LUIZ FILIPE BARBOSA MARTINS

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA UNIÃO À DENTINA DESMINERALIZADA PÓS-TRATAMENTOS REMINERALIZADORES

Piracicaba
2014

Universidade Estadual De Campinas
Faculdade De Odontologia De Piracicaba

LUIZ FILIPE BARBOSA MARTINS

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA UNIÃO À DENTINA DESMINERALIZADA PÓS-TRATAMENTOS REMINERALIZADORES

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Odontopediatria.

Orientador (a): Profa. Dra. Regina Maria Puppin Rontani

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Luiz Filipe Barbosa Martins e orientada pela Profa. Dra. Regina Maria Puppin Rontani.

_____
Assinatura do Orientador

Piracicaba
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Barbosa-Martins, Luiz Filipe, 1989-
B234a Avaliação da resistência da união à dentina desmineralizada pós-tratamentos remineralizadores / Luiz Filipe Barbosa Martins. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Regina Maria Puppin Rontani.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Remineralização dentária. 2. Resistência à tração. 3. Dentina. I. Puppin-Rontani, Regina Maria,1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of bond strength to demineralized dentin after remineralized treatment
Palavras-chave em inglês:
Tooth remineralization
Tensile strength
Dentin
Área de concentração: Odontopediatria
Titulação: Mestre em Odontologia
Banca examinadora:
Regina Maria Puppin Rontani [Orientador]
Lidiany Karla Azevedo Rodrigues
Mario Alexandre Coelho Sinhoreti
Data de defesa: 10-06-2014
Programa de Pós-Graduação: Odontologia

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 10 de Junho de 2014, considerou o candidato LUIZ FILIPE BARBOSA MARTINS aprovado.

Profa. Dra. REGINA MARIA PUPPIN RONTANI

Profa. Dra. LIDIANY KARLA AZEVEDO RODRIGUES

Prof. Dr. MARIO ALEXANDRE COELHO SINHORETI

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos agentes remineralizadores Fluoreto de Sódio (NaF) a 0,2%, MI Paste™ e Curodont™ Repair sobre a dentina desmineralizada e diferentes sistemas adesivos (Adper™ single Bond 2 (SB) (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) e Clearfil™ SE Bond (CSE) (Kuraray Co., Tokyo, Japan), por meio da avaliação da resistência da união à microtração. A amostra consistiu de 60 terceiros molares livres de cárie. A superfície dentinária foi exposta por meio de disco diamantado e polidas com lixas de carboneto de silício e congelados em solução tampão fosfato até o uso. Os dentes foram aleatoriamente distribuídos em 10 grupos (n=6) de acordo com o tratamento da superfície dentinária: 1. DH/SB - Dentina hígida; 2. DH/CSE - Dentina hígida; 3. DD/SB – Dentina Desmineralizada; 4. DD/CSE – Dentina Desmineralizada; 5. DR/SB - NaF a 0,2% por 1min; 6. DR/SB - NaF a 0,2% por 1min; 7. DR/SB - MI Paste™ por 1 min; 8. DR/CSE - MI Paste™ por 1 min; 9. DR/SB - Curodont™ Repair; 10. DR/CSE - Curodont™ Repair. Em 48 dentes a superfície dentinária foi submetida a aplicação de gel ácido (6% de carboximetilcelulose e ácido lático 0,1M com solução concentrada de KOH em pH5,0), simulando a dentina afetada por cárie. O procedimento adesivo/restaurador foi realizado foi realizado de acordo com os grupos experimentais, respeitando-se a aplicação do agente remineralizador e blocos de 4mm de altura de compósito foram construídos (Filtek Z350^{XT}) e estocados em água deionizada por 24h, sendo seccionados em palitos (1mm^2 - área secção), perpendicularmente a área de união, sendo submetidos ao teste de µTBS em 1,0mm/min e carga de 50kgF. Os sítios de fratura foram avaliados em MEV (50x e 150x). Os dados de µTBS (MPa) foram submetidos à ANOVA-two way e ao teste de Tukey ($p<0,05$). Os maiores valores de resistência de união a microtração foram obtidos quando a dentina desmineralizada foi tratada com MI Paste e Sistema CSE que não diferiram daqueles obtidos quando a dentina desmineralizada foi tratada com MI Paste/SB e Curodont Repair/SB e os menores valores foram obtidos para o mesmo adesivo quando utilizado o Curodent Repair, que não diferiram da dentina desmineralizada tratada com ambos sistemas adesivos. O tipo de fratura variou de acordo com o sistema adesivo e tratamento da dentina, sendo observados maiores percentuais de fratura Coesiva no compósito para a dentina hígida/SB, dentina hígida/CSE, Adesiva para a dentina desmineralizada/SB, dentina desmineralizada tratada com Curodont Repair/CSE, Mista para a dentina desmineralizada/NaF/SB, dentina desmineralizada/MI Paste/SB, dentina desmineralizada/Curodont Repair/SB, Coesiva na dentina para a dentina desmineralizada/MIPaste/CSE. Com base nos resultados obtidos e dentro dos limites do presente estudo pôde-se concluir que a utilização de agentes remineralizadores na dentina mostra-se uma alternativa favorável, em curto prazo, aos procedimentos adesivos. Quando utilizados o sistema adesivo Adper™ Single Bond 2 associado ao tratamento da superfície desmineralizada com Curodont™ Repair ou MI Paste™ ou ainda Clearfil™ SE Bond associado a MI Paste™ foram observados os maiores valores de resistência da união resina/dentina.

Palavras-Chaves: resistência à tração, dentina, remineralização.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effect of remineralizing agents such as sodium fluoride (NaF) at 0.2%, MI Paste™ or Curodont™ Repair on demineralized dentin and different adhesive systems (Adper ™ Single Bond 2 (SB) (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) and (Clearfil ™ SE Bond (CSE) (Kuraray Co., Tokyo, Japan) for the microtensile bond strength (μTBS). Sixty human third molars with mid-coronal portion of dentin exposed were randomized in 10 groups (n=6) according to factors studied (substrate): 1. SD/SB – Sound Dentin; 2. SD/CSE - Sound Dentin; 3. DD/SB – Demineralized Dentin; 4. DD/CSE - Demineralized Dentin; 5. RD/SB - Dentin Remineralized with 0.2% NaF for 1 min; 6. RD/CSE - Dentin Remineralized with 0.2% NaF for 1 min; 7. RD/SB - Dentin Remineralized with MI Paste™ for 1min; 8. RD/CSE - Dentin remineralized with MI Paste™ for 1min; 9. RD/SB – Dentin remineralized with Curodont™ Repair - for 5min; and 10. RD/CSE – Dentin remineralized with Curodont™ Repair - for 5min. Before dentin treatment and bond procedures it was acid gel applied (6% carboxymethylcellulose and 0.1 M lactic acid with KOH concentrated solution at pH 5.0) on 48 molars producing a simulated caries-affected dentin. Adhesive/restorative procedure was performed constructing composite (Filtek Z350XT) blocks with 4 mm height. They were stored in deionized water for 24 hours, sectioned in beams (1mm^2) and submitted to μTBS test at 1.0 mm/min and load of 50kgf. SEM (50x and 150x) evaluated the types of fracture. μTBS data (MPa) were submitted to two - way ANOVA and Tukey tests ($p<0.05$). It was found an interaction between the factors studied ($p<0.01$). The highest values of the microtensile bond strength were obtained when the demineralized dentin was treated with MI Paste™ and adhesive system CSE did not differ from those obtained when the demineralized dentin was treated with MI Paste/SB and Curodont Repair/SB and minors values were obtained for the same adhesive used when the Curodont™ Repair, which did not differ from demineralized dentin treated with both adhesive systems. The type of fracture varied according to the adhesive system and treatment of dentin, the highest percentages of cohesive/composite fracture is observed in to sound dentin/SB, sound dentin/CSE; demineralized dentin/SB and demineralized dentin treated with Curodont™ Repair/SB for adhesive; mixed for demineralized dentin treated with NaF/SB, demineralized dentin treated with MI Paste™/SB, demineralized dentin/Curodont Repair/SB; cohesive/dentin to demineralized dentin/MIPaste/CSE. Based on the results obtained and the limits of this study it was concluded that the use of agents in dentin remineralizadores shown a favorable alternative in the short term, the bonding procedures. When used Adper™ Single Bond system 2 associated with the treatment of demineralized surface Curodont™ Repair or MI Paste™ or Clearfil™ SE MI Paste™ associated with the highest values of resistance of resin/dentin were observed.

Key Words: bond strength, dentin, remineralization

SUMÁRIO

	DEDICATÓRIA	xiii
	AGRADECIMENTO ESPECIAL	xv
	AGRADECIMENTOS	xvi
	EPÍGRAFE	xxi
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1	CARACTERISTICAS DO SUBSTRATO DENTINARIO DE IMPORTANCIA PARA A ADESÃO DE MATERIAIS RESTAURADORES	6
2.2	ASPECTOS RELEVANTES DA CÁRIE EM DENTINA DE IMPORTANCIA PARA A ADESÃO DE MATERIAIS RESTAURADORES	9
2.3	BIOMATERIAIS E REMINERALIZAÇÃO	10
2.4	FUNDAMENTOS DA UNIÃO À DENTINA	16
3.	PROPOSIÇÃO	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	23
4.2	DELINEAENTO EXPERIMENTAL	23
4.3	COLETA, ARMAZENAMENTO, SELEÇÃO E PREPARO DOS DENTES	24
4.4	PRODUÇÃO DA DENTINA AFETADA – MÉTODO QUÍMICO	25
4.4.1	PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE DESMINERALIZAÇÃO	25
4.5	TRATAMENTO DA SUPERFICIE DENTINÁRIA	27
4.6	PROCEDIMENTO DE ADESÃO	30
4.7	ENSAIO DE RESISTÊNCIA DA UNIÃO À MICROTRAÇÃO	33
4.7.1	OBTENÇÃO DOS ESPECIMES	33

4.8 ENSAIO DE RESISTENCIA DA UNIÃO 34

4.9 ANALISE DO PADRÃO DE FRATURA 35

4.10 ANALISE ESTATISTICA 35

5. RESULTADOS 36

5.1 RESULTADOS DA ANÁLISE DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO (μTBS) 36

5.2 RESULTADOS DA ANÁLISE DO PADRÃO DE FRATURA 38

6. DISCUSSÃO 43

7. CONCLUSÃO 50

REFERÊNCIAS 51

ANEXO 1 61

APÊNDICE 1 62

APÊNDICE 2 63

APÊNDICE 3 64

Dedicatória

A ***Deus***, por iluminar minhas escolhas e meus objetivos de vida.

"Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e tudo o que há em mim bendiga o seu santo nome."
Salmo 103-1

Aos meus pais, ***Joaquim*** e ***Lúcia***, que não mediram esforços para me incentivar na realização dos meus sonhos. Que abdicaram de bens próprios e gastos pessoais para que eu conseguisse chegar até aqui, mesmo que eles nunca tenham tido a mesma oportunidade.

Aos meus irmãos, ***Aliny***, ***Igor*** e ***Marêssa***, por estarem sempre acreditando e torcendo por mim e pela cumplicidade demonstrada em todos estes anos de relacionamento em Família.

A minha querida avó, ***Fransquinha***, mulher forte, exemplo de luta, garra e coragem. Obrigado pelo exemplo de vida, honestidade, humildade e dentre milhares, você é com certeza é a melhor avó do mundo.

A minha cunhada, ***Raquel***. Obrigado pelo incentivo e apoio de sempre.

A ***Gabriela***, um presente de Deus em nossas vidas!

Agradecimento Especial

À Profa. Dra. ***Regina Maria Puppin-Rontani***, exemplo de conhecimento, dedicação e respeito. Obrigado pela orientação, atenção e oportunidades que a mim foram dadas. Além da sua contribuição na minha formação e por ter acreditado que um simples estudante de odontologia pudesse receber todos os ensinamentos científicos e pessoais que estivessem ao seu alcance. Pela forma simples, contagiante, determinada, sincera e constante com que você se dispôs a me ajudar na minha vivência cientifica. Meu muito obrigado.

"Feliz daquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."

Cora Carolina

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu ***Magnifico Reitor Prof. Dr. José Tadeu Jorge***.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do ***Diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Junior***.

À ***Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia***, Coordenadora Geral do Programa de Pós-Graduação e à ***Profa. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury***, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP, agradeço a oportunidade de poder fazer parte desta instituição de ensino.

À ***FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)***, pelo apoio financeiro durante o curso de mestrado.

À ***Profa. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury***, por sua dedicação, simplicidade, humildade e exemplo de educadora. Obrigado por não ter poupado esforços, sempre de forma espontânea para me ajudar quando precisei.

À ***Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa***, pelo apoio, incentivo para desenvolver pensamento crítico, nos conduzindo a pensar da melhor maneira.

À ***Profa. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião***, pelo profissionalismo, e dedicação sempre demonstrados. Obrigado pela contribuição na minha formação.

À ***Profa. Dra. Fernanda Miori Pascon***, pela seriedade e por nos ajudar e orientar sempre da melhor maneira possível. Obrigado pelo exemplo de profissionalismo e dedicação.

À ***Prof. Dr. Érico Barbosa Lima***, pelo profissionalismo, dedicação e amor que tens à Odontopediatria.

Aos ***Profs. Drs. Maria Beatriz Borges de Araújo Magnani, Vânia Célia Vieira de Siqueira*** *e* ***João Sarmento Pereira Neto***, pela experiência e por apoiar e acreditar em nossos projetos. Obrigado pela forma dedicada com que contribuíram para minha formação.

À ***Profa. Kátia do Nascimento Gomes (Molécula)***, pelas palavras de coragem, por acreditar em mim e pela amizade demonstrada ao longo do tempo. Que mesmo de longe, não deixou de demonstrar seu carinho, amizade e incentivo. Obrigado por tudo, quando crescer quero ser que nem você.

À ***Fá (Profa. Dra. Fabiana Scarparo Naufel)*** e a ***Profa. Dra. Andreia Bolzan de Paula***, pelo apoio, disposição em ajudar, carinho, dedicação, trocas de experiências clínicas, profissionalismo e pelas sábias palavras quando sempre precisei.

Às ***Profas. Dras. Fabiana Scarparo Naufel, Fernanda Miori Pascon e Kamila Rosamilia Kantovitz***, pela imensa e significante contribuição apresentada no exame de qualificação desta dissertação.

Aos Profs. Drs. **Mário Alexandre Coelho Sinhoreti** e **Lidiany Karla Azevedo Rodrigues**, por terem aceitado o convite para compor a banca avaliadora da defesa de minha dissertação e pela grande contribuição que realizarão.

Ao técnico responsável pelo laboratório de Odontopediatria FOP/UNICAMP ***Marcelo Corrêa Maistro***, pela amizade, disposição e por não medir esforços para ajudar todos os alunos e pelos momentos de descontração no laboratório.

À ***Shirley Rosana Sbravatti Moreto***, secretaria do Departamento de Odontologia Infantil Área de Odontopediatria FOP/UNICAMP, obrigado pela amizade e por ser tão prestativa.

Às minhas colegas desta quinta turma de mestrado em Odontopediatria FOP-UNICAMP: ***Darlle Santos Araújo, Fabiana Furtado Freitas, Juliana Neide Amato, Lenita Marangoni Lopes, Maribel Hilasaca Mamani, Micaela Cardoso, Natalia Martins Joaquim*** e ***Thaís Varanda***, que foram indispensáveis para que este curso se tornasse ainda melhor. Obrigado pelo companheirismo, vocês sempre serão especiais para mim.

Às minhas irmãs que a vida me deu ***Darlle Santos Araújo*** e ***Natalia Martins Joaquim***, obrigado pela solidariedade com que me acolheram, pelas boas conversas, desabafos, conselhos, incentivo, carinho, amizade e por estarem sempre ao meu lado quando sempre precisei. Vocês serão sempre insubstituíveis.

À ***Mi (Micaela Cardoso)***, pelos momentos de descontração, amizade, desabafo e trocas de experiências. Como é bom ser sua dupla, obrigado pelas palavras de força quando sempre precisei e com você tive a certeza que no final tudo dará certo.

À ***Fabi (Fabiana Furtado Freitas)***, obrigado por sua dedicação, amizade, carinho, troca de experiências, conselhos e descontração. Obrigado por tudo.

À ***Ary (Ariany Borges Carvalho)***, obrigado pela amizade, conselhos e pela doçura e leveza com que você faz a Odontopediatria ser mais bela. Obrigado por tudo.

Às colegas do doutorado em Odontopediatria FOP-UNICAMP: ***Alexsandra Shizue Iwamoto***, ***Ana Bheatriz Marangoni Montes***, ***Bruna Raquel Zancopé***, ***Daniele de Cassia Rodrigues Picco***, ***Luciana Tiemi Inagaki***, ***Lívia Pagotto Rodrigues***, ***Maria Carolina Salomé Marquezin***, ***Thayse Rodrigues e Souza e Vanessa Benetello Dainezi***. Obrigado pela amizade, trocas de experiências e pelo convívio.

À ***Bhea (Ana Bheatriz Marangoni Montes)***, que se dispusera em me ajudar desde quando enviei meus documentos iniciando meu sonho de ser mestre. Obrigado pela dedicação, amizade, solidariedade e hospitalidade na qual me acolheu tão bem em Piracicaba – SP.

À ***Carol (Maria Carolina Salomé Marquezin)***. Você não foi simplesmente mais uma pessoa que passou na minha vida durante o mestrado, você foi "a" amiga, companheira e irmã que levarei para toda a vida. Obrigado por tudo que fez e continua a fazer por mim, pelo carinho, otimismo, bom humor, exemplo de honestidade, pelas palavras, força, ajuda, alegrias compartilhadas, tristezas, por todos os momentos que dividimos juntos. Adoro você em gênero e grau.

À ***Alê (Alexsandra Shizue Iwamoto)***, obrigado pelo carinho, disposição, amizade e pela disponibilidade que sempre teve em me ajudar.

À ***Lu (Luciana Tiemi Inagaki)***, obrigado pela preocupação de realizar e executar tudo com perfeição. Obrigado pelas dicas clinicas, pelas palavras de força e, principalmente, a convivência durante esse período de mestrado.

À ***Lí (Lívia Pagotto Rodrigues)***, pelas palavras, convivência, amizade, disponibilidade e troca de experiências. Obrigado por tudo.

À minha estimada amiga ***La (Larissa Ferreira Pacheco)***, obrigado primeiramente por existir. Pela amizade, dedicação, pelos conselhos, dicas, amizade e por todos os momentos divididos.

À ***Thata (Thayse Rodrigues e Souza)***, pela força, otimismo e pelas palavras de coragem.

À ***Van (Vanessa Benetello Dainezi)***, obrigado por buscar e me ajudar na coleta dos artigos para realização deste trabalho, meu muito obrigado.

À amiga da área de Fisiologia ***Dani (Daniela Almeida Prado)***, obrigado pelas palavras de ajuda, amizade, carinho, desabafos e troca de experiências.

À amiga do Departamento de Odontologia Restauradora, Área de Materiais Dentários ***Gi (Giovana Spagnolo Albamonte Araújo)***, por todo os seus conhecimentos, pela ajuda psicológica e além do tempo gasto comigo. Obrigado por toda ajuda.

Aos técnicos responsáveis pelo Departamento de Microscopia da FOP-UNICAMP, ***Adriano Luis Martins*** e ***Eliene Aparecida Orsini Narvaes*** pela disposição, incentivo a pesquisa. Obrigado pela compreensão durante a realização das microscopias deste trabalho.

A todos os ***funcionários*** da FOP-UNICAMP, que nos recebem sempre com sorriso e fazem com que seja possível o andamento de todos os trabalhos realizados nesta instituição.

Ao estimado amigo ***Rô (Rodrigo Gustavo Paixão)***, que tanto se empenhou em me ajudar, em guardar e doar os dentes extraídos, sem eles esta pesquisa não teria sido realizada. Obrigado pela amizade, carinho e pela significativa contribuição.

Aos demais que ajudaram na coleta, muito obrigado.

Ao estimado amigo, "roommate" ***Carlos (Carlos da Cunha Oliveira Júnior)***, pelos momentos de descontração, desabafos, amizade, carinhos, companheirismo e por estar sempre disposto a me ajudar. Obrigado por tudo.

Ao meu estimado amigo-irmão ***Juscelino de Freitas Jardim***, pelo companheirismo, amizade inestimável, incentivo.

Aos ***tios-padrinhos Marcelo Aragão*** **e** ***Silva*** e ***Luciana Martins de Lira***, por entenderem minha ausência. Muito obrigado pela preocupação e torcida para que o melhor aconteça em minha vida.

À minha amiga ***Audrey Foster*** e ***Hortência Xavier***, obrigado pelos momentos de "aconchego" em que me fizeram me sentir bem acolhido em Piracicaba – SP.

Aos estimados amigos ***Everardo Fonseca***, ***Camila Câmara***, ***Olavo Garcia***, ***George Rabelo***, ***Waltim***, ***Thales Amaro***, ***Marlos Couto***, ***Lana Yasmin***, ***Saskia Gomes***, ***Andrezza Almeida***, ***Jannaina Jorge***, ***Janaína Queiroz***, ***Natércia Nobre***, ***Ítala Barbosa***, ***Josiene Leonardo***, ***Júnior Rodrigues***, ***Elizeu Pinheiro***, ***Lucas Bill***, muito obrigado pelo carinho e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Aos pacientes que pude ter o prazer em ajudar, sem vocês não teria aprimorado meus conhecimentos teóricos e práticos.

A ***todos*** que contribuíram indiretamente para realização deste sonho meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADO!

"Saber esperar é uma virtude!
Aceitar, sem questionar que cada
coisa tem um tempo certo para
acontecer... é ter Fé!"

Blue Shel

1. INTRODUÇÃO

A dentina é considerada um compósito natural, poroso, úmido e heterogêneo (Perdigão, *et al*., 2013), constituído por uma matriz proteica (20%) envolta em cristais de apatita (70%), e água (10%), sendo um dos principais constituintes da matriz orgânica o colágeno Tipo I (Perdigão, *et al*., 2013). Sua composição de natureza orgânica e úmida, a estrutura da dentina, torna complexa a adesão a este substrato.

Clinicamente, o substrato a ser restaurado mais frequentemente encontrado é a dentina afetada pelo processo carioso, uma vez que após a remoção da dentina infectada, a estrutura remanescente apresenta-se com alterações estruturais e químicas, como a diminuição do conteúdo mineral pela ação dos subprodutos bacterianos, e com uma área de deposição de cristais de fosfato de cálcio que provavelmente a torna menos permeável (Cilli *et al*., 2005). Na dentina afetada por cárie, a dentina intertubular encontra-se parcialmente desmineralizada, porém, com cristais de apatita unidos às fibras colágenas, chamados de sítios de nucleação. Esta zona de dentina desmineralizada apresenta espessura de dentina peritubular reduzida, mas a estrutura colágena e os processos odontoblásticos ainda podem ser identificados (Ohgushi e Fusayama, 1975).

Estas variações estruturais da dentina afetada por cárie podem ser um desafio à efetiva união de materiais resinosos, como reportado previamente por Yoshiyama *et al.,* 2002, que observaram que a dentina afetada por cárie apresenta menores valores de resistência de união que a dentina hígida (Yoshiama *et al*., 2000; Ceballos *et al*., 2003; Doi *et al*., 2004; Pereira *et al*., 2006; Wei *et al*., 2008). Essa diminuição da resistência da união no tecido dentinário afetado pela cárie pode ser atribuído a deposição desorganizada de minerais, provenientes da desmineralização, obstruindo os túbulos dentinários e impedindo a permeação das fibrilas colágenas pelos monômeros resinosos (Liu, *et al*., 2011). Além disso, Schimidlin *et al.,* 2008, observaram que o grau de mineralização da dentina é importante para a adesão e que o condicionamento adicional com ácido fosfórico reduziu a resistência de união de um sistema adesivo de três passos a base de

acetona e água. Entretanto, Tanaka *et al*., 2007 observaram que o substrato desmineralizado ou remineralizado não demonstraram diferença significativa quanto a resistência da união, porém foram inferiores aos obtidos com o substrato hígido, mas, essas diferenças estavam relacionadas ao tipo de adesivo utilizado (Clearfil™ SE Bond).

Além disso, pesquisas identificaram tanto na dentina sadia quanto na dentina afetada por cárie, de forma latente e/ou ativa, a presença de enzimas proteolíticas denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs) e catepsinas (Vidal *et al.,* 2014). Acredita-se que a degradação se inicia pelas proteases do tipo Catepsina-K (CT-K) em pH ácido. Posteriormente, com a volta do pH a normalidade, outras proteases como as MMPs são liberadas e continuam a degradação do colágeno e outros componentes da matriz (Everts *et al*., 1998). E dessa forma, apresentariam atividade na degradação das fibrilas colágenas não protegidas pela incompleta infiltração de monômeros resinosos na dentina condicionada (Perdigão, *et al.,* 2013). Assim, a exposição das fibras colágenas, numa área desmineralizada e não infiltrada por monômeros poderia contribuir para a redução da longevidade da união.

Os sistemas adesivos combinam monômeros hidrófilos e hidrófobos em sua composição, objetivando a interação, respectivamente, com o substrato dentinário e os compósitos resinosos. Após a polimerização do adesivo, a mistura de colágeno, monômeros resinosos, água e cristais de hidroxiapatita formam a camada híbrida que liga os materiais resinosos ao substrato dentinário (Nakabayashi, *et al*., 1982; Perdigão, *et al*., 2013).

Entretanto, até o momento tem-se demonstrado que a infiltração dos sistemas adesivos por entre as fibras colágenas não se dá por completo e tanto as fibrilas colágenas não hibridizadas pelos monômeros resinosos quanto estes, sofrem degradação, tanto quando usados os sistemas adesivos do tipo *ecth&rinse* quanto os autocondicionantes ou *self-ecthing* (Perdigão, *et al*., 2013). Isto acontece devido à expansão incompleta do colágeno após o condicionamento ácido, criando uma zona de dentina desmineralizada, ou demasiadamente desmineralizada que é suscetível à fadiga durante a função mastigatória aliado aos processos de degradação do colágeno não envolto em polímeros quanto a degradação hidrolítica da matriz

polimérica, pela presença do fluido dentinário (Wang, *et al*., 2003, Carrilho, *et al*., 2005; Hashimoto, *et al*., 2011).

Estudos sugerem que a remineralização dentinária seria potencialmente favorável aos procedimentos adesivos em dentina, promovendo a reestruturação das fibrilas colágenas, repondo o mineral perdido pelo processo de desmineralização (Cilli *et al*., 2005, Liu, *et al.,* 2011) e protegendo-o da degradação enzimática.

Dessa forma, a remineralização pode ser considerada uma estratégia interessante para melhorar a estabilidade da união resina/dentina, bem como controlar a cárie primária e secundária.

A remineralização de forma convencional, conhecida pela adsorção de fluoreto de cálcio a partir de produtos como o fluoreto de sódio (NaF), tem sido uma das estratégias (Rahiotis e Vougiouklakis, 2007). O NaF, por exemplo atua, formando depósitos de cristais de fluoreto de cálcio adsorvidos na superfície dental, sendo dissociados quando da presença de ambiente ácido. Constitui uma abordagem, no linguajar da nanotecnologia, uma estratégia *top-down* convencional, isto é, não necessitando de pontos de nucleação e acontece apenas superficialmente (Wong *et al.,* 2009*).*

Entretanto, a remineralização convencional da dentina parece não ser uma estratégia adequada, uma vez que não consegue remineralizar completamente a dentina dentro da camada híbrida criada pelo *etch-and-rinse* e por aqueles sistemas adesivos auto-condicionantes de agressividade moderada, ou a parte superficial de uma lesão de dentina afetada por cárie deixada para trás após a remoção parcial de tecido cariado em procedimentos de mínima intervenção. Apesar de aumentar o conteúdo mineral, poderia não ser adequada a penetração de monômeros. Além do mais, o ambiente ácido produzido pelo condicionamento com o ácido fosfórico permitiria maior solubilidade e mobilidade dos cristais de fluoreto de cálcio, podendo interferir ainda mais na permeabilidade dos monômeros resinosos quando do uso de sistemas adesivos do tipo *etch-and-rinse*.

Assim, a remineralização biomimética representaria uma estratégia diferente para este problema, na tentativa de suportar o colágeno da dentina

desmineralizada com partículas nanoprecursoras de fosfato de cálcio amorfo (ACP) por análogos biomiméticos de proteínas não colagenosas.

Diferentemente da remineralização pela deposição aleatória de minerais, a reconstrução dos cristais perdidos na remineralização biomimética poderia produzir melhor efetividade da união entre a restauração e a estrutura da dentina, constituindo-se em uma estratégia para se dirimir a degradação da camada híbrida (Tjaderhane, *et al.,* 2013). O conceito de remineralização biomimética baseia-se em replicar o que ocorre no processo de biomineralização, cuja proposta, permitiria que os espaços extras e intrafibrilares da matriz de colágeno ocupado anteriormente pela água sejam substituídos por cristais de nano-apatitas (Perdigão, *et al*., 2013; Veis, *et al.,* 2013) por meio dos agentes remineralizantes, deixando menor quantidade de colágeno exposto, evitando maior degradação da camada híbrida, sem, contudo interferir na penetração do sistema adesivo, uma vez que o processo de recristalização seria ordenado (Tjaderhane *et al.,* 2013).

O fosfopeptídeo de caseína (CPP) contendo um cluster da sequência de aminoácidos –Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- estabiliza o fosfato de cálcio amorfo (ACP). Teoricamente, o CPP pode servir como um análogo biomimético de proteínas fosforiladas, não colagenosas, da dentina, pelo recrutamento de nanoprecursores de ACP nos espaços das áreas das fibrilas colágenas (Poggio, *et al.,* 2013). A pasta MI Paste™ (GC International, Itabashi-ku, Tóquio, Japão) contendo CPP-ACP, tem mostrado bons resultados na remineralização de lesões de mancha branca em esmalte, e seu efeito também tem sido relacionado ao aumento da dureza da dentina e da diminuição da sensibilidade dentinária (Comar, *et al.,* 2013). Ainda, Borges, *et al*., 2013, demonstraram que a resistência da união à dentina hígida, após a aplicação do CPP-ACP (MI Paste™), foi maior do que o grupo sem aplicação da pasta.

Outro agente de remineralização biomimética é o peptídeo P_{11-4} contido no Curodont™ Repair, um composto descrito como tento capacidade de induzir a recristalização do esmalte desmineralizado, apresentando capacidade de reunir metabólitos do meio oral, formando andaimes biomiméticos capazes de promover a nucleação de uma nova hidroxiapatita (Kirkham, *et al.,* 2007). Com base nestes dados, Kirkham, *et al*., 2007 e Brunton, *et al*., 2013, sugeriram que o P_{11-4} poderia

ser útil na modulação do aumento do ganho mineral sendo capaz de iniciar um processo de remineralização biomimética. Este composto tem mostrado ser eficiente para a remineralização do esmalte, porém, não foi ainda testado em dentina.

Embora não haja consenso sobre a eficiência da resistência de união à dentina afetada por cárie, estudos evidenciam valores significativamente menores do que a dentina não cariada, o que tem sido atribuído principalmente à obliteração dos túbulos dentinários pelos cristais minerais depositados, e à presença de uma zona mais espessa de colágeno exposto pela desmineralização produzida pelo processo carioso (Yoshiyama *et al*., 2000; Yoshiyama *et al*., 2002; Yoshiyama *et al*., 2004; Ceballos *et al*., 2003; Doi *et al*., 2004; Pereira *et al*., 2006; Wei *et al*., 2008).

Embora os estudos apontem para a preservação da união resina/dentina afetada por cárie pela remineralização da dentina desmineralizada, estudos que verifiquem a influência dos processos de remineralização na dentina desmineralizada quando utilizado diferentes sistemas adesivos ainda são raros.

Neste contexto, este estudo propõe contribuir para o maior esclarecimento quanto à influência de agentes remineralizadores convencional e biomiméticos na dentina desmineralizada, previamente a utilização de sistemas adesivos do tipo *etch&rinse* e *self-etching*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERISTICAS DO SUBSTRATO DENTINÁRIO DE IMPORTÂNCIA PARA A ADESÃO DE MATERIAIS RESTAURADORES

A dentina é um substrato fundamental na odontologia restauradora, e o conhecimento de suas propriedades e características é determinante para o sucesso de grande parte dos procedimentos restauradores adesivos. Características essas que dificultam os procedimentos adesivos, por se tratar de um substrato intrinsecamente úmido, conter alto percentual orgânico e a diferença regional da disposição dos túbulos dentinários, obstáculos estes que se encontram diretamente relacionados ao índice de insucessos dos procedimentos adesivos e preventivos (Perdigão, 2013). A melhor compreensão deste substrato se faz necessário para entendimento dos desafios adesivos atuais.

Em contraste com o esmalte, que apresenta cerca de 97% de conteúdo mineral e apenas 3% de conteúdo orgânico, a dentina é considerada um compósito biológico complexo, poroso, úmido e heterogêneo que apresenta cerca de 18% de matriz orgânica, 12% de água e 70% de substâncias inorgânicas (cristais de hidroxiapatita) (Mjör; Fejerskov, 1990). A matriz orgânica da dentina compreende cerca de 30% de colágeno tipo I, que se apresenta como uma cadeia de três polipeptídeos entrelaçados, formando tripla hélice, mantendo o arcabouço para os cristais de apatita (Ten Cate, 2001) e fibras de proteínas não colagenosas, como proteínas da matriz dentinária e fosfoproteínas (Xu, *et al*., 2011), que exercem funções biológicas importantes na resposta do complexo dentino-pulpar frente aos agentes agressores. (Ten Cate, 2001).

Na biossíntese dentinária, as propriedades físicas e químicas do colágeno são especialmente adaptadas para a ligação das proteínas da matriz e também oferece suporte como um esqueleto para a deposição mineral (Xu, *et al*., 2011). Esta deposição mineral, de acordo com Marshall *et al*., (1997), pode ocupar dois sítios na trama de colágeno: intrafibrilar (na zona interna das fibrilas) e extrafibrilar (no espaço

entre as fibrilas). Estes componentes são responsáveis pela nucleação e regulação mineral durante a dentinogênese e por isso podem interferir no processo de desmineralização e remineralização. Uma vez desmineralizada a dentina, seus componentes orgânicos, principalmente as proteínas não colagenosas, atuam como nanoprecussores para a nucleação mineral, norteando o processo de remineralização (Fejerskov; Nyvad; Kidd, 2005; Xu, *et al*., 2011).

O conteúdo mineral da dentina sadia está principalmente localizado na dentina intertubular, esta região de dentina é considerada substrato favorável para a formação da camada hibrida. (Nakabayashi; Kojuma; Masuhara, 1982) (Figura 1).

Cada túbulo está circundado por dentina peritubular, que se apresenta hipermineralizada. A dentina peritubular é aproximadamente 9% mais mineralizada do que a dentina intertubular, e esta é constituída essencialmente de fibrilas colágenas envolvidas por cristalitos de apatita.

O número e o diâmetro dos túbulos variam de acordo com a proximidade da polpa e localização no dente, compondo apenas 1% da superfície dentinária na junção amelo-dentinaria e 22% na dentina próxima à polpa (Pashley, 1989). Garberoglio e Branstrom, em 1976, observaram que em média a dentina superficial apresenta ao redor de 20.000 túbulos/mm², a dentina média 29.000 túbulos/mm² e a dentina profunda apresenta 45.000 túbulos/mm² com o diâmetro dos túbulos dentinários variando de 1 a 3 µm, conforme a proximidade da polpa. Da mesma forma a dentina intertubular decresce à medida que se aproxima da polpa. (Manuja *et al*., 2012).

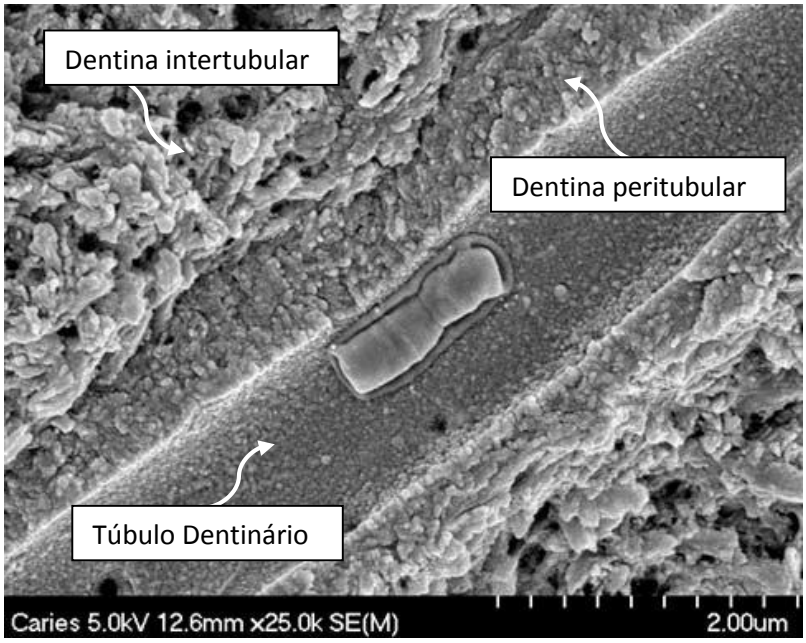


Foto Cedida pelo Professor Jorge Perdigão (2012).

Figura 1 – Microscopia Eletrônica de Varredura evidenciando a dentina inter e peritubular. Aumento 25.000x.

Permeando toda extensão da dentina, os túbulos dentinários são preenchidos por prolongamentos odontoblásticos e por fluído dentinário proveniente da polpa, tornando este substrato intrinsecamente úmido, sendo impossível a completa secagem em uma situação clínica (Perdigão, *et al*., 2013).

Além das características intrínsecas deste substrato, frente a qualquer estímulo ou modificação por processos fisiológicos, como o envelhecimento ou patologias como a cárie e desgastes dentários, podem ser observados diferentes aspectos dessa mesma dentina, como a dentina terciária, reacional, reparadora ou esclerótica, transformando as características originais desse substrato, produzindo aumento de mineralização, destruição da estrutura organizacional inicial ou até mesmo a desmineralização e destruição da rede de colágeno do substrato dentinário (Marshall, 1993).

2.2 ASPECTOS RELEVANTES DA CÁRIE EM DENTINA IMPORTANTES PARA A ADESÃO DE MATERIAIS RESTAURADORES

O processo mais conhecido de desmineralização na cavidade oral é a cárie dentária, que quando atinge a dentina, promove a destruição da matriz dentinária através da ação de ácidos liberados por microrganismos provenientes da metabolização dos carboidratos e de enzimas colagenolíticas.

A lesão de cárie em dentina é caracterizada pela desmineralização da porção inorgânica e desorganização da fase orgânica, resultando na desnaturação do colágeno. A medida que se aumenta a desmineralização da dentina peritubular ocorre a diminuição das propriedades mecânicas e do conteúdo mineral (Fusayama, 1979).

Como descrito por Fusayama (1979), em decorrência do processo carioso em dentina, podem ser identificadas duas camadas distintas: a primeira camada é a região mais superficial, possui consistência amolecida, irreversivelmente desnaturada apresentando destruição nas ligações cruzadas e nas moléculas de colágeno, dentina intertubular desmineralizada com cristais escassos e irregulares, deterioração das fibras colágenas remanescentes, processos odontoblásticos e dentina peritubular ausentes, túbulos dentinários invadidos por bactérias ou com cristais livremente espalhados no seu interior (dentina infectada). A segunda camada mais profunda apresenta-se endurecida, com alterações reversíveis na molécula do colágeno, dentina inter e peritubulares parcialmente desmineralizadas e presença dos prolongamentos odontoblásticos, mas com cristais de apatita unidos a fibras colágenas, as quais, diferentemente da camada anterior, não exibem destruição do colágeno, sendo assim remineralizáveis (dentina afetada por cárie) (Fusayama, 1979; Beeley *et al*., 2000; Angker *et al*., 2004).

Pugach *et al*., 2009 observaram que quando se utiliza o "*Caries Detector*" (Propilenoglicol e corante) para evidenciação do tecido cariado, como auxiliar para remoção deste, a área fortemente pigmentada apresenta-se mais desmineralizada, contendo 25% do conteúdo mineral da dentina normal, podendo estar relacionada com o conteúdo mineral intrafibrilar, que pode ser de importância em processos de remineralização e restauração das propriedades mecânicas da dentina, sugerindo

que esta área que é removida pelo clínico, poderia ser de grande valia para a restruturação dentinária devido ao conteúdo mineral residual.

Durante a evolução do processo carioso, a dentina intertubular apresenta menor conteúdo mineral e cristais resistentes à dissolução ácida resultantes da recristalização da apatita dissolvida, que são depositados no interior do lúmen dos túbulos dentinários, reduzindo a permeabilidade destes. (Yoshiyama *et al*., 2000; Zheng *et al*., 2003). Entretanto, a oclusão do lúmen dos túbulos pode reduzir a penetração dos monômeros resinosos e a formação de *tags* de resina, que com a infiltração na rede de fibrilas de colágeno exposta, constituem as principais e mais efetivas formas da união a dentina (Nakabayashi *et al*., 1982; Pashley & Carvalho, 1997).

Outra alteração decorrente do processo carioso a partir da tentativa de impedir a invasão bacteriana é o estreitamento dos túbulos dentinários, reduzindo o metabolismo bacteriano e diminuindo o avanço do processo carioso, pelo complexo dentinho-pulpar. A esclerose dentinária, que é um fator importante na resistência da dentina à progressão da lesão de cárie, ocorre onde o grau do estímulo provocado é menor, permitindo a resposta do complexo dentino-pulpar, resultando em oclusão dos túbulos dentinários (Miller e Massler, 1962; Kuwara e Massler, 1966).

2.3 BIOMATERIAIS E REMINERALIZAÇÃO

O conceito de remineralização da dentina, depois da dissolução ácida dos cristais de hidroxiapatita tem sido descrito há algum tempo, quando Fusayama, et al., 1979, caracterizaram o substrato dentinário, afetado por cárie, como uma camada superficial e uma camada mais profunda (Fusayama *et al*., 1979; Kuboki *et al*., 1977; Perdigão *et al*., 2013).

A camada superficial da lesão de cárie foi considerada fisiologicamente não remineralizável, por apresentar fibras colágenas desnaturadas e o desaparecimento de ligações cruzadas e a camada mais profunda foi descrita como medianamente descalcificada, com fibras de colágeno sadias, cristais de apatita

ligados às fibras colágenas, portanto, considerada do ponto de vista fisiológico, remineralizável (Fusayama *et al*., 1972).

Baseando-se nesse princípio, o conceito de remineralização biomimética aplicada à adesão dentinária tem sido explorado (Tay e Pashley, 2008; Kim *et al*., 2010; Perdigão *et al*., 2013).

Quando a hidroxiapatita da dentina é dissolvida por agentes ácidos dos procedimentos adesivos convencionais e autocondicionantes, a água imediatamente ocupa os espaços anteriormente ocupados por hidroxiapatita. Os monômeros resinosos dos sistemas adesivos atuais são incapazes de substituir o colágeno extrafibrilar, intrafibrilar e a água (Perdigão *et al*., 2013). Sugere-se que a remineralização em torno das fibras colágenas desmineralizadas seja uma forma de prevenção da degradação proteolítica e hidrolítica da camada híbrida, pois aumentaria o conteúdo inorgânico perdido e inativariam as metaloproteinases da matriz, aumentando a longevidade das restaurações (Brackett *et al*., 2011; Perdigão *et al*., 2013). A degradação da camada híbrida foi confirmada também por Erhardt *et al*., 2008, que observaram que a interface de união à dentina afetada por cárie apresenta-se mais favorável à degradação hidrolítica do que a dentina hígida.

A remineralização biomimética tem sido proposta como forma de remineralização para as camadas híbridas dos adesivos convencionais e autocondicionantes (Mai, *et al*., 2009; Tay&Pashely, 2009; Mai, *et al*., 2010; Kim, *et al*., 2010; Perdigão *et al*., 2013). Esta remineralização utiliza princípios de nanotecnologia que mimetizam o que ocorre no processo de biomineralização do tecido dentinário (Tay e Pashley, 2008; Perdigão, *et al*., 2013).

Esta estratégia substitui com nanocristais de apatita a água presente nos espaços abaixo da camada híbrida (espaços nanoinfiltrados). Estes nanocristais de apatita são suficientemente pequenos e podem ocupar os espaço extra e intrafibrilares da matriz de colágeno, promovendo maior resistência de união resina/dentina (Tay e Pashley, 2008; Perdigão *et al*., 2013). Para a adesão promovida por adesivos convencionais, foi observado a formação de nanocristais de apatita nos espaços extra e intrafibrilar após a remineralização biomimética, proporcionando um aumento favorável na resistência de união resina/dentina (Liu *et al*., 2011).

Para que ocorra a remineralização biomimética é necessário que o tecido dentinário apresente sítios aniônicos (Ácido aspártico- Fosfoserinas-) na rede de colágeno desmineralizada para nortear a nucleação mineral (Niu, *et al*., 2014). Mimetizando a ação das proteínas não colagenosas no processo de biomineralização, que envolve o sequestro da fase mineral amorfa por proteínas da matriz extracelular (proteínas não colagenosas), como as fosfoproteínas, que são proteínas multifuncionais que apresentam propriedades de sinalização, que são utilizadas como modelos para induzir a nucleação mineral e crescimento dentro da porção orgânica do tecido dentinário (Geroge e Veis, 2008; Veis, *et al.,* 2013). Assim reestruturando o suporte dentinário desmineralizado.

A remineralização da fase orgânica da dentina é um processo mais complexo comparado ao do esmalte (Bertassoni, *et al*., 2010). Várias abordagens têm sido relatadas em um esforço contínuo para remineralizar a dentina, incluindo o uso de fluoretos, fosfoproteínas, ácido carboxílico, fosfopeptídeo de caseína, fosfato de cálcio amorfo, fosfato de nano-beta-tricálcio coloidal e partículas de vidro bioativo, todos reivindicando o relativo sucesso no que diz respeito à observação da formação de mineral no local da lesão (Bertassoni, *et al*., 2011).

A ação do fluoreto de sódio (NaF) utilizado como agente remineralizante encontra evidências científicas na literatura quanto a remineralização de lesões em esmalte e dentina. A interação direta do NaF com a superfície dentinária pode ser observada pela união com íons cálcio, resultando na formação de cristais de fluoreto de cálcio o que produz uma redução da permeabilidade e do diâmetro dos túbulos dentinários. Esta obliteração com fluoreto de cálcio resulta de uma rápida precipitação mineral no interior dos túbulos dentinários. Entretanto, com vistas ao processo restaurador e infiltração de monômeros resinosos, responsáveis pela resistência da união resina/dentina, na superfície dentinária, a deposição desorganizada de minerais e a obstrução dos túbulos dentinários, pode não ser favorável (Prabhakar *et al*., 2013). O flúor tem sido mostrado como um agente remineralizador convencional via abordagem de remineralização da camada superficial do tecido afetado para o interior da zona de desmineralização, sendo considerado não funcional para biomineralização. A nucleação homogênea não é tão favorável termodinamicamente e necessita cineticamente que

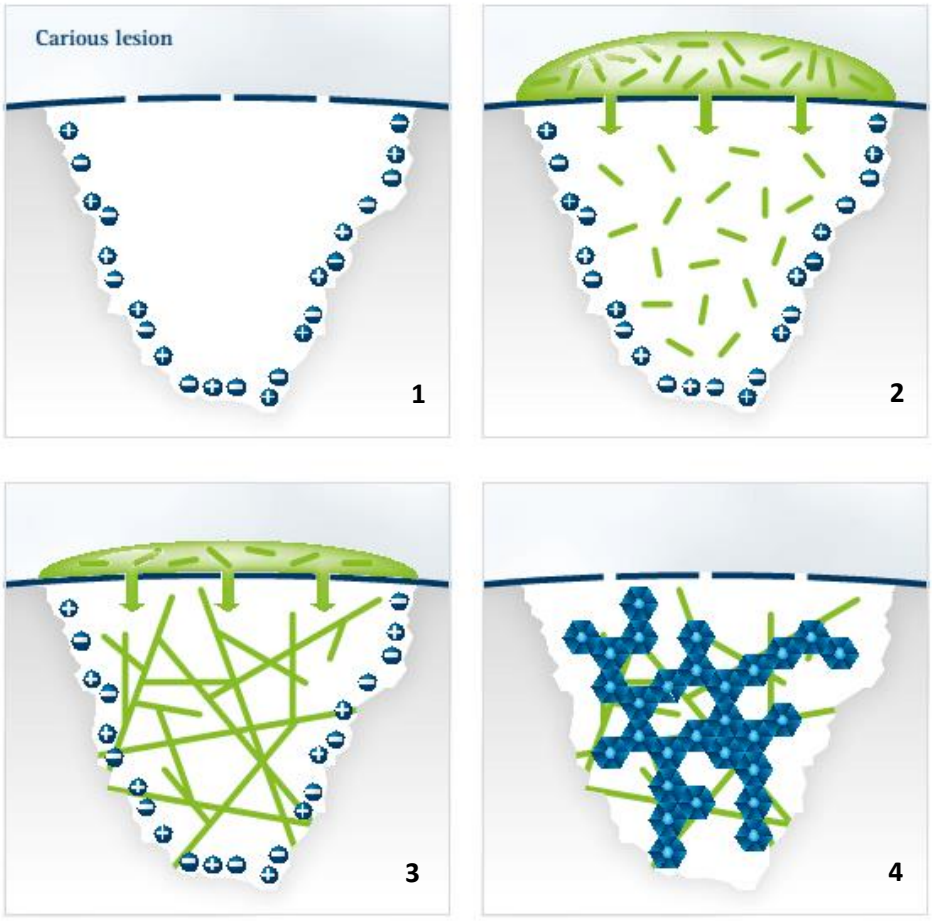
proteínas/polímeros moduladores norteiem o caminho para reduzir a ativação da nucleação através de passos sequenciais (Wang e Nancollas, 2009).

A nanotecnologia empregada a esta abordagem de remineralização, baseia-se no processo de automontagem, formação mineral organizada, formando partículas de nano-apatita (Xu *et al*, 2007; Gower, 2008; Wang e Nancollas, 2009), essas partículas em escala nanométrica, reforçariam a estrutura colágena desmineralizada do tecido afetado. Sendo esta abordagem, compatível com a observada da fase de fosfato de cálcio amorfo na biomineralização de tecidos duros. A reconstrução dos cristais pela remineralização biomimética poderia produzir melhor efetividade da união entre a restauração e a estrutura da dentina, constituindo-se em uma estratégia para diminuir a degradação hidrolítica da camada híbrida (Tjaderhane, *et al*., 2013).

Este processo permitiria que agentes remineralizantes preenchessem os espaços ocupados pela água, com cristais de nano-apatitas, evitando maior degradação da camada hibrida, sem, contudo interferir na penetração do sistema adesivo, uma vez que o processo de recristalização seria ordenado (Tjaderhane *et al*., 2013). Análogos biomimeticos de poliânions de fosfoproteínas podem ser utilizados para se unir ao colágeno e servir como indutores da nucleação e desenvolvimento do cristal de apatita em regiões da dentina completamente desmineralizada, como descrito anteriormente (Gower, 2008; Tjaderhane *et al*., 2013).

Tay e Pashley, 2009, demonstraram que a utilização destas substâncias com capacidade remineralizadoras aplicadas na dentina desencadeia um processo de remineralização que pode melhorar a interface de união resina/dentina (Tay&Pashley, 2009). Esforços têm sido direcionados a melhoria das condições da interface de união com o objetivo de diminuir a degradação hidrolítica e proteolítica na área. Estas nano-apatitas formadas a partir destas substâncias remineralizadoras assemelham-se muito as apatitas naturais encontradas no esmalte dental humano. Além disso, polifosfatos inorgânicos desempenham um papel importante na orientação da nucleação e crescimento de apatita, favorecendo assim o reforço na estrutura dentinária (Liu, *et al*., 2011).

Compostos como o peptídeo P_{11-4} (Ace-Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu-Phe-Glu-Gln-Gln-NH2, sintetizado a partir da glicina), contido no Curodont™ Repair sugerem este princípio de remineralização, tendo sido descrito como tendo capacidade de induzir a recristalização do esmalte desmineralizado (Kirkham, *et al*., 2007). O peptídeo P_{11-4} é um material bioativo sintetizado a partir de aminoácidos naturais, na forma de gel quimicamente modificado que adere em áreas de tecido poroso, incluindo lesões de cárie em esmalte e dentina exposta, produzindo um arcabouço que norteia a nucleação mineral. O P_{11-4} apresenta a espontânea capacidade de reunir metabólitos do meio para formar andaimes biomiméticos capazes de promover a nucleação de uma nova hidroxiapatita (Kirkham, *et al*., 2007). Com base nestes dados, Kirkham, *et al*., 2007 sugeriram que o P_{11-4} pode ser útil na modulação do aumento do ganho mineral.



Fonte: Credentis

Figura 2 – Representação esquemática do P_{11-4} peptídeo aderindo na superfície da lesão de cárie e a interação com o meio bucal: **1.** Lesão de cárie; **2.** P_{11-4} entrando em contato com a superfície da lesão; **3.** Formação do arcabouço; **4.** Arcabouço com íons do meio bucal.

Na forma de um hidrogel, constitui-se numa alternativa aos *scaffolds* utilizados em engenharia tecidual e medicina regenerativa. As propriedades deste peptídeo como a bioatividade e a resposta a desafios externos foi investigada por Bell *et al*., 2006 que verificaram que o P_{11-4} foi desenhado numa forma de hidrogel estável em meio de cultura fisiológico Bell *et al*., 2006. Kyle *et al*., 2008 avaliaram a capacidade deste peptídeo dar suporte a fibroblastos para o tratamento de lesões na pele e observaram que o peptídeo conseguiu manter a vitalidade celular além de 28 dias, sendo comparável aos resultados com colágeno, sendo promissor seu uso como *scaffold* em medicina regenerativa.

Assim, sistemas de auto estruturação como o P_{11-4} podem ser utilizados como substratos em aplicações de engenharia tecidual com o objetivo de mimetizar a matriz extracelular. Esses peptídeos são materiais excelentes para iniciar esse processo e podem ser rapidamente sintetizados por meios químicos e biológicos.

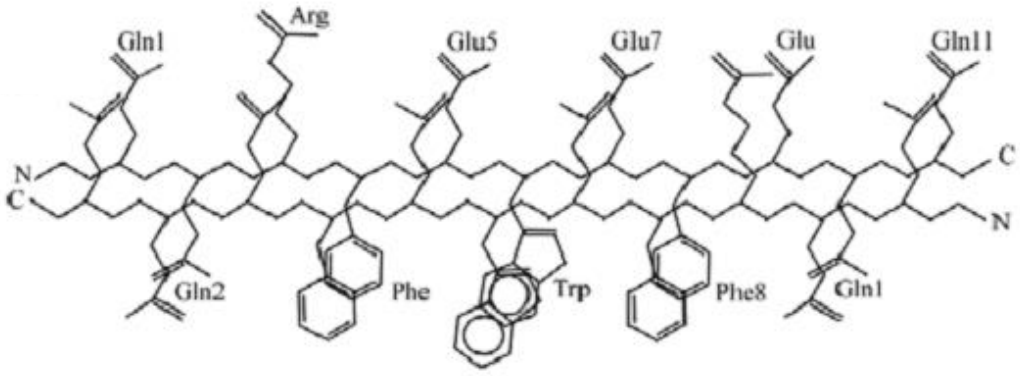


Figura 3 – Representação esquemática do peptídeo P_{11-4} (Ace-Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu-Phe-Glu-Gln-Gln-NH2)

Os estudos *in vitro* e *in vivo*, Felton, (2005) e Burke, (2011) constataram que o P_{11-4} mostrou ser altamente biocompativel e apresenta baixa imunogenicidade. O estudo de Brunton, (2013), utilizou 15 pacientes com lesões de mancha branca, submetidos ao tratamento com P_{11-4}. Os resultados sugeriram que o tratamento das lesões de cárie precoce com P_{11-4} é seguro, e uma única aplicação está associada com a regeneração significativa do esmalte, presumivelmente promovendo a deposição mineral no interior do tecido abaixo da lesão de cárie.

O CPP-ACP é um agente que se baseia em um nanocomplexo da proteína do leite, fosfopeptídeo de caseína (CPP) com fosfato de cálcio amorfo (ACP), tem sido pesquisado com o objetivo de liberação lenta de elementos químicos (Ca e PO_4) contribuindo para o processo de remineralização (Reynolds, 1998; Rahiotis e Vougiouklakis, 2007).

Os compostos baseados em CPP-ACP foram introduzidos no mercado mundial contendo cálcio e fosforo biodisponíveis, uma vez que, o fosfopeptídeo de caseína é capaz de estabilizar o fosfato de cálcio em fosfato de cálcio amorfo (ACP) (Cross *et al*., 2007; Reynolds, 2008).

Foi proposto um mecanismo anticárie para CPP-ACP, uma vez que este produto promove a remineralização das lesões de cárie (Reynolds, 1991), tendo sido demonstrado que o CPP-ACP é capaz de prevenir a desmineralização do esmalte e de promover a remineralização de lesões subsuperficiais em esmalte humano em estudo *in vitro* e *in situ*, e em estudos com modelos animais (Rahiotis e Vougiouklakis, 2007).

Além dos resultados promissores da pasta MI Paste™ (GC Corporation) contendo CPP-ACP na remineralização de lesões de mancha branca em esmalte, tem sido reclamado também seu efeito em relação ao aumento da dureza da dentina e da diminuição da sensibilidade dentinária com seu uso (Comar *et al*., 2013). Borges *et al*., 2013, demonstraram que a resistência da união a dentina hígida após a aplicação do CPP-ACP (MI Paste™, GC International, Itabashi-ku, Tóquio, Japão) foi maior do que o grupo sem aplicação da pasta. Entretanto, não há relatos quanto a utilização da pasta em dentina desmineralizada, em relação à resistência da união à microtração.

2.4 FUNDAMENTOS DA UNIÃO À DENTINA

A adesão em dentina é criada pela impregnação de misturas monoméricas resinosas no substrato dentinário, cuja estabilidade da interface de união apoia-se na criação de uma camada híbrida. Esta camada é formada pela permeação da rede de fibrilas expostas reveladas pelo condicionamento ácido, pelo solvente contido no sistema adesivo (adesivos convencionais) e/ou *primer* (adesivos

autocondicionantes) que deve ter a capacidade de se misturar com a água, portanto deve ser hidrófilo, o que equivale a ter o poder de deslocar e substituir a água ainda presente entre as fibrilas colágenas da camada de dentina desmineralizada pelo adesivo (Nakabayashi *et al*., 1982; Brechi *et al*., 2008).

Além das características morfológicas desfavoráveis tanto em relação à permeabilidade, como a heterogeneidade do substrato dentinário, que tornam crítica à obtenção da adesão eficaz, é preciso considerar ainda que na maioria dos casos, a superfície de dentina pós-remoção do tecido cariado ficará recoberta por *smear layer* (Alves, *et al*., 2013). A principal desvantagem da manutenção da integridade desta camada de detritos (*smear layer*) é a baixa resistência da união desta à dentina subjacente (Marshall, 1993).

Dessa forma, a dentina é um substrato peculiar, cujas características intrínsecas levam a dificuldade da realização de um efetivo procedimento adesivo, similar ao conseguido no esmalte. Buscando subsídios na união de materiais restauradores a estrutura do esmalte, muito se tem pesquisado, na tentativa de tornar a dentina um substrato mais adequado, isto é, menos hidrófilo haja vista a utilização de materiais restauradores hidrófobos disponíveis no mercado.

Devido à baixa resistência de união oferecida pela *smear layer* a estrutura dentinária subjacente, os adesivos do tipo *ecth&rinse* preconizam a remoção desta camada, no intuito de melhorar a união à dentina. Esta remoção é realizada principalmente por meio do condicionamento com ácido fosfórico a 35 ou 37% (Perdigão *et al*., 2001; Nakajima *et al*., 2011), consistindo na remoção completa da *smear layer* e desmineralização subsuperficial dentinária aumentando a porosidade da dentina intertubular e, por conseguinte, a energia de superfície (Nakabayashi e Pashley, 2000; Pashley e Tay, 2001; Breschi *et al*., 2008).

Os sistemas adesivos desenvolvidos em meados dos anos 90 possuíam características bifuncionais na mesma molécula, ou seja, possuíam radicais hidrófilos e hidrófobos e buscavam a adesão micromecânica proporcionada pela formação da camada híbrida (Nakabayashi *et al*., 1982; Cilli *et al*., 2005).

A utilização destes sistemas adesivos *etch&rinse* apresenta peculiarmente três passos durante o procedimento: o condicionamento ácido, a aplicação de um

primer e a aplicação do adesivo. A etapa inicial de preparação da superfície dentinária, consiste no condicionamento ácido por meio do ácido fosfórico, melhorando a molhabilidade da superfície, tornando-a mais hidrófila pelo aumento da porosidade superficial, pela desmineralização (Toledano *et al*., 2001). Esta desmineralização da dentina consiste na remoção de íons minerais da estrutura da apatita deixando as fibras colágenas sem suporte mineral (Bertassoni *et al*., 2011). O segundo passo é a lavagem da estrutura, removendo resíduos e minerais dissolvidos, preenchendo os espaços deixados pela desmineralização. Passo importante, a secagem, deve ser suficiente para remover o excesso de água, sem, entretanto, dessecar a estrutura desmineralizada, evitando o colapso da rede de fibrilas.

No *primer* encontram-se moléculas bifuncionais, além de solventes como acetona, água e álcool etílico cuja função é deslocar e promover a rápida evaporação da água presente entre as fibrilas colágenas, permitindo que os monômeros hidrofóbicos do adesivo preencham esses espaços sem que haja colapso da rede de fibrilas desmineralizadas. A permeação pelo monômero bifuncional na dentina inerentemente úmida é facilitada pela presença de radicais hidrófilos em sua molécula (Swift *et al*., 1995; Meerbeek *et al*., 1996). Os *primers* apresentam tensão superficial adequada para a interação da dentina com o adesivo, ou seja, eles transformam uma condição de superfície dentinária altamente hidrófila para uma condição menos hidrófila (Meerbeek *et al*., 1996), por apresentarem terminações hidrófobas em sua composição. O adesivo teria a função de estabilizar a camada híbrida, promovendo a conexão com os compósitos resinosos e a estrutura dentinária (Meerbeek *et al*., 1996; Li *et al*., 2000).

Entretanto, devido ao condicionamento ácido que desloca em profundidade cristais de hidroxiapatita, constata-se a presença de uma ampla camada exposta de fibras colágenas não permeadas pelos monômeros resinosos, propiciando a presença de uma zona fraca, sob a camada híbrida. Além disso, os três passos de aplicação do sistema adesivo convencional de três passos, do tipo, condiciona e lava, permite a inclusão de erros técnicos que contribui para a diminuição da efetividade da união resina/dentina (Swif *et al*., 1995). Como parte da limitação do erro técnico, e para ampliar a efetividade da união resina/dentina, propôs-se a simplificação da técnica adesiva, com a introdução de sistemas

adesivos convencionais, em apenas dois passos de técnica. Dessa forma, o adesivo e o *primer* são apresentados em um só frasco (Swif *et al*., 1995; Cilli *et al*., 2005).

Quase em sequência, foram inseridos também os sistemas adesivos de que apresentavam em sua composição monômeros ácidos que dissolviam parcialmente a *smear layer*, os adesivos *self-etching* (Tay *et al*., 2002; Breschi *et al*., 2008). Na tentativa de diminuir a extensão da desmineralização da dentina, e consequentemente diminuir ou eliminar a camada de colágeno exposto, não permeado pelos monômeros resinosos, foram propostos os sistemas autocondicionantes que incluem a presença de um primer ácido entre seus componentes, eliminando o passo de lavagem/secagem, sendo o primeiro deles o MDP. A ação desses sistemas adesivos decorre da desmineralização dentinária simultânea a infiltração dos monômeros bifuncionais. O mesmo princípio de desmineralização subsuperficial que é realizado pelos adesivos convencionais é atingido pelos adesivos autocondicionantes. Entretanto, não removem completamente a smear layer da superfície dentinária, apenas modifica-a pela ação dos monômeros ácidos, promovendo assim uma camada híbrida delgada e mais homogênea comparada aquela produzida pelos sistemas do tipo condiciona e lava. A menor espessura teoricamente é devida à diminuição gradual da acidez do *primer* sob o tecido dentinário devido ao efeito tampão da dentina. (Ceballos *et al*., 2003; Manuja *et al*., 2012). Similar os adesivos *etch&rinse*, os *self-etching* podem também ser apresentados em um único passo (primer e adesivo misturados e aplicados), ou dois passos (condicionamento com o primer ácido e em seguida aplicado o adesivo).

Apesar das melhorias feitas nos adesivos dentinários atuais, a interface adesiva ainda permanece sendo o elo fraco em uma restauração adesiva. Diante das características naturais, a dentina requer uma técnica úmida de adesão, o que favoreceu o desenvolvimento de adesivos dentinários com formulações com componentes hidrófilos, possibilitando a retenção dos monômeros resinosos, garantindo o sucesso imediato do processo adesivo (Kanca, 1992). Contudo, em médio e longo prazo muitas das restaurações perdem a capacidade de selar e proteger os tecidos dentinários íntegros, levando à nanoinfiltração, microinfiltração marginal e à recorrência de cárie, o que caracteriza o insucesso dos procedimentos adesivos, sendo uma das mais frequentes causas de trocas de restaurações (Chersoni *et al*., 2004).

Mesmo restaurações com selamento ótimo na interface resina/dentina, pode ocorrer infiltração entre a restauração e a estrutura dentária, identificada por Sano *et al*., 1995, como nanoinfiltração produzida pela penetração do nitrato de prata na interface, observada em microscopia de transmissão ou varredura ao longo da interface das restaurações. Eles descreveram como a ocorrência de padrões de infiltração nanométricos ao redor das fibras colágenas, dentro da camada híbrida as quais eles chamaram de nanoinfiltração. Essa nanoinfiltração representa espaços laterais a camada hibrida e podem ser resultado da incompleta infiltração do adesivo na dentina desmineralizada. Este tipo de infiltração pode permitir a penetração produtos bacterianos e fluidos orais ou pulpares ao longo da interface e resultar na degradação hidrolítica da matriz polimérica do adesivo e do colágeno da camada híbrida e dessa forma comprometer a estabilidade da união resina/dentina. (Sano *et al*., 1995).

Os sistemas adesivos autocondicionantes, como o Clearfil SE Bond (Kuraray, Japão), apresentam em sua composição monômeros à base de ácidos carboxílicos, como o 10-MDP (10-metacriloloxidecildihidrogênio fosfato), o qual apresenta uma alta capacidade de aumentar a molhabilidade das superfícies dentais, além de quelar íons cálcio presentes na dentina, apresentando um potencial de ligação química com o cálcio da hidroxiapatita residual. Esta ligação química oferece melhor resistência aos processos de hidrólise da camada híbrida e, portanto, pode ajudar a manter estáveis as margens da restauração por um período maior (Ceballos *et al*., 2003; Manuja *et al*., 2012).

Os testes de resistência de união à microtração permitem a realização de medições em pequenas áreas, o que torna possível avaliar a força de adesão dos compósitos resinosos à dentina sadia e ou cariada. A técnica visa distribuir tensões uniformes nos espécimes. Vários estudos têm indicado que a resistência da união resina/dentina depende do tipo de substrato (cariado ou sadio) e dos sistemas adesivos utilizados (Wei *et al*., 2010).

Dessa forma, mesmo com todas as melhorias conseguidas pelo emprego de tecnologia aos sistemas adesivos atuais, a heterogeneidade do substrato dentinário, os aspectos relevantes da dentina afetada por cárie e a intrínseca presença de umidade dificultam o sucesso do procedimento adesivo.

Uma vez que o substrato dentinário acometido por cárie apresenta alterações em sua estrutura morfológica, histológica e bioquímica, os componentes minerais de cálcio e fosfato diminuem na região da dentina afetada por cárie quando comparada à dentina sadia. As diferenças estruturais e composição encontradas não interferem apenas no procedimento de condicionamento ácido, mas também na infiltração dos monômeros resinosos na dentina desmineralizada, o que induz a grandes alterações na interface adesiva quando comparada àquelas encontradas em dentina sadia (Nakajima *et al*., 2011). O substrato dentinário afetado por cárie apresenta-se modificado em relação à dentina sadia em composição (bioquímica, morfológica e histológica), a perda da proteção desta porção mineral que envolve as fibras colágenas na dentina, torna a estrutura de colágeno vulnerável, aumentando a suscetibilidade à degradação enzimática e comprometendo a camada hibrida em relação à degradação hidrolítica (Tjäderhane *et al*., 2013).

Além disso, as fibras colágenas na camada híbrida mal infiltrada, são submetidas a vários graus de danos mecânicos irreversíveis pelo processo de mastigação. Esta rede de fibras colágenas da camada mal infiltrada apresenta um módulo de elasticidade de 10-100 MPa, enquanto as fibras colágenas infiltradas pelos monômeros resinosos apresentam um módulo de elasticidade de 2,5 GPa, essa redução da elasticidade permite microrupturas da estrutura das fibras colágenas uma vez que estão submetidas a cargas mastigatórias constantes (Tjäderhane *et al*., 2013). Por estas razões, a remineralização das fibras colágenas da camada híbrida representa uma abordagem atrativa e inovadora uma vez que com esta remineralização ocorreria o reestabelecimento das propriedades mecânicas e o seu estado mineralizado normal, sendo diretamente proporcional a durabilidade da adesão resina/dentina.

A melhor compreensão do processo de remineralização do substrato dentinário representa implicações positivas em procedimentos adesivos e que levam a novos métodos para preservação e proteção deste tecido.

3. PROPOSIÇÃO

Este trabalho objetivou avaliar a resistência da união à dentina desmineralizada após ser tratada com diferentes agentes remineralizantes: NaF (0,2%), Pasta MI Paste™ contendo CPP-ACP e o peptídeo P_{11-4} contido no Curodont™ Repair, utilizando-se diferentes tipos de sistemas adesivos (*etch&rinse* e *self-etch*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

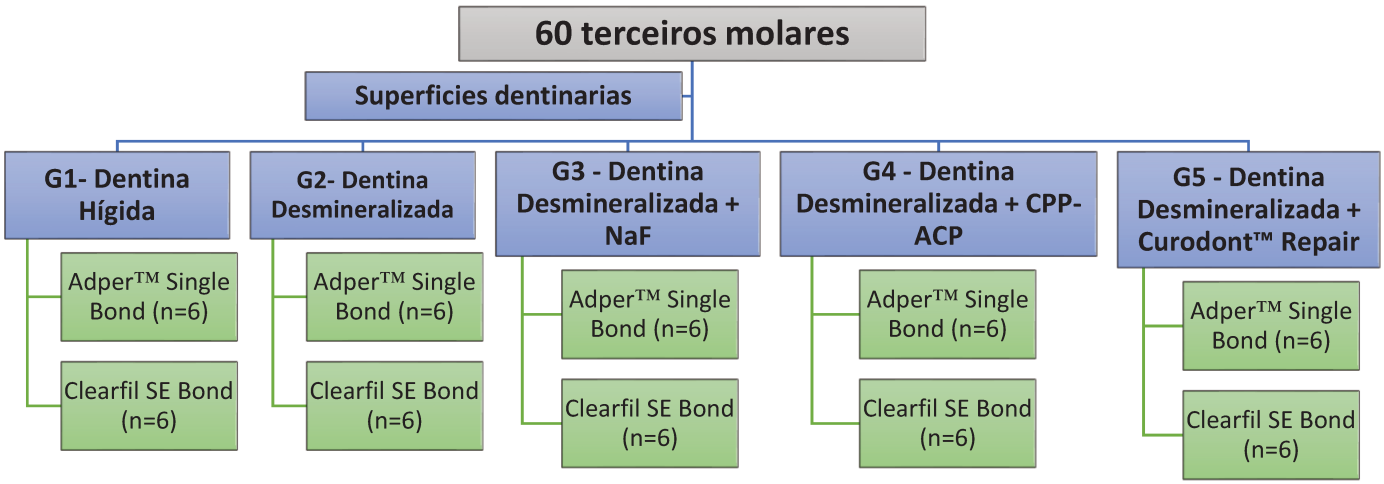
Este estudo foi conduzido após a aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (ANEXO 1).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento do experimento foi inteiramente casualisado e desenvolvido conforme mostra no organograma abaixo:

Fator 1: Substrato Dentinário – dividido em 5 níveis (**Controle Positivo** – dentina hígida/sem tratamento; **Controle Negativo** – Dentina desmineralizada/sem tratamento; **NaF a 0,2%**, **MI Paste™** (GC Internacional, Itabashi-ku, Tóquio, Japão); **Curodont™ Repair** (Credentis AG, Dorfstrasse, Windisch, Suíça);

Fator 2: Tratamento Remineralizador/Estratégia de Adesão – dividido em 2 níveis: **Adper™ Single Bond 2.0** (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) e **Clearfil SE Bond** (Kuraray Co. Japan).



Organograma 1 – Desenho Experimental

4.3 COLETA, ARMAZENAGEM, SELEÇÃO E PREPARO DOS DENTES

Foram utilizados 60 terceiros molares humanos, livres de cárie, doados conforme protocolo nº 088/2011 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (ANEXO 1). Os dentes foram limpos manualmente com curetas periodontais, a fim de se remover debris orgânicos e inorgânicos (Figura 4A e 4B). O terço oclusal e as raízes foram seccionados com disco diamantado dupla face, em cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler, Lake, Bluff, IL, USA), obtendo-se superfícies dentinárias de profundidade média (Figura 4C e 4D). As superfícies dentinárias foram lixadas e planificadas utilizando-se lixas de carboneto de silício GRIT 600 umedecidas, os remanescentes de dentina coronária armazenados em solução saturada de timol ≅ 0,067%, a uma temperatura de 4 °C, até o momento da utilização (Figura 4E e 4F).

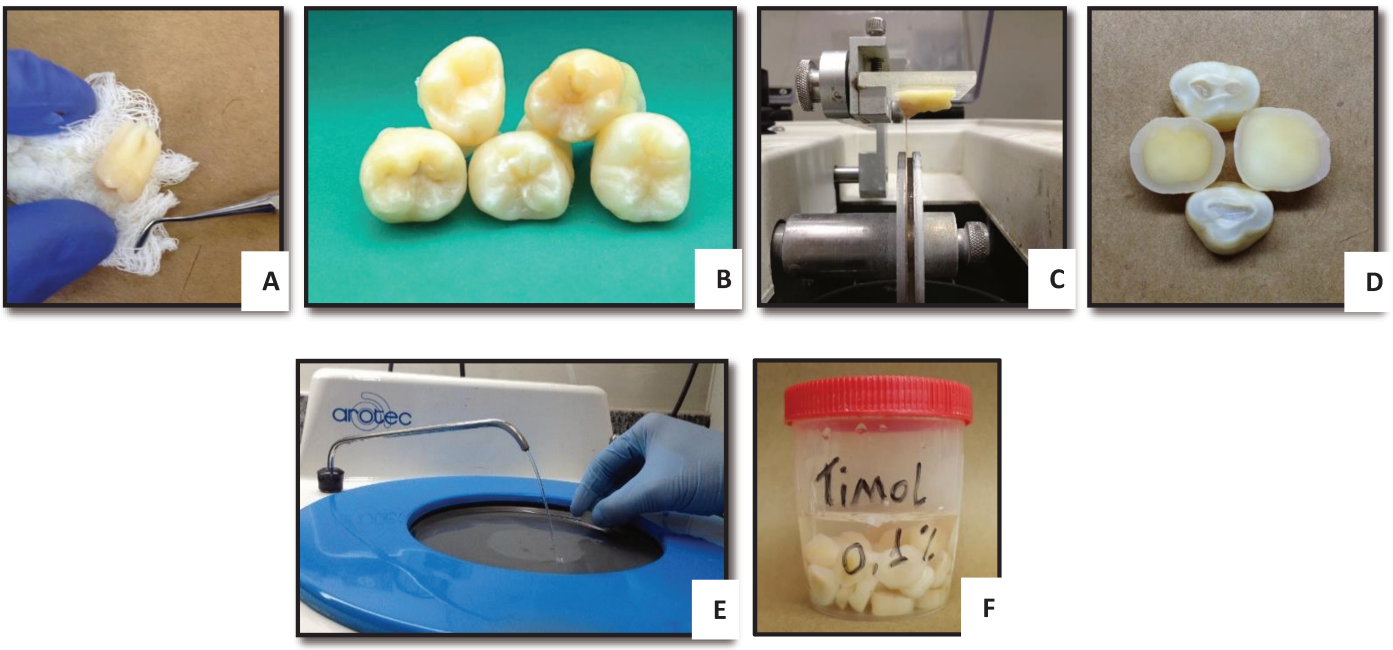


Figura 4: Sequência das etapas realizadas para armazenamento dos dentes. **A**. Limpeza dos dentes; **B**. Terceiros molares limpos; **C**. Secção transversal do terço oclusal e radicular, com descarte das raízes; **D**. Fragmentos dentinários obtidos; **E**. Desgaste coronário para padronização da dentina coronária remanescente. **F**. Armazenamento dos remanescentes coronários de interesse em Timol aproximadamente 0,067%.

4.4 PRODUÇÃO DA DENTINA DESMINERALIZADA – METODO QUÍMICO

4.4.1 PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE DESMINERALIZAÇÃO

Foi realizado um estudo piloto para padronização do tempo de desmineralização com gel ácido contendo 6% de carboximetilcelulose em pH 5,0, contendo 0,1 M de ácido lático titulado para pH 5,0 com solução concentrada de KOH (Sacramento *et al*., 2012). Foram utilizados 6 (seis) espécimes, para padronização do tempo de exposição ao gel ácido, visando a formação da dentina desmineralizada (simulando a dentina afetada por cárie). Após preparados como descrito anteriormente, os dentes foram divididos em 2 grupos, de acordo com o tempo de desmineralização (24 e 48h). Os espécimes foram impermeabilizados com verniz ácido resistente (esmalte para unhas – Coloroma; CEIL Com. Exp. Ind. Ltda., São Paulo, SP, Brasil), deixando uma das metades da superfície dentinária exposta (Figura 5A). Em seguida, foram imersos em 5 mL do gel ácido por 24h e 48h (Figura 5B e 5C). Após 24h ou 48h, foram lavados em água deionizada e em seguida seccionados no sentido longitudinal em cortadeira metalógrafica (ISOMET 1000, Buehler, Lake, Bluff, IL, USA) (Figura 5D). Então, as duas secções mais centrais de cada segmento coronário foram polidas em lixas de carboneto de silício na sequência de granulação – GRIT: 400, 600, 800, 1200, 2500 e 4000 (Figura 5E) para observação em microscópio de luz polarizada. As secções com aproximadamente 0,15 mm de espessura (Figura 5F), foram submetidos a banho de ultrassom durante 5 minutos (Figura 5G e 5H). Prosseguindo, os espécimes foram observados em microscópio de luz polarizada (Microscópio Leica modelo DMLP, com uma câmera (DFC 280 - Leica microsystens, Alemanha) acoplada, utilizando o Software LAS - Leica Application Suite, versão 2.8.1 (Leica microsystens, Alemanha) (Figura 5I), identificando-se a profundidade e a homogeneidade da desmineralização. Verificou-se que o tempo de 48h de desmineralização produziu maior profundidade e homogeneidade de desmineralização do que 24h, como mostrado no APÊNDICE 1 e 2 comparadas à dentina sadia (APÊNDICE 3).

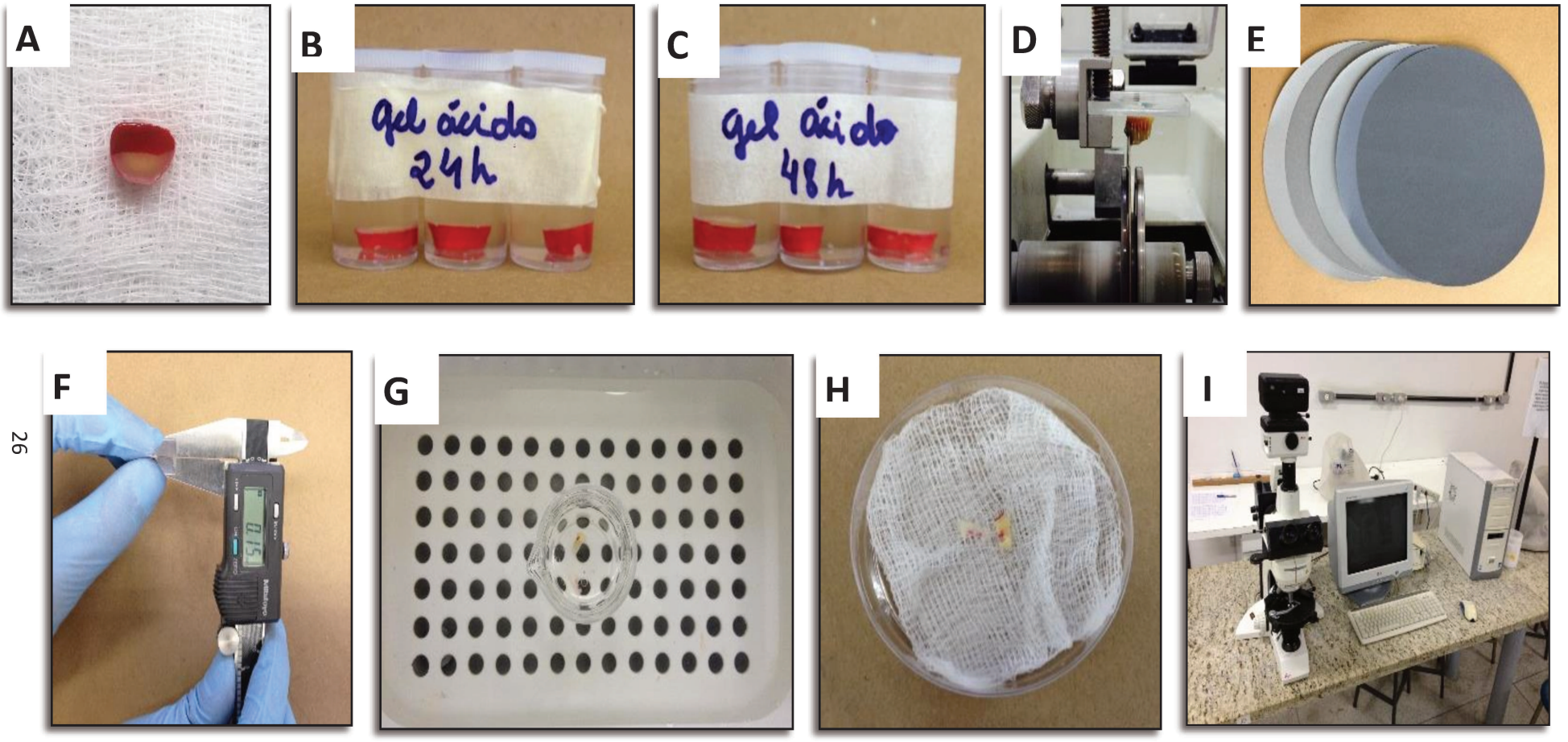
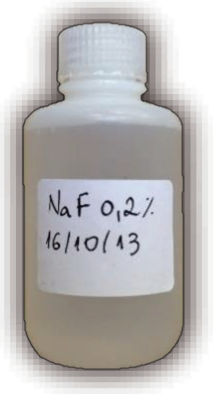


Figura 5: Etapas realizadas para padronização da desmineralização. **A.** Superfície dentinária impermeabilizada com verniz ácido resistente; **B. e C.** Espécimes submersos no gel desmineralizador. **D**. Cortes para produção das fatias; **E.** Sequência de lixas; **F.** Mensuração da fatia; **G. e H.** Espécimes submetidos a banho de ultrassom e armazenados para leitura em Microscópio por Luz Polarizada.

Após a padronização do tempo de desmineralização em 48 horas, foram utilizados os 48 espécimes foram desmineralizados.

4.5 TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DENTINÁRIA

Tabela 1 - Composição dos agentes remineralizadores

Produto	Composição	Fabricante/Nº. de Lote	pH
NaF 0,2% 	0.2g de NaF em 100 ml de água deionizada	--	pH: 7,0
MI Paste™	Glicerol, CPP-ACP, D-Sorbitol, Propileno Glicol, Dioxido de titânio e silício.	GC Internacional, Itabashi-ku, Tóquio, Japão 100723l	pH: 6,94
Curodont™ Repair	Peptídeo P11-4 – sequência de aminoácidos – (Ace-Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu-Phe-Glu-Gln-Gln-NH2)	Credentis AG, Dorfstrasse, Windisch, Suíça 203X	pH: 7,0

Gln – glicina; Ace – xxxx; Arg – arginina; Glu – ácido glutâmico; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina;

As superfícies de dentina foram aleatoriamente distribuídas nos grupo de acordo com o tratamento (Organograma 1).

Grupo 1 – Dentina Hígida: dentina sadia – controle positivo:

No grupo 1 as superfícies de dentina não receberam tratamento desmineralizador.

Grupo 2 – Dentina desmineralizada: dentina afetada – controle negativo:

No grupo 2 as superfícies de dentina foram desmineralizadas mas não receberam tratamento remineralizador.

Grupo 3 – Dentina desmineralizada + NaF 0,2%:

As amostras foram lavadas em água deionizada por 10 s, secas com papel absorvente (Figura 6A e 6B), em seguida com uma seringa de insulina (1mL) foi aplicado 0,2 mL de solução de NaF, permanecendo por 1 minuto sobre a superfície de dentina (Figura 6C e 6D). O excesso de NaF foi removido com papel absorvente (Figura 6E).

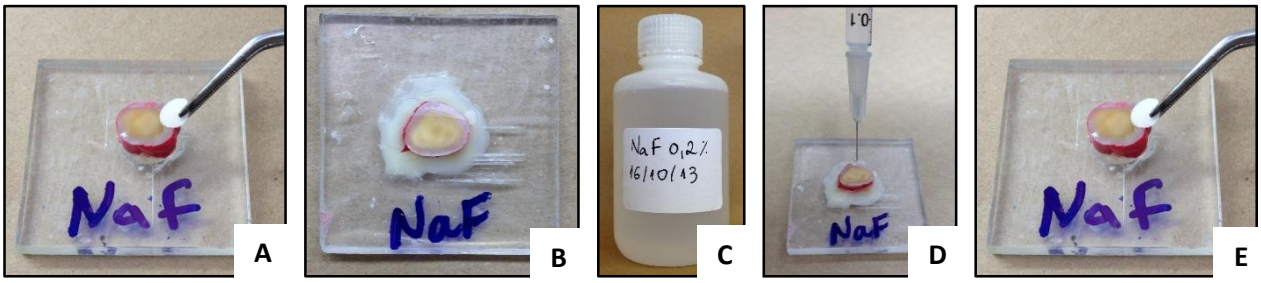


Figura 6: Sequência de aplicação do Grupo 3. **A. e B.** Secagem da superfície dentinária; **C.** Solução de NaF; **D.** Aplicação da solução na superfície dentinária; **E.** Secagem do excesso da solução de NaF.

Grupo 4 – Dentina desmineralizada + CPP-ACP (MI Paste™):

As amostras foram lavadas em água deionizada por 10 segundos, secas com papel absorvente (Figura 7A e 7B), em seguida com uma seringa de insulina (1 mL) foi aplicado 0,1 mL de CPP-ACP (MI Paste™, GC International, Itabashi-ku, Tóquio, Japão) (Figura 7C) e aplicado levemente com *microbrush* na superfície dentinária permanecendo por 1 minuto (Figura 7D). A seguir a superfície dentinária foi lavada

com água por 10s e o excesso de MI Paste™ foi removido (Figura 7F) e a superfície seca com papel absorvente (Figura 7G).

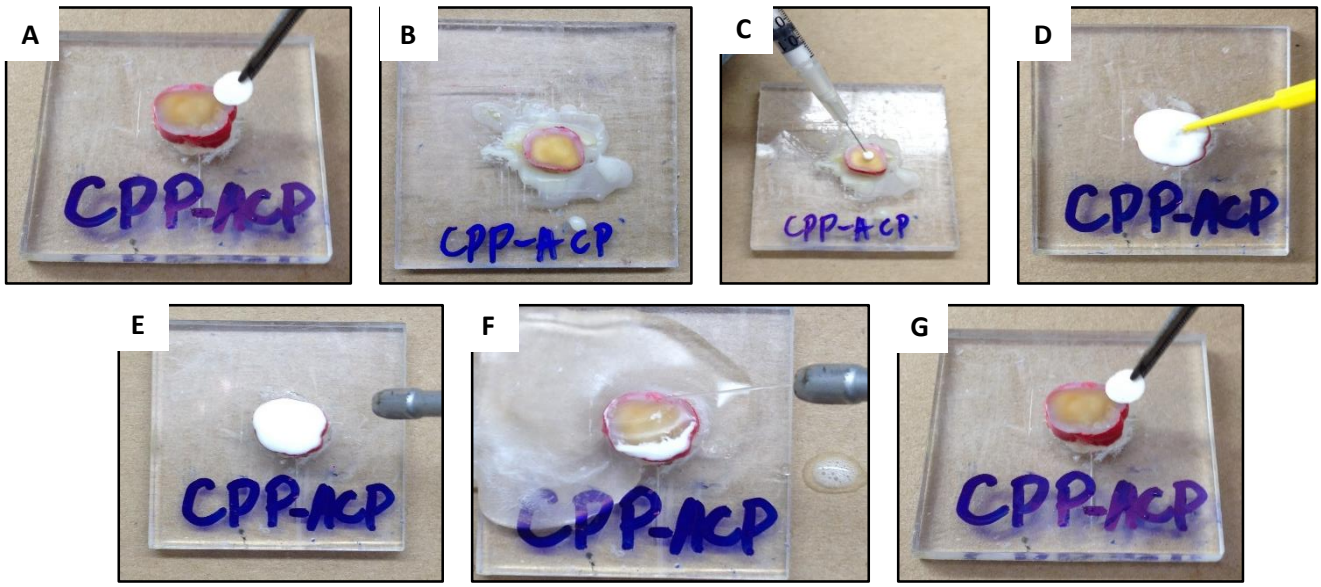


Figura 7: Protocolo de aplicação do Grupo 4. **A. e B.** Secagem da superfície dentinária; **C.** Aplicação da solução na superfície dentinária; **D.** Aplicação com o auxílio de um *microbrush*; **E. e F.** Lavagem da superfície dentinária para remoção do excesso de MI Paste™; **G.** Secagem do superfície dentinária.

Grupo 5 – Dentina desmineralizada + Curodont™ Repair:

As superfícies de dentina foram lavadas com água deionizada por 10 segundos, secas com papel absorvente (Figura 8A), em seguida o conteúdo do frasco de Curodont™ Repair foi dissolvido pela inserção de 0,5 mL de água deionizada com seringa de insulina (1 mL) (Figura 8B e 8C) no receptáculo do frasco. Foram depositados 0,1mL de Curodont™ Repair sobre a superfície dentinária e deixado agir por 5 minutos (Figura 8D). Foram depositados 0,1 mL da solução aquosa saturada em Ca e PO_4, produzida no Laboratório de Odontopediatria da FOP/UNICAMP (Figura 8E e 8F). A seguir, o excesso foi removido com papel absorvente (Figura 8G).

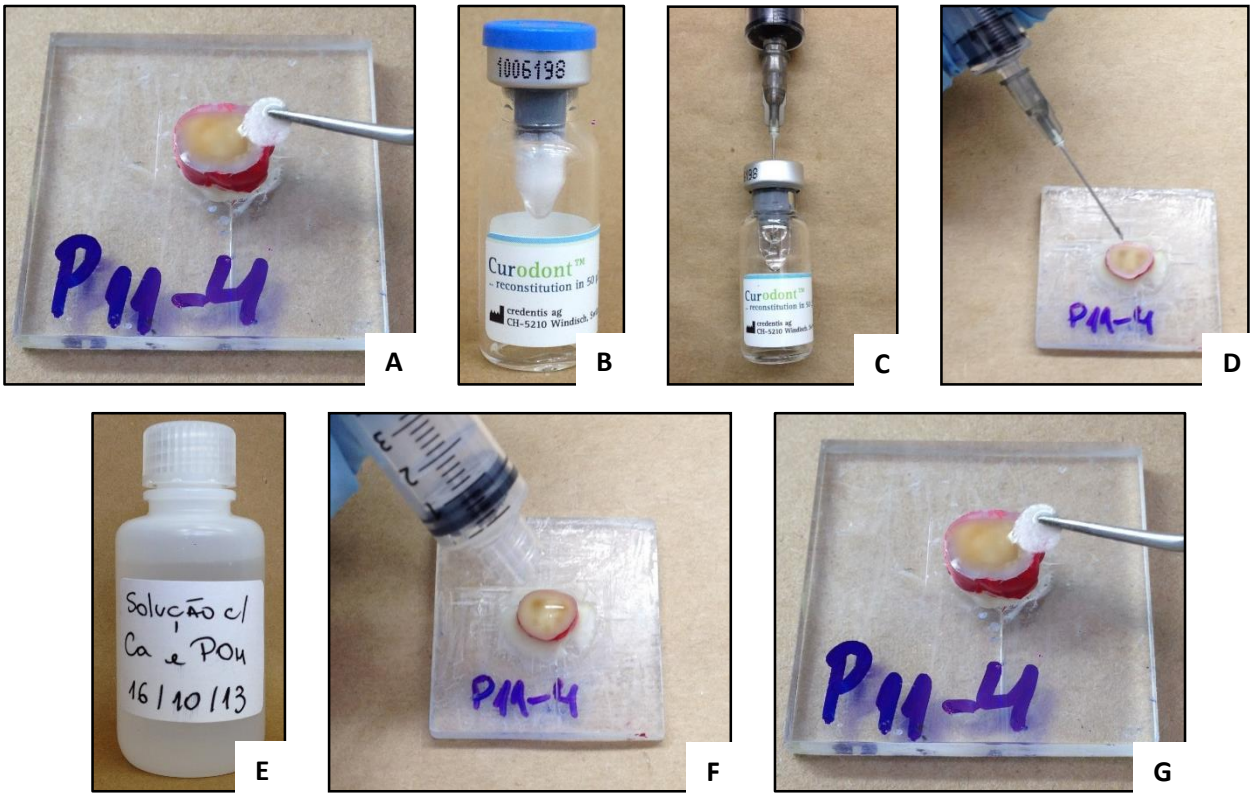


Figura 8: Protocolo de aplicação do Grupo 5. A. Secagem da superfície dentinária; **B e C**. Curodont™ Repair; **D.** Aplicação do Curodont™ Repair. **E**. Solução com Ca e PO_4; **F.** Aplicação da solução com Ca e PO_4; **G.** Secagem as superfície dentinária.

4.6 PROCEDIMENTO DE ADESÃO

Após os tratamentos das superfícies dentinárias, foram realizados os procedimentos de adesão utilizando-se os adesivos: Adper™ Single Bond 2.0, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) e Clearfil™ SE Bond (Kuraray Medical Inc, Kurashiki, Tokyo, Japan**)**. O sistema adesivo foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante. A composição e os fabricantes do sistema adesivo e compósito estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Composição, fabricante, pH e técnica de aplicação segundo o fabricante dos sistemas adesivos e compósito utilizados no estudo.

Produto	Composição	Fabricante (Número de Lote)	Valor do pH	Técnica de Aplicação
RESINA COMPOSTA FILTEK™ Z350	BIS-GMA, BIS-EMA, UDMA com pequenas quantidades de TEGDMA, nanopartículas de sílica não aglomerada	3M Dental Products, St. Paul, MN, USA (51202)	--	- Inserção incremental de 2mm; - Fotoativação (20s)
ADPER™ SINGLE BOND 2.0 (SB)	**(1) Ácido:** Ácido Fosforico a 37% **(2) Adesivo:** Dimetacrilatos, Bis-GMA, HEMA, copolímero dos ácidos poliacrílicos e poliitacônico, fotoiniciador, etanol e água.	3M Dental Products, St. Paul, MN, USA (51202)	pH=0.6 (condicionamento ácido) pH=4.7 (Primer+Bond)	- Condicionamento ácido (15s); - Lavagem pelo dobro do tempo; - Aplicar uma gota de adesivo em toda a superfície; - Secar levemente e fotoativação (10s)
CLEARFIL™ SE BOND (CSE)	**Primer:** MDP, HEMA, dimetacrilatos hidrofílico de canforoquinona, N.N-Dietanol p-toluidina e água **Bond:** MDP, Bis-GMA, HEMA, dimetacrilatos hidrofóbico de canforoquinona, N.N-Dietanol p-toluidina, Sílica coloidal silanizada.	Kuraray Medical Inc, Kurashiki, Tokyo, Japan **Primer**: 00861A **Adesivo**: 01262A	pH= 2.0 (**Primer**) pH=2.0 (**Bond**)	- Aplicação do Primer (20s); - Secar levemente; - Aplicação do adesivo e fotoativação (10s).

Os procedimentos adesivos foram realizados de acordo com o preconizado pelos fabricantes de ambos os sistemas utilizados, descritos brevemente a seguir e representados na Figura 9.

Adper™ Single Bond 2.0 (SB) - Foi realizado condicionamento com ácido fosfórico 37% (Condad 37- FGM, DENTSCARE LTDA, Joinville, Santa Catarina, Brasil – #070410), por 30 segundos sobre o esmalte e 15 segundos sobre a dentina (Figura 9A e 9B) e em seguida lavagem por 60s. O sistema adesivo foi aplicado com

microbrush e seu espalhamento e remoção de excesso se deram com leve jato de ar, em seguida foi fotoativado por 10s (Figura 9C e 9D). A resina composta fotopolimerizável Filtek™ Z350, cor A2, foi utilizada em incrementos de 2 mm, até completar o procedimento atingindo a altura de 4 mm de compósito (Figura 9E, 9F e 9G). Cada incremento foi fotoativado por 20 segundos utilizando-se o aparelho Fotoativador LED Valo (Ultradent) (Figura 9D e 9F), apresentando irradiância de 1000 mW/cm^2. Os conjuntos resina/dentina foram armazenados em água destilada a 37°C por 24h (Figura 9G E 9H).

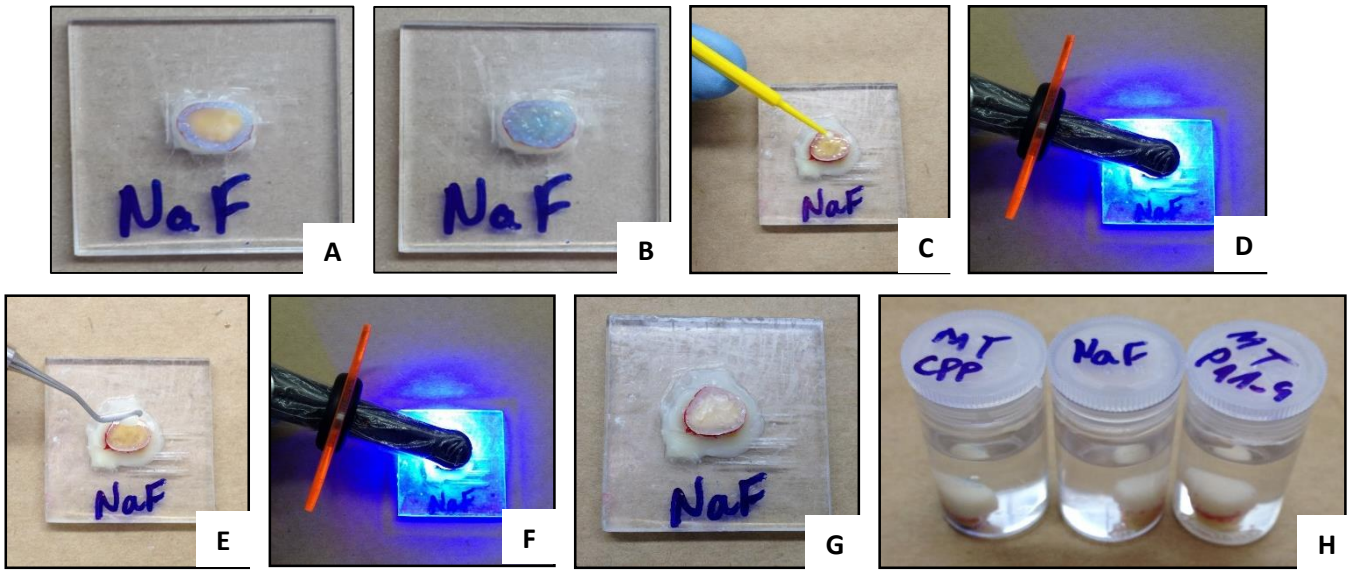


Figura 9 – Procedimentos Adesivos – Sistema Convencional. **A. e B.** Condicionamento ácido na superfície de esmalte e dentina; **C.** Aplicação do adesivo; **D.** Fotoativação; **E.** Inserção de incrementos de resina composta; **F.** Fotoativação; **G.** Confecção dos blocos de resina; **H.** Armazenamento em água por 24h.

Clearfil™ SE Bond (CSE) – Foi aplicado o Primer com *microbrush* por 20 segundos (Figura 10A), e aplicado levemente o jato de ar, logo após foi aplicado com o microbrush o adesivo e realizou-se seu espalhamento com um leve jato de ar e em seguida foi fotoativado por 10 segundos (Figura 10B) com o mesmo aparelho descrito para o sistema adesivo Adper Single Bond 2. A resina composta fotopolimerizável Filtek™ Z350, cor A2, foi utilizada até atingir a altura de 4 mm de compósito em incrementos de 2 mm (Figura 10C e 10D). Cada incremento foi fotoativado por 20 segundos utilizando o aparelho Fotoativador LED Valo (Ultradent) (Figura 10E e 10F), apresentando irradiância de 1000 mW/cm^2. Os conjuntos resina/dentina foram armazenados em água destilada a 37°C por 24h (Figura 10G).

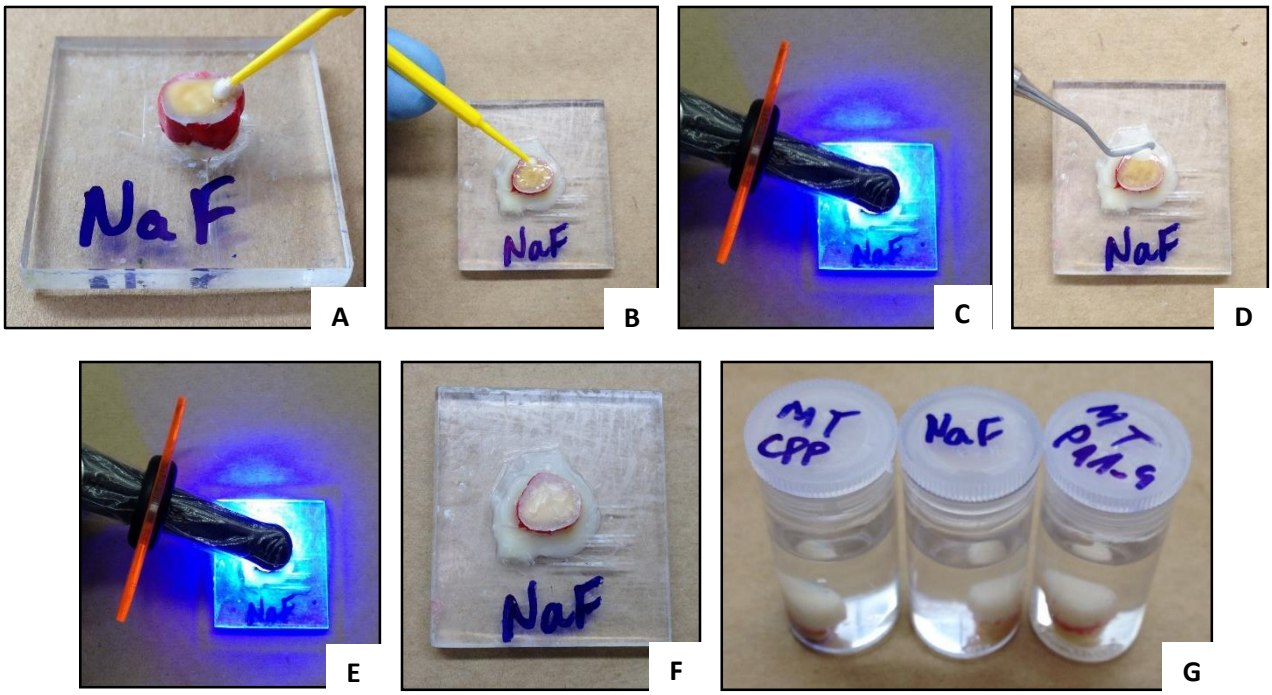


Figura 10 – Procedimentos Adesivos – Sistema Autocondicionante. **A. e B.** Aplicação do *primer* ácido e aplicação do adesivo; **C.** Fotoativação; **D.** Inserção de incrementos de resina composta; **E.** Fotoativação; **F.** Confecção dos blocos de resina; **G.** Armazenamento em água

4.7 ENSAIO DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO A MICROTRAÇÃO

4.7.1 OBTENÇÃO DOS PALITOS

Cada conjunto dente/restauração foi adaptado à máquina de corte e foram realizados cortes seriados perpendiculares à interface de união (dentina/adesivo/resina-composta) no sentido mésio-distal e vestíbulo-lingual. Foram obtidos espécimes em forma de “palitos” (50 por grupo, em média 8 palitos por dente da região central, sendo os palitos da região periférica descartados) com cerca de 0,8 mm² de área de secção transversal, mensurada com paquímetro digital (CD-6”BS, Mitutoyo Corporation, Tokyo , Japan) (Figura11).

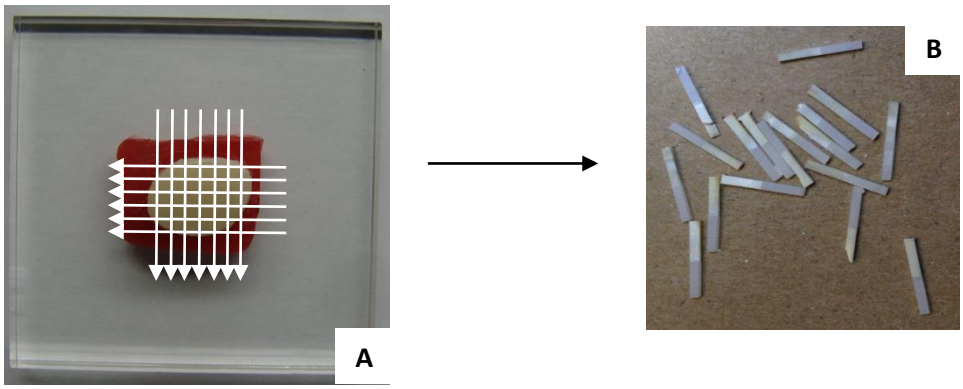


Figura 11 – Sequência das etapas de seccionamento dos conjuntos dentina/resina para obtenção dos palitos. **A.** Foto ilustrando o sentido dos cortes; **B.** Palitos.

4.8 ENSAIO DE RESISTÊNCIA DA UNIÃO

Cada palito foi fixado com a cola à base de cianoacrilato (Super Bonder Power Flex-Gel Control, LOCTITE, Henkel Ltda, Itapevi, São Paulo, Brasil - # EDF) em dispositivos desenvolvidos para o ensaio de microtração. O ensaio de microtração foi realizado na máquina de ensaio universal EMIC DL 500 (São José dos Pinhais) e submetidos sob carga de tração (50 kgf) a velocidade de 1 mm/min (Figura 12A e 12B).

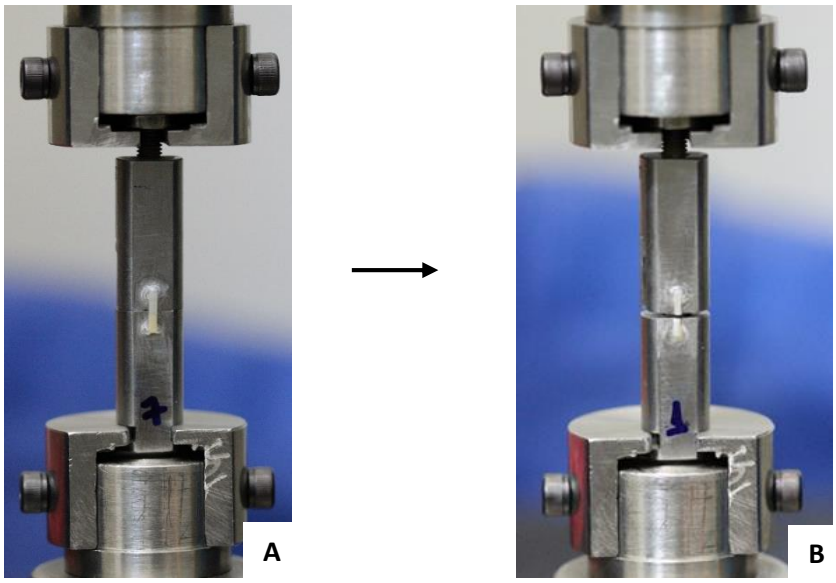


Figura 12 – **A.** Espécime fixado com cola à base de cianoacrilato ao dispositivo de microtração; **B.** Espécime fraturado após o teste de microtração.

4.9 ANÁLISE DO PADRÃO DE FRATURA

Após a realização do ensaio de microtração, a parte de dentina de cada espécime fraturado foi armazenada. Em seguida, foram fixadas em “stubs” de alumínio com o auxílio de fita dupla face de carbono (Electron Microscopy Sciences, Washington 19034 – USA) e desumidificada por 2 horas no interior de um recipiente plástico fechado contendo sílica gel. Todos os espécimes receberam cobertura de ouro/paládio (Balzers, modelo SCD 050 sputer coater, Balzers Union Aktiengesellschaft, Fürstentum Liechtenstein, FL-9496 – Germany) e foram observados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-5600 LV, Japão) a uma aceleração de voltagem de 15 KV, WD=30mm e spotsize 28nm, nos aumentos 50X e 150X. Os padrões de fratura foram determinados por uma análise qualitativa, classificados de acordo com as seguintes falhas: Tipo 1: Falha adesiva; Tipo 2: Falha mista; Tipo 3: Fratura Coesiva em compósito; Tipo 4: Fratura Coesiva em dentina. Para a determinação do erro do método e da determinação do nível de coincidência intra-examinador, as imagens obtidas foram analisadas quanto ao tipo de fratura, duas vezes, por um único examinador calibrado, em dois tempos diferentes, com intervalo de uma semana entre eles. Os resultados foram submetidos ao teste de correlação de Pearson ($p<0,0001$) e o nível de coincidência intra-examinador foi de 95%.

4.10 ANÁLISE ESTATISTICA

Os dados obtidos a partir do ensaio de resistência da união resina/dentina a microtração foram analisados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, sendo verificada a distribuição normal dos dados e em seguida, pelo teste ANOVA two-way e teste Tukey post hoc para comparação entre os grupos ($p<0,05$). Foi realizado o teste Kruskal-wallis para análise do padrão de fratura ($p<0,05$). Foi utilizado o teste de correlação de Pearson para avaliar o nível de coincidência intra-examinador ($p<0,05$), para a avaliação dos sítios de fratura. Os palitos não testados devido a falha prematura durante o período pré-teste foram descartados e não foram contados na análise estatística. Os dados percentuais obtidos dos palitos perdidos no pré-teste foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS DA ANÁLISE DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO (µTBS)

Na tabela 3 podem ser observadas as médias e o desvio padrão da resistência de união a microtração da dentina tratada com diferentes agentes remineralizadores e diferentes sistemas adesivos.

Tabela 3 – Médias dos valores de µTBS resina/dentina (MPa) e desvio padrão, considerando-se o tratamento da superfície dentinária e o sistema adesivo utilizado.

Adesivos	Grupos Experimentais	Médias dos valores de µTBS (MPa)	
Adper™ Single Bond 2 - SB	Dentina Hígida (DH/SB)	**40,85 ± 5,99** 50/58*	Bc
	Dentina Desmineralizada	**26,38 ± 8,64** 50/65	E
	Dentina Desmineralizada + NaF	**33,43 ± 10,41** 50/60	D
	Dentina Desmineralizada + MI Paste™	**45,25 ± 8,82** 50/66	Ab
	Dentina Desmineraliza + Curodont™ Repair	**46,42 ± 12,03** 50/69	Ab
Clearfil™ SE Bond - CSE	Dentina Hígida	**32,95 ± 7,41** 50/60	D
	Dentina Desmineralizada	**25,38 ± 8,58** 50/63	E
	Dentina Desmineralizada + NaF	**35,59 ± 9,18** 50/60	Cd
	Dentina Desmineralizada + MI Paste™	**48,11 ± 11,71** 50/66	A
	Dentina Desmineraliza + Curodont™ Repair	**25,85 ± 9,02** 44/68	E

* número de espécimes avaliados/número total de espécimes; Diferentes letras indicam diferença significativa ($p<0,0001$) entre os tipos de tratamento, pelos testes ANOVA Two-way e Tukey.

Os menores valores de resistência de união a microtração foram obtidos para a dentina desmineralizada, para ambos os sistemas adesivos, não diferindo entre si, não diferindo significativamente da dentina desmineralizada tratada com Curodont™

Repair e restaurada ao sistema adesivo CSE (p>0,05). Os maiores valores de resistência de união foram obtidos quando a dentina desmineralizada foi tratada com MI Paste™, independente do sistema adesivo utilizado (p<0,05), não diferindo significativamente quando foi tratada pelo Curodont™ Repair e utilizado o sistema adesivo SB. O tratamento da dentina desmineralizada com NaF a 0,2%, e sistema adesivo CSE, recuperou os valores de resistência de união da dentina hígida, porém, quando utilizado o sistema adesivo SB, os valores foram significativamente menores que os demais tratamentos, porém, significativamente maiores que os da dentina desmineralizada (p<0,05).

Na figura 13 podem ser observadas as porcentagens dos palitos perdidos pré-teste de μTBS em função dos tratamentos e sistema adesivo utilizado.

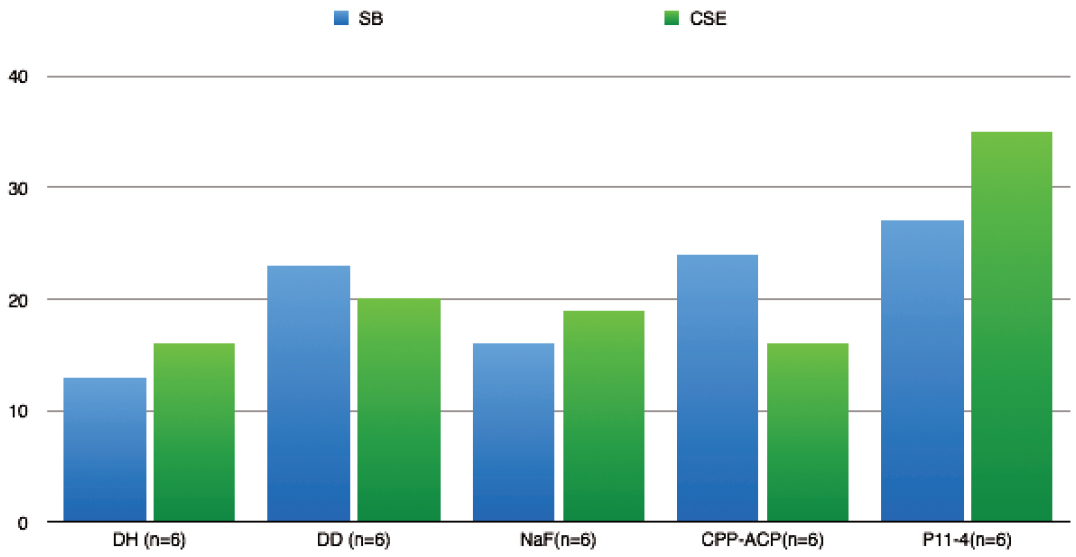


Figura 13 - Porcentagem de palitos perdidos durante o pré-teste para os sistemas adesivos SB e CSE, nos diferentes tipos de dentina.

A análise estatística demonstrou que não houve diferenças significativas (p=0,5149) entre os grupos quanto ao percentual de palitos perdidos durante o período do pré-teste (descolamento precoce).

5.2. RESULTADOS DA ANÁLISE DO PADRÃO DE FRATURA

A tabela 5 representa a distribuição percentual dos padrões de fratura observados para cada sistema adesivo (SB e CSE) nos grupos estudados.

Tabela 5 – Distribuição do tipo de fratura de acordo com sistema adesivo e tratamento remineralizador.

Grupos Experimentais	Distribuição do Modo de Fratura				
	Tipo 1 - Adesiva	**Tipo 2 - Mista**	**Tipo 3 - Coesiva - Compósito**	**Tipo 4 - Coesiva - Dentina**	
Adper™ Single Bond – SB					
Dentina Hígida	**(0%)** 0/50*	**(44%)** 22/50	**(56%)** 28/50	**(0%)** 0/50	Aa
Dentina Desmineralizada	**(76%)** 38/50	**(24%)** 12/50	**(0%)** 0/50	**(0%)** 0/50	Ab
Dentina Desmineralizada + NaF	**(12%)** 6/50	**(84%)** 42/50	**(4%)** 2/50	**(0%)** 0/50	Ac
Dentina Desmineralizada + MI Paste™	**(2%)** 1/50	**(54%)** 27/50	**(6%)** 3/50	**(38%)** 19/50	Aa
Dentina Desmineralizada + Curodont™ Repair	**(2%)** 1/50	**(68%)** 34/50	**(24%)** 12/50	**(6%)** 3/50	Aa
Clearfil™ SE Bond - CSE					
Dentina Hígida	**(0%)** 0/50	**(42%)** 21/50	**(58%)** 29/50	**(0%)** 0/50	Aa
Dentina Desmineralizada	**(42%)** 21/50	**(58%)** 29/50	**(0%)** 0/50	**(0%)** 0/50	Bb
Dentina Desmineralizada + NaF	**(8%)** 4/50	**(86%)** 43/50	**(6%)** 3/50	**(0%)** 0/50	Ac
Dentina Desmineralizada + MI Paste™	**(2%)** 1/50	**(40%)** 20/50	**(8%)** 4/50	**(50%)** 25/50	Aa
Dentina Desmineralizada + Curodont™ Repair	**(93%)** 41/44	**(7%)** 3/44	**(0%)** 0/44	**(0%)** 0/44	Bd

* número de espécimes com falhas/número total de espécimes; ( ) – porcentagem de espécimes com falha; Diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p<0,05$) na distribuição dos escores de tipos de falhas, pelos testes Kruskall-wallis e Student-Newman-Keuls para a comparação entre os sistemas adesivos nos mesmos substratos; Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p<0,05$) na distribuição dos escores de tipos de falhas, pelos testes Kruskall-wallis e Student-Newman-Keuls para a comparação entre os diferentes substratos dentinários para um mesmo sistema adesivo.

O padrão de fratura do tipo 1 apresentou maior incidência quando utilizado o sistema adesivo convencional associado ao substrato desmineralizado (76%), já quando utilizado o CSE a maior incidência do padrão de fratura do tipo 1 foi quando associado ao tratamento com P_{11-4} contido no Curodont™ Repair (93%),

seguida pelo substrato desmineralizado que apresentou um percentual de 42% para o mesmo tipo de falha. O padrão de fratura do tipo 2 apresentou uma maior incidência para ambos sistemas adesivos quando associado ao tratamento com NaF a 0,2% (86%) (SB) e (84%) (CSE), este padrão de fratura ainda é observado quando utilizado SB associado ao tratamento com P_{11-4} contido no Curodont™ Repair (68%), tratamento CPP/ACP – MI Paste™ (54%), aos substratos hígido (44%) e desmineralizado (24%). Para o CSE, o padrão de fratura do tipo 2 ainda foi observado quando associado aos substratos hígido (42%) e desmineralizado (58%) e ao tratamento CPP/ACP – MI Paste™ (40%). O padrão de fratura do tipo 3 apresentou uma maior incidência para ambos sistema adesivos associado ao substrato hígido (56%) (SB) e (58%) (CSE), ainda foi observado incidência deste tipo de fratura quando utilizado o SB associado ao tratamento com P_{11-4} contido no Curodont™ Repair (24%). O tipo de fratura do tipo 4 apresentou uma maior incidência quando utilizado ambos adesivos e associado ao tratamento CPP/ACP – MI Paste (38%) (SB) e (50%) (CSE).

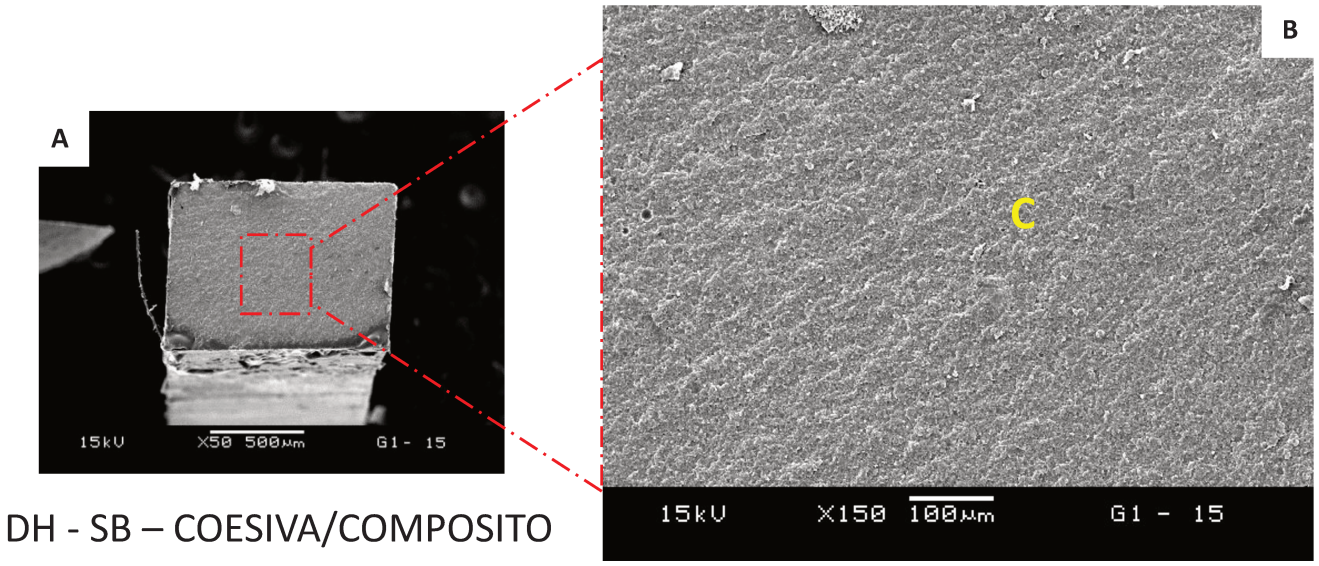


Figura 14 – **A.** Microscopia eletrônica por varredura da área fraturada do espécime do grupo de dentina hígida (X50) associado ao adesivo SB; **B.** Aumento da imagem figura A (X150), mostrando uma fratura do tipo coesiva em compósito. **Letra em amarelo** – **C** - indica área do compósito.

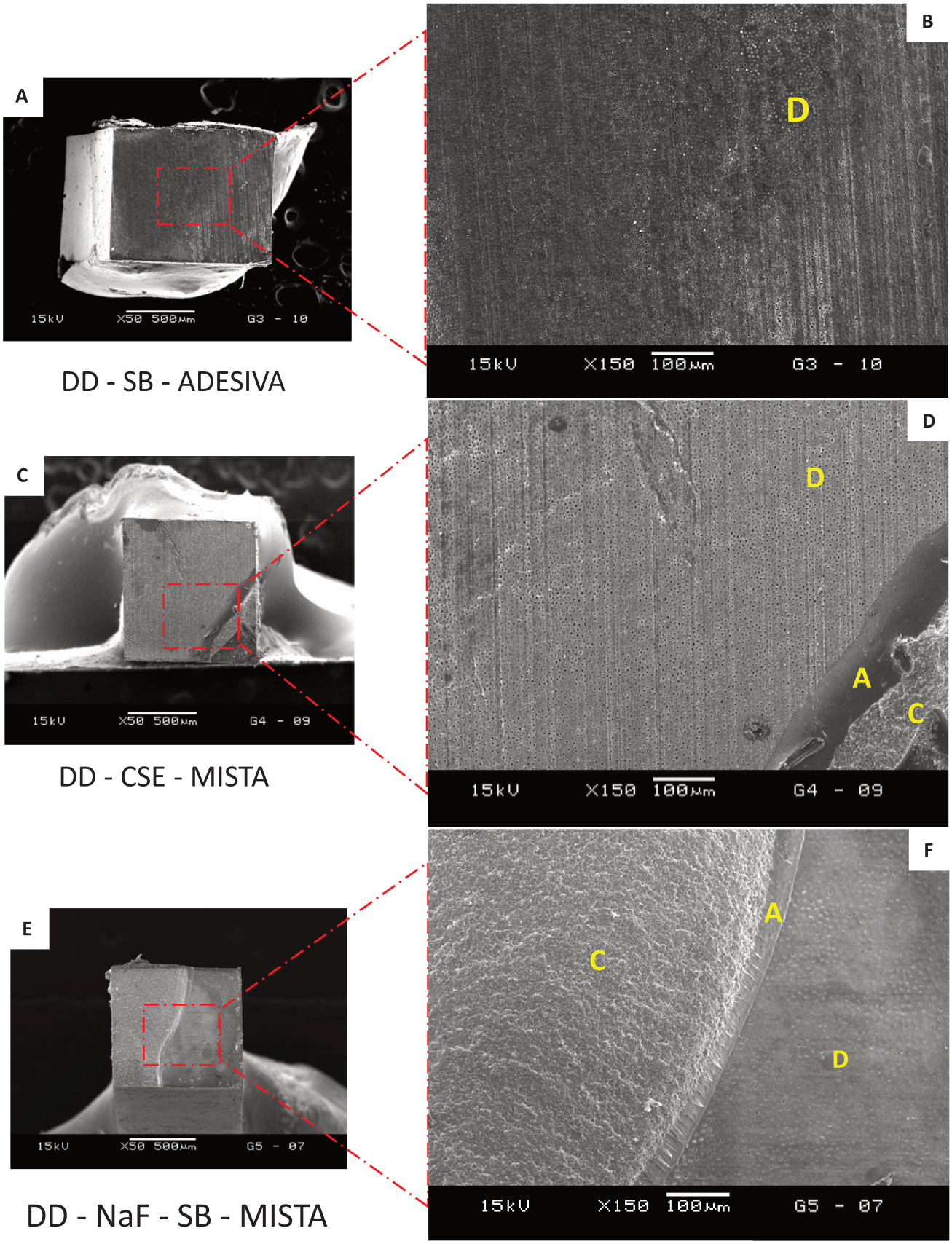


Figura 15 – **A e C.** Microscopia eletrônica por varredura da área fraturada do espécime do grupo de dentina desmineralizada associado ao adesivo SB e CSE (50X); **E.** Área fraturada do espécime do grupo de dentina NaF associado ao adesivo SB **B, D e F.** Aumento da imagem figura **A**, **C e E** (150X) respectivamente, mostrando uma fratura do tipo coesiva em compósito. **Letra em amarelo – A, C e D**: indica área de adesivo, compósito e dentina, respectivamente.

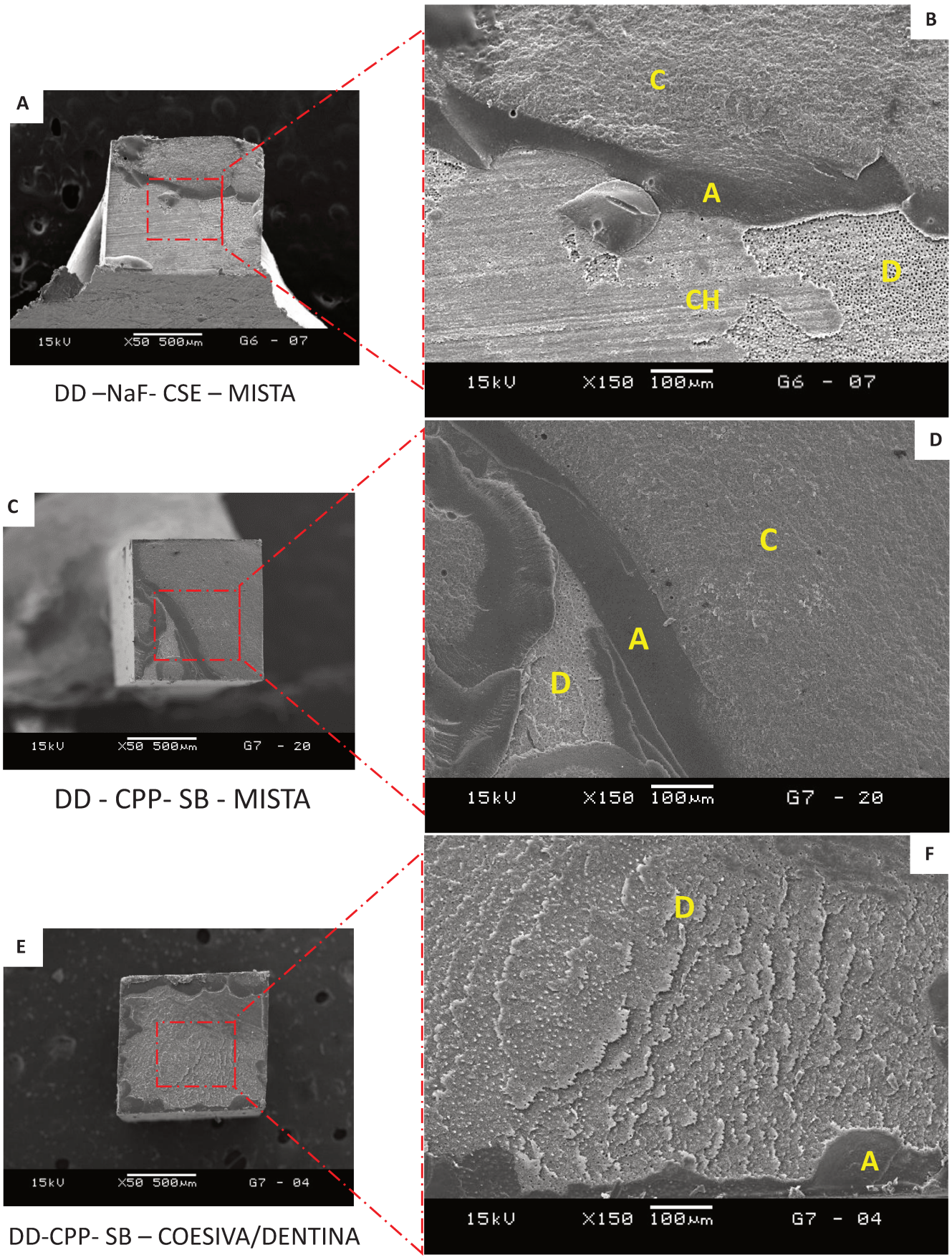


Figura 15 – **A.** Microscopia eletrônica por varredura da área fraturada do espécime quando utilizado NaF associado ao adesivo CSE (50X); **C e E.** Área fraturada do espécime quando utilizado MI Paste™ associado ao adesivo SB e CSE (50X), respectivamente; **B, D.** Aumento da imagem figura **A**, **C** (150X) respectivamente, mostrando fratura do tipo mista; **F.** Aumento da imagem de **E.**, mostrando uma fratura do tipo coesiva em dentina. **Letra em amarelo** – **A, C e D**: indica área de adesivo, compósito e dentina, respectivamente.

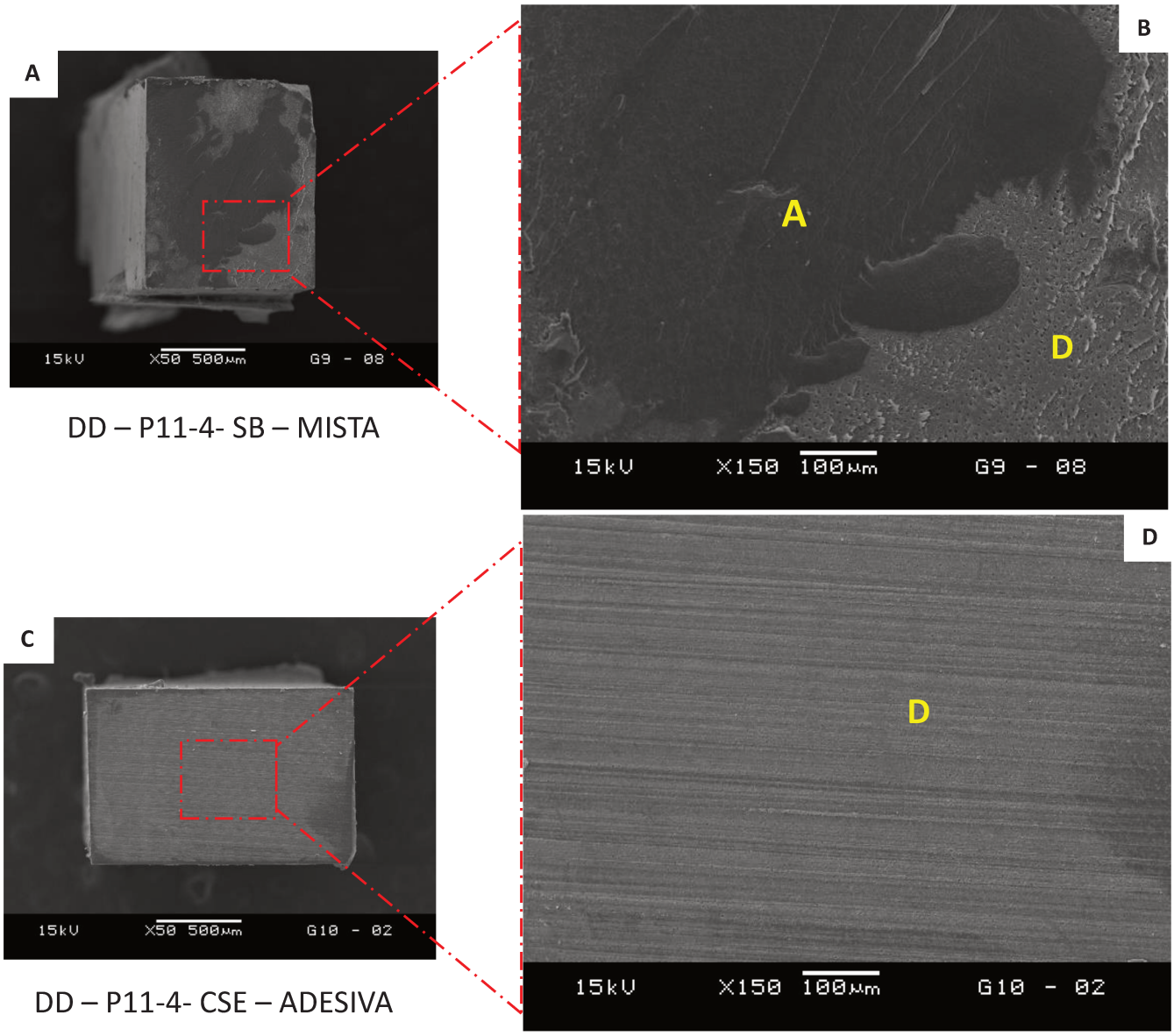


Figura 17 – **A. e C.** Microscopia eletrônica por varredura da área fraturada do espécime quando utilizado o Curodont™ Repair associado ao adesivo SB e CSE (50X), respectivamente; **B e D.** Aumento da imagem figura **A**, **C** (150X) respectivamente, mostrando uma fratura do tipo mista e adesiva respectivamente. **Letra em amarelo** – **A e D**: indica área de adesivo, compósito e dentina, respectivamente.

6. DISCUSSÃO

Há vários problemas que podem afetar a qualidade da união resina/dentina, tanto para o uso de adesivos *etch&rinse* quanto para adesivos *self-etching*, em substrato afetado por cárie ou reversivelmente desmineralizado, dentre eles as diferenças estruturais e químicas encontradas nesse substrato (Marshall *et al*, 1997).

A hipótese nula deste estudo foi rejeitada. Observou-se influência significativa dos fatores em estudo, tipo de sistema adesivo e substrato tratado com agentes remineralizantes, sobre a resistência da união (μTBS) resina/dentina desmineralizada simulando a dentina afetada por cárie.

Interessante notar que apesar de não ter sido um fator de estudo, os grupos controles, positivo/dentina hígida, e negativo/dentina desmineralizada/sem tratamento apresentaram diferença significativa nos valores de μTBS com ambos os sistemas adesivos utilizados no estudo. Estes resultados refletem aqueles observados na literatura, demonstrando que a dentina afetada por cárie, desmineralizada, apresenta menores valores de μTBS comparada a dentina hígida (Yoshiyama *et al*., 2004). Ainda, os resultados obtidos no presente estudo avaliando-se a μTBS, mostraram que a variação do substrato dentinário sadio e desmineralizado, resultou em um comportamento diferente para cada adesivo, corroborando outros trabalhos encontrados na literatura que utilizaram sistemas adesivos convencionais e autocondicionantes (Yoshiyama *et al*., 2000; Yoshiyama *et al*., 2004; Ceballos *et al*., 2003; Doi *et al*., 2004; Pereira *et al*., 2006; Wei *et al*., 2008). Observou-se que para o substrato hígido o sistema adesivo SB produziu maiores valores de μTBS que o CSE. Esses resultados corroboram os de Arrais *et al*., 2004, Cilli *et al*., 2005 e Pereira *et al*., 2006, Ceballos *et al*., 2003, e Doi *et al*., 2004 que utilizaram o mesmo sistema adesivo convencional e na mesma condição do substrato (hígido) que o presente estudo. Esse perfil de desempenho, do SB em relação a dentina hígida, pode estar relacionado a vários fatores, entre eles, a presença da *smear layer* que para os adesivos autocondicionantes, cujo *primer* ácido não seria capaz de remover a camada de debris (*smear layer*), apenas trata-la,

promoveria menor interação com a dentina subjacente. Sabe-se que *a smear* layer apresenta baixos valores de µTBS com a dentina subjacente, e resistência coesiva, podendo representar o elo fraco da união com os materiais resinosos. Ainda, a interação do ácido fosfórico a 37% com a superfície dentinária desmineralizada, quando do uso do sistema adesivo SB, promoveria a remoção da camada de debris de dentina (*smear layer*), aumentando a energia de superfície e a permeação dos espaços interfibrilares, pelos monômeros resinosos, garantindo maior µTBS resina/dentina.

Enquanto que para a dentina desmineralizada, não houve diferença significativa em relação µTBS os sistemas adesivos *etch&rinse* e *self-etching*, não apresentaram diferença significativa, corroborando os estudos de Yoshyama *et al*., 2000, Ceballos *et al*., 2003, Arrais *et al*., 2004, Doi *et al*., 2004, Pereira *et al*., 2006 Wei *et al*., 2008, em situações similares. A dentina intertubular do substrato desmineralizado, exibe maior grau de porosidades do que a dentina do substrato sadio atribuído à perda mineral decorrente da desmineralização pelo processo carioso. Esta perda mineral pode prejudicar severamente a infiltração dos monômeros resinosos, uma vez que este substrato ao ter alterada a estrutura e composição pelo processo de cárie promove a formação de cristais ácido-resistentes (fosfato tricálcico “whitlockite”) que obliteram o lúmen dos túbulos dentinários. Essa obstrução pode diminuir a penetração dos monômeros resinosos no substrato desmineralizado, principalmente relacionado aos adesivos autocondicionantes, uma vez que o *primer* ácido apresenta pH mais alto comparado ao ácido dos adesivos convencionais (Marshall *et al*., 2001).

Outros fatores podem estar relacionados aos menores valores de µTBS para a dentina desmineralizada, como a falha na formação de *tags* resinosos, devido à presença de depósitos minerais ácido-resistentes que obliteram os túbulos dentinários (Marshall *et al*., 2001).

Com o objetivo de melhorar as condições mecânicas e químicas da dentina afetada por cárie, ou no caso deste estudo, da dentina desmineralizada, simulando a dentina afetada por cárie, procedimentos de remineralização podem ser utilizados (Tay *et al*., 2007).

Historicamente, a eficácia do fluoreto de sódio (NaF) como agente remineralizador e cariostárico tem sido bem estabelecida, e a ação tópica deste agente remineralizador tem sido realizada por profissionais para deter a progressão de lesões de cárie ativas (Hamba *et al*., 2011; Prabhakar *et al*., 2013).

Os fluoretos agem promovendo a deposição mineral tanto na superfície quanto em profundidade em áreas desmineralizadas, decorrentes da difusão dos íons em direção ao interior do tecido dentinário afetado (Arends *et al*., 1989; Arends *et al*., 1990; ten Cate, 2005). Este processo diminui a velocidade de progressão de lesões cariosas, podendo ocorrer inclusive hipermineralização da superfície dentinária, onde níveis elevados de íons Flúor são conduzidos para o interior da zona de desmineralização e a impregnação desses íons ocorre na parede dos túbulos dentinários. A hipermineralização ocorre a partir da redução do transporte de íons para as regiões mais profundas da lesão. Isso poderia explicar, em parte, porque as lesões clinicamente diagnosticadas como inativas, com mineralização da superfície, podem apresentar progressão (ten Cate *et al*., 1995). Tendo em vista o processo de adesão e a infiltração dos monômeros resinosos, a precipitação e deposição mineral desorganizada, promovendo uma obliteração dos túbulos dentinários e a hipermineralização do tecido pode não ser favorável ao sucesso dos procedimentos adesivos (Prabhakar *et al*., 2013).

Como pode ser observado no presente estudo, a dentina tratada com NaF a 0,2% apresentou diferente desempenho para ambos os adesivos. Quando este tratamento foi associado aos procedimentos adesivos utilizando o adesivo Adper™ Single Bond 2, as médias dos valores de µTBS foram inferiores as encontradas no grupo de dentina hígida, entretanto, apresentando-se superior aos encontrados para o grupo de dentina desmineralizada sem tratamento. Ainda, quando associado ao Clearfil™ SE Bond, as médias dos valores de µTBS conseguiram recuperar os valores observados do grupo dentina hígido. Estes achados sugerem que o tratamento com NaF 0,2% mostrou um reforço à estrutura desmineralizada de dentina, sem contudo haver maior efetividade na ação do NaF, visto que o Flúor necessita de maior disponibilidade de íons Cálcio para a formação mineral e que não foi disponibilizado mais minerais para o substrato do que aqueles presentes após a desmineralização promovida pelo condicionamento ácido fosfórico para o sistema adesivo *etch&rinse* e/ou a ação do *primer* do sistema adesivo self-etching. O fluoreto

de sódio (NaF), agente remineralizador com comprovada ação nos tecidos dentários, seu mecanismo de ação sugerido foi atribuído ao fato de o íon F, por ser altamente eletronegativo, provavelmente se ligou aos íons Ca^{2+} e outros minerais, que se tornaram disponível no meio oral (Kato *et al.,* 2014).

No presente estudo, as maiores médias dos valores de µTBS foram observadas quando a dentina desmineralizada/afetada foi tratada com MI Paste™, que contém CPP-ACP, utilizando o sistema adesivo *self-etching*, comparado à dentina hígida. Não há na literatura estudo similar ao desenvolvido, utilizando dentina desmineralizada e o agente CPP-ACP para remineralização. Entretanto, similares resultados foram encontrados por Borges *et al*., 2013, embora, utilizando superfície dentinária hígida, observando maiores médias de µTBS utilizando CPP-ACP (MI Paste™) quando comparado ao grupo sem tratamento. Contrariamente a Borges *et al*, 2013, Sattabanasuk *et al.,* 2009 observaram diferença significativa em relação ao grupo sem tratamento, também realizado também, em dentina hígida. A diferença entre os estudos pode ser atribuída ao tempo de aplicação do produto que neste último foi aplicado por 5 min, enquanto que o presente estudo (60 segundos) e o de Borges *et al*., 2013 foi de apenas 3 min.

Importando a ideia para o presente estudo, em um substrato desmineralizado/afetado, as fibras colágenas estão expostas e passíveis de remineralização. Como o agente remineralizador promove a reposição de cálcio e fosfato, sendo estes minerais constituintes do tecido dentinário removidos, a precipitação mineral que ocorreria na dentina desmineraliza/afetada promoveria uma alta resistência de união quando utilizado o sistema adesivo *self-etching* (Clearfil™ SE Bond). Dessa forma, os minerais depositados que não seriam removidos totalmente pela ação dos monômeros ácidos, reforçariam a estrutura das fibras colágenas, proporcionando maior resistência de união à dentina remineralizada.

Borges *et al*., 2013, também sugeriu que a aplicação de MI Paste™ poderia proporcionar um efeito preventivo ao processo de desmineralização, aumentando a remineralização do substrato, e que a interface adesiva poderia apresentar uma diminuição a suscetibilidade às lesões de cárie secundaria quando pré-tratados com MI Paste™. Estudos devem ser realizados no sentido de avaliar a resistência da união em dentina, ao longo do tempo.

O CPP-ACP é um agente que se baseia em um nanocomplexo da proteína do leite, fosfopeptídeo de caseína (CPP) que é um grupo de peptídeos derivados da caseína uma parte da proteína que é encontrada no leite e fosfato de cálcio amorfo (ACP), tem sido pesquisado com o objetivo de liberação lenta de elementos químicos (Ca e PO_4) contribuindo para o processo de remineralização (Reynolds, 1998; Reynolds, 2008; Rahiotis & Vougiouklakis, 2007). Uma vez que os compostos baseados em CPP-ACP contêm cálcio e fosforo biodisponiveis, visto como, o fosfopeptídeo de caseína é capaz de estabilizar o fosfato de cálcio em fosfato de cálcio amorfo (ACP) (Cross *et al*., 2007; Reynolds, 2008). Apresentando agentes biodisponíveis como Ca e PO_4, estes minerais estão presentes na composição mineral do tecido dentinário, esta deposição de Ca e PO_4, poderia ajudar no processo de remineralização do tecido desmineralizado/afetado reforçando a estrutura de colágeno.

Em relação ao agente remineralizante contido no Curodont™ Repair utilizado sobre a dentina desmineralizada, as maiores médias de μTBS foram observadas quando o sistema adesivo SB foi utilizado. Entretanto, quando utilizado o CSE nas mesmas condições, foram observadas médias de resistência da união significativamente menores, comparáveis as da dentina desmineralizada não tratada. O tratamento com o Curodont™ Repair produziu desempenho dos sistemas adesivos com perfis similares aos encontrados pelo tratamento da dentina hígida, isto é, maiores valores de resistência de união para o sistema adesivo SB que o CSE. O Curodont™ Repair, composto pelo Peptídeo P11-4 (QQRFEWEFEQQ) que foi desenhado para formar β-sheets e géis, num pH entre 5-7 em concentração de 12,6 mM em água (Aggeli *et al*., 2003; Carrick *et al*., 2005; Davies *et al*., 2006; Kayser *et al*., 2004). Este Peptídeo foi sintetizado na forma de CH3CO- e –NH2 bloqueando os grupos nos terminais N- e C-, formando a sequência de peptídeos referida com a forma química de cP_{11-4}, sendo aplicado como tratamento tecidual na remineralização óssea e dental (Krikham *et al* 2007).

Esse gel formado com características hidrófobas determinadas pela presença da Glicina, um aminoácido com cadeias laterais apolares, provavelmente apresenta um comportamento hidrófobo quando na superfície da dentina desmineralizada. A potencial penetração desse gel na superfície desmineralizada garante a percolação por meio da água, de íons Ca e PO_4 no interior da área desmineralizada, sem perder o caráter hidrófobo da superfície. O peptídeo P_{11-4},

contido no Curodont™ Repair é um material bioativo sintetizado a partir de aminoácidos naturais, na forma de gel quimicamente modificado que adere em áreas de tecido poroso, incluindo lesões de cárie em esmalte e dentina exposta, produzindo um arcabouço que norteia a nucleação mineral. O P_{11-4} apresenta espontaneamente a capacidade de reunir metabólitos do meio para formar andaimes biomimeticos capazes de promover a nucleação de uma nova hidroxiapatita (Kirkham, *et al*. 2007). Com base nestes dados, Kirkham, *et al*. 2007 sugeriram que o P_{11-4} pode ser útil na modulação do aumento do ganho mineral.

Dessa forma, a superfície hidrófoba produzida pela aplicação do Curodont™ Repair, provavelmente dificultou o condicionamento produzido pelo *primer* ácido*,* do sistema adesivo CSE, com características hidrófilas pela presença de etanol e água, induzindo a resultados significativamente inferiores aos do SB. Pode-se notar durante a aplicação do *primer* do sistema adesivo CSE que à medida que este era aplicado observou-se a dificuldade de molhabilidade da superfície. Ainda, houve maior porcentagem de perda de palitos no pré-teste, o que denota resistência de união menor para esse grupo, produzindo também, maior porcentagem de falhas adesivas.

Por sua vez, o condicionamento ácido realizado após a aplicação do Curodont™ Repair, quando da utilização do sistema adesivo SB, reproduziu a superfície hidrófila favorável à penetração do adesivo SB, produzindo maiores valores de µTBS resina/dentina tratada. Trabalhos enfocando a área de união e as condições do substrato são importante foco para elucidar as ocorrências nessa interface.

Ainda, o agente remineralizador P_{11-4} apresenta a capacidade de reestruturar o tecido afetado por cárie, promovendo um aumento mineral devido ao efeito combinado do aumento mineral e inibição do processo de desmineralização no esmalte. A remineralização biomimética, seria uma alternativa à abordagem de remineralização convencional apresentada pela ação remineralizadora dos fluoretos, uma vez que este peptídeo induziria a reestruturação do tecido, ou seja, uma nucleação mineral organizada e não uma deposição desorganizada de minerais (Brunton *et al*., 2013).

Esta remineralização e reestruturação do tecido dentinário pode se mostrar uma alternativa favorável aos procedimentos adesivos aumentando a µTBS.

O presente estudo obteve para o grupo que utilizou o tratamento da dentina desmineralizada/afetada o Curodont™ Repair utilizando um sistema adesivo *etch&rinse* de dois passos, uma maior resistência dos demais grupos remineralizadores. Os resultados do presente trabalham nos levam a acreditar que a interação do agente remineralizador foi favorável ao tecido dentinário desmineraliza/afetado e para o adesivo *etch&rinse* de dois passos utilizado no presente estudo houve uma interação positiva, entretanto para o adesivo *self-etching* utilizado no presente estudo, esta interação do agente remineralizador e a adesão não foi favorável, mostrando os menos valores das médias das resistências de união comparados com os demais grupos.

Mesmo tendo mostrado valores inferiores a outros agentes remineralizadores para os adesivos autocondicionantes, o $P_{11\text{-}4}$, contido no Curodont™ Repair apresentou um comportamento similar ao comportamento do controle positivo (hígido) para os adesivos em avaliação no presente estudo.

A remineralização do tecido dentinário desmineralizado, previamente a utilização de sistemas adesivos parece ser um método promissor. Estudos de longo termo devem ser realizados para averiguar o desempenho da união resina/dentina desmineralizada, uma vez que a remineralização pode diminuir a degradação dessa interface, pois as fibrilas colágenas estariam envolvidas em minerais (Tay & Pashley 2009).

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e dentro dos limites do presente estudo pôde-se concluir que a utilização de agentes remineralizadores na dentina mostra-se uma alternativa favorável, em curto prazo, aos procedimentos adesivos. Quando utilizados o sistema adesivo Adper™ Single Bond 2.0 associado ao tratamento da superfície desmineralizada com Curodont™ Repair ou MI Paste™ ou ainda Clearfil™ SE associado a MI Paste™ foram observados os maiores valores de resistência da união resina/dentina.

REFERÊNCIAS

Alves FB, Lenzi TL, Reis A, Loguercio AD, Carvalho TS, Raggio DP. Bonding of simplified adhesive systems to caries-affected dentin of primary teeth. J Adhes Dent. 2013 Oct;15(5):439-45.

Antonucci JM, O'Donnell JN, Schumacher GE, Skrtic D. Amorphous calcium Phosphate composites and their effect on composite-adhesive-dentin bonding. J Adhes Sci Technol. 2009 Jan 1;23(7):1133-1147.

Arends J, Ruben JL, Christoffersen J, Jongebloed WL, Zuidgeest TG. Remineralization of human dentine in vitro. Caries Res. 1990;24(6):432-5.

Arends J, Christoffersen J, Ruben J, Jongebloed WL. Remineralization of bovine dentine in vitro. The influence of the F content in solution on mineral distribution. Caries Res. 1989;23(5):309-14.

Arrais CA, Giannini M, Nakajima M, Tagami J. Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine. Eur J Oral Sci. 2004 Oct;112(5):458-64.

Angker L, Nockolds C, Swain MV, Kilpatrick N. Quantitative analysis of the mineral content of sound and carious primary dentine using BSE imaging. Arch Oral Biol. 2004 Feb;49(2):99-107.

Aggeli A, Bell M, Carrick LM, Fishwick CW, Harding R, Mawer PJ, Radford SE, Strong AE, Boden N. pH as a trigger of peptide beta-sheet self-assembly and reversible switching between nematic and isotropic phases. J Am Chem Soc. 2003 Aug 13;125(32):9619-28.

Burke J L. In situ engineering of skeletal tissues using self-assembled biomimetic scaffolds [PhD]. Leeds: The University of Leeds, 2011.

Beeley JA, Yip HK, Stevenson AG. Chemochemical caries removal: a review of the techniques and latest developments. Br Dent J. 2000 Apr 22;188(8):427-30. Review.

Bell CJ, Carrick LM, Katta J, Jin Z, Ingham E, Aggeli A, Boden N, Waigh TA, Fisher J. Self-assembling peptides as injectable lubricants for osteoarthritis. J Biomed Mater Res A. 2006 Aug;78(2):236-46.

Bertassoni LE, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. Mechanical recovery of dentin following remineralization in vitro--an indentation study. J Biomech. 2011 Jan 4;44(1):176-81.

Bertassoni LE, Habelitz S, Pugach M, Soares PC, Marshall SJ, Marshall GW Jr. Evaluation of surface structural and mechanical changes following remineralization of dentin. Scanning. 2010 Sep-Oct;32(5):312-9.

Borges BC, Souza-Junior EJ, da Costa Gde F, Pinheiro IV, Sinhoreti MA, Braz R,Montes MA. Effect of dentin pre-treatment with a casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) paste on dentin bond strength in tridimensional cavities. Acta Odontol Scand. 2013 Jan;71(1):271-7.

Brackett MG, Li N, Brackett WW, Sword RJ, Qi YP, Niu LN, Pucci CR, Dib A, Pashley DH, Tay FR. The critical barrier to progress in dentine bonding with the etch-and-rinse technique. J Dent. 2011 Mar;39(3):238-48.

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 Jan;24(1):90-101. Epub 2007 Apr 17. Review.

Brunton PA, Davies RP, Burke JL, Smith A, Aggeli A, Brookes SJ, Kirkham J. Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides—a clinical safety trial. Br Dent J. 2013 Aug;215(4):E6.

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

Carrick L, Tassieri M, Waigh TA, Aggeli A, Boden N, Bell C, Fisher J, Ingham E, Evans RM. The internal dynamic modes of charged self-assembled peptide fibrils. Langmuir. 2005 Apr 26;21(9):3733-7.

Cilli R, Prakki A, de Araújo PA. Evaluating a method of artificially hypermineralizing dentin to simulate natural conditions in bonding studies. J Adhes Dent. 2005 Winter;7(4):271-9.

Ceballos L, Camejo DG, Victoria Fuentes M, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM, Pashley DH. Microtensile bond strength of total-etch and self-etching adhesives to caries-affected dentine. J Dent. 2003 Sep;31(7):469-77. PubMed PMID: 12927458.

Comar LP, Souza BM, Gracindo LF, Buzalaf MA, Magalhães AC. Impact of experimental nano-HAP pastes on bovine enamel and dentin submitted to a pH cycling model. Braz Dent J. 2013 May-Jun;24(3):273-8.

Chersoni S, Suppa P, Grandini S, Goracci C, Monticelli F, Yiu C, Huang C, Prati C, Breschi L, Ferrari M, Pashley DH, Tay FR. In vivo and in vitro permeability of one-step self-etch adhesives. J Dent Res. 2004 Jun;83(6):459-64.

Cross KJ, Huq NL, Reynolds EC. Casein phosphopeptides in oral health--chemistry and clinical applications. Curr Pharm Des. 2007;13(8):793-800. Review.

Creemers LB, Jansen ID, Docherty AJ, Reynolds JJ, Beertsen W, Everts V. Gelatinase A (MMP-2) and cysteine proteinases are essential for the degradation of collagen in soft connective tissue. Matrix Biol. 1998 Apr;17(1):35-46.
Doi J, Itota T, Torii Y, Nakabo S, Yoshiyama M. Micro-tensile bond strength of self-etching primer adhesive systems to human coronal carious dentin. J Oral Rehabil. 2004 Oct;31(10):1023-8.

Davies RPW, Aggeli A, Beevers AJ, Boden N, Carrick LM, Fishwick CWG, McLeish TCB, Nyrkova I, Semenov AN. 2006. Self-assembling betasheet tape forming peptides. Supramol Chem 18:435–443.

Erhardt MC, Toledano M, Osorio R, Pimenta LA. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: effects of long-term water exposure. Dent Mater. 2008 Jun;24(6):786-98.

Felton S. Self assembling -sheet peptide networks as smart scaffolds for tissue engineering [PhD Thesis]. Leeds: University of Leeds, 2005.

FEJERSKOV, O; *KIDD*, E. *Cárie dentária*: a *doença* e *seu tratamento clínico*. *São Paulo*: *Santos*, *cap 2*, *p. 7-26*, *2005*.

Fusayama T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. Oper Dent. 1979 Spring;4(2):63-70.

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

Gower LB. Biomimetic model systems for investigating the amorphous precursor pathway and its role in biomineralization. Chem Rev. 2008 Nov;108(11):4551-627. Review.

George A, Veis A. Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. Chem Rev. 2008 Nov;108(11):4670-93.

Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. Arch Oral Biol. 1976;21(6):355-62.

Hamba H, Nikaido T, Inoue G, Sadr A, Tagami J. Effects of CPP-ACP with sodium fluoride on inhibition of bovine enamel demineralization: a quantitative assessment using micro-computed tomography. J Dent. 2011 Jun;39(6):405-13.

Hashimoto M, Nagano F, Endo K, Ohno H. A review: Biodegradation of resin-dentin bonds. Japanese Dental Science Review, Volume 47, Issue 1, Feb 2011.

Jiang H, Liu XY. Principles of mimicking and engineering the self-organized structure of hard tissues. J Biol Chem. 2004 Oct 1;279(40):41286-93.

Kayser V, Turton DA, Aggeli A, Beevers A, Reid GD, Beddard GS. Energy migration in novel pH-triggered self-assembled beta-sheet ribbons. J Am Chem Soc. 2004 Jan 14;126(1):336-43.

Kanca J 3rd. Resin bonding to wet substrate. 1. Bonding to dentin. Quintessence Int. 1992 Jan;23(1):39-41.

Kuboki Y, Ohgushi K, Fusayama T. Collagen biochemistry of the two layers of carious dentin. J Dent Res. 1977 Oct;56(10):1233-7.

Kim J, Gu L, Breschi L, Tjäderhane L, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Implication of ethanol wet-bonding in hybrid layer remineralization. J Dent Res. 2010 Jun;89(6):575-80.

Kirkham J, Firth A, Vernals D, Boden N, Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Aggeli A. Self-assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. J Dent Res. 2007 May;86(5):426-30.

KUWARA, R.; MASSLER, M. Pulpar reactions to active and tertiary. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 1966, v.33, n.3, p.190-204.

Liu Y, Li N, Qi Y, Niu LN, Elshafiy S, Mao J, Breschi L, Pashley DH, Tay FR. The use of sodium trimetaphosphate as a biomimetic analog of matrix phosphoproteins for remineralization of artificial caries-like dentin. DentMater. 2011 May;27(5):465-77.

Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, Pashley DH, Tay FR. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. J Dent Res. 2011 Aug;90(8):953-68.

Li H, Burrow MF, Tyas MJ. Nanoleakage patterns of four dentin bonding systems. Dent Mater. 2000 Jan;16(1):48-56.

MJOR & FEJERSKOV. Embriologia e Histologia Oral Humana. Editora Médica Panamericana. 1990.

Mai S, Kim YK, Kim J, Yiu CK, Ling J, Pashley DH, Tay FR. In vitro remineralization of severely compromised bonded dentin. J Dent Res. 2010 Apr;89(4):405-10.

Mai S, Kim YK, Toledano M, Breschi L, Ling JQ, Pashley DH, Tay FR. Phosphoric acid esters cannot replace polyvinylphosphonic acid as phosphoprotein analogs in biomimetic remineralization of resin-bonded dentin. Dent Mater. 2009 Oct;25(10):1230-9.

Manuja N, Nagpal R, Pandit IK. Dental adhesion: mechanism, techniques and durability. J Clin Pediatr Dent. 2012 Spring;36(3):223-34.

MILLER, W.; MASSLER, M. Permeability and staining of active and arrested lesions in dentine. Brit Dent J. 1962v.112, n.5, p.187-197.

Marshall GW Jr, Balooch M, Tench RJ, Kinney JH, Marshall SJ. Atomic force microscopy of acid effects on dentin. Dent Mater. 1993 Jul;9(4):265-8.

Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. J Dent. 1997 Nov;25(6):441-58.

Marshall GW, Habelitz S, Gallagher R, Balooch M, Balooch G, Marshall SJ. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentin. J Dent Res. 2001 Aug;80(8):1768-71.

Nakabayashi N. [Bonding mechanism of resins and the tooth]. Kokubyo Gakkai Zasshi. 1982 Jun;49(2):410. Japanese.

Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. J Biomed Mater Res. 1982 May;16(3):265-73.

Nakabayashi N, Pashley, DH. Hibridização dos tecidos dentais duros. São Paulo. Quintessence Editora. 2000. 129p.

Ogushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. J Dent Res. 1975 Sep-Oct;54(5):1019-26.

Pereira PN, Nunes MF, Miguez PA, Swift EJ Jr. Bond strengths of a 1-step self-etching system to caries-affected and normal dentin. Oper Dent. 2006 Nov-Dec;31(6):677-81.

Pashley EL, Tao L, Derkson G, Pashley DH. Dentin permeability and bond strengths after various surface treatments. Dent Mater. 1989 Nov;5(6):375-8.

Pashley DH, Tay FR. Aggressiveness of contemporary self-etching adhesives. Part II: etching effects on unground enamel. Dent Mater. 2001 Sep;17(5):430-44.

Perdigão J, Eiriksson S, Rosa BT, Lopes M, Gomes G. Effect of calcium removal on dentin bond strengths. Quintessence Int. 2001 Feb;32(2):142-6. Erratum in: Quintessence Int 2001 Jul-Aug;32(7):524.

Poggio C, Lombardini M, Vigorelli P, Ceci M. Analysis of Dentin/Enamel Remineralization by a CPP-ACP Paste: AFM and SEM Study. Scanning. 2013 Feb 20.

Pugach MK, Strother J, Darling CL, Fried D, Gansky SA, Marshall SJ, Marshall GW. Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. J Dent Res. 2009 Jan;88(1):71-6.

Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. J Esthet Restor Dent. 2013 Aug;25(4):219-41.

Prabhakar AR, Manojkumar AJ, Basappa N. In vitro remineralization of enamel subsurface lesions and assessment of dentine tubule occlusion from NaF dentifrices with and without calcium. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2013 Jan-Mar;31(1):29-35.

Reynolds EC. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. Spec Care Dentist. 1998 Jan-Feb;18(1):8-16. Review.

Rahiotis C, Vougiouklakis G. Effect of a CPP-ACP agent on the demineralization and remineralization of dentine in vitro. J Dent. 2007 Aug;35(8):695-8.

Ryou H, Niu LN, Dai L, Pucci CR, Arola DD, Pashley DH, Tay FR. Effect of biomimetic remineralization on the dynamic nanomechanical properties of dentin hybrid layers. J Dent Res. 2011 Sep;90(9):1122-8.

Reynolds EC. Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence? Aust Dent J. 2008 Sep;53(3):268-73.

Reynolds EC. Anticariogenic Phosphopeptides. U.S. Patent 5015628, 1991.

Stuart Kyle, Amalia Aggeli, Eileen Ingham, Michael J. McPherson. Recombinant self-assembling peptides as biomaterials for tissue engineering. Biomaterials. 2010 December; 31(36): 9395–9405.

Shibata Y, He LH, Kataoka Y, Miyazaki T, Swain MV. Micromechanical property recovery of human carious dentin achieved with colloidal nano-beta-tricalcium phosphate. J Dent Res. 2008 Mar;87(3):233-7.

Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. Lancet. 2007 Jan 6;369(9555):51-9. Review.

Sattabanasuk V, Shimada Y, Tagami J. Bonding of resin to artificially carious dentin. J Adhes Dent. 2005 Autumn;7(3):183-92.

Schmidlin PR, Siebenmann J, Kocher P, Seemann R, Attin T, Bindl A. Effects of de- and remineralization of dentin on bond strengths yielded by one-, three-, and four-step adhesives. J Adhes Dent. 2008 Feb;10(2):119-26.

Sacramento PA, de Castilho AR, Banzi EC, Puppi-Rontani RM. Influence of cavity disinfectant and adhesive systems on the bonding procedure in demineralized dentin - a one-year in vitro evaluation. J Adhes Dent. 2012 Dec;14(6):575-83.

Saito T, Yamauchi M, Crenshaw MA. Apatite induction by insoluble dentin collagen. J Bone Miner Res. 1998 Feb;13(2):265-70.

Swift EJ Jr, Perdigão J, Heymann HO. Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art, 1995. Quintessence Int. 1995 Feb;26(2):95-110.Review.

Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Horner JA, Matthews WG, Pashley DH. Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. Oper Dent. 1995 Jan-Feb;20(1):18-25.

Tanaka K, DOI J, Takabatake Y, Nishitani Y, Yamaji K, Itota T, Yoshiyama M. Bonding of self-etching adhesive systems to demineralized and remineralized dentin. Adhesive Dentistry; 2007; Vol.25; n.1; P.12-18.

Tay FR, Pashley DH. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. J Dent Res. 2009 Aug;88(8):719-24.

Tay FR, Pashley DH. Guided tissue remineralisation of partially demineralized human dentine. Biomaterials. 2008 Mar;29(8):1127-37.

Tay FR, Pashley DH, Rueggeberg FA, Loushine RJ, Weller RN. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. J Endod. 2007 Nov;33(11):1347-51.

Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. J Dent. 2002 Sep-Nov;30(7-8):371-82.

Toledano M, Osorio R, de Leonardi G, Rosales-Leal JI, Ceballos L, Cabrerizo-Vilchez MA. Influence of self-etching primer on the resin adhesion to enamel and dentin. Am J Dent. 2001 Aug;14(4):205-10.

ten Cate JM, Buijs MJ, Damen JJ. pH-cycling of enamel and dentin lesions in the presence of low concentrations of fluoride. Eur J Oral Sci. 1995 Dec;103(6):362-7.

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

TEN CATE, A.R. Histologia Bucal. Desenvolvimento, Estrutura e Função. Editora Guanabara Koogan. RJ. 2001.

Ten Cate JM (2005). Interações químicas entre o Dente e os fluidos orais. In. Cárie Dentária: A Doença e o Seu tratamento Clínico. São Paulo: Editora Santos, pp. 49-69.

Vollenweider M, Brunner TJ, Knecht S, Grass RN, Zehnder M, Imfeld T, Stark WJ. Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. Acta Biomater. 2007 Nov;3(6):936-43.

Van Meerbeek B, Conn LJ Jr, Duke ES, Eick JD, Robinson SJ, Guerrero D. Correlative transmission electron microscopy examination of nondemineralized and demineralized resin-dentin interfaces formed by two dentin adhesive systems. J Dent Res. 1996 Mar;75(3):879-88.

Veis A, Dorvee JR. Biomineralization mechanisms: a new paradigm for crystal nucleation in organic matrices. Calcif Tissue Int. 2013 Oct;93(4):307-15.

Vidal CM, Tjäderhane L, Scaffa PM, Tersariol IL, Pashley D, Nader HB, Nascimento FD, Carrilho MR. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. J Dent Res. 2014 Mar;93(3):269-74.

Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. J Dent Res. 2003 Feb;82(2):141-5.

Wang L, Nancollas GH. Pathways to biomineralization and biodemineralization of calcium phosphates: the thermodynamic and kinetic controls. Dalton Trans. 2009 Apr 21;(15):2665-72.

Wong TS, Brough B, Ho CM. Creation of functional micro/nano systems through top-down and bottom-up approaches. Mol Cell Biomech. 2009 Mar;6(1):1-55.

Wei S, Sadr A, Shimada Y, Tagami J. Effect of caries-affected dentin hardness on the shear bond strength of current adhesives. J Adhes Dent. 2008 Dec;10(6):431-40.

Yoshiyama M, Urayama A, Kimochi T, Matsuo T, Pashley DH. Comparison of conventional vs self-etching adhesive bonds to caries-affected dentin. Oper Dent. 2000 May-Jun;25(3):163-9.

Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Itou K, Carvalho RM, Nakajima M, Pashley DH. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. J Dent Res. 2002 Aug;81(8):556-60.

Yoshiyama M, Tay FR, Torii Y, Nishitani Y, Doi J, Itou K, Ciucchi B, Pashley DH. Resin adhesion to carious dentin. Am J Dent. 2003 Feb;16(1):47-52.

Xu Z, Neoh KG, Lin CC, Kishen A. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2011 Jul;98(1):150-9.

Xu A-W, Ma Y, Cölfen H. Biomimetic mineralization. J Mater Chem. 2007, 17:415-419.

Xuan W, Hou BX, Lü YL. Bond strength of different adhesives to normal and caries-affected dentins. Chin Med J (Engl). 2010 Feb 5;123(3):332-6.

Zheng L, Hilton JF, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. Dentin caries activity status related to hardness and elasticity. Eur J Oral Sci. 2003 Jun;111(3):243-52.

ANEXO 1

- **Certificado do CEP – FOP/UNICAMP**

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Análise da aplicabilidade do fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo e da lisozima, lactoferrina e lactoperoxidase em lesões de cárie dentinárias"**, protocolo nº 088/2011, dos pesquisadores Sérgio Luiz Pinheiro, Luiz Filipe Barbosa Martins e Regina Maria Puppin Rontani, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 04/04/2012.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Applicability analysis of casein phosphospeptide/amorphous calcium phosphate and lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase in dentin carious lesions"**, register number 088/2011, of Sérgio Luiz Pinheiro, Luiz Filipe Barbosa Martins and Regina Maria Puppin Rontani, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 04/04/2012.

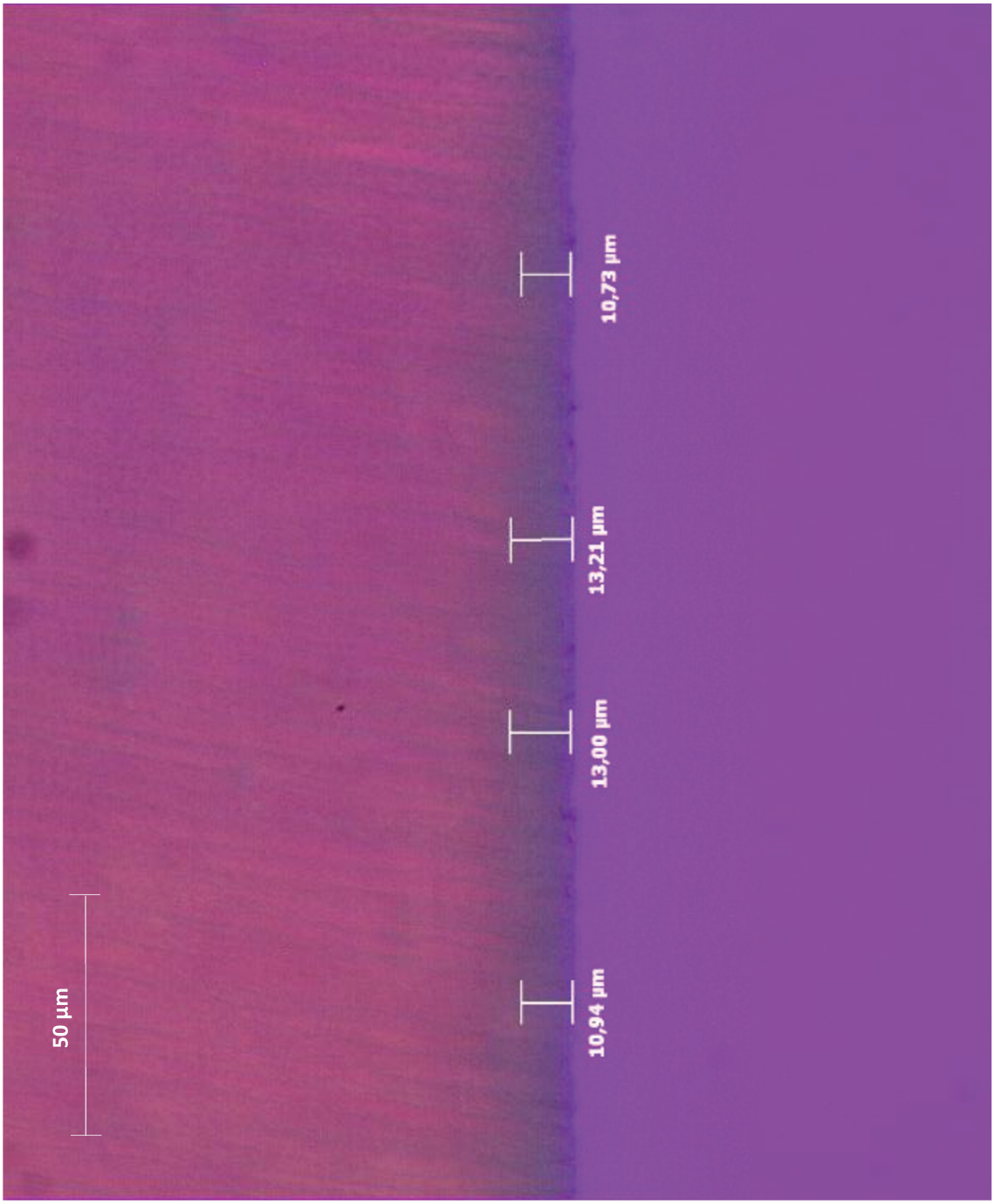
Profa. Dra. Lívia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

APÊNDICE 1

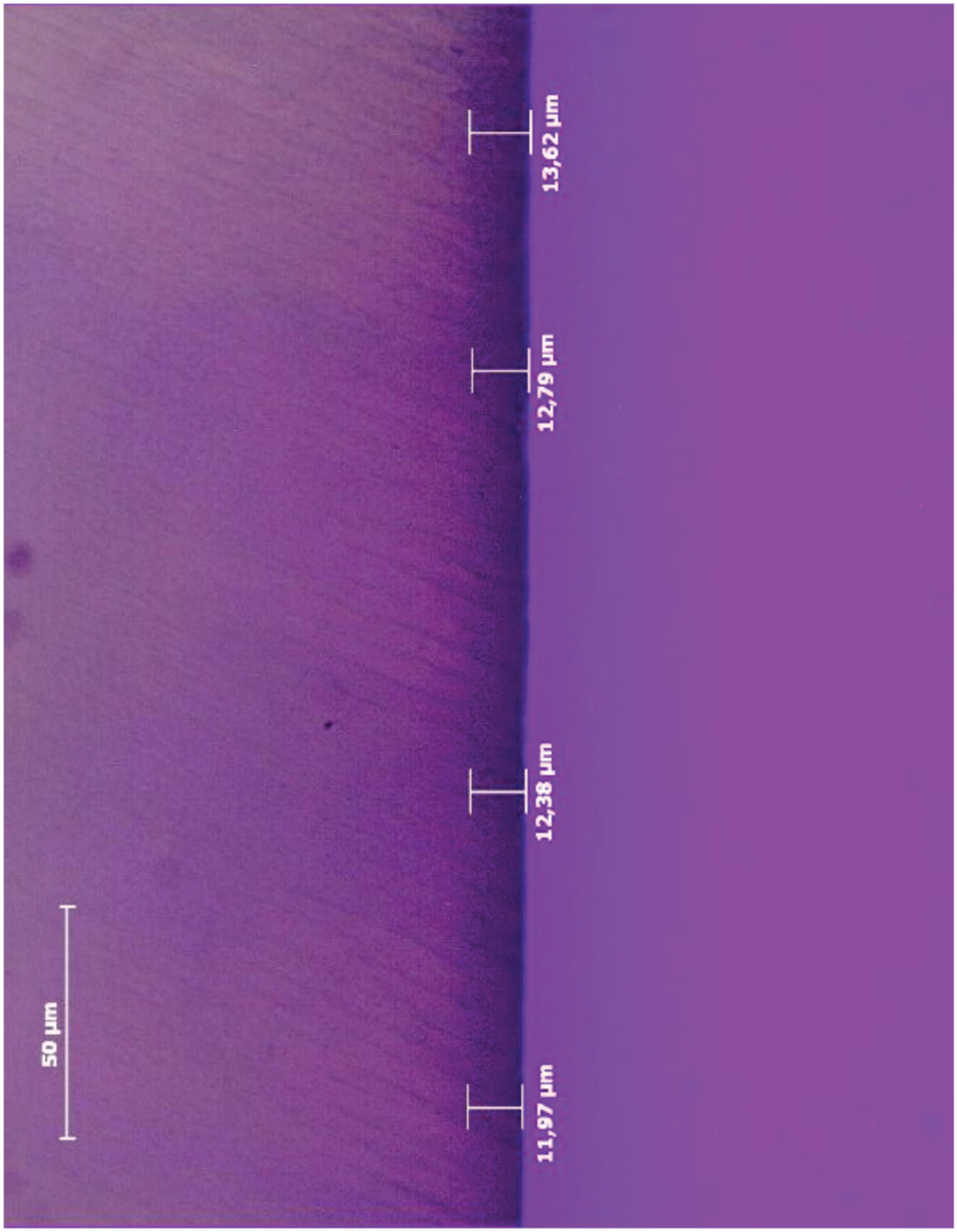
- **Imagens de Microscopia por Luz Polarizada – Tempo de 24 horas**



APÊNDICE 1 – Aspecto da superfície da dentina submetida a desmineralização por ação do gel ácido por um tempo de 24 horas.

APÊNDICE 2

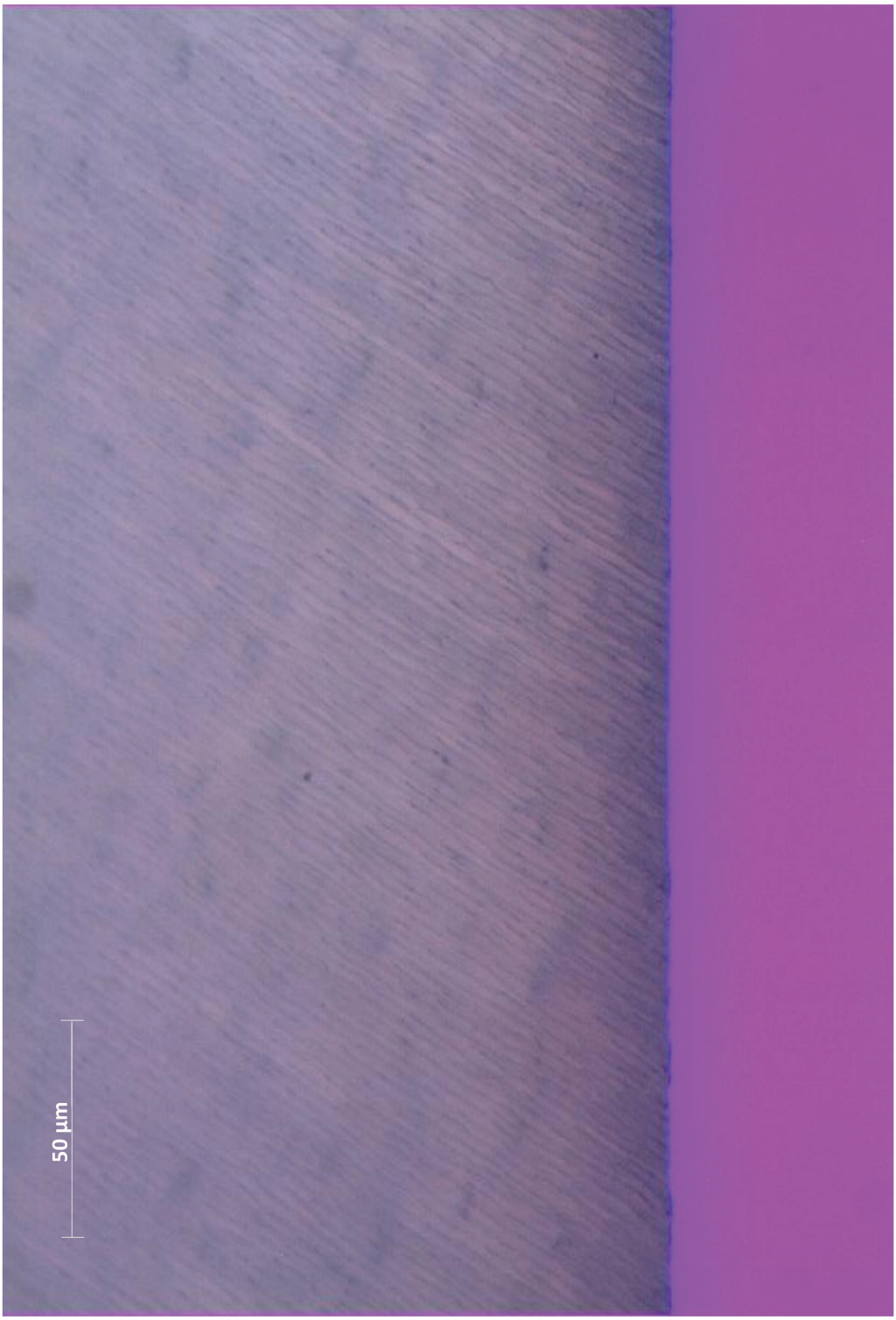
- **Imagens de Microscopia por Luz Polarizada – Tempo de 48 horas**



APÊNDICE 2 – Aspecto da superfície da dentina submetida a desmineralização por ação do gel ácido por um tempo de 48 horas.

APÊNDICE 3

- **Imagens de Microscopia por Luz Polarizada – Dentina Hígida**



APÊNDICE 3 – Aspecto da superfície da dentina hígida.