Haimed T, Hassan AH, et al. Is chlorhexidine-methacrylate as effective as chlorhexidine digluconate in preserving resin dentin interfaces? *J Dent*. 2016;45:7-13.
31. Toman M, Toksavul S, Tamaç E, Sarikanat M, Karagözoğlu I. Effect of chlorhexidine on bond strength between glass-fiber post and root canal dentine after six month of water storage. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2014;22(1):29-34.
32. Chauhan K, Basavanna RS, Shivanna V. Effect of bromelain enzyme for dentin deproteinization on bond strength of adhesive system. *J Conserv Dent*. 2015;18(5):360-3.
33. Diolosa M, Donati I, Turco G, Cadenaro M, Di Lenarda R, Breschi L, et al. Use of methacrylate-modified chitosan to increase the durability of dentine bonding systems. *Biomacromolecules*. 2014;15(12):4606-13.
34. Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;86(2):330-4.
35. Fang M, Liu R, Xiao Y, Li F, Wang D, Hou R, et al. Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin-dentin bonds. *J Dent*. 2012;40(6):458-66.
36. Osorio R, Yamauti M, Sauro S, Watson TF, Toledano M. Experimental resin cements containing bioactive fillers reduce matrix metalloproteinase-mediated dentin collagen degradation. *J Endod*. 2012;38(9):1227-32.
37. Tezvergil-Mutluay A, Seseogullari-Dirihan R, Feitosa VP, Tay FR, Watson TF, Pashley DH, et al. Zoledronate and ion-releasing resins impair dentin collagen degradation. *J Dent Res*. 2014;93(10):999-1004.
38. Aggarwal V, Bhasin SS. Application of Calcium Silicate Materials After Acid Etching May Preserve Resin-Dentin Bonds. *Oper Dent*. 2018;43(5):E243-e52.
39. Profeta AC, Mannocci F, Foxton R, Watson TF, Feitosa VP, De Carlo B, et al. Experimental etch-and-rinse adhesives doped with bioactive calcium silicate-based micro-fillers to generate therapeutic resin-dentin interfaces. *Dent Mater*. 2013;29(7):729-41.

40. Braga RR. Calcium phosphates as ion-releasing fillers in restorative resin-based materials. *Dent Mater.* 2019;35(1):3-14.
41. Tezvergil-Mutluay A, Seseogullari-Dirihan R, Feitosa VP, Cama G, Brauer DS, Sauro S. Effects of Composites Containing Bioactive Glasses on Demineralized Dentin. *J Dent Res.* 2017;96(9):999-1005.
42. Sauro S, Osorio R, Watson TF, Toledano M. Therapeutic effects of novel resin bonding systems containing bioactive glasses on mineral-depleted areas within the bonded-dentine interface. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(6):1521-32.
43. Vollenweider M, Brunner TJ, Knecht S, Grass RN, Zehnder M, Imfeld T, et al. Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. *Acta Biomater.* 2007;3(6):936-43.
44. Carneiro KK, Araujo TP, Carvalho EM, Meier MM, Tanaka A, Carvalho CN, et al. Bioactivity and properties of an adhesive system functionalized with an experimental niobium-based glass. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018;78:188-95.
45. Profeta AC, Mannocci F, Foxton RM, Thompson I, Watson TF, Sauro S. Bioactive effects of a calcium/sodium phosphosilicate on the resin-dentine interface: a microtensile bond strength, scanning electron microscopy, and confocal microscopy study. *Eur J Oral Sci.* 2012;120(4):353-62.
46. Sauro S, Osorio R, Fulgencio R, Watson TF, Cama G, Thompson I, et al. Remineralisation properties of innovative light-curable resin-based dental materials containing bioactive micro-fillers. *J Mater Chem B.* 2013;1(20):2624-38.
47. Jang JH, Lee MG, Ferracane JL, Davis H, Bae HE, Choi D, et al. Effect of bioactive glass-containing resin composite on dentin remineralization. *J Dent.* 2018;75:58-64.
48. Par M, Gubler A, Attin T, Tarle Z, Tarle A, Taubock TT. Experimental Bioactive Glass-Containing Composites and Commercial Restorative Materials: Anti-Demineralizing Protection of Dentin. *Biomedicines.* 2021;9(11).

49. Bauer J, Silva ESA, Carvalho EM, Ferreira PVC, Carvalho CN, Manso AP, et al. Dentin pretreatment with 45S5 and niobophosphate bioactive glass: Effects on pH, antibacterial, mechanical properties of the interface and microtensile bond strength. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2019;90:374-80.
50. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater.* 2015;31(4):351-70.
51. Sauro S, Osorio R, Osorio E, Watson TF, Toledano M. Novel light-curable materials containing experimental bioactive micro-fillers remineralise mineral-depleted bonded-dentine interfaces. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2013;24(8):940-56.
52. Osorio R, Yamauti M, Sauro S, Watson TF, Toledano M. Zinc incorporation improves biological activity of beta-tricalcium silicate resin-based cement. *J Endod.* 2014;40(11):1840-5.
53. Fan W, Li Y, Sun Q, Ma T, Fan B. Calcium-silicate mesoporous nanoparticles loaded with chlorhexidine for both anti- *Enterococcus faecalis* and mineralization properties. *J Nanobiotechnology.* 2016;14(1):72.
54. Balbinot GS, Leitune VCB, Nunes JS, Visioli F, Collares FM. Synthesis of sol-gel derived calcium silicate particles and development of a bioactive endodontic cement. *Dent Mater.* 2020;36(1):135-44.
55. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res.* 2005;84(2):118-32.
56. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006;22(3):211-22.
57. 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.
58. Yiu CKY, Hiraishi N, Chersoni S, Breschi L, Ferrari M, Prati C, et al. Single-bottle adhesives behave as permeable membranes after polymerisation. II. Differential permeability reduction with an oxalate desensitiser. *Journal of Dentistry.* 2006;34(2):106-16.

59. Delaviz Y, Finer Y, Santerre JP. Biodegradation of resin composites and adhesives by oral bacteria and saliva: a rationale for new material designs that consider the clinical environment and treatment challenges. *Dent Mater.* 2014;30(1):16-32.
60. 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.
61. Sauro S, Pashley DH, Montanari M, Chersoni S, Carvalho RM, Toledano M, et al. Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dent Mater.* 2007;23(6):705-13.
62. Tay FR, Frankenberger R, Krejci I, Bouillaguet S, Pashley DH, Carvalho RM, et al. Single-bottle adhesives behave as permeable membranes after polymerization. I. In vivo evidence. *Journal of Dentistry.* 2004;32(8):611-21.
63. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Van Landuyt K, Yoshida Y, Peumans M. From Buonocore's Pioneering Acid-Etch Technique to Self-Adhering Restoratives. A Status Perspective of Rapidly Advancing Dental Adhesive Technology. *J Adhes Dent.* 2020;22(1):7-34.
64. King NM, Tay FR, Pashley DH, Hashimoto M, Ito S, Brackett WW, et al. Conversion of one-step to two-step self-etch adhesives for improved efficacy and extended application. *American journal of dentistry.* 2005;18(2):126-34.
65. Brackett WW, Ito S, Tay FR, Haisch LD, Pashley DH. Microtensile dentin bond strength of self-etching resins: effect of a hydrophobic layer. *Oper Dent.* 2005;30(6):733-8.
66. 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.
67. Tay FR, Pashley DH. Water treeing--a potential mechanism for degradation of dentin adhesives. *Am J Dent.* 2003;16(1):6-12.
68. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2002;62(3):447-56.

69. Ye Q, Park JG, Topp E, Wang Y, Misra A, Spencer P. In vitro performance of nano-heterogeneous dentin adhesive. *J Dent Res*. 2008;87(9):829-33.
70. Park JG, Ye Q, Topp EM, Kostoryz EL, Wang Y, Kieweg SL, et al. Preparation and Properties of Novel Dentin Adhesives with Esterase Resistance. *J Appl Polym Sci Symp*. 2008;107(6):3588-97.
71. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;147:1-73.
72. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(2):160-6.
73. Hickel R, Manhart J. Longevity of restorations in posterior teeth and reasons for failure. *J Adhes Dent*. 2001;3(1):45-64.
74. Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjaderhane L, et al. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res*. 2012;91(5):467-72.
75. 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.
76. Hashimoto M. A review--micromorphological evidence of degradation in resin-dentin bonds and potential preventional solutions. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;92(1):268-80.
77. Anchieta RB, Machado LS, Martini AP, Santos PH, Giannini M, Janal M, et al. Effect of long-term storage on nanomechanical and morphological properties of dentin-adhesive interfaces. *Dent Mater*. 2015;31(2):141-53.
78. Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, et al. Self-assembled Nano-layering at the Adhesive interface. *J Dent Res*. 2012;91(4):376-81.

79. Kiuru O, Sinervo J, Vahanikkila H, Anttonen V, Tjaderhane L. MMP Inhibitors and Dentin Bonding: Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Dent*. 2021;2021:9949699.
80. Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. *Aust Endod J*. 2009;35(3):131-9.
81. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, et al. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dent Mater*. 2010;26(8):771-8.
82. Loguercio AD, Stanislawczuk R, Malaquias P, Gutierrez MF, Bauer J, Reis A. Effect of Minocycline on the Durability of Dentin Bonding Produced with Etch-and-Rinse Adhesives. *Oper Dent*. 2016;41(5):511-9.
83. Li H, Li T, Li X, Zhang Z, Li P, Li Z. Morphological effects of MMPs inhibitors on the dentin bonding. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(7):10793-803.
84. Loguercio AD, Hass V, Gutierrez MF, Luque-Martinez IV, Szezs A, Stanislawczuk R, et al. Five-year Effects of Chlorhexidine on the In Vitro Durability of Resin/Dentin Interfaces. *J Adhes Dent*. 2016;18(1):35-42.
85. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *J Dent*. 2011;39(1):40-7.
86. Silva Sousa AB, Vidal CMP, Leme-Kraus AA, Pires-de-Souza FCP, Bedran-Russo AK. Experimental primers containing synthetic and natural compounds reduce enzymatic activity at the dentin-adhesive interface under cyclic loading. *Dent Mater*. 2016;32(10):1248-55.
87. Yiu CK, Hiraishi N, Tay FR, King NM. Effect of chlorhexidine incorporation into dental adhesive resin on durability of resin-dentin bond. *J Adhes Dent*. 2012;14(4):355-62.
88. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent*. 2007;32(2):107-11.

89. Mobarak EH. Effect of chlorhexidine pretreatment on bond strength durability of caries-affected dentin over 2-year aging in artificial saliva and under simulated intrapulpal pressure. *Oper Dent.* 2011;36(6):649-60.
90. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulp pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent.* 2009;37(2):108-14.
91. Zhou J, Tan J, Chen L, Li D, Tan Y. The incorporation of chlorhexidine in a two-step self-etching adhesive preserves dentin bond in vitro. *J Dent.* 2009;37(10):807-12.
92. De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(5):494-501.
93. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley DH, Tay FR, et al. Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants. *J Dent.* 2011;39(2):148-53.
94. Wang Y, Green A, Yao X, Liu H, Nisar S, Gorski JP, et al. Cranberry juice extract rapidly protects demineralized dentin against digestion and inhibits its gelatinolytic activity. *Materials.* 2021;14(13):3637.
95. Mazzoni A, Apolonio FM, Saboia VP, Santi S, Angeloni V, Checchi V, et al. Carbodiimide inactivation of MMPs and effect on dentin bonding. *J Dent Res.* 2014;93(3):263-8.
96. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res.* 2001;80(6):1545-9.
97. Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006;38(5):306-21.
98. Feitosa SA, Palasuk J, Kamocki K, Geraldeli S, Gregory RL, Platt JA, et al. Doxycycline-encapsulated nanotube-modified dentin adhesives. *J Dent Res.* 2014;93(12):1270-6.

99. Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, Cadenaro M, Tjaderhane L, et al. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dent Mater.* 2018;34(1):78-96.
100. Khamverdi Z, Rezaei-Soufi L, Rostamzadeh T. The Effect of Epigallocatechin Gallate on the Dentin Bond Durability of Two Self-etch Adhesives. *J Dent (Shiraz).* 2015;16(2):68-74.
101. Pupo YM, Farago PV, Nadal JM, Simao LC, Esmerino LA, Gomes OM, et al. Effect of a novel quaternary ammonium methacrylate polymer (QAMP) on adhesion and antibacterial properties of dental adhesives. *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):8998-9015.
102. Sabatini C, Ortiz PA, Pashley DH. Preservation of resin-dentin interfaces treated with benzalkonium chloride adhesive blends. *Eur J Oral Sci.* 2015;123(2):108-15.
103. Sabatini C, Pashley DH. Aging of adhesive interfaces treated with benzalkonium chloride and benzalkonium methacrylate. *Eur J Oral Sci.* 2015;123(2):102-7.
104. Stape THS, Tjaderhane L, Abuna G, Sinhoreti MAC, Martins LRM, Tezvergil-Mutluay A. Optimization of the etch-and-rinse technique: New perspectives to improve resin-dentin bonding and hybrid layer integrity by reducing residual water using dimethyl sulfoxide pretreatments. *Dent Mater.* 2018;34(7):967-77.
105. Stape THS, Mutluay MM, Tjaderhane L, Uurasjarvi E, Koistinen A, Tezvergil-Mutluay A. The pursuit of resin-dentin bond durability: Simultaneous enhancement of collagen structure and polymer network formation in hybrid layers. *Dent Mater.* 2021;37(7):1083-95.
106. Fronza BM, Braga RR, Cadenaro M. Dental Adhesives-Surface Modifications of Dentin Structure for Stable Bonding. *Dent Clin North Am.* 2022;66(4):503-15.
107. Vidal CM, Leme AA, Aguiar TR, Phansalkar R, Nam JW, Bisson J, et al. Mimicking the hierarchical functions of dentin collagen cross-links with plant derived phenols and phenolic acids. *Langmuir.* 2014;30(49):14887-93.

108. Liu Y, Dusevich V, Wang Y. Proanthocyanidins rapidly stabilize the demineralized dentin layer. *J Dent Res.* 2013;92(8):746-52.
109. Diolosà M, Donati I, Turco G, Cadenaro M, Di Lenarda R, Breschi L, et al. Use of methacrylate-modified chitosan to increase the durability of dentine bonding systems. *Biomacromolecules.* 2014;15(12):4606-13.
110. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res.* 2010;89(11):1187-97.
111. Bertassoni LE, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. Mechanical recovery of dentin following remineralization in vitro--an indentation study. *J Biomech.* 2011;44(1):176-81.
112. Makowski GS, Ramsby ML. Differential effect of calcium phosphate and calcium pyrophosphate on binding of matrix metalloproteinases to fibrin: comparison to a fibrin-binding protease from inflammatory joint fluids. *Clinical and experimental immunology.* 2004;136(1):176-87.
113. Jun SK, Yang SA, Kim YJ, El-Fiqi A, Mandakhbayar N, Kim DS, et al. Multi-functional nano-adhesive releasing therapeutic ions for MMP-deactivation and remineralization. *Sci Rep.* 2018;8(1):5663.
114. Sauro S, Watson TF, Thompson I, Banerjee A. One-bottle self-etching adhesives applied to dentine air-abraded using bioactive glasses containing polyacrylic acid: an in vitro microtensile bond strength and confocal microscopy study. *J Dent.* 2012;40(11):896-905.
115. Wu Z, Xiaokan W, Wang Z, Changyu S, Jin X, Zhang L, et al. Self-Etch Adhesive as a Carrier for ACP Nanoprecursors to Deliver Biomimetic Remineralization. *ACS applied materials & interfaces.* 2017;9.
116. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M, Wang J, Jiang T, Wang Y, et al. Polycarboxylated microfillers incorporated into light-curable resin-based dental adhesives evoke remineralization at the mineral-depleted dentin. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2014;25(7):679-97.
117. Bendary IM, Garcia IM, Collares FM, Takimi A, Samuel SMW, Leitune VCB. Wollastonite as filler of an experimental dental adhesive. *J Dent.* 2020;102:103472.

118. Lee JD. Química inorgânica não tão concisa. inglesa Tde, editor: Editora Edgard Blücher Ltda; 1999.

119. Schleier R, Galitesi CRL, Ferreira ECM. Silício e cálcio: uma abordagem antropológica. *Arte Med Ampl.* 2014;102-13.

120. Fonseca MGd, Airoidi C. Híbridos inorgânico-orgânicos derivados da reação de filossilicatos com organossilanos. *Química Nova.* 2003;26:699-707.

121. Shahsavari R, Chen L, Tao L. Edge dislocations in dicalcium silicates: Experimental observations and atomistic analysis. *Cement and Concrete Research.* 2016;90:80-8.

122. Wen J, Yeung Y-y, Ning L, Duan C-K, Huang Y, Zhang J, et al. Effects of vacancies on valence stabilities of europium ions in β -Ca₂SiO₄: Eu phosphors. *Journal of Luminescence.* 2016;178.

123. Yamnova NA, Zubkova NV, Eremin NN, Zadov AE, Gazeev VM. Crystal structure of Iarnite β -Ca₂SiO₄ and specific features of polymorphic transitions in dicalcium orthosilicate. *Crystallography Reports.* 2011;56(2):210-20.

124. Gobechiya E, Yamnova N, Zadov A, Gazeev V. Calcio-olivine γ -Ca₂SiO₄: I. Rietveld refinement of the crystal structure. *Crystallography Reports - CRYSTALLOGR REP.* 2008;53:404-8.

125. Taylor JC, Aldridge LP. Full-profile Rietveld quantitative XRD analysis of Portland cement: Standard XRD profiles for the major phase tricalcium silicate (C₃S: 3CaO.SiO₂). *Powder Diffraction.* 1993;8(3):138-44.

126. Jeffery JW. The crystal structure of tricalcium silicate. *Acta Crystallographica.* 1952;5(1):26-35.

127. Nishi F, Takeuchi Y, Maki I. Tricalcium Silicate Ca₃O[SiO₄]: The monoclinic superstructure. *Zeitschrift für Kristallographie - Crystalline Materials.* 1985;172(1-4):297-314.

128. Gobbo LdA. Os compostos do clínquer Portland: sua caracterização por difração de raios-X e quantificação por refinamento de Rietveld [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.

129. Klein; C, Dutrow B. Manual de Ciência dos Minerais. ed, editor. Porto Alegre Bookman; 2012.

130. Fernandes AdA. Síntese de Zeólitas e Wolastonita à partir da cinza da casca do arroz [tese. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2006.

131. Hazar ABY. Preparation and in vitro bioactivity of CaSiO₃ powders. *Ceramics International*. 2007;33(4):687-92.

132. Lin K, Chang J, Lu J. Synthesis of wollastonite nanowires via hydrothermal microemulsion methods. *Materials Letters*. 2006;60(24):3007-10.

133. Wang S, Peng X, Tang L, Zeng L, Lan C. Influence of Hydrothermal Synthesis Conditions on the Formation of Calcium Silicate Hydrates: from Amorphous to Crystalline Phases. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater Sci Ed*. 2018;33(5):1150-8.

134. Lakshmi R, Swamiappan S. Synthesis, Characterization and Bioactivity Studies of Calcium Silicate Bioceramics. *Advanced Materials Research*. 2012;584:479-83.

135. Kulkarni S, Nagabhushana BM, Suriya murthy N, Shivakumara C, Chakradhar RPS, Damle R. Synthesis, luminescence and EPR studies on CaSiO₃: Pb, Mn-nano phosphors synthesized by the solution combustion method. *Ceramics International*. 2013;39(2):1917-22.

136. Sreekanth Chakradhar RP, Nagabhushana BM, Chandrappa GT, Ramesh KP, Rao JL. Solution combustion derived nanocrystalline macroporous wollastonite ceramics. *Materials Chemistry and Physics*. 2006;95(1):169-75.

137. Saravanapavan P, Hench LL. Mesoporous calcium silicate glasses. I. Synthesis. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2003;318(1):1-13.

138. Fan W, Li Y, Sun Q, Ma T, Fan B. Calcium-silicate mesoporous nanoparticles loaded with chlorhexidine for both anti- *Enterococcus faecalis* and mineralization properties. *Journal of Nanobiotechnology*. 2016;14.

139. Lopes JH, Bueno O, Mazali IO, Bertran CA. Investigation of citric acid-assisted sol-gel synthesis coupled to the self-propagating combustion method for preparing bioactive glass with high structural homogeneity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;97:669-78.
140. Hench LL, West JK. The sol-gel process. *Chemical Reviews.* 1990;90(1):33-72.
141. Bellucci D, Sola A, Salvatori R, Anesi A, Chiarini L, Cannillo V. Sol-gel derived bioactive glasses with low tendency to crystallize: synthesis, post-sintering bioactivity and possible application for the production of porous scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;43:573-86.
142. Klein LC. Sol-gel technology for thin films, fibers, preforms, electronics and specialty shapes. . Noyes Publications, New Jersey, USA 1988;1:2.
143. Hayashi T, Saito H. Preparation of CaO-SiO₂ glasses by the gel method. *Journal of Materials Science.* 1980;15(8):1971-7.
144. Bansal NP. Influence of Several Metal Ions on the Gelation Activation Energy of Silicon Tetraethoxide. *Journal of the American Ceramic Society.* 1990;73(9):2647-52.
145. Lee BS, Lin HP, Chan JC, Wang WC, Hung PH, Tsai YH, et al. A novel sol-gel-derived calcium silicate cement with short setting time for application in endodontic repair of perforations. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:261-71.
146. Abdalla MM, Lung CYK, Neelakantan P, Matinlinna JP. A novel, doped calcium silicate bioceramic synthesized by sol-gel method: Investigation of setting time and biological properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2020;108(1):56-66.
147. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995;21(7):349-53.
148. Filling of a root canals with Portland cement. *Deutsche Vierteljahrsschrift für Zahnheilkunde.* 1878;18:153-4.

149. Braz MG, Camargo EA, Salvadori DM, Marques ME, Ribeiro DA. Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to mineral trioxide aggregate and Portland cements. *J Oral Rehabil.* 2006;33(3):234-9.
150. Juarez Broon N, Bramante CM, de Assis GF, Bortoluzzi EA, Bernardineli N, de Moraes IG, et al. Healing of root perforations treated with Mineral Trioxide Aggregate (MTA) and Portland cement. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(5):305-11.
151. Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *J Oral Sci.* 2007;49(1):41-5.
152. Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J Endod.* 2006;32(3):193-7.
153. Chattopadhyay B. *Smart. Nanoconcretes and Cement-Based Materials.* Kolkata, West Bengal: Presidency University; 2020.
154. Cuesta A, Ayuela A, Aranda MAG. Belite cements and their activation. *Cement and Concrete Research.* 2021;140:106319.
155. Parker G. *Encyclopedia of materials: science and technology.* 2001.
156. Ducheyne P. *Comprehensive biomaterials:* Elsevier; 2015.
157. Agamy HA, Bakry NS, Mounir MM, Avery DR. Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp-capping agents in pulpotomized primary teeth. *Pediatr Dent.* 2004;26(4):302-9.
158. Lin P-Y, Chen H-S, Wang Y-H, Tu Y-K. Primary molar pulpotomy: A systematic review and network meta-analysis. *Journal of Dentistry.* 2014;42(9):1060-77.
159. Petrou MA, Alhamoui FA, Welk A, Altarabulsi MB, Alkilzy M, C HS. A randomized clinical trial on the use of medical Portland cement, MTA and calcium hydroxide in indirect pulp treatment. *Clin Oral Investig.* 2014;18(5):1383-9.

160. Holland R, Bisco Ferreira L, de Souza V, Otoboni Filho JA, Murata SS, Dezan E, Jr. Reaction of the lateral periodontium of dogs' teeth to contaminated and noncontaminated perforations filled with mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2007;33(10):1192-7.
161. Hakki SS, Bozkurt SB, Ozcopur B, Purali N, Belli S. Periodontal ligament fibroblast response to root perforations restored with different materials: a laboratory study. *Int Endod J.* 2012;45(3):240-8.
162. Pairokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action. *Journal of Endodontics.* 2010;36(3):400-13.
163. Pontius V, Pontius O, Braun A, Frankenberger R, Roggendorf MJ. Retrospective evaluation of perforation repairs in 6 private practices. *J Endod.* 2013;39(11):1346-58.
164. Mente J, Hage N, Pfefferle T, Koch MJ, Geletneky B, Dreyhaupt J, et al. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate: repair of root perforations. *J Endod.* 2010;36(2):208-13.
165. Sarris S, Tahmassebi JF, Duggal MS, Cross IA. A clinical evaluation of mineral trioxide aggregate for root-end closure of non-vital immature permanent incisors in children—a pilot study. *Dent Traumatol.* 2008;24(1):79-85.
166. Pace R, Giuliani V, Nieri M, Di Nasso L, Pagavino G. Mineral Trioxide Aggregate as Apical Plug in Teeth with Necrotic Pulp and Immature Apices: A 10-year Case Series. *Journal of Endodontics.* 2014;40(8):1250-4.
167. Felipe WT, Felipe MC, Rocha MJ. The effect of mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Int Endod J.* 2006;39(1):2-9.
168. Katsamakidis S, Slot DE, Van der Sluis LW, Van der Weijden F. Histological responses of the periodontium to MTA: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2013;40(4):334-44.
169. Saunders WP. A prospective clinical study of periradicular surgery using mineral trioxide aggregate as a root-end filling. *J Endod.* 2008;34(6):660-5.

170. von Arx T, Hänni S, Jensen SS. 5-year Results Comparing Mineral Trioxide Aggregate and Adhesive Resin Composite for Root-end Sealing in Apical Surgery. *Journal of Endodontics*. 2014;40(8):1077-81.
171. Lindeboom JAH, Frenken JWFH, Kroon FHM, van den Akker HP. A comparative prospective randomized clinical study of MTA and IRM as root-end filling materials in single-rooted teeth in endodontic surgery. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2005;100(4):495-500.
172. Song M, Kim E. A Prospective Randomized Controlled Study of Mineral Trioxide Aggregate and Super Ethoxy–Benzoic Acid as Root-end Filling Materials in Endodontic Microsurgery. *Journal of Endodontics*. 2012;38(7):875-9.
173. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater*. 2013;29(2):e20-8.
174. Malkondu O, Karapinar Kazandag M, Kazazoglu E. A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. *Biomed Res Int*. 2014;2014:160951.
175. Asgary S, Shahabi S, Jafarzadeh T, Amini S, Kheirieh S. The properties of a new endodontic material. *J Endod*. 2008;34(8):990-3.
176. Koubi G, Colon P, Franquin JC, Hartmann A, Richard G, Faure MO, et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. *Clin Oral Investig*. 2013;17(1):243-9.
177. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int Endod J*. 2010;43(10):917-29.
178. Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Modena E, Ciapetti G, Prati C. Development of the foremost light-curable calcium-silicate MTA cement as root-end in oral surgery. Chemical–physical properties, bioactivity and biological behavior. *Dental Materials*. 2011;27(7):e134-e57.

179. Taddei P, Modena E, Tinti A, Siboni F, Prati C, Gandolfi MG. Vibrational investigation of calcium-silicate cements for endodontics in simulated body fluids. *Journal of Molecular Structure*. 2011;993(1):367-75.
180. Taddei P, Modena E, Tinti A, Siboni F, Prati C, Gandolfi MG. Effect of the fluoride content on the bioactivity of calcium silicate-based endodontic cements. *Ceramics International*. 2014;40(3):4095-107.
181. Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *Journal of endodontics*. 2009;35(5):731-6.
182. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, De Stefano Dorigo E, Rossi PL, Prati C. Kinetics of apatite formation on a calcium-silicate cement for root-end filling during ageing in physiological-like phosphate solutions. *Clin Oral Investig*. 2010;14(6):659-68.
183. Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, Bossu M, Riccitiello F, Prati C. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2015;13(1):43-60.
184. Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Prati C. Ion release, porosity, solubility, and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate. *J Endod*. 2014;40(10):1632-7.
185. Gandolfi MG, Pagani S, Perut F, Ciapetti G, Baldini N, Mongiorgi R, et al. Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblast-like cell response. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87(2):477-86.
186. Dreger LA, Felipe WT, Reyes-Carmona JF, Felipe GS, Bortoluzzi EA, Felipe MC. Mineral trioxide aggregate and Portland cement promote biomineralization in vivo. *J Endod*. 2012;38(3):324-9.
187. Reyes-Carmona JF, Santos AR, Figueiredo CP, Felipe MS, Felipe WT, Cordeiro MM. In vivo host interactions with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide: inflammatory molecular signaling assessment. *J Endod*. 2011;37(9):1225-35.

188. Bryan TE, Khechen K, Brackett MG, Messer RL, El-Awady A, Primus CM, et al. In vitro osteogenic potential of an experimental calcium silicate-based root canal sealer. *J Endod.* 2010;36(7):1163-9.

189. Gandolfi MG, Shah SN, Feng R, Prati C, Akintoye SO. Biomimetic calcium-silicate cements support differentiation of human orofacial mesenchymal stem cells. *J Endod.* 2011;37(8):1102-8.

190. Gandolfi MG, Ciapetti G, Taddei P, Perut F, Tinti A, Cardoso MV, et al. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dent Mater.* 2010;26(10):974-92.

191. Gandolfi MG, Ciapetti G, Perut F, Taddei P, Modena E, Rossi PL, et al. Biomimetic calcium-silicate cements aged in simulated body solutions. Osteoblast response and analyses of apatite coating. *J Appl Biomater Biomech.* 2009;7(3):160-70.

192. Seo MS, Hwang KG, Lee J, Kim H, Baek SH. The effect of mineral trioxide aggregate on odontogenic differentiation in dental pulp stem cells. *J Endod.* 2013;39(2):242-8.

193. Shen Q, Sun J, Wu J, Liu C, Chen F. An in vitro investigation of the mechanical-chemical and biological properties of calcium phosphate/calcium silicate/bismutite cement for dental pulp capping. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;94(1):141-8.

194. Tecles O, Laurent P, Aubut V, About I. Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;85(1):180-7.

195. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod.* 2004;30(4):218-9.

196. Siqueira JF, Jr., Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999;32(5):361-9.

197. Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. *J Endod.* 2010;36(6):1042-7.

198. Dammaschke T, Stratmann U, Wolff P, Sagheri D, Schafer E. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an immunohistologic comparison with calcium hydroxide in rodents. *J Endod.* 2010;36(5):814-9.

199. Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with Mineral Trioxide Aggregate: a randomized controlled trial. 2008. *Int Endod J.* 2009;42(5):422-44.

200. Bogen G, Kim JS, Bakland LK. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an observational study. *J Am Dent Assoc.* 2008;139(3):305-15; quiz -15.

201. Accorinte MLR, Loguercio AD, Reis A, Bauer JRO, Grande RHM, Murata SS, et al. Evaluation of two mineral trioxide aggregate compounds as pulp-capping agents in human teeth. *International Endodontic Journal.* 2009;42(2):122-8.

202. Mente J, Geletneky B, Ohle M, Koch MJ, Friedrich Ding PG, Wolff D, et al. Mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: an analysis of the clinical treatment outcome. *J Endod.* 2010;36(5):806-13.

203. Gandolfi MG, Van Landuyt K, Taddei P, Modena E, Van Meerbeek B, Prati C. Environmental scanning electron microscopy connected with energy dispersive x-ray analysis and Raman techniques to study ProRoot mineral trioxide aggregate and calcium silicate cements in wet conditions and in real time. *J Endod.* 2010;36(5):851-7.

204. Gandolfi MG, Taddei P, Modena E, Siboni F, Prati C. Biointeractivity-related versus chemi/physisorption-related apatite precursor-forming ability of current root end filling materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(7):1107-23.

205. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine™ induces TGF-β1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *International Endodontic Journal.* 2012;45(5):439-48.

206. Tziafa C, Koliniotou-Koumpia E, Papadimitriou S, Tzias D. Dentinogenic responses after direct pulp capping of miniature swine teeth with Biodentine. *J Endod.* 2014;40(12):1967-71.

207. Brizuela C, Ormeno A, Cabrera C, Cabezas R, Silva CI, Ramirez V, et al. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial. *J Endod.* 2017;43(11):1776-80.

208. Katge FA, Patil DP. Comparative Analysis of 2 Calcium Silicate-based Cements (Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate) as Direct Pulp-capping Agent in Young Permanent Molars: A Split Mouth Study. *J Endod.* 2017;43(4):507-13.

209. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2013;39(6):743-7.

210. Arandi NZ, Rabi T. TheraCal LC: From Biochemical and Bioactive Properties to Clinical Applications. *Int J Dent.* 2018;2018:3484653.

211. Camilleri J, Laurent P, About I. Hydration of Biodentine, Theracal LC, and a prototype tricalcium silicate-based dentin replacement material after pulp capping in entire tooth cultures. *J Endod.* 2014;40(11):1846-54.

212. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Chemical-physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *Int Endod J.* 2012;45(6):571-9.

213. Camilleri J. Hydration characteristics of Biodentine and Theracal used as pulp capping materials. *Dent Mater.* 2014;30(7):709-15.

214. Chailertvanitkul P, Paphangkorakit J, Sooksantisakoonchai N, Pumas N, Pairojamornyoot W, Leela-Apiradee N, et al. Randomized control trial comparing calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate for partial pulpotomies in cariously exposed pulps of permanent molars. *Int Endod J.* 2014;47(9):835-42.

215. Lee H, Shin Y, Kim SO, Lee HS, Choi HJ, Song JS. Comparative Study of Pulpal Responses to Pulpotomy with ProRoot MTA, RetroMTA, and TheraCal in Dogs' Teeth. *J Endod.* 2015;41(8):1317-24.

216. Cannon M, Gerodias N, Viera A, Percinoto C, Jurado R. Primate pulpal healing after exposure and TheraCal application. *J Clin Pediatr Dent.* 2014;38(4):333-7.

217. Gopika G, Ramarao S, Sathyanarayanan U, John B, Vezhavendhan N. Histological evaluation of human pulp capped with light-cured calcium based cements: a randomized controlled clinical trial. *International Journal of Scientific Reports*. 2017.
218. Bakhtiar H, Nekoofar MH, Aminishakib P, Abedi F, Naghi Moosavi F, Esnaashari E, et al. Human Pulp Responses to Partial Pulpotomy Treatment with TheraCal as Compared with Biodentine and ProRoot MTA: A Clinical Trial. *J Endod*. 2017;43(11):1786-91.
219. Tay FR, Pashley DH. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. *Biomaterials*. 2008;29(8):1127-37.
220. Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Modena E, De Stefano ED, Prati C. Biomimetic remineralization of human dentin using promising innovative calcium-silicate hybrid "smart" materials. *Dental Materials*. 2011;27(11):1055-69.
221. Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, et al. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater*. 2014;30(1):77-96.
222. Qi YP, Li N, Niu LN, Primus CM, Ling JQ, Pashley DH, et al. Remineralization of artificial dentinal caries lesions by biomimetically modified mineral trioxide aggregate. *Acta Biomater*. 2012;8(2):836-42.
223. Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*. 1938;60(2):309-19.
224. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED. Improved properties of amorphous calcium phosphate fillers in remineralizing resin composites. *Dent Mater*. 1996;12(5):295-301.
225. Lee SY, Regnault WF, Antonucci JM, Skrtic D. Effect of particle size of an amorphous calcium phosphate filler on the mechanical strength and ion release of polymeric composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;80(1):11-7.
226. Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, et al. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res A*. 2008;84(1):19-29.

227. AbuReqaiba A, Matinlinna J, Choi A, A.A.A R. Fracture strength and fractographic analysis of zirconia copings treated with four experimental silane primers. *Journal of Adhesion Science and Technology - J ADHES SCI TECHNOL.* 2012;27:1-13.

228. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials.* 2006;27(15):2907-15.

229. White A. *Principles of Biochemistry.* 4th ed: New York: McGraw Hill Book Company; 1968.

230. Wohllebe M, Carmichael DJ. Biochemical characterization of guanidinium chloride-soluble dentine collagen from lathyrtic-rat incisors. *Biochem J.* 1979;181(3):667-76.

231. Bornstein P, Sage H. Structurally distinct collagen types. *Annu Rev Biochem.* 1980;49:957-1003.

232. Taskiran D, Taşkiran E, Yercan H, Kutay Z. Quantification of Total Collagen in Rabbit Tendon by the Sirius Red Method. *Turkish Journal of Medical Sciences.* 1999;29:7-9.

233. Bye GC, Ceramics Io. *Portland Cement: Composition, Production, and Properties:* Pergamon Press; 1983.

234. Utrap A, Pielmeier MRP, Lange T, Gädt T, Nilges T. An Ordered Alite Cement Clinker Phase (Ca_3SiO_5 , aP162) from Flux Synthesis. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie.* 2021;647(22):2105-12.

235. Ropp RC. Chapter 3 - Group 16 (O, S, Se, Te) Alkaline Earth Compounds. In: Ropp RC, editor. *Encyclopedia of the Alkaline Earth Compounds.* Amsterdam: Elsevier; 2013. p. 105-97.

236. Zheng K, Boccaccini AR. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review. *Advances in Colloid and Interface Science.* 2017;249:363-73.

237. Baino F, Fiorilli S, Vitale-Brovarone C. Composite Biomaterials Based on Sol-Gel Mesoporous Silicate Glasses: A Review. *Bioengineering (Basel).* 2017;4(1).

238. Fan W, Li Y, Sun Q, Ma T, Fan B. Calcium-silicate mesoporous nanoparticles loaded with chlorhexidine for both anti- *Enterococcus faecalis* and mineralization properties. *Journal of Nanobiotechnology*. 2016;14(1):72.
239. Choi HW, Um S-H, Rhee S-H. Synthesis of a $\text{Ca}_3\text{SiO}_5\text{-Ca}_2\text{SiO}_4\text{-Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$ cement system with rapid setting capacity by spray-pyrolysis coupled with sol-gel method. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2019;107(5):1440-51.
240. Radwan MM, Nagi SM, Abd El-Hamid HK. Physico-mechanical characteristics of tri-calcium silicate pastes as dentin substitute and interface analysis in class II cavities: effect of CaCl_2 and SBF solutions. *Heliyon*. 2019;5(6):e01975.
241. Heriyanto, Pahlevani F, Sahajwalla V. Synthesis of calcium silicate from selective thermal transformation of waste glass and waste shell. *Journal of Cleaner Production*. 2018;172:3019-27.
242. Nicoleau L, Nonat A, Perrey D. The di- and tricalcium silicate dissolutions. *Cement and Concrete Research*. 2013;47:14-30.
243. Bansal NP. Low temperature synthesis of CaO-SiO_2 glasses having stable liquid-liquid immiscibility by the sol-gel process. *Journal of Materials Science*. 1992;27(11):2922-33.
244. Venkateswara Rao A, Bhagat SD. Synthesis and physical properties of TEOS-based silica aerogels prepared by two step (acid-base) sol-gel process. *Solid State Sciences*. 2004;6(9):945-52.
245. Lakshmi R, Sasikumar S. Synthesis, Characterization and Bioactivity Studies of Calcium Silicate Bioceramics. *Advanced Materials Research*. 2012;584:479-83.
246. Mohd Yusop H, Mohd Ismail AIH, Wan Ismail WN. Preparation and Characterization of New Sol-Gel Hybrid Inulin-TEOS Adsorbent. *Polymers (Basel)*. 2021;13(8).
247. Mastuli MS, Ansari NS, Nawawi MA, Mahat AM. Effects of Cationic Surfactant in Sol-gel Synthesis of Nano Sized Magnesium Oxide. *APCBEE Procedia*. 2012;3:93-8.

248. Zhou J, Yang S, Yu J. Facile fabrication of mesoporous MgO microspheres and their enhanced adsorption performance for phosphate from aqueous solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011;379(1):102-8.
249. Esmaeili E, Khodadadi A, Mortazavi Y. Microwave-induced combustion process variables for MgO nanoparticle synthesis using polyethylene glycol and sorbitol. *J Eur Ceram Soc*. 2009;29(6):1061-8.
250. Wu C, Chang J, Fan W. Bioactive mesoporous calcium–silicate nanoparticles with excellent mineralization ability, osteostimulation, drug-delivery and antibacterial properties for filling apex roots of teeth. *Journal of Materials Chemistry*. 2012;22(33):16801-9.
251. Fan W, Wu D, Tay FR, Ma T, Wu Y, Fan B. Effects of adsorbed and templated nanosilver in mesoporous calcium-silicate nanoparticles on inhibition of bacteria colonization of dentin. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:5217-30.
252. Pandey AK, Biswas K. Effect of agglomeration and calcination temperature on the mechanical properties of yttria stabilized zirconia (YSZ). *Ceramics International*. 2014;40(9, Part A):14111-7.
253. Berent K, Komarek S, Lach R, Pyda W. The Effect of Calcination Temperature on the Structure and Performance of Nanocrystalline Mayenite Powders. *Materials (Basel)*. 2019;12(21).
254. Garcia IM, Leitune VCB, Ferreira CJ, Collares FM. Tantalum oxide as filler for dental adhesive resin. *Dent Mater J*. 2018;37(6):897-903.
255. Leitune VC, Collares FM, Takimi A, de Lima GB, Petzhold CL, Bergmann CP, et al. Niobium pentoxide as a novel filler for dental adhesive resin. *J Dent*. 2013;41(2):106-13.
256. Garcia IM, Leitune VCB, Takimi AS, Bergmann CP, Samuel SMW, Melo MA, et al. Cerium Dioxide Particles to Tune Radiopacity of Dental Adhesives: Microstructural and Physico-Chemical Evaluation. *J Funct Biomater*. 2020;11(1).

257. Shortall AC, Palin WM, Burtscher P. Refractive index mismatch and monomer reactivity influence composite curing depth. *J Dent Res*. 2008;87(1):84-8.
258. Par M, Spanovic N, Mohn D, Attin T, Tauböck TT, Tarle Z. Curing potential of experimental resin composites filled with bioactive glass: A comparison between Bis-EMA and UDMA based resin systems. *Dent Mater*. 2020;36(6):711-23.
259. Sample Dispersion and Refractive Index Guide
https://warwick.ac.uk/fac/cross_fac/sciencecity/programmes/internal/themes/am2/booking/particlesize/sample_dispersion_refractive_index_guide.pdf:
Malvern Instruments Ltd; 2007.
260. Yang SY, Han AR, Kim KM, Kwon JS. Acid neutralizing and remineralizing orthodontic adhesive containing hydrated calcium silicate. *J Dent*. 2022;123:104204.
261. Collares FM, Ogliairi FA, Zanchi CH, Petzhold CL, Piva E, Samuel SM. Influence of 2-hydroxyethyl methacrylate concentration on polymer network of adhesive resin. *J Adhes Dent*. 2011;13(2):125-9.
262. Takahashi A, Sato Y, Uno S, Pereira PN, Sano H. Effects of mechanical properties of adhesive resins on bond strength to dentin. *Dent Mater*. 2002;18(3):263-8.
263. Profeta AC. Preparation and properties of calcium-silicate filled resins for dental restoration. Part I: chemical-physical characterization and apatite-forming ability. *Acta Odontol Scand*. 2014;72(8):597-606.
264. Yiu CK, King NM, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Carrilho MR, et al. Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. *Biomaterials*. 2004;25(26):5789-96.
265. Chiari MDS, Alania Y, Bedran-Russo AK, Braga RR. Experimental dentin adhesives containing calcium orthophosphate particles: Effect on dentin bond strength, micro-permeability and collagen degradation. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2021;107:102828.

266. Sauro S, Osorio R, Watson TF, Toledano M. Influence of phosphoproteins' biomimetic analogs on remineralization of mineral-depleted resin-dentin interfaces created with ion-releasing resin-based systems. *Dent Mater.* 2015;31(7):759-77.
267. Profeta AC. Preparation and properties of calcium-silicate filled resins for dental restoration. Part II: Micro-mechanical behaviour to primed mineral-depleted dentine. *Acta Odontol Scand.* 2014;72(8):607-17.
268. Zhang L, Weir MD, Hack G, Fouad AF, Xu HH. Rechargeable dental adhesive with calcium phosphate nanoparticles for long-term ion release. *J Dent.* 2015;43(12):1587-95.
269. Chen C, Weir MD, Cheng L, Lin NJ, Lin-Gibson S, Chow LC, et al. Antibacterial activity and ion release of bonding agent containing amorphous calcium phosphate nanoparticles. *Dent Mater.* 2014;30(8):891-901.
270. Rodrigues MC, Chiari MDS, Alania Y, Natale LC, Arana-Chavez VE, Meier MM, et al. Ion-releasing dental restorative composites containing functionalized brushite nanoparticles for improved mechanical strength. *Dent Mater.* 2018;34(5):746-55.
271. Kovalčíková M, Estokova A. Leaching of calcium and silicon from cement composites in the aggressive environment. *Pollack Periodica.* 2014;9:123-30.
272. Niu LN, Jiao K, Wang TD, Zhang W, Camilleri J, Bergeron BE, et al. A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements. *J Dent.* 2014;42(5):517-33.
273. Han L, Okiji T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. *Int Endod J.* 2011;44(12):1081-7.
274. Thomas NL, Double DD. Calcium and silicon concentrations in solution during the early hydration of portland cement and tricalcium silicate. *Cement and Concrete Research.* 1981;11(5):675-87.
275. Pan M, Li Z, Xu J, Lei Y, Shu C, Lao W, et al. Release of Interface Confined Water Significantly Improves Dentin Bonding. *J Dent Res.* 2023:220345231161006.

276. Braga R, Habelitz S. Current Developments on Enamel and Dentin Remineralization. *Current Oral Health Reports*. 2019;6.
277. Nunes MCP, de Souza Procelli IC, Franco EB. Influence of different storage media on the microhardness of composite resins. *Oral Sciences*. 2015;7-13.
278. Rosa R, Balbinot C, Blando E, Mota E, Oshima H, Hirakata L, et al. Evaluation of mechanical properties on three nanofilled composites. *Stomatologija / issued by public institution "Odontologijos studija" [et al]*. 2012;14:126-30.
279. Ozcan S, Yikilgan I, Uctasli MB, Bala O, Bek Kurklu ZG. Comparison of time-dependent changes in the surface hardness of different composite resins. *Eur J Dent*. 2013;7(Suppl 1):S020-S5.
280. Yanikoglu N, Duymus ZY, Yilmaz B. Effects of different solutions on the surface hardness of composite resin materials. *Dent Mater J*. 2009;28(3):344-51.
281. Watts DC, Amer OM, Combe EC. Surface hardness development in light-cured composites. *Dent Mater*. 1987;3(5):265-9.
282. Erdemir U, Yildiz E, Eren MM, Ozel S. Surface hardness evaluation of different composite resin materials: influence of sports and energy drinks immersion after a short-term period. *J Appl Oral Sci*. 2013;21(2):124-31.
283. Yap AU, Low JS, Ong LF. Effect of food-simulating liquids on surface characteristics of composite and polyacid-modified composite restoratives. *Operative dentistry*. 2000;25(3):170-6.
284. Nicholson JW, Gjorgievska E, Bajraktarova B, McKenzie MA. Changes in properties of polyacid-modified composite resins (compomers) following storage in acidic solutions. *J Oral Rehabil*. 2003;30(6):601-7.
285. Yesilyurt C, Yoldas O, Altintas SH, Kusgoz A. Effects of food-simulating liquids on the mechanical properties of a silorane-based dental composite. *Dent Mater J*. 2009;28(3):362-7.

286. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Study of water sorption, solubility and modulus of elasticity of light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*. 2003;24(4):655-65.

287. Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Influence of water-storage time on the sorption and solubility behavior of current adhesives and primer/adhesive mixtures. *Oper Dent*. 2007;32(1):53-9.

288. Yiu CKY, King NM, Carrilho MRO, Sauro S, Rueggeberg FA, Prati C, et al. Effect of resin hydrophilicity and temperature on water sorption of dental adhesive resins. *Biomaterials*. 2006;27(9):1695-703.

289. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dental Materials*. 2006;22(10):973-80.

290. Marchesi G, Navarra CO, Cadenaro M, Carrilho MR, Codan B, Sergio V, et al. The effect of ageing on the elastic modulus and degree of conversion of two multistep adhesive systems. *Eur J Oral Sci*. 2010;118(3):304-10.

291. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials*. 2005;26(33):6449-59.

292. Carrilho MR, Tay FR, Pashley DH, Tjaderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater*. 2005;21(3):232-41.

293. Featherstone JD. Modeling the caries-inhibitory effects of dental materials. *Dent Mater*. 1996;12(3):194-7.

294. Dong Z, Chang J, Deng Y, Joiner A. In vitro remineralization of acid-etched human enamel with Ca₃SiO₅. *Applied Surface Science*. 2010;256(8):2388-91.

295. Thomas JJ, Jennings HM, Chen JJ. Influence of Nucleation Seeding on the Hydration Mechanisms of Tricalcium Silicate and Cement. *J Phys Chem C*. 2009;113(11):4327-34.

296. Nakazawa Y, Seino E, Ushiki T, Ogata T, Hirai Y, Kawada E, et al. Microhardness evaluations of resin-dentin bonding areas by nano-indentation. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1999;40(1):47-54.
297. Habelitz S, Marshall GW, Jr., Balooch M, Marshall SJ. Nanoindentation and storage of teeth. *J Biomech.* 2002;35(7):995-8.
298. Altinci P, Mutluay M, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A. Inhibition of dentin matrix-bound cysteine cathepsins by potassium fluoride. *Eur J Oral Sci.* 2019;127(1):1-9.
299. Prestes Dornelles R, Golunski SM, Toniazzo G, Kempka A, Luccio M. CARACTERIZAÇÃO DA FIBRA DE COLÁGENO, GELATINA E COLÁGENO HIDROLISADO. *Rev Bras Prod Agro.* 2013;15:375-82.
300. Carmona AK, Juliano MA, Juliano L. The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. *Anais Academia Bras de Ciências.* 2009;81.
301. Rifane TO, Cordeiro KEM, Silvestre FA, Souza MT, Zanotto ED, Araujo-Neto VG, et al. Impact of silanization of different bioactive glasses in simplified adhesives on degree of conversion, dentin bonding and collagen remineralization. *Dent Mater.* 2023;39(2):217-26.
302. Chung L, Dinakarandian D, Yoshida N, Lauer-Fields JL, Fields GB, Visse R, et al. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *EMBO J.* 2004;23(15):3020-30.
303. Nagase H, Fushimi K. Elucidating the function of non catalytic domains of collagenases and aggrecanases. *Connect Tissue Res.* 2008;49(3):169-74.
304. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Paakkonen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod.* 2010;36(3):475-81.
305. Zhang SC, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci.* 2009;1(4):163-76.

306. Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res*. 2011;90(4):506-11.

307. Kim YK, Mai S, Mazzoni A, Liu Y, Tezvergil-Mutluay A, Takahashi K, et al. Biomimetic remineralization as a progressive dehydration mechanism of collagen matrices--implications in the aging of resin-dentin bonds. *Acta Biomater*. 2010;6(9):3729-39.

308. Kremer EA, Chen Y, Suzuki K, Nagase H, Gorski JP. Hydroxyapatite Induces Autolytic Degradation and Inactivation of Matrix Metalloproteinase-1 and -3. *J Bone Miner Res*. 1998;13(12):1890-902.

309. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004;83(3):216-21.

APÊNDICE A – Descrição e caracterização das sínteses preliminares

As sínteses iniciais foram realizadas através método sol-gel com *template* de surfactante³. As variáveis e constantes das sínteses são apresentadas na Figura Apêndice 1. A utilização de moléculas orgânicas (surfactantes) funcionam como direcionadores de estrutura formando um material compósito ordenado orgânico-inorgânico. O surfactante é removido pela calcinação, o que geralmente promove a formação de uma rede porosa na estrutura cristalina. Após a calcinação por 4 horas a 550 °C (velocidade de aquecimento 5 °C/min), o produto das sínteses das realizadas em meio alcalino apresentaram coloração acinzentada, indicando a presença de carbono proveniente do surfactante. Dessa forma, optou-se pela a calcinação a 800 °C/4 horas, na qual todas as sínteses apresentaram-se livres de estruturas carbonatadas.

O DRX (Figura Apêndice 2) das sínteses realizadas com estequiometria 1:2 evidenciou formação de sílica pura (síntese ácida) e estrutura amorfa (síntese básica) sendo ambas excluídas dos testes subsequentes. O DRX das sínteses realizadas com estequiometria 1:1 ou 2:1 indicaram formação de misturas de silicatos de cálcio (Ca_2SiO_4 e Ca_3SiO_5).

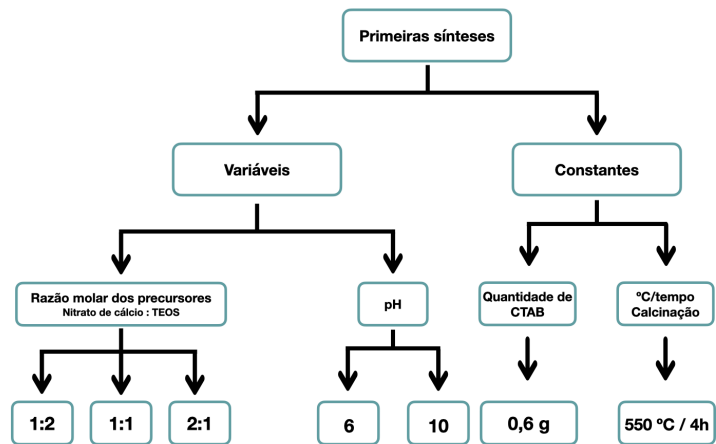
Para decisão em relação às sínteses futuras, as partículas provenientes das sínteses ácidas e básicas com razão molar dos precursores 1:1 e 2:1, foram adicionadas em 10% em massa a uma matriz orgânica constituída por dimetacrilato de glicidila bisfenol-A (BisGMA) e dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) na proporção de 1:1 em mols, 0,5% em peso de canforoquinona e 0,5% em peso de benzoato de 4-dimetilamino de etila (EDMAB) como fotoiniciadores (todos os compostos da Sigma–Aldrich). Para cada material, foram confeccionados corpos de prova em formato de discos para cada material (5x1mm, n=5). Os corpos de prova foram imersos individualmente em 5 mL de água deionizada e armazenados a 37 °C por 7 dias. As concentrações iônicas de cálcio foram determinadas por espectrometria de emissão óptica por

³ Santana LP, Almeida ESd, Soares JL, Vichi FM. Low temperature synthesis of CdSiO_3 nanostructures. J Braz Chem Soc.22(10):2013-7.

plasma acoplado indutivamente (ICP-OES Radial, Spectro Arcos/AMETEK Materials Analysis Division). Inicialmente, foram construídas curvas de calibração com pontos entre 1 e 20 ppm, utilizando-se soluções-padrão (SpecSol Quimlab) em diferentes diluições. Previamente à análise, as soluções foram filtradas e acidificadas com 5 μ L de HNO₃. As leituras de cálcio foram realizadas utilizando a emissão espectral de 396,847 nm. As médias e desvios-padrão de cada grupo são apresentadas na Tabela Apêndice 1. De acordo com com as concentrações de cálcio mensuradas, quanto maior adição de nitrato de cálcio na síntese mais promissoras as partículas em relação a liberação iônica. Dessa forma, optou-se por seguir com sínteses na razão molar 2:1 e, como novo experimento, 3:1 (Figura Apêndice 3). Além disso, baseado em estudo que sintetizou partículas de SC com tamanhos médios $79,5 \pm 13,3$ e $78,6 \pm 11,1$ nm, um aumento na quantidade de CTAB adicionada a síntese foi testada como uma nova variável (238). Os novos DRX indicaram, novamente, formação de misturas de silicatos de cálcio, diferindo na intensidade dos picos (Figura Apêndice 4), entretanto as imagens de MEV indicaram presença de aglomerados grandes para as sínteses realizadas com maior quantidade de CTAB, dessa forma essa variável foi excluída das sínteses subsequentes.

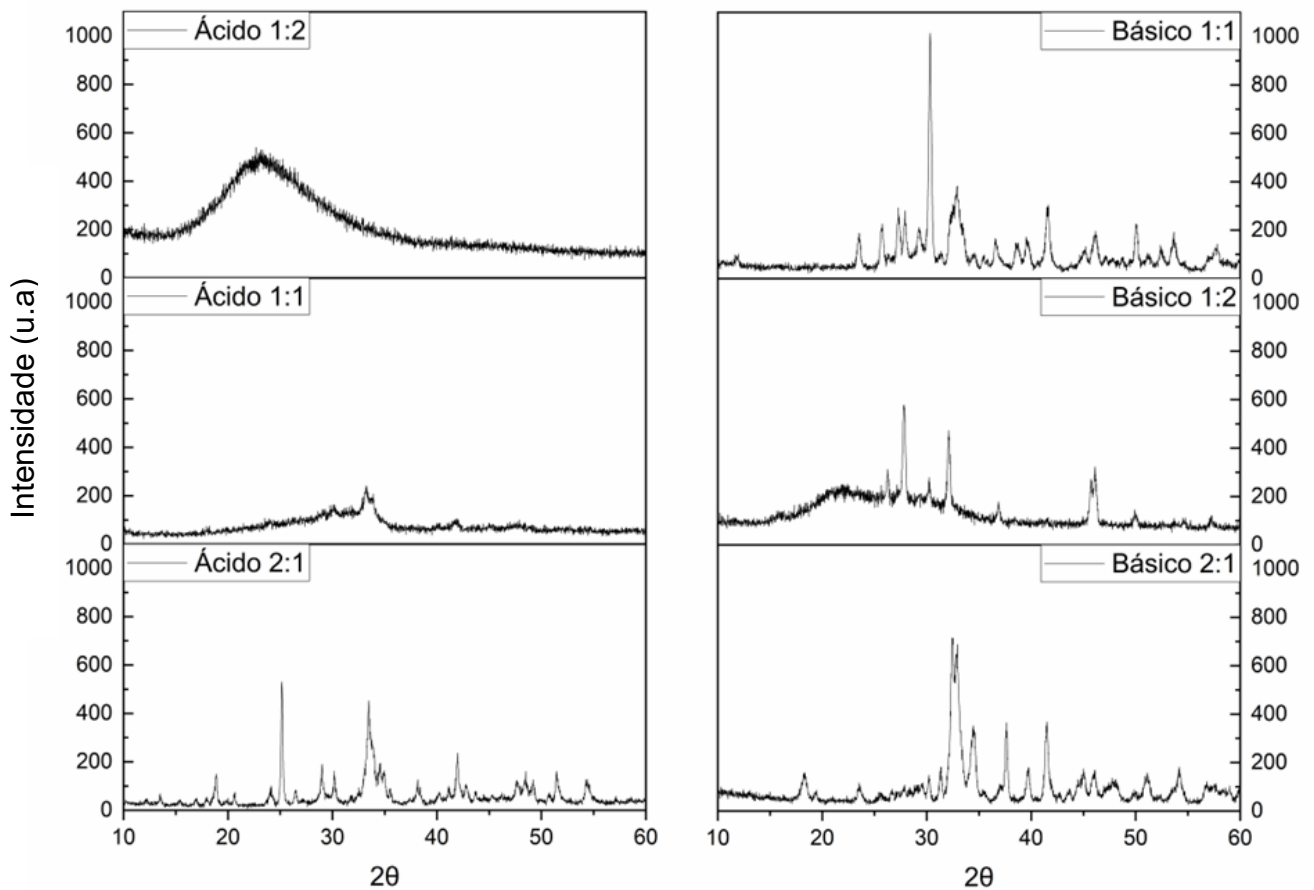
De acordo com os resultados das últimas análises, foram propostas a realização de novas sínteses mantendo as razões molares dos precursores 2:1 e 3:1, 0,6 gramas de CTAB, temperatura de síntese a 80 °C, meios ácido e alcalino e temperatura de calcinação em 800 °C/4horas. As variáveis adicionadas foram 1,2 gramas de CTAB e temperatura de síntese de 24 °C (238). A metodologia de caracterização e os resultados dessas dezesseis sínteses são apresentados nas seções 4.1 e 5.1, respectivamente.

Figura Apêndice 1 - Fluxograma das variáveis e constantes utilizadas nas primeiras sínteses



Fonte: A autora.

Figura Apêndice 2 - Difratogramas das primeiras sínteses



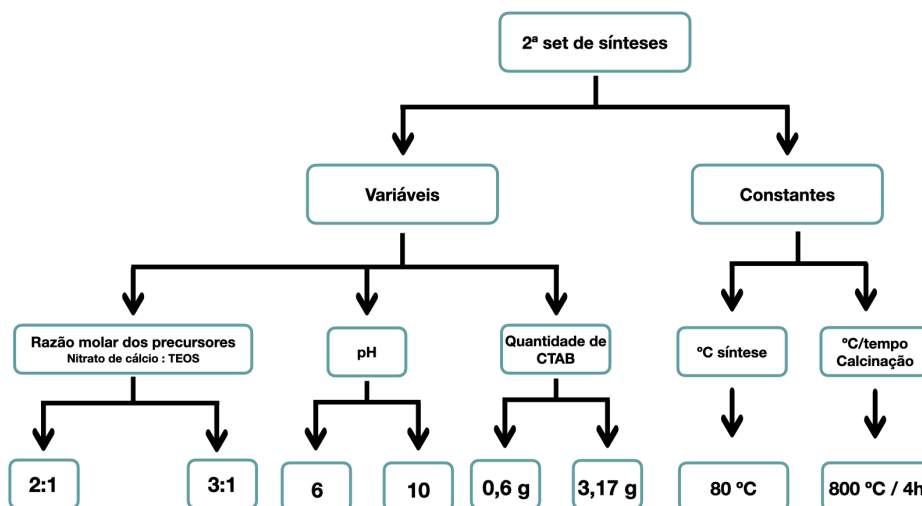
Fonte: A autora.

Tabela apêndice 1 - Médias e desvios-padrão para os dados de liberação de íons cálcio no período de 7 dias (determinados em ICP-OES, n=5) de um compósito experimental 10% em massa das partículas sintetizadas nos meios ácido e alcalino, com as razões molares de 1:1 e 2:1

Material	Cálcio (ppm)
Ácido 1:1	6,7 (0,8)
Ácido 2:1	11,3 (4,8)
Alcalino 1:1	6,5 (0,7)
Alcalino 2:1	7,6 (1,8)

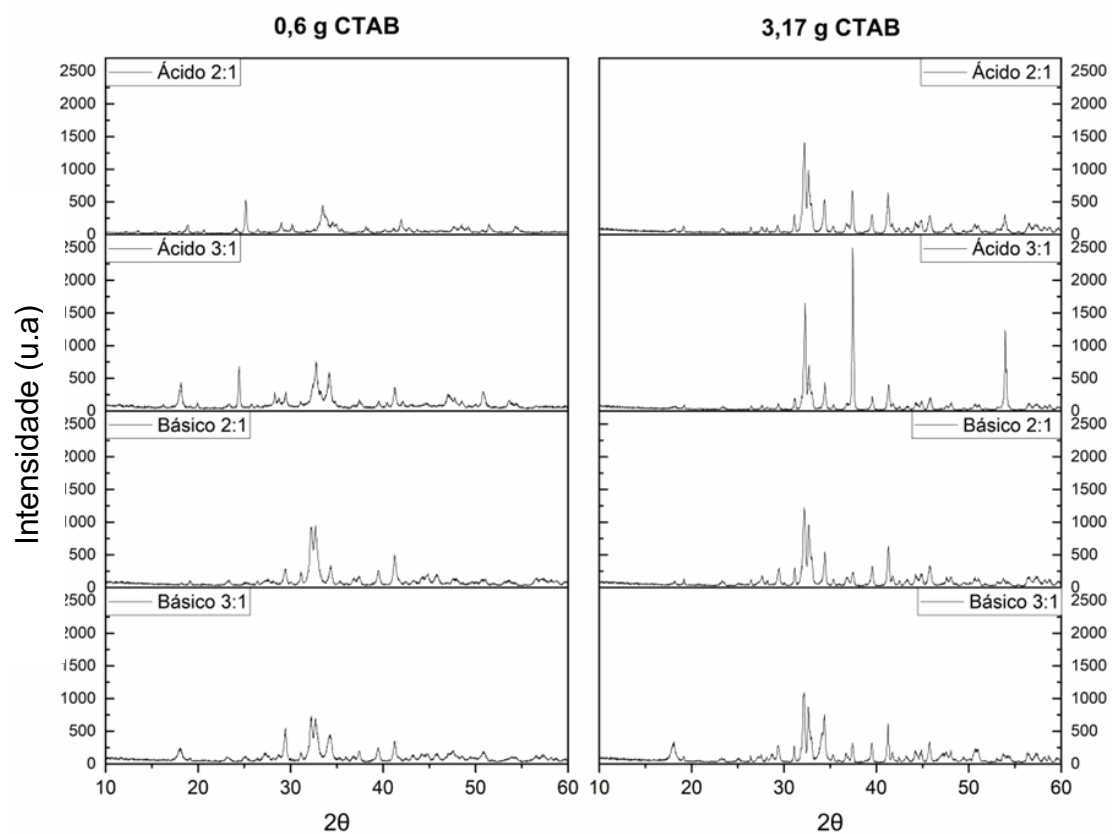
Fonte: A autora.

Figura apêndice 3 - Fluxograma das variáveis e constantes utilizadas no segundo conjunto de sínteses



Fonte: A autora.

Figura apêndice 4 - Difratomogramas do segundo set de sínteses



Fonte: A autora.

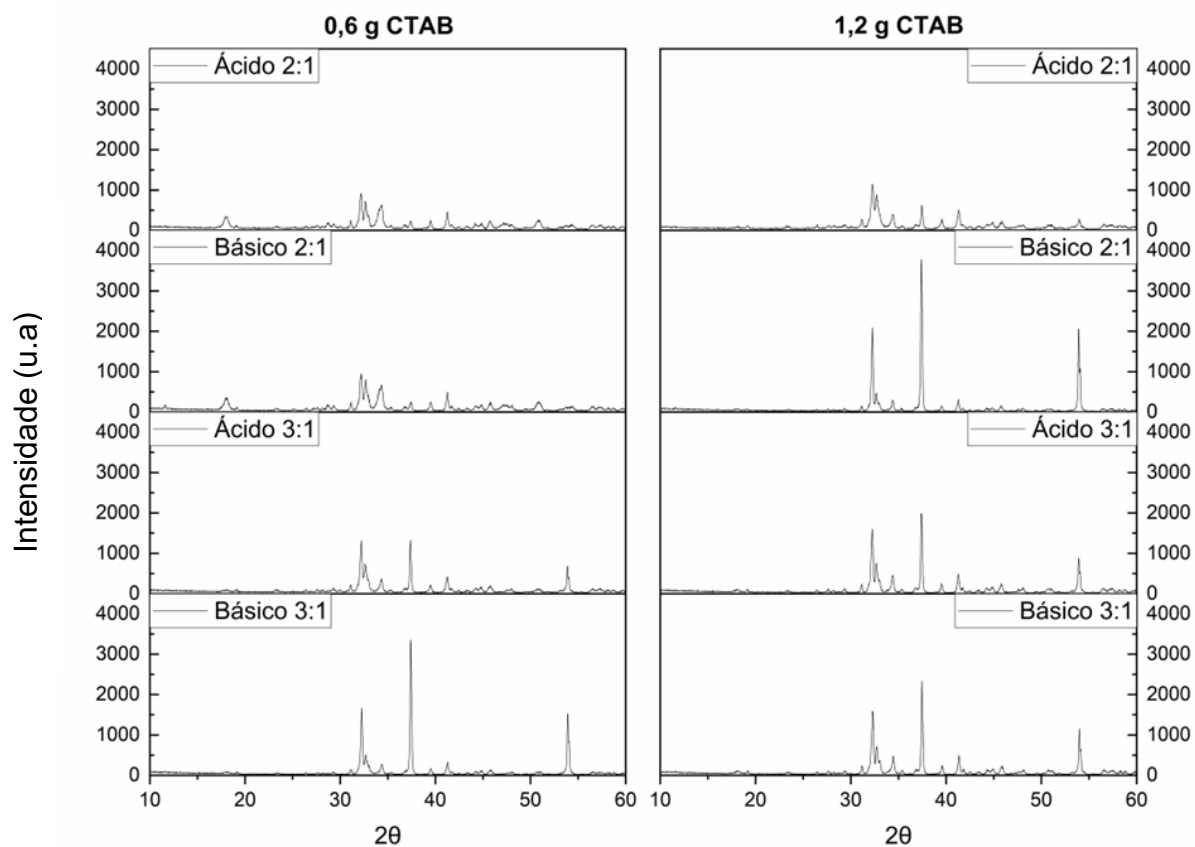
APÊNDICE B - Difratogramas das sínteses realizadas nas condições descritas na seção 4.1

Tabela apêndice 2 - Massa ou volume dos reagentes utilizados nas sínteses realizadas nas condições descritas na seção 4.1

Reagentes	Proporção entre os reagentes (Nitrato:TEOS)	
	2:1	3:1
CTAB	0,6 ou 1,2 g	0,6 ou 1,2 g
Nitrato de cálcio (Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O)	8,1297 g	12,1945 g
TEOS (Si(OC ₂ H ₅) ₄)	3,8 mL	3,8 mL

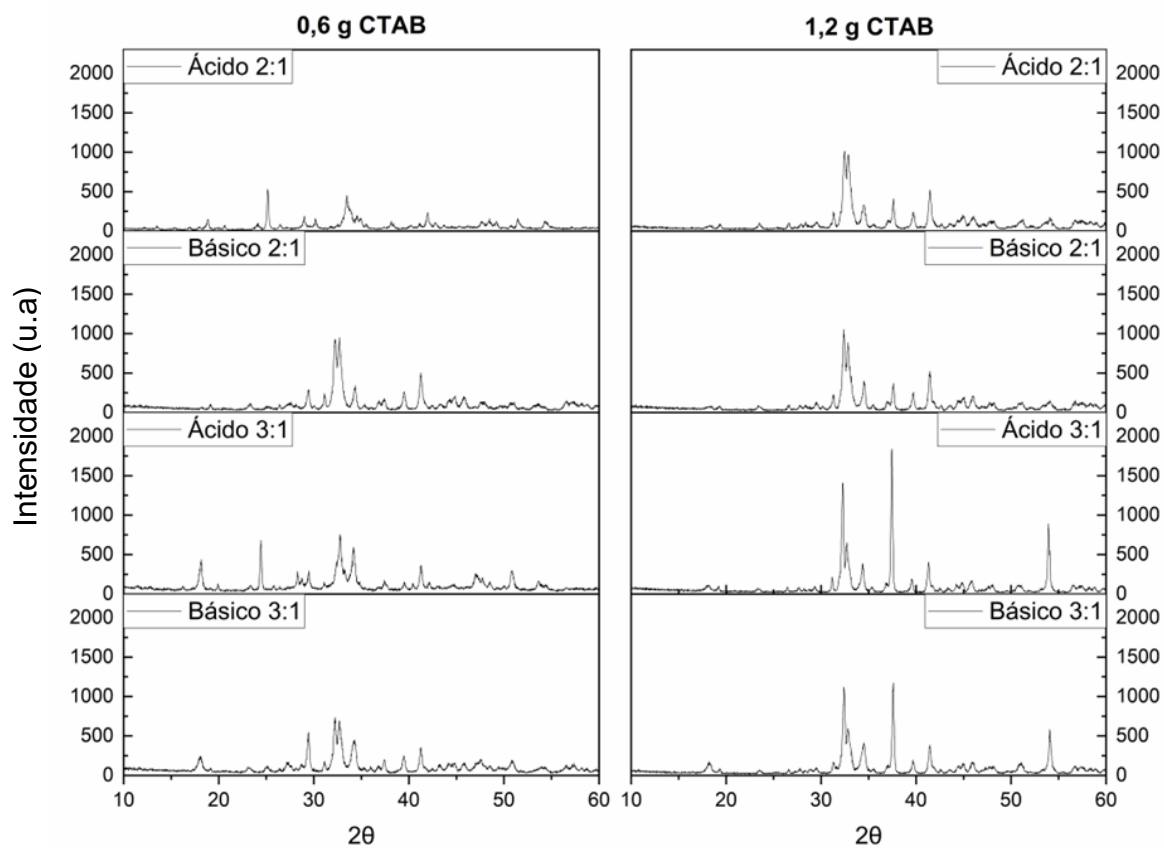
Fonte: A autora.

Figura apêndice 5 - Difratogramas das sínteses realizadas em 24 °C



Fonte: A autora.

Figura apêndice 6 - Difratomogramas das sínteses realizadas em 80 °C.



Fonte: A autora.

APÊNDICE C – Descrição dos estudos preliminares em adesivos

Dezesseis grupos experimentais foram manipulados seguindo o delineamento de dois fatores: fração em massa de solvente (EtOH, Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda) nos níveis de 0, 10, 20 e 30% e fração em massa de silicato de cálcio (nos níveis de 0, 5, 10 e 15%). Para todos os grupos, a matriz orgânica continha 68,75% de bisfenol-A glicidil metacrilato (BisGMA), 20% de trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA), 10% de HEMA (2-hidroxietil metacrilato), 0,25% de canforoquinona e 1% de etil-4 dimetilamino benzoato (EDMAB. Porcentagens em massa. Todos os compostos da Sigma–Aldrich). Os monômeros foram misturados a vácuo (Speedmixer DAC 150.1 FVZ-K, FlackTek Inc., Landrum, SC, EUA) e mantidos sob refrigeração até duas horas antes de sua utilização. As partículas de silicato de cálcio foram adicionadas à mistura monomérica e, por último, foi adicionado o etanol. Os componentes foram misturados em um misturador tipo vortex por 1 minuto (Fisher Scientific - New Jersey, NJ, EUA). Os grupos experimentais foram testados quanto ao seu grau de conversão e resistência coesiva.

Grau de conversão e cinética de polimerização

A cinética de polimerização e o grau de conversão dos sistemas adesivos foi determinado através de espectroscopia de infra-vermelho médio (Vertex 70; Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemanha) associado a uma unidade de refletância total atenuada (ATR, Bruker Optik GmbH). 30 µL de adesivo (n = 5) foram aplicados no interior de um molde de silicone com 0,3 mm de espessura posicionado sobre o cristal do ATR. Um jato de ar foi aplicado durante 90 s para evaporação do solvente. A polimerização foi realizada a 1000 mW/cm² por 40 s (Valo Grand Cordless, Ultradent, UT, EUA) com uma distância padronizada de 1 mm entre a superfície de amostra e a ponta do fotopolimerizador. A cinética foi analisada por 10 minutos (detector MID-IR/MIR) após a polimerização em no intervalo de comprimentos entre 4000-400 cm⁻¹,

pela co-adição de 4 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} . GC foi calculado utilizando-se a razão entre a altura das bandas correspondentes à ligação dupla de carbono alifática (1638 cm^{-1}) e ligações de carbono no anel aromático (1608 cm^{-1} , utilizadas como referência interna), usando a seguinte equação:

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

A primeira derivada da curva “GC x tempo” foi utilizada na determinação da taxa máxima de polimerização (R_p^{max}). O grau de conversão em R_p^{max} ($GC@R_p^{\text{max}}$), indicativo do momento em que a reação entra em desaceleração (ou seja, inicia-se a vitrificação do polímero) também foi identificado. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA / Tukey de dois fatores (alfa: 5%). As médias e o desvio padrão para GC, R_p^{max} e $GC@R_p^{\text{max}}$ são apresentados na Tabela apêndice 3. Para GC e $GC@R_p^{\text{max}}$, ambos os fatores e a interação foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$). No geral, os adesivos contendo etanol apresentaram valores de GC mais elevados do que os adesivos sem solvente. O conteúdo de partículas não afetou o GC para os grupos com 0, 10% e 30% EtOH. Por outro lado, para o grupo com 20% EtOH, a adição de 5% ou 10% de silicato de cálcio causou reduções no GC. O GC mais elevado foi observado quando 15% de partículas foram adicionadas ao adesivo com 20% EtOH. Para R_p^{max} , apenas os fatores foram significativos ($p < 0,001$). A adição de partículas (independentemente da proporção utilizada) reduziu significativamente o R_p^{max} do adesivo. Da mesma forma, a presença de etanol em qualquer proporção também reduziu o R_p^{max} . Quando presentes na formulação, não houve diferença entre os diferentes níveis de partícula ou de etanol. Os valores de $GC@R_p^{\text{max}}$ não apresentaram muitas diferenças estatisticamente significantes entre grupos. No entanto, de modo geral os grupos sem EtOH apresentaram valores mais altos do que os demais.

Tabela apêndice 3 - Médias e desvios-padrão para GC, Rp^{max} e $GC@Rp^{max}$. As mesmas letras maiúsculas indicam ausência de diferença significativa na mesma coluna (ANOVA / Tukey, $p > 0,05$)

Grupo		GC %	Rp^{max}	$GC@Rp^{max}$
%EtOH	%SC			
0	0	64,4 (1,7)DE	7,6 (0,8)A	39,9 (0,9)A
	5	65,2 (0,9)CDE	8,0 (0,8)A	37,7 (2,8)AB
	10	64,3 (0,7)DE	5,9 (1,5)ABC	36,5 (9,0)AB
	15	62,0 (4,7)E	6,4 (0,5)AB	34,0 (6,7)AB
10	0	76,1 (2,8)B	5,4 (2,0)ABCD	24,1 (2,2)ABCDE
	5	73,5 (1,1)BCD	3,6 (0,6)BCDE	22,1 (4,4)BCDE
	10	70,9 (2,8) BCDE	2,6 (0,3)DE	13,7 (1,4)CDE
	15	68,0 (5,1)BCDE	3,2 (2)CDE	14,5 (4,7)CDE
20	0	76,4 (1,3)B	4,4 (0,9)BCDE	23,8 (4,1)ABCDE
	5	64,2 (4,8)DE	2,0 (0,2)E	10,0 (1,2)E
	10	68,0 (4,8)BCDE	2,3 (0,4)E	12,6 (4,9)CDE
	15	86,4 (1,8)A	2,8 (0,3)DE	26,5 (10,7)ABCD
30	0	75,4 (1,8)BC	5,5 (1,5)ABCD	27,8 (6,2)ABC
	5	71,8 (4,8) BCDE	2,3 (0,1)E	15,9 (5,0)CDE
	10	74,0 (4,8)BCD	2,8 (0,6)DE	16,0 (7,1)CDE
	15	73,0 (4,0)BCD	2,1 (0,2)E	10,9 (1,9)DE

Fonte: A autora.

Resistência coesiva e resistência de união à microtração

Foi observado que os adesivos contendo 30% em massa de EtOH não polimerizavam na camada mais profunda dos espécimes. Sendo assim, o ensaio de resistência coesiva foi realizado somente com 12 grupos, sendo excluídas as formulações com 30% de EtOH. Os espécimes (n=5) foram confeccionados e fraturados de acordo com o descrito na seção 4.5.2. Os resultados de resistência coesiva para esses grupos são apresentados na Tabela apêndice 4. Para os adesivos sem solvente, a presença de partículas não reduziu a resistência coesiva. Para os adesivos sem partícula não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, independente do nível de solvente. Nos adesivos com SC, o aumento do

conteúdo de EtOH promoveu reduções na resistência, estatisticamente significantes em alguns grupos. Da mesma forma, a presença de SC resultou em menores médias, com diferenças estatisticamente significantes para os adesivos 10% EtOH com 15% SC e 20% EtOH com 10% SC. Dentre os grupos contendo etanol e partículas, o material que continha 10% EtOH e 10% SC foi o que apresentou melhores resultados e, portanto, selecionado para o teste de microtração. Como controle foi utilizado o material com a mesma porcentagem de etanol, porém sem partículas. Três dentes foram restaurados seguindo o protocolo descrito na seção 4.6.2. Os dentes restaurados foram armazenados em 15 mL de FCS a 37 °C por 24 horas e, em seguida, seccionados perpendicularmente à interface adesivo-dentinária de acordo com o descrito na seção 4.7.1 com o objetivo de se obter espécimes em formato de palitos (0,8x0,8 mm²). Entretanto, todos os palitos fraturaram durante o corte, impossibilitando a realização do teste. Devido a esse resultado, optou-se pela utilização de um sistema adesivo comercial. A maioria dos adesivos comerciais contém partículas de reforço, havendo um aumento significativo de viscosidade quando as partículas de SC são adicionadas. Dessa forma, optou-se por utilizar um sistema adesivo comercial padrão-ouro de três passos sem partículas de reforço, no caso Adper Scotchbond Multipurpose (3M ESPE). Para definição da porcentagem em massa de SC a ser adicionada no adesivo, foi avaliada resistência de união à microtração do sistema adesivo com a adição de 0, 5 ou 10% em massa de partículas no material contido no frasco 3 do sistema, denominado "Adhesive" (n=2). Os resultados obtidos foram (em MPa): 0% SC: 41,2±24,0; 5% SC: 52,4 ±3,4 e 10% SC: 42,0 ±17,5. Sendo assim, a porcentagem de 5% foi escolhida para utilização nos outros testes do estudo.

Tabela apêndice 4 - Médias e desvios-padrão para resistência coesiva dos 12 grupos de adesivos experimentais. Valores seguidos de da mesma letra maiúscula em uma coluna em indicam ausência de diferença estatisticamente significativa. Valores seguidos da mesma letra minúscula em uma linha indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis/Dunn, $p > 0,05$)

% SC	% EtOH		
	0	10	20
0	53,0 (19,4) Aa	38,9 (15,0) Aa	33,6 (15,2) Aa
5	44,8 (4,4) Aa	30,6 (10,3) Ab	21,2 (6,9) ABb
10	31,4 (6,9) Aa	31,1 (3,8) ABa	16,7 (5,0) Bb
15	40,5 (10,2) Aa	26,2 (6,2) Bb	23,7 (3,1) ABb

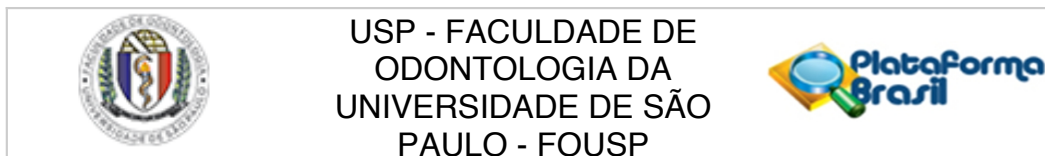
Fonte: A autora.

Tabela apêndice 5 - Composição Adper Scotchbond Multipurpose (3M ESPE). Informações disponíveis no site do fabricante, acessível em https://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=SSSSSuUn_zu8I00xmx2xNxtBPv70k17zHvu9lxtD7SSSSSS--. A composição exata incluindo pesos e componentes é sigilo comercial

Frasco	Composição (% em peso)
Primer (Frasco 2)	40 – 50 % Água
	35 – 45 % HEMA
	10 – 20 % copolímero de ácidos acrílicos e itacônicos
Adesivo (Frasco 3)	55 – 65 % BisGMA
	35 – 45% HEMA
	<0,5% EDMAB

Fonte: A autora.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e aplicação de nanopartículas de silicato de cálcio para remineralização dentinária

Pesquisador: MARINA DAMASCENO E SOUZA DE CARVALHO CHIARI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 38741220.3.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.322.648

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto que visa a investigar o efeito de variáveis da síntese de nanopartículas de silicato de cálcio (SC) obtidas pelo método sol-gel em sistemas adesivos.

Objetivo da Pesquisa:

Testar a hipótese nula que a presença de partículas de silicato de cálcio no adesivo ou a utilização de um primer a base de SC não interfere no desempenho da interface adesiva a longo prazo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

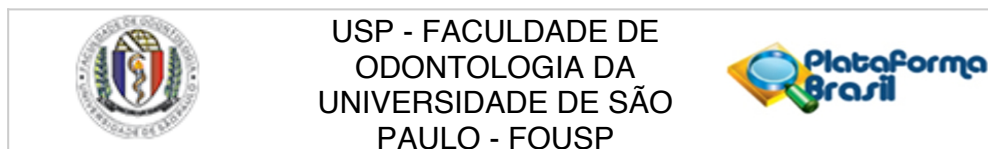
Os pesquisadores destacam que a pesquisa não causará desconfortos ou riscos aos sujeitos da pesquisa uma vez que os dentes a serem utilizados foram extraídos previamente por outras razões alheias a esta pesquisa e serão cedidos pelo banco de dentes (Biobanco) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Serão observados ainda para a segurança dos pesquisadores os cuidados de biossegurança pertinentes à manipulação de material biológico. Considerada pois a análise de material de biobanco os benefícios da pesquisa se voltam ao aperfeiçoamento de métodos restauradores em odontologia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem delineada e relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 4.322.648

Apresentados, projeto completo, folha de rosto, declaração do biobanco que fornecerá o material de estudo, justificativa para dispensa de TCLE (material de biobanco, declaração de infraestrutura, declaração de compromisso / comentários éticos dos pesquisadores).

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou óbices éticos

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1639400.pdf	01/10/2020 10:58:57		Aceito
Outros	Comentarios_eticos.pdf	01/10/2020 10:41:25	MARINA DAMASCENO E SOUZA DE CARVALHO CHIARI	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biobanco.pdf	01/10/2020 10:40:20	MARINA DAMASCENO E SOUZA DE CARVALHO CHIARI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/10/2020 10:40:09	MARINA DAMASCENO E SOUZA DE CARVALHO CHIARI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	01/10/2020 10:39:54	MARINA DAMASCENO E SOUZA DE CARVALHO CHIARI	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_dos_pesquisadores.pdf	01/10/2020 10:39:40	MARINA DAMASCENO E	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FOU SP



Continuação do Parecer: 4.322.648

Declaração de Pesquisadores	Declaracao_dos_pesquisadores.pdf	01/10/2020 10:39:40	SOUZA DE CARVALHO CHIARI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_infraestrutura.pdf	01/10/2020 10:39:24	MARINA DAMASCENO E SOUZA DE CARVALHO CHIARI	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	01/10/2020 10:38:27	MARINA DAMASCENO E SOUZA DE CARVALHO CHIARI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 06 de Outubro de 2020

Assinado por:
Alyne Simões Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br