

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - DOUTORADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DENTÍSTICA RESTAURADORA

FABIANA SUELEN FIGUERÊDO DE SIQUEIRA

**ALTERNATIVAS PARA MELHORAR AS PROPRIEDADES ADESIVAS DE  
SISTEMAS ADESIVOS UNIVERSAIS EM DENTINA EROSIONADA**

PONTA GROSSA  
2017

**FABIANA SUELEN FIGUERÊDO DE SIQUEIRA**

**ALTERNATIVAS PARA MELHORAR AS PROPRIEDADES ADESIVAS DE  
SISTEMAS ADESIVOS UNIVERSAIS EM DENTINA EROSIONADA**

Tese apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Doutor na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Doutorado em Odontologia - Área de Concentração Dentística Restauradora.

Linha de Pesquisa: Propriedades Físico-Químicas e Biológicas de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Gomes  
Co-orientadores: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Hass.

PONTA GROSSA  
2017

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

S618 Siqueira, Fabiana Suelen Figuerêdo de  
Alternativas para melhorar as  
propriedades adesivas de sistemas adesivos  
universais em dentina erosionada/ Fabiana  
Suelen Figuerêdo de Siqueira. Ponta  
Grossa, 2017.  
141f.

Tese (Doutorado em Odontologia - Área  
de Concentração: Dentística Restauradora),  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
Orientador: Prof. Dr. João Carlos  
Gomes.

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro  
Dourado Loguercio.

Coorientadora: Profª Drª Viviane Hass.

1. Adesivos dentinários. 2. Riboflavina.  
3. Proantocianidina. 4. Resistência à  
tração. 5. Infiltração dentária. I. Gomes,  
João Carlos. II. Loguercio, Alessandro  
Dourado. III. Hass, Viviane. IV.  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
Doutorado em Odontologia. V. T.


CDD: 617.6

**FABIANA SUELEN FIGUERÊDO DE SIQUEIRA**

**Alternativas para melhorar as propriedades adesivas de sistemas adesivos universais em dentina erosionada.**

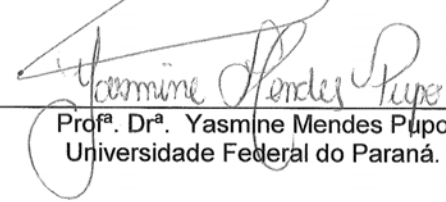
Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de doutorado em Odontologia. Área de concentração: Dentística Restauradora.

Ponta Grossa, 07 de Abril de 2017.



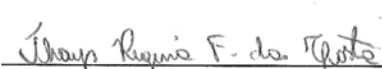
---

Prof. Dr. João Carlos Gomes  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.



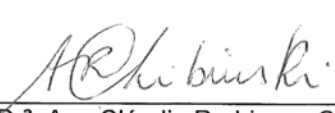
---

Prof.ª Dr.ª Yasmine Mendes Pupo  
Universidade Federal do Paraná.




---

Prof.ª Dr.ª Thays Regina Ferreira da Costa  
Universidade Federal do Paraná.



---

Prof.ª Dr.ª Ana Cláudia Rodrigues Chibinski  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.



---

Prof.ª Dr.ª Bruna Fortes Bittencourt  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

## DEDICATÓRIA

**A Deus,**  
Por sempre estar presente na minha vida.  
E por colocar em meu caminho pessoas que me inspiram, me ajudam e me  
encorajam a ser cada dia melhor.

Aos meus pais **José Divino de Siqueira** e **Maria Neide Figuerêdo de Siqueira,**  
Por sempre ajudar na realização dos meus sonhos.  
Por ser meu grande exemplo de vida,  
Sem a força, boa vontade e o amor de vocês, este sonho não seria possível.  
Obrigado por  
Estarem sempre presentes, ainda que distantes.  
Espero ter sido merecedora por todos os esforços, especialmente quanto a minha  
formação.

Às minhas irmãs **Flávia Siqueira** e **Flaviana Siqueira,** pela cumplicidade, parceria,  
afeto, amizade e todo amor sempre dedicado.  
Meu ponto de apoio em todos os momentos, mesmo quando longe suas palavras,  
lágrimas e orações cruzaram todo o país, vieram principalmente quando mais  
precisei e foram essenciais para mim.

Ao amor da minha vida, meu esposo **Andres Millan,** companheiro incondicional.  
Só tenho a agradecer por toda ajuda, dedicação e comprometimento em todos os  
nossos trabalhos. Essa vitória é nossa!  
Obrigada por me fazer sentir tão amada, por todo carinho,  
Parceria, amizade, cumplicidade, afeto e paciência, você torna minha vida mais  
doce e alegre todos os meus dias!  
Te amo infinito!!

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Prof. Dr. João Carlos Gomes**, por me acolher com todo carinho, pelo apoio e em especial pela confiança em mim depositada. Sou eternamente grata ao senhor por fazer de Ponta Grossa minha segunda casa. Sempre terei orgulho em dizer que o senhor foi meu orientador!

A **Profª. Drª. Ana Claudia Rodrigues Chibinski**, por me acompanhar e me ajudar desde o Mestrado com um carinho de mãe imensurável, pode ter certeza que a senhora também faz parte do meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus queridos **Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio** e **Profª. Drª. Alessandra Reis**, obrigada pela disponibilidade, mesmo em período de férias. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo percurso. Não posso esquecer das contribuições de cada um para o meu crescimento profissional e pessoal.

Sou eternamente grata por todo o apoio, pela paciência depositada, oportunidade e incentivo que vocês dois tem oferecido para mim e Andres. Sempre serei eternamente grata por todas essas oportunidades que vocês nos dão.

A minha querida **Prof. Drª. Giovana Mongruel Gomes**, por ajudar a mim e Andrés desde o Mestrado, por toda paciência, dedicação e boa vontade!!

A minha querida amiga e **Prof. Drª. Viviane Hass**, obrigada por todos os conhecimentos transmitidos, por sempre se preocupar comigo e com Andres, por toda paciência e dedicação. Tenho profunda admiração por você!!

A **Profª. Drª. Osnara Maria Mongruel Gomes**, pelo carinho, apoio e disponibilidade de sempre. Obrigada por se preocupar comigo e por todo o carinho de “mãe”.

A meus queridos **Prof. Dr. Matheus Coelho Bandeca** e **Profª. Drª. Shelon Cristina Souza Pinto**. Obrigada por toda confiança depositada. Obrigada por essa amizade infinita e por todo o apoio oferecido. Obrigada por sempre proporcionar uma surpresa boa na minha vida.

A **Profª. Drª. Denise Stedler Wambier** obrigada por todo esse carinho comigo, pela confiança e dedicação com o Programa de Pós-Graduação.

## AGRADECIMENTOS

A todos os **Professores** que fazem parte do Programa de Pós-graduação pelos ensinamentos e experiências proporcionado durante todo meu Doutorado. Obrigada a todos pelos incentivos e momentos inesquecíveis. Vocês são grandes exemplos a serem seguidos. Muito obrigada.

A todos os meus **colegas de Mestrado e Doutorado** que compartilharam comigo todo este tempo de pós-graduação, pelos momentos de parceria, de aprendizado, de laboratório e de esforços juntos... **obrigada** a todos vocês.

Como não agradecer em especial a **Sibelli Parreiras, Juliana Schaia, Fabi Coppla, Gisele Diaz, Anna Luiza, Pâmela Malaquias, Eveline Martine, Veriadiana Campos, Bruna Hilgemberg e Thalita Paris**. Obrigada pelas tardes e finais de semana no laboratório, pela parceria, amizade e confiança depositada, o laboratório não é mesmo quando vocês não estão presentes!!!!

Como não lembrar da querida **Simone Sabino**, obrigada por toda ajuda e boa vontade de sempre.

A **todos os funcionários da UEPG** em especial a **Morgana das Graças e Bianca Linhares**, porque sempre estiveram dispostas a me ajudar com muita competência, amor e paciência.

Eu não posso deixar de agradecer a meus grandes amigos e compadres **Jeferson e Marininha**. Os domingos não são os mesmos em Ponta Grossa sem vocês! Obrigada por tudo.

## **DADOS CURRICULARES**

### **Fabiana Suelen Figuerêdo de Siqueira**

Nascimento 16.03.1985	Delmiro Gouveia– Alagoas – Brasil.
FILIAÇÃO	Maria Neide Figuerêdo de Siqueira José Divino de Siqueira.
2006 - 2011	Curso de Graduação Universidade Federal de Alagoas – UFAL.
2012 - 2014	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, nível de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Dentística Restauradora.
2014 - 2016	Especialização em Dentística Restauradora - ABO Ponta Grossa.
2014 - 2017	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, nível de Doutorado em Odontologia – Área de Concentração em Dentística Restauradora.



SIQUEIRA FSF. **Alternativas para melhorar as propriedades adesivas de sistemas adesivos universais em dentina erosionada.** [Tese] Doutorado em Dentística Restauradora. Ponta Grossa. Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2017.

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar as propriedades adesivas à dentina erosionada utilizando sistemas adesivos universais e verificar o efeito da aplicação de agentes reticuladores de colágeno ou inibidores de Metaloproteinasas (MMPs) na interface resina-dentina erosionada, através de três estudos laboratoriais. Para o experimento 1, os dentes foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais de acordo com a combinação das variáveis: superfície dentinária (controle sem erosão e erosionada) vs. sistemas adesivos (10 sistemas adesivos universais) vs. estratégia adesiva [condicionamento convencional (ER) e autocondicionante (SE)]. Os sistemas adesivos foram aplicados de acordo com as especificações do fabricante e os dentes foram restaurados. Depois foram seccionados para análise da resistência de união à dentina ( $\mu$ TBS) e nanoinfiltração (NI). A superfície de 2 dentes foi examinada sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar as características da superfície após ciclagem erosiva. Para o experimento 2, os dentes foram aleatoriamente alocados em 18 condições experimentais de acordo com as variáveis: Ciclagem erosiva (dentina erosionada com coca-cola pH  $\approx$  2,7 e dentina erosionada com ácido cítrico pH 2,3) vs. Sistemas adesivos [Prime & Bond Elect (PBE), Scotchbond Universal Adhesive (SBU) e Tetric N-Bond Universal (TEU)] vs. Agentes de tratamento [*primer* contendo 6,5% de proantocianidina (PA) e *primer* contendo 0,1% de riboflavina (RI)]. Os sistemas adesivos foram aplicados de acordo com as especificações do fabricante após aplicação do *primer* e restaurados. A seguir, os dentes foram seccionados e testados para análise da  $\mu$ TBS, NI e grau de conversão (GC). A superfície de 2 dentes foi examinada sob MEV para avaliar as características da superfície após erosão. Para o experimento 3, os dentes foram alocados aleatoriamente dentro de 18 condições experimentais de acordo com as variáveis: Ciclagem erosiva (dentina erosionada com coca-cola pH  $\approx$  2,7 e dentina erosionada com ácido cítrico pH 2,3) vs. Sistemas adesivos (PBE, SBU e TEU) vs. pré-tratamento ácido [controle com ácido fosfórico 37%; Ácido fosfórico contendo 2% de clorexidina (CHXácido) e ácido fosfórico contendo 3% de PA (PAácido)]. Os dentes foram condicionados de acordo com cada grupo experimental, os sistemas adesivos foram aplicados e restaurados com resina composta. Posteriormente, os dentes foram seccionados e testados para análise da  $\mu$ TBS, NI e GC. Todos os dados foram submetidos a ANOVA 3 fatores e teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Os valores de  $\mu$ TBS em dentina erosionada foi estatisticamente inferior à dentina sadia, independente da estratégia adesiva ( $p > 0,61$ ). A inclusão de *primers* contendo agentes reticuladores de colágeno no protocolo adesivo a dentina erosionada, melhorou os valores de  $\mu$ TBS ( $p < 0,001$ ), diminuiu significativamente a NI ( $p < 0,004$ ) para os adesivos testados, além de melhorar o GC ( $p < 0,03$ ). A utilização de ácidos fosfórico contendo inibidores de MMPs ou agentes reticuladores de colágeno melhorou os valores de  $\mu$ TBS ( $p > 0,33$ ), produziu uma redução significativa da NI ( $p < 0,004$ ) e melhorou o GC ( $p < 0,03$ ). Os agentes reticuladores independente do veículo (*primer* ou condicionamento ácido) foram eficazes para melhorar as propriedades da interface resina-dentina erosionada.

**Palavra-chaves:** Adesivos dentinários, proantocianidina, riboflavina, resistência à

tração, infiltração dentária, Análise espectral Raman.

SIQUEIRA FSF. **Alternatives to improve the adhesive properties of universal adhesive systems in eroded dentin.** [Tese] Doutorado em Dentística Restauradora. Ponta Grossa. Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2017.

## ABSTRACT

The aim of the present study was evaluate the adhesive properties of eroded dentin with different pH cycling using universal adhesive systems and to evaluate the application of collagen cross-linking agent or MMP inhibitors on the resin-eroded dentin interface, through of three in vitro studies. For the experiment 1, the teeth were randomly assigned into the experimental groups according to the combination of variables: dentin surface (sound dentin and eroded dentin) vs adhesive systems (10 universal adhesives) vs Adhesive strategy [etch-and-rinse (ER) and self-etch (SE)]. The adhesive systems were applied according to the manufacturer's instructions and the teeth were restored. They were sectioned to analysis of microtensile bond strength ( $\mu$ TBS) and nanoleakage (NL). The surfaces of 2 tooth were examined under scanning electron microscopy (SEM) to evaluate the surface characterization after erosive-cycling. For experiment 2, the teeth were randomly assigned into 18 experimental conditions according to the variables: Erosive cycling (eroded dentin with soft drink pH  $\approx$  2,7 and eroded dentin with citric acid pH 2.3) vs. adhesive systems [Prime & Bond Elect (PBE); Scotchbond Universal Adhesive (SBU); Tetric N-Bond Universal (TEU)] vs Treatment agents [6.5% primer containing proanthocyanidin (PA) and 0.1% riboflavin (RI)]. The surface was treated with primers and the adhesive systems were applied and restored. The samples were sectioned and tested for  $\mu$ TBS, NL and degree of conversion (DC). The surfaces of 2 tooth were examined under SEM to evaluate the surface characterization after erosive-cycling. For experiment 3, the teeth were randomly assigned into 18 experimental conditions according to the variables: Erosive cycling (eroded dentin with soft drink pH  $\approx$  2,7 and eroded eroded with citric acid pH 2.3) vs. Adhesive Systems (PBE; SBU; TEU) vs Acid pretreatment [control with 37% phosphoric acid; Phosphoric acid containing 2% chlorhexidine (CHXacid) and phosphoric acid containing 3% PA (PAacid)]. The teeth were acid-etched according to each experimental conditions, the adhesive systems were applied and the teeth were restored. The teeth were sectioned and tested for  $\mu$ TBS, NL and DC. Data were submitted to appropriate statistical analysis ( $\alpha = 0.05$ ). The  $\mu$ TBS values in eroded dentin were statistically lower than sound dentin, independent of the adhesive strategy ( $p < 0.01$ ) The inclusion of primers containing collagen cross-linking agents in the eroded dentin adhesive protocol improved  $\mu$ TBS values ( $p < 0.001$ ), significantly reduced NL ( $p < 0.004$ ) for all the adhesives tested, as well as improved DC ( $p < 0.03$ ). The use of phosphoric acids containing MMPs inhibitors or collagen cross-linking agent improved  $\mu$ TBS values ( $p > 0.33$ ), produced a significant reduction of NL ( $p < 0.004$ ) and improved DC ( $p < 0.03$ ). The application of MMP inhibitors (primer or acid etching - containing) were effective to improve the properties of the resin-eroded dentin interface.

**Keywords:** Dentin-bonding agents, proanthocyanidin, riboflavin, Tensile strength, Dental leakage, Spectrum Analysis Raman.

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

#	Antífen
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
<	Menor que
>	Maior que
cm <sup>-1</sup>	Número de onda (unidade de comprimento de onda)
H	Horas (unidade de medida de tempo)
M	Molar (unidade de medida de volume)
min	Minuto
mM	Milimolar (unidade de medida de volume)
mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado (Unidade de área)
MPa	Mega Pascal
mW	Miliwatt
mW/cm <sup>2</sup>	MiliWatt por centímetro quadrado
N	Newton (unidade de medida de força)
n	Número amostral
nm	Nanômetro (unidade de comprimento de onda)
°C	Grau Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
x	Número de vezes
α	Alfa (nível de significância)
μm	Micrômetro

## LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
GC	Grau de conversão
ED	Erosão dentaria
ER	Etch-and-Rinse ou Condicionamento total
LED	Light-emitting diode
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMPs	Metaloproteinases da matriz
NI	Nanoinfiltração
SE	Self-etch ou autocondicionante
UVA	Ultravioleta A
μTBS	Resistência de união à microtração

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Preparo da superfície dentinária. (A) Dente hígido; (B) Superfície oclusal planificada em dentina; (C) Desgaste de todas as bordas periféricas de esmalte.....	21
<b>Figura 2.</b> Imagem representativa do desenho experimental e sistemas adesivos utilizados na estratégia ER e SE.....	22
<b>Figura 3.</b> Restauração dos dentes após aplicação do sistema adesivo. (A) Confecção do incremento de resina composta; (B) Adaptação de cada incremento; (C) Fotoativação de cada incremento.....	26
<b>Figura 4.</b> Sequência de corte para a obtenção dos palitos. (A) Superfície oclusal das coroas de resina compostas pintadas com caneta marcadora permanente de cores diferentes para identificação dos palitos de cada grupo; (B) Dente fixado com cera pegajosa ao dispositivo da máquina de corte montada com um disco diamantado; (C) Duas sequências perpendiculares de corte, uma no eixo x e outra no eixo y, permitindo a obtenção dos palitos para o teste de resistência de união; (D) Os palitos de cada dente foram armazenados em água destilada até o momento do teste de resistência de união. ....	27
<b>Figura 5.</b> Preparo de amostras para NI. (A) Palitos imersos em uma solução aquosa de nitrato de prata; (B) armazenamento por 24 h sob total escuridão; (C) Após lavagem, imersos em solução reveladora por 8 h sob luz fluorescente; (D) Palitos revelados, montados em <i>stubs</i> de alumínio para facilitar o polimento uniforme; (E) Palitos dessecados em sílica por 24 h; (F) Palitos metalizados para a análise de MEV.....	29
<b>Figura 6.</b> Inclusão dos <i>primers</i> no protocolo adesivo. (A) Aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 s; (B) Lavagem com jato de água-ar; (C) Aplicação do <i>primer</i> de proantocianidina ativamente por 60 s; (D) Aplicação do sistema adesivo de acordo com as recomendações do fabricante; (E) Aplicação de jato de ar para evaporação do solvente; (F) Fotoativação do sistema adesivo.....	36
<b>Figura 7.</b> Preparo das amostras para análise do grau de conversão. (A) Espécimes selecionados aleatoriamente para cada condição experimental; (B) Polimento com lixa de SiC de granulação de #1500 e # 2000; (C) Limpeza dos espécimes em cuba ultra-sônica por 10 minutos; (D) Equipamento XploRA ONETM Raman, HORIBA.....	38
<b>Figura 8.</b> Aplicação dos ácidos contendo os agentes terapêuticos. (A) Aplicação de ácido fosfórico contendo proantocianidina por 30 s; (B) Lavagem com jato de água-ar; (C) Aplicação do sistema adesivo de acordo com as recomendações do fabricante; (D) Aplicação de jato de ar para evaporação do solvente; (E) Fotoativação do sistema adesivo.....	44

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b> - Sistemas adesivos, número de lotes, composição e estratégia de aplicação.....	23
<b>Tabela 2</b> - Produto, lote e composição dos <i>primers</i> .....	31
<b>Tabela 3</b> - Sistemas adesivos (Lote), composição, grupos e modo de aplicação.....	32
<b>Tabela 4</b> - Sistemas adesivos (Lote), composição, grupos e modo de aplicação.....	41

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. PROPOSIÇÃO</b> .....	20
2.1 PROPOSIÇÃO GERAL .....	20
2.2 PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA.....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
3.1 EXPERIMENTO 1 .....	21
3.1.1 Preparo dos dentes.....	21
3.1.2 Desenho experimental.....	22
3.1.3 Modelo de ciclagem erosiva.....	26
3.1.4 Procedimento restaurador e preparo dos espécimes.....	26
3.1.5 Teste de resistência de união à microtração ( $\mu$ TBS).....	27
3.1.6 Análise da nanoinfiltração por microscopia eletrônica de varredura.....	28
3.1.7 Análise morfológica da superfície dentinária erosionada.....	29
3.1.8 Análise estatística.....	30
3.2 EXPERIMENTO 2.....	30
3.2.1 Delineamento experimental e preparo dos dentes.....	30
3.2.2 Modelo de ciclagem erosiva.....	35
3.2.3 Procedimento restaurador e preparo dos espécimes.....	35
3.2.4 Teste de resistência de união à microtração ( $\mu$ TBS).....	36
3.2.5 Análise da nanoinfiltração por microscopia eletrônica de varredura.....	37
3.2.6 O grau de conversão <i>in situ</i> (GC) dentro das camadas adesivas / híbridas.....	37
3.2.7 Análise morfológica da superfície dentinária erosionada.....	38
3.2.8 Análise estatística.....	39
3.3 EXPERIMENTO 3.....	39
3.3.1 Preparo dos dentes.....	39
3.3.2 Desenho experimental.....	39
3.3.3 Modelo de ciclagem erosiva.....	43
3.3.4 Procedimento restaurador e preparo dos espécimes.....	43
3.3.5 Teste de resistência de união à microtração ( $\mu$ TBS).....	44
3.3.6 Análise da nanoinfiltração por microscopia eletrônica de varredura.....	45
3.3.7 O grau de conversão <i>in situ</i> (GC) dentro das camadas adesivas / híbridas.....	45
3.3.8 Análise estatística.....	46
<b>4. ARTIGOS</b> .....	47
4.1 The bonding performance of universal adhesives to eroded dentin.....	49
4.2 The use of collagen cross-linking agents as an alternative to improve the eroded dentin-bonding.....	73



4.3 The effect of experimental phosphoric acid containing MMP-inhibitor on resin eroded-dentin bonding properties.....	99
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	121
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	129
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	130
<b>ANEXO</b> - Termo de Aprovação da Comissão de Ética em pesquisa.....	139

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, o aumento da prevalência da erosão dentária (ED) tem motivado o desenvolvimento de novas pesquisas nesta área. De acordo com Salas et al. 2015, a prevalência total estimada da erosão dentária no mundo varia de 7,2% a 74,0% (Salas et al.<sup>1</sup> 2015). Um recente estudo europeu indicou que cerca de 30% da população com idade entre 10 a 35 anos que frequenta o cirurgião dentista tem pelo menos um dente com desgaste erosivo (Bartlett et al.<sup>2</sup> 2013). Portanto, a ED é considerada um tema relevante para pesquisas odontológicas.

ED é definida como um processo químico resultante de uma perda cumulativa de tecido dental não causado por bactérias (Imfeld<sup>3</sup> 1996), este processo cumulativo afeta principalmente o esmalte, mas quando atinge a dentina, pode remover “*plugs*” dentinários e a dentina intertubular orgânica, resultando em um aumento do diâmetro dos túbulos dentinários. Além disso, as superfícies de dentina erosionada têm uma maior quantidade de fibras de colágeno expostas e um teor mineral reduzido na camada mais externa (Prati et al.<sup>4</sup> 2003; Zimmerli et al.<sup>5</sup> 2012). Esta dissolução mineral muitas vezes provoca comprometimento estético e funcional juntamente com hipersensibilidade dentinária (Gillam et al.<sup>6</sup> 1999; West et al.<sup>7</sup> 2013).

Para reduzir a progressão da lesão, minimizar os sintomas tais como hipersensibilidade dentinária e restaurar a função e a estética, o procedimento restaurador é uma alternativa útil e indicada (Carvalho et al.<sup>8</sup> 2016). Entretanto, devido às modificações severas sob a dentina exposta durante o processo erosivo, o procedimento adesivo (passo fundamental para o sucesso do tratamento restaurador) pode ser comprometido (Zimmerli et al.<sup>5</sup> 2012; Cruz et al.<sup>9</sup> 2012).

O ciclo de queda de pH e a neutralização por tampões salivares leva à desmineralização que expõe a matriz orgânica e também tem potencial para levar à ativação e à atividade funcional de proteases derivadas de hospedeiros (MMPs) da saliva ou dentina e cisteína catépsinas (Tjaderhane et al.<sup>10</sup> 2015). Com a ativação das proteases, a taxa de progressão da erosão aumenta com a degradação da matriz orgânica (Kleter et al.<sup>11</sup> 1994; Ganss et al.<sup>12</sup> 2001).

Assim como já foi demonstrado na interface adesiva (Tjaderhane et al.<sup>13</sup> 1998; Pashley et al.<sup>14</sup> 2004; Liu et al.<sup>15</sup> 2011), as MMPs podem interferir na desmineralização erosiva. A interação entre essas enzimas colagenolíticas pode

determinar o destino da matriz orgânica da dentina durante a desmineralização (Tjaderhane et al.<sup>10</sup> 2015). Assim, alternativas para controlar este processo de degradação da matriz de colágeno, bem como a atividade das enzimas colagenolíticas são fundamentais e poderiam beneficiar a redução do processo erosivo.

À luz disto, o uso de inibidores específicos de enzimas colagenolíticas como a clorexidina (CHX) e galato de epigallocatequina do chá verde foram investigados para reduzir a perda mineral adicional na superfície erosionada (Buzalaf, Kato, Hannas<sup>16</sup> 2012). Estes agentes foram utilizados em aplicação tópica com colutórios ou géis como estratégias preventivas para a redução da desmineralização em ED (Magalhaes et al.<sup>17</sup> 2009; Kato et al.<sup>18</sup> 2010).

No entanto, estas soluções podem ser eliminadas da superfície dentinária após a lavagem, o que não é prático para o clínico. Além disso, devido à perda de tecido dental no processo erosivo, várias vezes o tratamento restaurador imediato é necessário, exigindo alternativas para reduzir a degradação enzimática e melhorar as propriedades do colágeno da matriz orgânica erosionada sinergicamente.

Assim, a inclusão de agentes reticuladores no procedimento restaurador na dentina erosionada parece ser uma alternativa racional, uma vez que eles são capazes de estabelecer ligações químicas e inibir as MMPs, melhorando as propriedades das fibrilas de colágeno, bem como a inclusão de inibidores de MMPs para controlar o processo da degradação.

Dentre os agentes investigados na odontologia, CHX é talvez o inibidor de enzimas proteolíticas mais estudado em relação à degradação do colágeno da camada híbrida. A desvantagem potencial é que CHX pode lixiviar da interface de união ao longo do tempo, pelo fato de não estabelecer fortes ligações químicas com a dentina (Ricci et al.<sup>19</sup> 2010).

O uso de glutaraldeído, proantocianidina (Bedran-Russo et al.<sup>20</sup> 2007), riboflavina (Cova et al.<sup>21</sup> 2011), ácido itacônico (Bedran-Russo et al.<sup>22</sup> 2009) têm sido proposto para melhorar a estabilidade mecânica e estrutural do colágeno dentinário, além de inibir as MMPs, levando a uma matriz dentinária estável, após infiltração dos monômeros resinosos, o que deve fornecer uma camada híbrida mais duradoura (Al-Ammar, Drummond, Bedran-Russo<sup>23</sup> 2009; Macedo, Yamauchi,

Bedran-Russo<sup>24</sup> 2009; Mazzoni et al.<sup>25</sup> 2013; Mazzoni et al.<sup>26</sup> 2014; Scheffel et al.<sup>27</sup> 2014).

Hass et al.<sup>28</sup> 2016 mostraram que após 6 meses de armazenamento, a utilização de um ácido fosfórico com 2% de proantocianidina foi efetivo para manter a resistência de união e reduzir a nanoinfiltração da interface resina-dentina. Além disso, Hass et al.<sup>29</sup> 2016, também mostraram que a aplicação de *primers* não prejudicam a polimerização dos monômeros resinosos presentes nos sistemas adesivos. Assim, sabe-se que o uso de inibidores de MMPs e agentes reticuladores de colágeno na forma de *primers* ou géis incluídos dentro do protocolo adesivo, podem ser benéficos para a estabilidade da interface resina-dentina. Porém, o uso de inibidores de MMPs em géis e agentes reticuladores de colágeno em forma de *primers* ou géis só foram testados em dentina sadia e cariada e não em dentina erosionada.

Adicionalmente, o procedimento adesivo na odontologia restauradora está baseado em duas estratégias, convencional (*etch-and-rinse* no idioma inglês [ER]) e autocondicionantes (*self-etch* no idioma inglês [SE]) (Reis, Carrilho et al.<sup>30</sup> 2013). Porém, na dentina erosionada os resultados são divergentes (Oliveira et al.<sup>31</sup> 2014; Zimmerli et al.<sup>5</sup> 2012), pois não há consenso sobre qual estratégia adesiva apresenta o melhor desempenho em dentina erosionada. Alguns autores relataram que o adesivo SE proporciona uma melhor adesão em relação ao ER, porque reduzem a discrepância entre a desmineralização e a infiltração dos monômeros resinosos (Zimmerli et al.<sup>5</sup> 2012). Entretanto, quando Cruz et al.<sup>32</sup> 2015 testou a efetividade da adesão em ED com sistemas adesivos ER, eles mostraram um desempenho semelhante aos SE (Cruz et al.<sup>32</sup> 2015).

Mais recentemente foi introduzida uma nova família de sistemas adesivos, conhecida como adesivos universais, (Hanabusa et al.<sup>33</sup> 2012; Perdigão et al.<sup>34</sup> 2012; Munoz et al.<sup>35</sup> 2013) que permitem serem utilizados como ER e SE para esmalte e dentina. Esta versatilidade resulta da inclusão de monômeros funcionais ácidos, tais como MDP, em sua composição. Porém, uma recente revisão sistemática mostrou que outros estudos para avaliar esses adesivos em diferentes substratos ainda são necessários (Rosa, Piva, Silva<sup>36</sup> 2015).

Outra lacuna, ainda não explorada por investigadores, é sobre o agente erosivo e o modelo de ciclagem do pH para simular erosão. Sabe-se que

refrigerantes e ácido cítrico são soluções reprodutíveis, baratas e muito utilizadas para o desafio erosivo (Shellis et al.<sup>37</sup> 2011; Zimmerli et al.<sup>5</sup> 2012; Cruz et al.<sup>32</sup> 2015, Forgerini et al.<sup>38</sup> 2017). Porém, não se sabe se propriedades adesivas na dentina erosionada são influenciadas pelos diferentes potenciais erosivos dos protocolos encontrados na literatura.

## 2. PROPOSIÇÃO

### 2.1 PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar as propriedades adesivas à dentina erosionada utilizando sistemas adesivos universais.

### 2.2 PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

2.2.1 Avaliar a resistência de união à microtração e nanoinfiltração de diferentes sistemas adesivos universais no modo ER e SE em dentina erosionada.

2.2.2 Avaliar se as propriedades adesivas em dentina erosionada são influenciadas por diferentes protocolos laboratoriais para produzir erosão.

2.2.3 Avaliar o efeito do uso de *primers* aquosos contendo agentes reticuladores de colágeno (proantocianidina e riboflavina) nas propriedades da interface resina-dentina erosionada por meio de resistência de união, nanoinfiltração e grau de conversão.

2.2.4 Avaliar o efeito de ácidos experimentais contendo clorexidina e proantocianidina na resistência de união à dentina, nanoinfiltração e grau de conversão da interface resina-dentina erosionada.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados três experimentos. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob parecer 1.652.555.

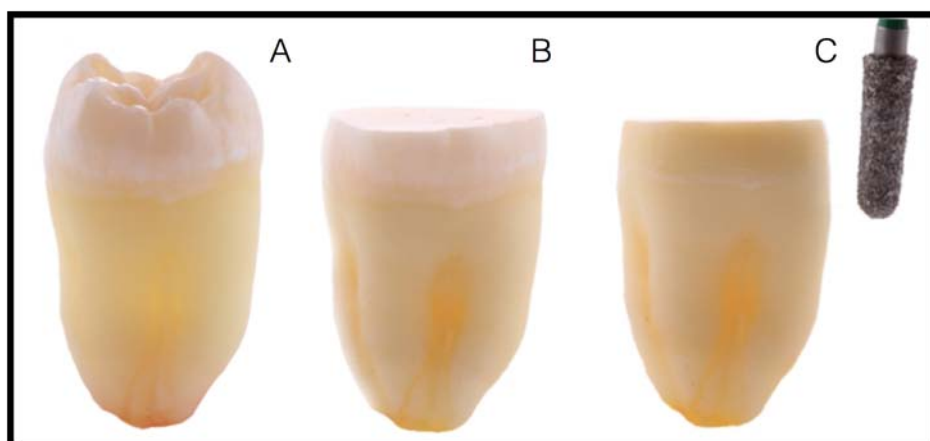
#### 3.1 EXPERIMENTO 1

*Desempenho imediato da interface resina-dentina de sistemas adesivos universais no modo ER e SE em dentina erosionada: resistência de união e nanoinfiltração.*

##### 3.1.1 Preparo dos dentes

Duzentos e dois molares humanos hígidos obtidos do Banco de Dentes da UEPG foram usados para esse experimento. Os dentes foram desinfetados em cloramina 0,5% e armazenados em água destilada trocada semanalmente até sua utilização.

A superfície do esmalte oclusal desses dentes foi removida até a exposição da dentina usando lixas de carbeto de silício granulação # 180 sob irrigação a água e o esmalte lateral foi desgastado com a ponta diamantada nº 4137 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em alta rotação sob irrigação constante deixando apenas tecido dentinário. A seguir, a *smear layer* foi padronizada por 60 s, utilizando lixas carbeto de silício com granulação # 600 (Extec, Enfield, CT, EUA) sob irrigação com água (Figura 1).



**Figura 1.** Preparo da superfície dentinária. (A) Dente hígido; (B) Superfície oclusal planificada em dentina; (C) Desgaste de todas as bordas periféricas de esmalte.

### 3.1.2 Desenho experimental

Os dentes foram aleatoriamente distribuídos em quarenta grupos (n=5) com base na combinação das variáveis, isto é, superfície dentinária vs. sistemas adesivos vs. estratégias adesivas. (1) Superfície dentinária: grupo controle sem erosão e dentina erosionada; (2) Sistemas adesivos: 1. All-Bond Universal (ABU, Bisco, Schaumburg, IL, EUA); 2. Ambar Universal (AMB, FGM Prod Odont, Joinville, SC, Brasil); 3. Clearfil Universal (CFU, Kuraray Noritake Dental, Tóquio, Japão); 4. Futurabond U (FBU, VOCO, Cuxhaven, Alemanha); 5. One Coat 7 Universal (OCU, Coltene, Altstätten, Suíça); 6. Peak Universal Bond (PUB, Ultradent Products, South Jordan, UT, EUA); 7. Prime & Bond Elect (PBE, Dentsply, Konstanz, Alemanha); 8. Scotchbond Universal Adhesive (SBU, 3M ESPE, (ST Paul, MN, EUA também conhecido como Single Bond Universal em alguns países); 9: Tetric N-Bond Universal (TEU, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein), 10. Xeno Select (XEN, Dentsply, Konstanz, Alemanha, também conhecido como Prime & Bond One Select em alguns países) e (3) Estratégia adesiva: ER e SE (Figura 2). A composição, o modo de aplicação e os números dos lotes estão descritos na Tabela 1.



**Figura 2.** Imagem representativa do desenho experimental e sistemas adesivos utilizados na estratégia ER e SE.



Tabela 1. Sistemas adesivos, número de lotes, composição e estratégia de aplicação.

Sistema Adesivo (lote)	Composição	Estratégia de aplicação (*)	
		Auto-condicionante (SE)	Condicionamento total (ER)
<b>All-Bond Universal</b> – Bisco Inc. (1500002859)	HEMA, 10-MDP, Bis-GMA, etanol, água, iniciadores.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar duas camadas do sistema adesivo, ativamente com um microbrush por 10-15 s;</li> <li>2. Forte jato de ar por 5 s, para evaporação do solvente. Até não ser visível nenhum movimento do material com uma superfície uniforme e brilhante;</li> <li>3. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplique o ácido durante 15 s;</li> <li>2. Enxaguar completamente;</li> <li>3. Remova o excesso de água com jato de ar por 1 - 2 s;</li> <li>4. Aplique o adesivo igual ao modo autocondicionante.</li> </ol>
<b>Ambar Universal</b> - FGM (210415)	Monômeros metacrílicos (UDMA e 10-MDP), fotoiniciador, co-iniciadores, estabilizantes, nanopartículas de sílica inertes e etanol.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar duas camadas com um microbrush ativamente por 20 s (10 s cada camada);</li> <li>2. Secar cuidadosamente com jato de ar durante 10 s;</li> <li>3. Fotoativação por 10 s.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplique o ácido por 15 s;</li> <li>2. Enxaguar completamente;</li> <li>3. Remova o excesso de água com jato de ar;</li> <li>4. Aplique o adesivo igual ao modo autocondicionante.</li> </ol>
<b>Clearfil Universal</b> - Kuraray (CR0002)	Bis-GMA, HEMA, etanol, 10-MDP, dimetacrilato hidrofóbico alifático, sílica coloidal, CQ, agente de acoplamento silano, aceleradores, inibidores e água.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar com um microbrush ativamente por 10 s;</li> <li>2. Secar cuidadosamente com jato de ar por 5 s até que o adesivo não se mova;</li> <li>3. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplique o ácido por 15 s;</li> <li>2. Enxaguar;</li> <li>3. Remova o excesso de água com jato de ar;</li> <li>4. Aplique o adesivo igual ao modo autocondicionante.</li> </ol>
<b>Futurabond U</b> - Voco (1346518)	HEMA, Bis-GMA, HEDMA, monômeros ácidos, UDMA, catalisador, nanopartículas de sílica e etanol.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar com um microbrush ativamente por 20 s;</li> <li>2. Secar cuidadosamente com jato de ar por 5 s até que o adesivo não se mova;</li> <li>3. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplique o ácido por 15 s;</li> <li>2. Enxaguar por 10 s;</li> <li>3. Remova o excesso de água com jato de ar por 2 s;</li> <li>4. Aplique o adesivo igual ao modo autocondicionante.</li> </ol>

<b>One Coat 7 Universal -</b> Coltene (F96836)	Metacrilatos incluindo 10-MDP, fotoiniciadores, etanol ethanol, água.	1. Aplicar com um microbrush ativamente por 20 s; 2. Secar cuidadosamente com jato de ar por 5 s; 3. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm <sup>2</sup> .	1. Aplique o ácido por 15 s; 2. Enxaguar; 3. Remova o excesso de água com jato de ar; 4. Aplique o adesivo igual ao modo autocondicionante.
<b>Peak Universal Bond-</b> Ultradent (BB7D7)	HEMA, Bis-GMA, etanol, 0.2% de diacetato de clorexidina, ácido metacrilico, 7,5% de partículas.	1. Aplicar ativamente o Peak SE <i>Primer</i> por 20 s e suave jato de ar; 2. Aplique uma camada do adesivo Peak LC ativamente por 10 s; 3. Secar cuidadosamente com jato de ar por 10 s; 3. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm <sup>2</sup>	1. Aplique o ácido por 15 s; 2. Enxaguar por 5 s; 3. Remova o excesso de água com jato de ar; 4. Aplique o adesivo igual ao modo autocondicionante.
<b>Prime&amp;Bond Elect –</b> Dentsply Caulk (130811)	Mono-di-trimethacrylate de resina; PENTA; óxido de fosfina orgânica, estabilizantes, hidrifloureto de cetil-amida, acetone e água.	1. Aplicar uma quantidade generosa do adesivo molhando completamente toda a superfície e deixar reagir por 20 s; 2. Secar cuidadosamente com jato de ar por 5 s. A superfície deve ser uniforme e brilhante. 3. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm <sup>2</sup> .	1. Aplique o ácido por 15 s 2. Enxaguar por 5 s 3. Remova o excesso de água com jato de ar; 4. Aplique o adesivo igual ao modo autocondicionante.
<b>Scotchbond Universal -</b> 3M ESPE (523652)	10-MDP, monômeros dimetacrilatos, HEMA, copolímero de acrilico, ácido itacônico, nanopartículas, etanol, água, caforoquinona, silano	1. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s e se necessário reaplique o adesivo; 2. Secar cuidadosamente com jato de ar por 5 s, até que o adesivo não se mova e so solvente evapore completamente 3. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm <sup>2</sup> .	1. Aplique o ácido por 15 s; 2. Enxaguar por 10 s; 3. Remova o excesso de água com jato de ar por 2s; 4. Aplique o adesivo igual ao modo autocondicionante.
<b>Tetric N-Bond Universal –</b> Ivoclar Vivadent	HEMA, 10-MDP, Bis-GMA, MCAP, D3MA, etanol, água, dióxido de silício altamente disperso e CQ.	1. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s; 2. Secar cuidadosamente com jato de ar por 5 s. 3. Fotoativação por 10 s a 1200	1. Aplique o ácido por 15 s; 2. Enxaguar por 10 s; 3. Remova o excesso de água com jato de ar por 5 s;

(U42905)		mW/cm <sup>2</sup> .	4. Aplique o adesivo igual ao modo autocondicionante.
<b>Xeno Select</b> – Dentsply DeTrey (1401001210)	Acrilatos bifuncionais, acrilato acídico, éster de ácido fosfórico funcionalizado, etilo 2-[5-dihidrogenio fosforil-5,2-dioxapentil]acrilato; água, álcool terc-butílico, iniciador (canforoquinona), co-iniciador (DMABN), estabilizante.	1. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s; 2. Secar cuidadosamente por 5 s. A superfície deve ter uma aparência uniforme e brilhante; 3. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm <sup>2</sup> .	1. Aplique o ácido por 15 s; 2. Enxaguar por 10 s; 3. Remova o excesso de água com jato de ar por 5 s; 4. Aplique o adesivo igual ao modo autocondicionante.

*\*Os materiais foram aplicados de acordo com as recomendações do respectivo fabricante.*

*HEMA, 2-Hidroxiethyl Metacrilato; Bis-GMA, Bisfenol A diglicidil éter dimetacrilato; MDP, Metacriloxidecil fosfato; UDMA, Uretano dimetacrilato; HEDMA, metacrilato de (5-etil-1,3-dioxan-5-il) metilo; PENTA, Dipentaeritrol penta acrilato ácido éster monofosforado; CQ, Canforoquinona; MCAP, Polímero de ácido carboxílico metacrilato; D3MA, dimentacrilado decandiol.*

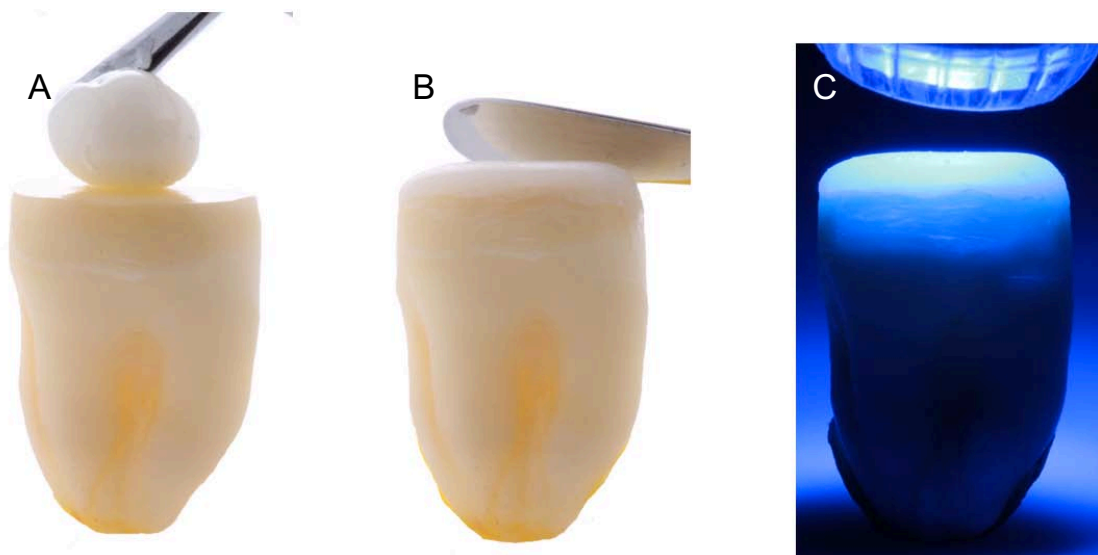
### 3.1.3 Modelo de ciclagem erosiva

Para a desmineralização erosiva, os espécimes foram submetidos a ciclagem erosiva por um total de 10 dias (5 dias/semana, 2 semanas). Os dentes foram desmineralizados com solução de ácido cítrico 0,05 M (pH 2,3, ácido cítrico anidro) seis vezes por dia durante 5 min (Flury et al. <sup>39</sup> 2013).

Após cada desafio erosivo, os espécimes foram enxaguados com água deionizada (10 s) e imersos numa solução remineralizante durante 60 min. ( $H_3PO_4$  4,08 mM, KCl 20,10 mM,  $Na_2CO_3$  11,90 mM e  $CaCl_2$  1,98 mM com um pH de 6,7). (Flury et al. <sup>39</sup> 2013). As soluções foram renovadas a cada ciclo e o pH foi monitorado periodicamente com a ajuda de pHmetro (SPLabor, São Paulo, SP, Brasil).

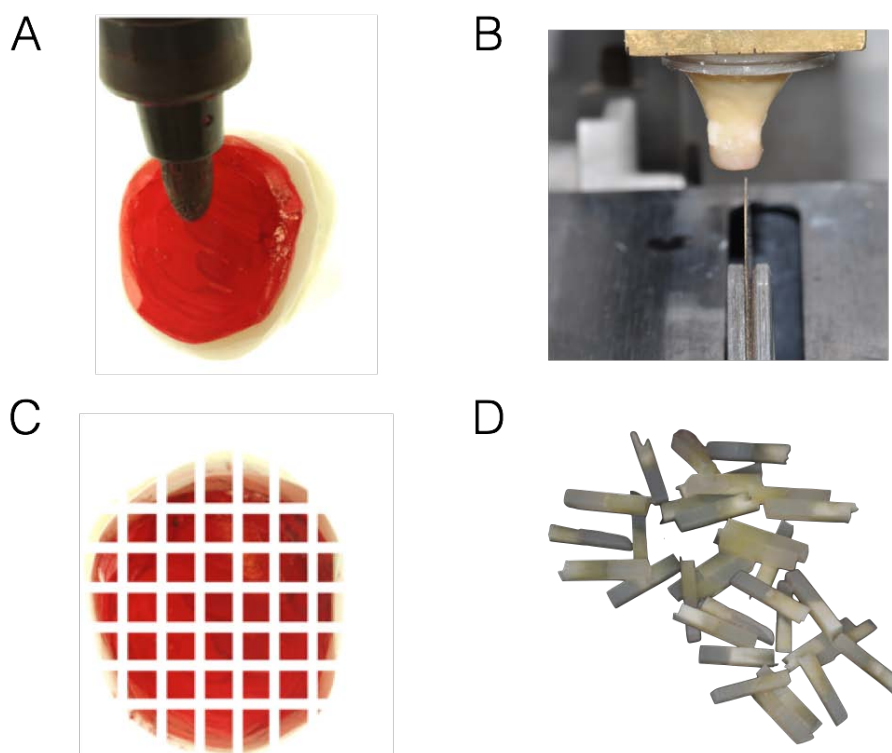
### 3.1.4 Procedimento restaurador e preparo dos espécimes

O passo a passo de todos os procedimentos de adesão está descrito na Tabela 1. Os sistemas adesivos foram aplicados de acordo com as recomendações dos fabricantes e fotoativados com um aparelho fotopolimerizador Radii Cal (SDI, Bayswater, Victoria, Australia;  $1200\text{ mW/cm}^2$ ). Após isso, esses dentes foram incrementalmente restaurados com resina composta (Opalis, FGM, Joinivlle, SC, Brasil) e as três camadas foram fotopolimerizadas por 40 s cada com o mesmo aparelho fotopolimerizador previamente descrito (Figura 3).



**Figura 3.** Restauração dos dentes após aplicação do sistema adesivo. (A) Confeção do incremento de resina composta; (B) Adaptação de cada incremento; (C) Fotoativação de cada incremento.

Após o armazenamento em água destilada a 37 °C por 24 h, os espécimes foram seccionados longitudinalmente nas direções mesio-distal e vestibulo-lingual através da interface adesiva, com ajuda de um disco de corte diamantado (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) em uma máquina de corte (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) em baixa velocidade sob irrigação a água para obter espécimes em forma de palitos de resina-dentina com uma área de secção transversal de aproximadamente 0,8 mm<sup>2</sup>, medido com paquímetro digital (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Tóquio, Japão) (Figura 4). Registrou-se o número de palitos que apresentavam falha prematura (PF) durante a obtenção dos espécimes para cada dente.



**Figura 4.** Sequência de corte para a obtenção dos palitos. (A) Superfície oclusal das coroas de resina compostas pintadas com caneta marcadora permanente de cores diferentes para identificação dos palitos de cada grupo; (B) Dente fixado com cera pegajosa ao dispositivo da máquina de corte montada com um disco diamantado; (C) Duas sequências perpendiculares de corte, uma no eixo x e outra no eixo y, permitindo a obtenção dos palitos para o teste de resistência de união; (D) Os palitos de cada dente foram armazenados em água destilada até o momento do teste de resistência de união.

### 3.1.5 Teste de resistência de união à microtração ( $\mu$ TBS)

Os palitos de resina-dentina foram fixados em garras de Geraldeli (Perdigao et al. <sup>40</sup> 2002) com cola de cianoacrilato (IC-GEL™, BSI, Atascadero, CA, USA) e testados em uma máquina de ensaios universal (Kratos Dinamometros, Cotia, SP) a 0,5 mm/min de tensão, com uma carga de 100N, até a ruptura da interface adesiva,

para obter valores de  $\mu$ TBS em MPa.

O modo de falha dos palitos foi classificado como coesiva ([C] falha exclusivamente na dentina ou resina composta), falha adesiva/mista ([A/M] na interface resina-dentina / falha coesiva parcial nos substratos vizinhos). O modo de falha foi avaliado em um estereomicroscópio com aumento de 100x (Olympus SZ40, Tóquio, Japão).

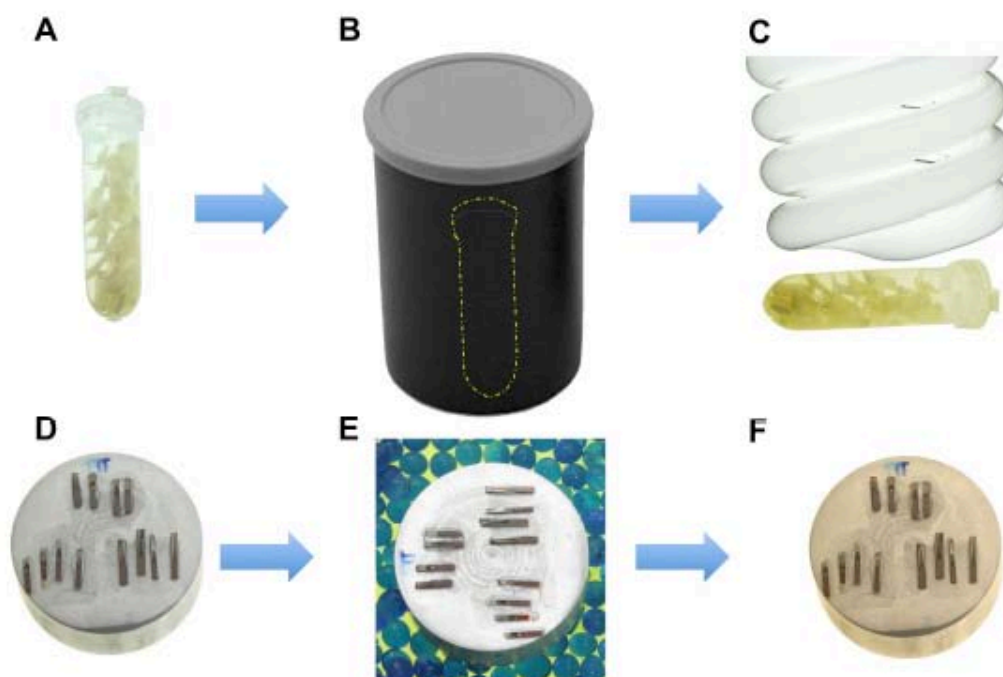
### **3.1.6 Análise da nanoinfiltração por microscopia eletrônica de varredura.**

Três palitos randomizados de cada dente, que não foram testados para  $\mu$ TBS, foram imersos em solução amoniacal de nitrato de prata a 50% em peso (Tay et al. <sup>41</sup> 2002) por 24 h em ambiente escuro protegido da luz. Então, os espécimes foram lavados em água destilada e armazenados em solução reveladora (Kodak, Rochester, Nova York, EUA) sob luz fluorescente por 8 h para que houvesse redução dos íons de prata ao longo das microporosidades na interface de união.

Depois disso, os espécimes foram fixados em *stubs* de alumínio e polidos com lixas de SiC de granulação #600, #1000, #1200, #1500, #2000 e #2500 e pastas diamantadas granulação 1 e 0,25  $\mu$ m (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), com banho em cuba ultrassônica entre as lixas por 5 min.

Posteriormente, os *stubs* contendo os espécimes foram lavados em cuba ultrassônica por 30 min, desidratados em ambiente contendo sílica e metalizados com carbono-ouro (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) (Figura 5). As interfaces foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no modo de elétrons retroespalhados a 12 kV (VEGA 3 TESCAM, Shimadzu, Tóquio, Japão), na magnificação de 600x.

Três microfotografias foram obtidas para cada espécime: a primeira ao centro, e as outras duas a 0,3 mm para direita e esquerda a partir da primeira microfotografia (Reis et al. <sup>42</sup> 2007). A porcentagem de nanoinfiltração dentro das camadas adesiva e híbrida foram mensuradas por um software específico de domínio público Image J software program (version 1.42q; NIH, Bethesda, MD). (Schneider et al. <sup>43</sup> 2012).



**Figura 5.** Preparo de amostras para Ni. (A) Palitos imersos em uma solução aquosa de nitrato de prata; (B) armazenamento por 24 h sob total escuridão; (C) Após lavagem, imersos em solução reveladora por 8 h sob luz fluorescente; (D) Palitos revelados, montados em *stubs* de alumínio para facilitar o polimento uniforme; (E) Palitos dessecados em sílica por 24 h; (F) Palitos metalizados para a análise de MEV.

### 3.1.7 Análise morfológica da superfície dentina erosiona

Para a análise morfológica da superfície erosionada, 2 dentes foram utilizados. As coroas dos dentes foram longitudinalmente cortadas em sentido vestibular-lingual sob irrigação a água em uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) com ajuda de um disco diamantado (15 HC-4in, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) sob irrigação a 300 rpm. Cada terço foi transversalmente dividido com a ajuda do disco de corte em 2 partes ( $n = 4$  espécime). Cada espécime foi aleatoriamente alocados de acordo com a ciclagem erosiva: grupo controle sem erosão ou dentina erosionada com ácido cítrico pH 2,3. Em seguida, as superfícies foram lavadas com água durante 30 s, seguido de secagem com jato de ar durante 5 s para remover o excesso de água.

Todas as amostras foram secas e desidratadas em um dessecador durante 12 h e metalizadas com uma liga metálica de carbono-ouro em um metalizador (SCD 050, Balzers, Schaan, Liechtenstein). A totalidade da superfície de dentina tratada foi examinada sob Microscopia Eletrônica de Varredura (VEGA3 SB, TESCAN ORSAY HOLDING, Warrendale, PA, EUA). Fotomicrografias representativas das

superfícies foram tomadas com magnificações de 5000x.

### 3.1.8 Análise estatística

Foi realizada uma média dos valores de resistência de união e nanoinfiltração à dentina obtidos do mesmo dente para fins estatísticos de modo que a unidade experimental neste estudo foi o dente. O  $\mu$ TBS (MPa) e os dados de NI (%) foram submetidos a ANOVA de três fatores (superfície erosionada vs. sistema adesivo vs estratégia adesiva) e teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

## 3.2 EXPERIMENTO 2

*Uso de primers com agentes reticuladores de colágeno na adesão à dentina erosionada: resistência de união, nanoinfiltração e grau de conversão.*

### 3.2.1 Preparo dos dentes e delineamento experimental.

Noventa e dois molares humanos hígidos foram utilizados. Os dentes foram desinfetados em cloramina 0,5% e armazenados em água destilada trocada semanalmente até sua utilização. Com o auxílio de uma politriz (Arotec E, Cotia, SP, Brasil) e usando lixa de carbetto de silício de granulação #180, sob constante irrigação, foi retirado o esmalte oclusal e planificada a superfície dos molares até exposição da dentina. O esmalte lateral foi totalmente desgastado com a ponta diamantada nº 4137 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em alta rotação e irrigação constante, deixando unicamente tecido dentinário. A seguir, as superfícies de dentina foram polidas manualmente sob irrigação por 60 s para a padronização da *smear layer* utilizando lixas de carbetto de silício de granulação #600 (Extec, Enfield, CT, EUA).

Os dentes foram aleatoriamente alocados dentro de 18 condições experimentais (n=5) para os testes de resistência de união a microtração, nanoinfiltração e grau de conversão *in situ* de acordo com as variáveis: (1) Ciclagem erosiva: dentina erosionada com Coca-Cola pH  $\approx$  2,7 (Coca-cola, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), ou dentina erosionada com ácido cítrico pH 2,3; (2) Sistemas adesivos: Prime & Bond Elect (PBE, Dentsply, Konstanz, Alemanha), Scotchbond Universal Adhesive (SBU, 3M ESPE, St Paul, MN, EUA), Tetric N-Bond Universal (TEU, Ivoclar Vivadent) e (3) Agentes de tratamento: *primer* contendo 6,5% em peso de



proantocianidina e *primer* contendo 0,1% em peso de riboflavina. O Produto (fabricante), lote e composição dos *primers* encontra-se na Tabela 2.

A composição, o modo de aplicação e os números de lote dos sistemas adesivos em estudo estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 2.** Produto, lote e composição dos *primers*.

	<b>Produto (Fabricante)</b>	<b>Composição</b>
<b>Agentes Reticuladores</b>	Proantocianidina primer (Mega Natural Gold, Madera, EUA). Lote 1501902	Proantocianidina – extrato da semente de uva (90% de pureza) a 6,5 % peso, água destilada.
	Riboflavina primer (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Alemanha) Lote 070046	Riboflavina a 0,1 % em peso, água destilada.

Tabela 3. Sistemas adesivos (Lote), composição, grupos e modo de aplicação. (\*)

Sistemas adesivos (Lote)	Composição	Grupos	Modo de aplicação
Prime & Bond Elect (PBE) Dentsply Caulk (130811)	Mono-di-trimetacrilato de resina; PENTA; óxido de fosfina orgânica; estabilizantes; hidrofluoreto de cetil-amida; acetona; água.	Dentina erosionada (DE)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar ácido fosfórico 37% (Condac, FGM; Joinville, SC, Brasil) por 15 s;</li> <li>2. Lavagem por 15 s e secar suavemente com jato de ar;</li> <li>3. Aplicar uma quantidade generosa do adesivo, molhando completamente toda a superfície e deixar reagir por 20 s;</li> <li>4. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 s. A superfície deve ser uniforme e brilhante;</li> <li>5. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
		DE + Proantocianidina <i>primer</i> (DE + PA <i>primer</i> ) (Mega Natural Gold, Madera, EUA)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar ácido fosfórico 37% (Condac, FGM; Joinville, SC, Brasil) por 15 s;</li> <li>2. Lavagem por 15 s e secar suavemente com jato de ar;</li> <li>3. Aplicação do <i>primer</i> aquoso contendo proantocianidina, por 60 s com um <i>microbrush</i> totalmente saturado;</li> <li>4. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 segundos, mantendo a superfície ligeiramente úmida;</li> <li>5. Aplicar uma quantidade generosa do adesivo, molhando completamente toda a superfície e deixar reagir por 20 s;</li> <li>6. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 s. A superfície deve ser uniforme e brilhante;</li> <li>7. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
		DE + Riboflavina <i>primer</i> (DE + Ri <i>primer</i> ) (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Alemanha)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar ácido fosfórico 37% (Condac, FGM; Joinville, SC, Brasil) por 15 s;</li> <li>2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar;</li> <li>3. Aplicação do <i>primer</i> aquoso contendo riboflavina, por 60 s com um <i>microbrush</i> totalmente saturado;</li> <li>4. Fotoativação por 2 min;</li> <li>5. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 segundos, mantendo a superfície ligeiramente úmida;</li> </ol>

			<ol style="list-style-type: none"> <li>6. Aplicar uma quantidade generosa do adesivo, molhando completamente toda a superfície e deixar reagir por 20 s;</li> <li>7. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 s. A superfície deve ser uniforme e brilhante;</li> <li>8. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
		Dentina erosionada (DE)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar ácido fosfórico 37% (Condac, FGM; Joinville, SC, Brasil) por 15 s;</li> <li>2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar;</li> <li>3. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s e se necessário reaplicar o adesivo;</li> <li>4. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 s até que o adesivo não se mova e o solvente evapore completamente;</li> <li>5. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
Single Bond Universal (SBU) 3MESPE (523652)	10-MDP, monômeros dimetacrilatos, HEMA, Copolímero de acrílico e ácido itacônico, nanopartículas, etanol, água, CQ, silano.	DE + Proantocianidina <i>primer</i> (DE + PA <i>primer</i> ) (Mega Natural Gold, Madera, EUA)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar ácido fosfórico 37% (Condac, FGM; Joinville, SC, Brasil) por 15 s;</li> <li>2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar;</li> <li>3. Aplicação do <i>primer</i> aquoso contendo proantocianidina, por 60 s com um microbrush totalmente saturado;</li> <li>4. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 segundos, mantendo a superfície ligeiramente úmida;</li> <li>5. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s e se necessário reaplicar o adesivo;</li> <li>6. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 s até que o adesivo não se mova e o solvente evapore completamente;</li> <li>7. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
		DE + Riboflavina <i>primer</i> (DE + Ri <i>primer</i> ) (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Alemanha)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar ácido fosfórico 37% (Condac, FGM; Joinville, SC, Brasil) por 15 s;</li> <li>2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar;</li> <li>3. A Aplicação do <i>primer</i> aquoso contendo riboflavina, por 60 s com um <i>microbrush</i> totalmente saturado;</li> <li>4. Fotoativação por 2 min;</li> <li>5. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 segundos,</li> </ol>

			<p>mantendo a superfície ligeiramente úmida;</p> <p>6. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s e se necessário reaplicar o adesivo;</p> <p>7. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 s até que o adesivo não se mova e o solvente evapore completamente;</p> <p>8. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</p>
		Dentina erosionada (DE)	<p>1. Aplicar ácido fosfórico 37% (Condac, FGM; Joinville, SC, Brasil) por 15 s;</p> <p>2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar;</p> <p>3. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s;</p> <p>4. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</p>
Tetric N-Bond Universal (TEU) Ivoclar Vivadent (U42905)	HEMA, 10-MDP, Bis-GMA, MCAP, D3MA, etanol, água, dióxido de silício altamente disperso, CQ.	DE + Proantocianidina <i>primer</i> (DE + PA <i>primer</i> ) (Mega Natural Gold, Madera, EUA)	<p>1. Aplicar ácido fosfórico 37% (Condac, FGM; Joinville, SC, Brasil) por 15 s;</p> <p>2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar;</p> <p>3. Aplicação do <i>primer</i> aquoso contendo proantocianidina, por 60 s com um microbrush totalmente saturado;</p> <p>4. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 segundos, mantendo a superfície ligeiramente úmida;</p> <p>5. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s;</p> <p>6. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</p>
		DE + Riboflavina <i>primer</i> (DE + Ri <i>primer</i> ) (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Alemanha)	<p>1. Aplicar ácido fosfórico 37% (Condac, FGM; Joinville, SC, Brasil) por 15 s;</p> <p>2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar;</p> <p>3. Aplicação ativamente do <i>primer</i> de riboflavina por 60 s;</p> <p>4. Fotoativação por 2 min;</p> <p>5. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 segundos, mantendo a superfície ligeiramente úmida;</p> <p>6. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s;</p> <p>7. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</p>

\*Os materiais foram aplicados de acordo com as recomendações do respectivo fabricante.

Bis-GMA, Bisfenol A diglicidil éter dimetacrilato; HEMA, 2-Hidroxiethyl Metacrilato; MDP, Metacriloxidecil fosfato; CQ, Canforoquinona; MCAP, Polímero de ácido carboxílico metacrilato; D3MA, dimetacrilado decandiol.

### 3.2.2 Modelo de ciclagem erosiva

Para a desmineralização erosiva com refrigerante, os espécimes foram submetidos a ciclagem erosiva por imersão em coca-cola (Coca-Cola, pH  $\approx$  2,7, Brasil) quatro vezes ao dia por 90 s cada, durante 5 dias. (Magalhães et al. <sup>44</sup> 2014; Zarella et al. <sup>45</sup> 2015).

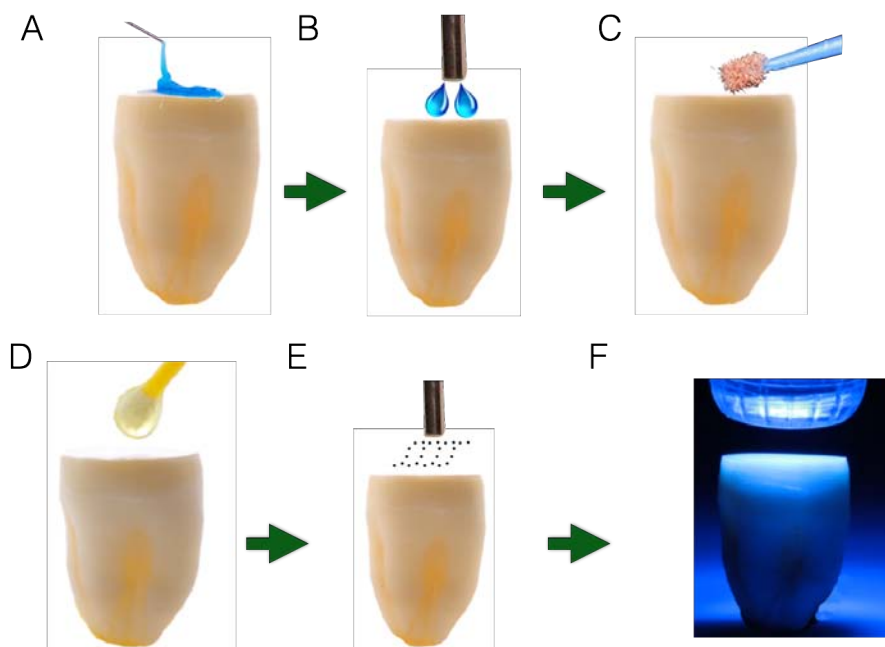
Para a desmineralização erosiva com ácido cítrico, os espécimes foram submetidos a ciclagem erosiva por um total de 10 dias (5 dias/semana, 2 semanas). Os dentes foram desmineralizados com solução de ácido cítrico 0,05 M (pH 2,3, ácido cítrico anidro) seis vezes por dia durante 5 min (Flury et al. <sup>39</sup> 2013).

Após ambas demineralizações erosivas, os espécimes foram enxaguados com água deionizada (10 s) e imersos numa solução remineralizante durante 60 min ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  4,08 mM, KCl 20,10 mM,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  11,90 mM e  $\text{CaCl}_2$  1,98 mM com um pH de 6,7) (Flury et al. <sup>39</sup> 2013). As soluções foram renovadas a cada ciclo e o pH foi monitorado periodicamente com a ajuda de pHmetro (SPLabor, São Paulo, SP, Brasil).

### 3.2.3 Procedimento restaurador e preparo dos espécimes

O passo a passo dos procedimentos de adesão para todos os grupos está descrito na Tabela 2. Após ciclagem erosiva, a dentina de todos os dentes foi condicionada com gel de ácido fosfórico 37% durante 15 s (FGM, Joinville, SC, Brasil), enxaguadas com água (15 s), secas com ar (5 s) e mantidas ligeiramente úmidas para ser tratada de acordo com os grupos experimentais. Para a solução aquosa a 0,1% de riboflavina (RB), a superfície da dentina foi exposta à lâmpada de luz LED Radii Cal (SDI, Bayswater, Victoria, Australia; 1,200 mW/cm<sup>2</sup>) durante 2 minutos, em virtude da riboflavina necessitar de luz para permitir a formação de radicais livres e estabelecer forte reticulação com o colágeno dentinário.

Os sistemas adesivos foram aplicados de acordo com as recomendações dos fabricantes e fotopolimerizados com um aparelho fotopolimerizador Radii Cal (SDI, Bayswater, Victoria, Australia; 1,200 mW/cm<sup>2</sup>) por 10 s. Posteriormente, os dentes foram restaurados de forma incremental com a resina composta Opallis (FGM, Joinville, SC, Brasil) e cada incremento fotopolimerizado por 40 s com o aparelho citado anteriormente (SDI, Bayswater, Victoria, Australia; 1200 mW/cm<sup>2</sup>) (Figura 6).



**Figura 6.** Inclusão dos *primers* no protocolo adesivo. (A) Aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 s; (B) Lavagem com jato de água-ar; (C) Aplicação do *primer* de proantocianidina ativamente por 60 s; (D) Aplicação do sistema adesivo de acordo com as recomendações do fabricante; (E) Aplicação de jato de ar para evaporação do solvente; (F) Fotoativação do sistema adesivo.

Após o armazenamento em água destilada a 37° C por 24 h, os dentes restaurados foram seccionados longitudinalmente no sentido mesio-distal e vestibulo-lingual através da interface de união, usando um disco diamantado em baixa velocidade (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) para obtenção de palitos com uma área de secção transversal de aproximadamente 0,8 mm<sup>2</sup>, medido com auxílio de um paquímetro digital (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Tóquio, Japão) (Figura 4). O número de palitos com falhas prematuras (PF) foi registrado durante o seccionamento.

### 3.2.4 Teste de resistência de união à microtração ( $\mu$ TBS)

Os palitos de resina-dentina foram fixados em garras de Geraldeli (Perdigao et al. <sup>40</sup> 2002) com cola de cianoacrilato (IC-GEL™, BSI, Atascadero, CA, EUA) e testados em uma máquina de ensaio universal (Kratos Dinamometros, Cotia, SP) a 0,5 mm/min de tensão com uma carga de 100N, até a ruptura da interface adesiva. Os valores de  $\mu$ TBS em (MPa) foram anotados.

O modo de falha dos palitos foi classificado como coesiva ([C] falha exclusivamente na dentina ou resina composta) e falha adesiva ([A/M] na interface resina-dentina / falha coesiva parcial em substratos vizinhos). O modo de falha foi avaliado em um estereomicroscópio com aumento de 100x (Olympus SZ40, Tóquio,

Japão).

### 3.2.5 Análise da nanoinfiltração por microscopia eletrônica de varredura

Três palitos randomizados de cada dente, que não foram testados por  $\mu$ TBS, foram imersos em solução amoniacal de nitrato de prata a 50% em peso (Tay et al. <sup>41</sup> 2002) por 24 h em ambiente escuro protegido da luz. Então, os espécimes foram lavados em água destilada e armazenados em solução reveladora (Kodak, Rochester, Nova York, EUA) sob luz fluorescente por 8 h para que houvesse redução dos íons de prata ao longo das microporosidades na interface de união.

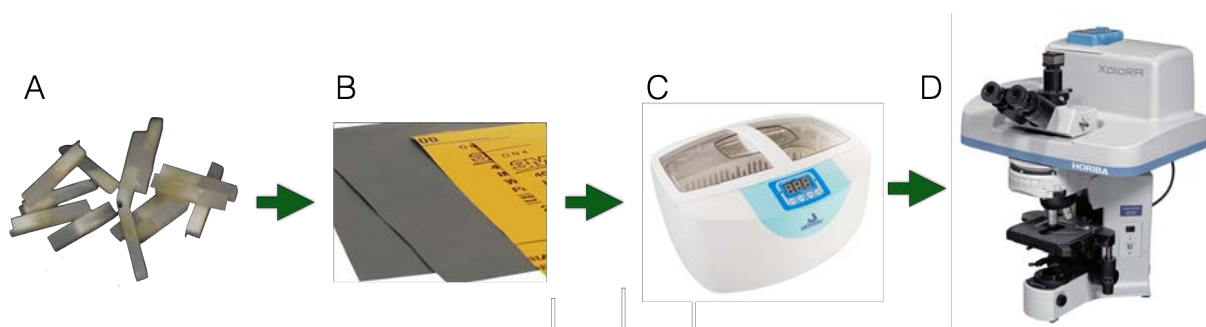
Depois disso, os espécimes foram fixados em *stubs* de alumínio e polidos com lixas de SiC de granulação #600, #1000, #1200, #1500, #2000 e #2500 e pastas diamantadas granulação 1 e 0,25  $\mu$ m (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA). Posteriormente, os *stubs* contendo os espécimes foram lavados em cuba ultrassônica por 30 min, desidratados em ambiente contendo sílica e cobertos com ouro-carbono (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) (Figura 5). As interfaces foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no modo de elétrons retroespalhados a 12 kV (VEGA 3 TESCAM, Shimadzu, Tóquio, Japão).

Três microfotografias foram obtidas para cada espécime: a primeira ao centro, e as outras duas a 0,3 mm para direita e esquerda a partir da primeira microfotografia (Reis et al. <sup>44</sup> 2007) A porcentagem de nanoinfiltração dentro das camadas adesiva e híbrida foram mensuradas por um software específico de domínio publico Image J software program (version 1.42q; NIH, Bethesda, MD) (Schneider et al. <sup>43</sup> 2012).

### 3.2.6 O grau de conversão *in situ* (GC) dentro das camadas adesivas / híbridas

Dois palitos de resina-dentina que não foram testados por  $\mu$ TBS foram selecionados aleatoriamente para avaliar o GC imediatamente após o corte. Os palitos foram polidos com lixas de SiC de granulação de #1500 e #2000. Os espécimes foram limpos em cuba ultra-sônica por 10 minutos e levados para o equipamento micro-Raman (microscópio XploRA ONETM Raman, HORIBA Scientific, New Jersey, NY, EUA) (Figura 7), que foi primeiro calibrado para zero e depois para valores de coeficientes usando uma amostra de silício. As amostras foram analisadas utilizando um *laser* de diodo de 785 nm através de uma objectiva

de 100x. O sinal de Raman foi adquirido utilizando uma grade de 600-linhas/mm entre 500 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ , foram utilizados parâmetros a 100 mW, resolução espacial de 3  $\mu\text{m}$ , resolução espectral 5  $\text{cm}^{-1}$ , tempo de acumulação de 30 s com 5 coadições. Os espectros foram obtidos na interface dentina-adesivo, em três locais aleatórios (por cada palito) dentro da camada híbrida, na dentina intertubular-infiltrada. Espectros de adesivos não fotopolimerizados foram tomados como referências. A proporção de conteúdo de ligação dupla do monômero para polímero no adesivo foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:  $\text{GC} (\%) = (1 - [\text{R polimerizado} / \text{R não polimerizado}]) \times 100$ , em que 'R' é a relação da intensidade de picos alifáticos e aromáticos a 1639  $\text{cm}^{-1}$  e 1609  $\text{cm}^{-1}$  em adesivos polimerizados e não polimerizados.



**Figura 7.** Preparo das amostras para análise do grau de conversão. (A) Espécimes selecionados aleatoriamente para cada condição experimental; (B) Polimento com lixa de SiC de granulação de 1500 e 2000; (C) Limpeza dos espécimes em cuba ultrassônica por 10 minutos; (D) Equipamento XploRA ONETM Raman, HORIBA.

### 3.2.7 Análise morfológica da superfície dentinária erosionada

Para análise morfológica da superfície erosionada, 2 dentes foram utilizados. As coroas dos dentes foram longitudinalmente cortadas em sentido vestibular-lingual sob irrigação a água em uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) com ajuda de um disco diamantado (15 HC-4in, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) sob irrigação a 300 rpm. Cada terço foi transversalmente dividido com a ajuda do disco de corte em 2 partes ( $n = 4$  espécime). Cada espécime foi aleatoriamente alocados de acordo com a ciclagem erosiva: dentina erosionada com refrigerante  $\text{pH} \approx 2,7$  ou dentina erosionada com ácido cítrico  $\text{pH} 2,3$ . Em seguida, as superfícies foram lavadas com água durante 30 s, seguido de secagem com jato de ar durante 5 s para remover o excesso de água.

Todas as amostras foram secas e desidratadas num dessecador durante 12 h e metalizadas com uma liga metálica de ouro/paládio em um metalizador (SCD 050,



Balzers, Schaan, Liechtenstein). A totalidade da superfície de dentina tratada foi examinada sob Microscopia Eletrônica de Varredura (VEGA3 SB, TESCAN ORSAY HOLDING, Warrendale, PA, EUA). Fotomicrografias representativas das superfícies foram tomadas com ampliações de 5000x.

### 3.2.8 Análise estatística

Foi realizada uma média dos valores de resistência de união e nanoinfiltração à dentina obtidos do mesmo dente para fins estatísticos de modo que a unidade experimental neste estudo foi o dente. O  $\mu$ TBS (MPa); os dados de NI (%) e GC (%) foram submetidos a ANOVA três fatores (superfície erosionada vs. sistema adesivo vs. agentes de tratamento) e teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

## 3.3 EXPERIMENTO 3

*Uso de condicionadores ácidos com inibidores de MMPs à dentina erosionada: resistência de união, nanoinfiltração e grau de conversão.*

### 3.3.1 Preparo dos dentes

Noventa molares humanos hígidos foram usados para esse experimento. Os dentes foram desinfetados em cloramina 0,5% e armazenados em água destilada trocada semanalmente até sua utilização.

A superfície do esmalte oclusal desses dentes foi removida para exposição da dentina usando lixas carbeto de silício granulação # 180 sob irrigação e o esmalte lateral foi desgastado com uma ponta diamantada nº 4137 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em alta rotação sob irrigação constante deixando unicamente tecido dentinário. A seguir, a *smear layer* foi padronizada por 60 s, utilizando lixas carbeto de silício com granulação #600 (Extec, Enfield, CT, EUA) sob irrigação a água (Figura 1).

### 3.3.2 Desenho experimental

Os dentes foram então distribuídos aleatoriamente em dezoito grupos (n=5), para os teste de resistência de união, nanoinfiltração e grau de conversão *in situ* com base na combinação das principais variáveis, ou seja: (1) superfície erosionada: dentina erosionada com refrigerante pH  $\approx$  2,7 (Coca-cola, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e dentina erosionada com ácido cítrico pH 2,3; (2) sistemas adesivos em estudo:

[Prime & Bond Elect (Dentsply Culk, Milford, DE, EUA); Scotchbond Universal Adhesive (3M ESPE, St Paul, MN, EUA); Tetric N-Bond Universal (Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein)] e (3) pré-tratamento ácido: controle com ácido fosfórico 37%; Ácido fosfórico contendo 2% de CHX e ácido fosfórico contendo 3% de proantocidinina. Sistemas adesivos (Lote), composição, grupos e modo de aplicação estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Sistemas adesivos (Lote), composição, grupos e modo de aplicação (\*)

<b>Sistemas adesivos (Lote)</b>	<b>Composição</b>	<b>Grupos</b>	<b>Modo de aplicação</b>
Prime&Bond Elect – Dentsply Caulk (130811)	Mono-, di- e trimetacrilato de resina; PENTA; óxido de fosfina orgânica; estabilizantes; hidrofluoreto de cetil-amida; acetona; água	Dentina erosionada (DE)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar ácido fosfórico 37% (Condac, FGM; Joinville, SC, Brasil) por 15 s;</li> <li>2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar;</li> <li>3. Aplicar uma quantidade generosa do adesivo, molhando completamente toda a superfícies e deixar reagir por 20 s;</li> <li>4. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 s. A superfície deve uniforme e brilhante;</li> <li>5. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
		DE + CHX-ácido	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar ácido fosfórico contendo 2% de CHX por 15 s;</li> <li>2. Lavagem por 15 s e secos suavemente com jato de ar;</li> <li>3. Aplicar uma quantidade generosa do adesivo, molhando completamente toda a superfícies e deixar reagir por 20 s;</li> <li>4. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 s. A superfície deve ser uniforme e brilhante;</li> <li>5. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
		DE + PA-ácido (Mega Natural Gold, Madera, EUA)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar ácido fosfórico contendo 3% de proantocianidina por 30 s;</li> <li>2. Lavagem por 15 s e secos suavemente com jato de ar;</li> <li>3. Aplicar uma quantidade generosa do adesivo, molhando completamente toda a superfícies e deixar reagir por 20 s;</li> <li>4. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 s. A superfície deve ser uniforme brilhante;</li> <li>5. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
Single Bond Universal (SBU) 3MESPE (523652)	10-MDP, monômeros dimetacrilatos, HEMA, Copolímero de acrílico e ácido	Dentina erosionada (DE)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar ácido fosfórico 37% (Condac, FGM; Joinville, SC, Brasil) por 15 s;</li> <li>2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar;</li> <li>3. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s e se necessário reaplicar o adesivo;</li> <li>4. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 s até que o adesivo não se mova e o solvente evapore completamente;</li> </ol>

	itaçônico, nanopartículas, etanol, água, CQ, silano	DE + CHX- ácido	5. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm <sup>2</sup> . 1. Aplicar ácido fosfórico contendo 2% de CHX por 15 s; 2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar; Aplicar o adesivo ativamente por 20 s e se necessário reaplicar o adesivo; 4. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 s até que o adesivo não se mova e o solvente evapore completamente; 5. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm <sup>2</sup> .
		DE + PA-ácido (Mega Natural Gold, Madera, EUA)	1. Aplicar ácido fosfórico contendo 3% de proantocianidina por 30 s; 2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar; 3. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s e se necessário reaplicar o adesivo; 4. Secar cuidadosamente com um jato de ar por 5 s até que o adesivo não se mova e o solvente evapore completamente; 5. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm <sup>2</sup> .
Tetric N- Bond Universal (TEU) Ivoclar Vivadent (U42905)	HEMA, 10-MDP, Bis-GMA, MCAP, D3MA, etanol, água, dióxido de silício altamente disperse, CQ	Dentina erosionada (DE)	1. Aplicar ácido fosfórico 37% (Condac, FGM; Joinville, SC, Brasil) por 15 s; 2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar; 3. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s; 4. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm <sup>2</sup> .
		DE + CHX- ácido	1. Aplicar ácido fosfórico contendo 2% de CHX por 15 s; 2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar; 3. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s; 4. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm <sup>2</sup> .
		DE + PA-ácido (Mega Natural Gold, Madera, EUA)	1. Aplicar ácido fosfórico contendo 3% de proantocianidina por 30 s; 2. Lavagem por 15 s e secado suavemente com jato de ar; 3. Aplicar o adesivo ativamente por 20 s; 4. Fotoativação por 10 s a 1200 mW/cm <sup>2</sup> .

\*Os materiais foram aplicados de acordo com as recomendações do respectivo fabricante.

Bis-GMA, Bisfenol A diglicidil éter dimetacrilato; HEMA, 2-Hidroxiethyl Metacrilato; MDP, Metacriloxidecil fosfato; CQ, Canforoquinona; MCAP, Polímero de ácido carboxílico metacrilato; D3MA, dimetacrilado decandiol.

### 3.3.3 Modelo de ciclagem de erosiva.

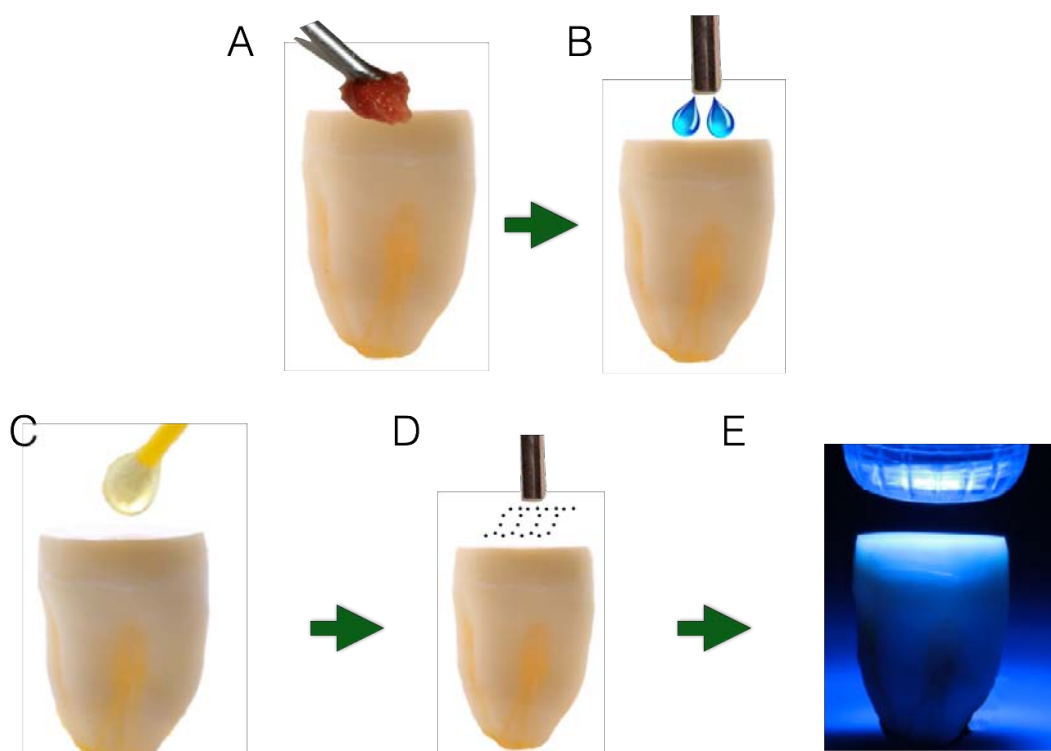
Para a desmineralização erosiva com refrigerante, os espécimes foram submetidos a ciclagem erosiva por imersão em coca-cola (Coca-Cola, pH  $\approx$  2,7 Brasil) quatro vezes ao dia por 90 s cada, durante 5 dias (Magalhães et al. <sup>44</sup> 2014; Zarella et al. <sup>45</sup> 2015).

Para a desmineralização erosiva com ácido cítrico, os espécimes foram submetidos a ciclagem erosiva por um total de 10 dias (5 dias/semana, 2 semanas). Os dentes foram desmineralizados com solução de ácido cítrico 0,05 M (pH 2,3, ácido cítrico anidro) seis vezes por dia durante 5 min (Flury et al. <sup>39</sup> 2013).

Após ambos desafios erosivos, os espécimes foram enxaguados com água deionizada (10 s) e imersos numa solução remineralizante durante 60 min. ( $H_3PO_4$  4,08 mM, KCl 20,10 mM,  $Na_2CO_3$  11,90 mM e  $CaCl_2$  1,98 mM com um pH de 6,7). (Flury et al. <sup>39</sup> 2013). As soluções foram renovadas a cada ciclo e o pH foi monitorado periodicamente com a ajuda de pHmetro (SPLabor, São Paulo, SP, Brasil).

### 3.3.4 Procedimento restaurador e preparo dos espécimes

O passo a passo de todos os procedimentos de adesão está descrito na Tabela 3. Após ciclagem erosiva no grupo controle a dentina de todos os espécimes foram condicionados com ácido fosfórico 37% por 15 s (FGM, Joinville, SC, Brasil). Para os grupos experimentais, foram preparados condicionadores ácidos: 1) Ácido à base de proantocianidina (ácido fosfórico a 10%, proantocianidina do extrato de semente de uva 3% e etanol 20%) esse condicionador ácido foi aplicado por 30 s; 2) Ácido à base de clorexidina (ácido fosfórico 37% e clorexidina em 2%) o qual foi aplicado por 15 s. Os produtos químicos foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), menos o extrato de semente de uva (Mega Natural Gold Polyphenolics, Madera, EUA). Depois de serem condicionadas de acordo com os respectivos grupos, as superfícies foram enxaguadas com água destilada durante 30 s, secas ao ar durante 5 s e mantidas ligeiramente úmidas para a aplicação do adesivo (Figura 8).



**Figura 8.** Aplicação dos ácidos contendo os agentes terapêuticos. (A) Aplicação de ácido fosfórico contendo proantocianidina por 30 s; (B) Lavagem com jato de água-ar; (C) Aplicação do sistema adesivo de acordo com as recomendações do fabricante; (D) Aplicação de jato de ar para evaporação do solvente; (E) Fotoativação do sistema adesivo.

Os sistemas adesivos foram aplicados de acordo com as recomendações dos fabricantes e fotoativados com um aparelho fotopolimerizador Rádi Cal (SDI, Bayswater, Victoria, Australia;  $1200 \text{ mW/cm}^2$ ) por 10 s. Posteriormente, os dentes foram incrementalmente restaurados com resina composta Opallis (FGM, Joinville, SC, Brasil) e cada incremento fotoativado por 40 s.

Após o armazenamento em água destilada a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h, os dentes restaurados foram seccionados longitudinalmente no sentido mesio-distal e vestibulo-lingual através da interface de união, usando um disco diamantado em baixa velocidade (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) para obtenção de palitos com uma área de secção transversal de aproximadamente  $0,8 \text{ mm}^2$ , medido com auxílio de um paquímetro digital (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Tóquio, Japão) (Figura 4). O número de palitos com falhas prematuras (PF) durante o seccionamento foram anotados.

### 3.3.5 Teste de resistência de união à microtração ( $\mu\text{TBS}$ )

Os palitos de resina-dentina foram fixados em garras de Geraldeli (Perdigão, Geraldeli et al. <sup>40</sup> 2002) com cola de cianoacrilato (IC-GEL<sup>TM</sup>, BSI, Atascadero, CA,

EUA) e testados em uma máquina de ensio universal (Kratos Dinamometros, Cotia, SP) a 0,5 mm / min de tensão com uma carga de 100N, até a ruptura da interface adesiva. Os valores de  $\mu$ TBS em (MPa) foram anotados.

O modo de falha dos palitos foi classificado como coesiva (falha [C] exclusivamente na dentina ou resina composta), falha adesiva ([A/M] na interface resina/dentina ou falha coesiva parcial dos substratos vizinhos). O modo de falha foi avaliado em um estereomicroscópio com aumento de 100x (Olympus SZ40, Tóquio, Japão).

### **3.3.6 Análise da nanoinfiltração por microscopia eletrônica de varredura**

Três palitos radomizados de cada dente, que não foram testados por  $\mu$ TBS, foram imersos em solução amoniacal de nitrato de prata a 50% em peso (Tay et al. <sup>41</sup> 2002) por 24 h em ambiente escuro protegido da luz. Então, os espécimes foram lavados em água destilada e armazenados em solução reveladora (Kodak, Rochester, Nova York, EUA) sob luz fluorescente por 8 h para que houvesse redução dos íons de prata ao longo das microporosidades na interface de união.

Depois disso, os espécimes foram fixados em *stubs* de alumínio e polidos com lixas de SiC de granulação #600, #1000, #1200, #1500, #2000 e #2500 e pastas diamantadas granulação 1 e 0,25  $\mu$ m (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA). Posteriormente, os *stubs* contendo os espécimes foram lavados em cuba ultrassônica por 30 min, desidratados em ambiente contendo sílica e cobertos com carbono-ouro (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) (Figura 5). As interfaces foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no modo de elétrons retroespalhados a 12 kV (VEGA 3 TESCAM, Shimadzu, Tóquio, Japão).

Três microfotografias foram obtidas para cada espécime: a primeira ao centro, e as outras duas a 0,3 mm para direita e esquerda a partir da primeira microfotografia (Reis et al. <sup>44</sup> 2007). A porcentagem de nanoinfiltração dentro das camadas adesiva e híbrida foram mensuradas por um software específico de domínio publico Image J software program (version 1.42q; NIH, Bethesda, MD). (Schneider et al. <sup>43</sup> 2012)

### **3.3.7 O grau de conversão *in situ* (GC) dentro das camadas adesivas / híbridas**

Palitos de resina-dentina erosionada que não foram testados por  $\mu$ TBS foram

selecionados aleatoriamente para avaliar a GC imediatamente após o corte. Os palitos foram polidos com lixa de SiC de granulação de 1500 e 2000. Os espécimes foram limpos em cuba ultra-sônica por 10 minutos e levados para o equipamento micro-Raman (microscópio XploRA ONETM Raman, HORIBA Scientific, New Jersey, NY, EUA) (Figura 7), que foi primeiro calibrado para zero e depois para valores de coeficientes usando uma amostra de silício. As amostras foram analisadas utilizando um laser de diodo de 785 nm através de uma objectivo de 100 x. O sinal de Raman foi adquirido utilizando uma grade de 600-linhas/mm entre 500 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ , foram utilizados parâmetros a 100 mW, resolução espacial de 3  $\mu\text{m}$ , resolução espectral 5  $\text{cm}^{-1}$ , tempo de acumulação de 30 s com 5 coadições. Os espectros foram obtidos na interface dentina-adesivo, em três locais aleatórios (por cada palito) dentro da camada híbrida, na dentina intertubular-infiltrada. Espectros de adesivos não curados foram tomados como referências. A proporção de conteúdo de ligação dupla do monômero para polímero no adesivo foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:  $\text{GC (\%)} = (1 - [\text{R polimerizado} / \text{R não polimerizado}]) \times 100$ , em que 'R' é a relação de da intensidade de picos alifáticos e aromáticos a 1639  $\text{cm}^{-1}$  e 1609  $\text{cm}^{-1}$  em adesivos polimerizados e não polimerizados .

### **3.3.8 Análise estatística**

Foi realizada uma média dos valores de resistência de união e nanoinfiltração à dentina obtidos do mesmo dente para fins estatísticos de modo que a unidade experimental neste estudo foi o dente. O  $\mu\text{TBS}$  (MPa); os dados de NI (%) e GC (%) foram submetidos a ANOVA três fatores (superfície erosionada vs. sistema adesivo vs. pré-tratamento ácido) e teste de Tukey com um nível de significância de 5%.



## **4. ARTIGOS**

4.1 The bonding performance of universal adhesives to eroded dentin.

Status: Em processo de revisão.

4.2 The use of collagen cross-linking agents as an alternative to improve the eroded dentin-bonding.

Status: Em processo de revisão.

4.3 The effect of experimental phosphoric acid containing MMP-inhibitor on resin eroded-dentin bonding properties.

Status: Em processo de revisão.

# Artigo 1

## The bonding performance of universal adhesives to eroded dentin.

### Abstract

**Purpose:** The aim of the present study was evaluated the microtensile bond strength ( $\mu$ TBS) and nanoleakage (NL) of several universal adhesive systems in eroded dentin in etch-and-rinse (ER) and self-etch (SE) strategies.

**Materials and Methods:** Two-hundred-two molars were randomized allocated according to dentin surface (sound dentin or eroded dentin surface). To erosive challenge was made cycles of de/remineralization for 10 days with citric acid. For each surface, the following adhesive systems were applied according to the respective manufacturer's instructions: 1) All-Bond Universal (ABU); 2) Ambar Universal (AMB); 3) Clearfil Universal (CFU); 4) Futurabond U (FBU); 5) One Coat 7 Universal (OCU); 6) Peak Universal Bond (PUB); 7) Prime&Bond Elect (PBE); 8) Scotchbond Universal Adhesive (SBU); 9) Tetric N-Bond Universal (TEU); 10) Xeno Select (XEN). After restorations, specimens were sectioned into resin-dentine beams ( $0.8 \text{ mm}^2$ ) and tested under tension ( $0.5 \text{ mm/min}$ ). Selected beams from each tooth were used for NL. The surface characterization was examined under a scanning electron microscopy. The data were analyzed by three-way ANOVA and Tukey post test ( $\alpha = 0.05$ ).

**Results:** In eroded dentin, no difference in bonding effectiveness was observed among the adhesive strategies ( $p > 0.61$ ) The most part of  $\mu$ TBS values for eroded dentin were lower than those of sound dentin ( $p < 0.01$ ). A statistically increased silver nitrate deposition was observed for a majority of the adhesive systems in eroded dentin ( $p < 0.002$ ). Eroded dentin showed a more enlarged tubule with lost partial of peritubular dentin.

**Conclusion:** Eroded dentin reduce significantly the  $\mu$ TBS and increased the NL, independent of the adhesive strategy for all universal adhesive systems.

**Keywords:** Dentin-bonding agents; Tensile strength; Dental leakage; Thoot erosion.

## Introduction

Over the recent decades, the increase in the prevalence of dental erosion (DE) has motivated the development of new researchers on this area. According to Salas et al. 2015, the overall estimated prevalence of tooth erosion is 30.4%, with rates ranging from 7.2% to 74.0% (1). A recent European study indicated that around 30% of population attending general practices aged 10-35 years has at least one tooth with advanced erosive tooth wear (2). Therefore, DE is considered a topic relevant for the dental practice.

DE is defined as a chemical process resulting in a cumulative loss of hard dental tissue that is not caused by bacteria (3). This accumulative process primarily affects the enamel, but when reaches the dentin, it can remove dentinal plugs and organic intertubular dentin, resulting in increased tubule diameters (4, 5). In addition, the eroded dentin surfaces have more exposed collagen fibrils and a reduced mineral content in the outermost layer (4, 5). This mineral dissolution often causes aesthetic and functional impairment, besides dentinal hypersensitivity (6, 7).

Restorative management reduces or stops the progression of the advanced lesion, to reduce symptoms of pain and dentine hypersensitivity, or to restores esthetic and function (3). But, the different characteristics of the eroded dentin represent an additional challenge for dental adhesion. It is known that a superficial layer of exposed collagen is often inadequately infiltrated by resin monomers in DE (4).

Nowadays, etch-and-rinse (ER) and self-etch (SE) adhesive systems are the two adhesive approaches used in restorative dentistry for the placement of composite (8). However, since the results are divergent in eroded dentin (9) (4), there is no consensus in the literature about which adhesive strategy shows the best performance. It was reported that SE-adhesive provide better adhesion to DE, because they reduce the discrepancy between demineralization and infiltration of the resin monomer (4). However, when Cruz et al 2015 tested the bonding effectiveness in DE, the ER showed the similar performance than that SE (10).

Recently, a novel family of adhesive systems, known as universal adhesives, has been introduced (11-13). These adhesives have been recommended to be used both as etch-and-rinse (two-step) and self-etching (one- or two-step) adhesives for

enamel and dentin. This versatility results from the inclusion of acidic functional monomers, such as MDP (methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate), in their composition. But a recent systematic review showed that other studies to evaluate these adhesives on different substrate are needed (14).

Thus, since the universal adhesives systems are indicated in ER mode or SE mode and are poorly investigated in DE, the aim of the present study was to evaluate the microtensile bond strength ( $\mu$ TBS) and nanoleakage (NL) of several universal adhesive systems in eroded dentin in ER or SE strategy. The null hypotheses tested were that (1)  $\mu$ TBS; (2) NL of the universal adhesive are the same ER and SE strategies when applied in eroded dentin.

## **MATERIALS & METHODS**

### **Selection and Preparation of Teeth**

Two-hundred-two extracted, sound human molars were used. The Ethics Committee of the State University of Ponta Grossa-PR approved this research project (protocol number 1.652.555). The teeth were disinfected in 0.5% chloramine and stored in distilled water.

The teeth were sectioned parallel to the occlusal surface using a low-speed diamond saw (Isomet; Buehler, Evanston, IL, USA), under water cooling, to expose the mid-coronal dentin. All specimens had a smear layer standardized by polishing the flat dentin surface with 600-grit SiC paper under running water for 60 s.

### **Experimental Design**

The teeth were randomly assigned to forty groups based on the combination of the main variables, i.e., dentin surface vs. adhesive system vs. adhesive strategies. The **dentin surface tested**: sound dentin and eroded dentin. The **adhesive systems**: 1. All-Bond Universal (ABU, Bisco; Schaumburg, IL, USA); 2. Ambar Universal (AMB, FGM Prod Odont; Joinville, SC, Brazil); 3. Clearfil Universal (CFU, Kuraray Noritake Dental; Tokyo, Japan); 4. Futurabond U (FBU, VOCO; Cuxhaven, Germany); 5. One Coat 7 Universal (OCU, Coltene; Altstätten, Switzerland); 6. Peak Universal Bond (PUB, Ultradent Products; South Jordan, UT, USA); 7. Prime&Bond Elect (PBE, Dentsply; Konstanz, Germany); 8. Scotchbond Universal Adhesive (SBU, 3M ESPE, also known as Single Bond Universal in some

countries, Minnesota, USA); 9: Tetric N-Bond Universal (TEU, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein), 10. Xeno Select (XEN, Dentsply, also known as Prime&Bond One Select in some countries, Konstanz, Germany). **Adhesive strategy:** 2-step etch-and-rinse (ER) and 1-step self-etch (SE). The composition, application mode, and batch numbers are described in Table 1.

### **pH cycling model**

For erosive demineralization, the specimens were subjected to a cyclic of and remineralization procedures for 10 days (5 days/week; 2 weeks). Molars were demineralized with 0.05 M citric acid solution (pH 2.3, anhydrous citric acid) six times per day for 5 min (15).

After the demineralization challenge, the specimens were rinsed with deionized water (10 s) and immersed in a remineralizing solution for 60 min. (4.08 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 20.10 mM KCl, 11.90 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, and 1.98 mM CaCl<sub>2</sub> with a pH of 6.7) (15). The pH of the solutions was monitored periodically with a pH meter.

### **Restorative Procedures**

The step-by-step bonding procedures for all groups are described in Table 1. Composite resin buildups (Filtek Z350, 3M ESPE, Saint Paul, USA) were then constructed incrementally (three increments of 1.5-mm each) and individually light activated for 40 s each time, using an LED light-curing unit set at 1200 mW/cm<sup>2</sup> (Radii, SDI; Bayswater, Victoria, Australia). A single operator carried out all bonding procedures. Five teeth were used for each experimental group (n = 5).

After storage in distilled water at 37°C for 24 h, the specimens were sectioned longitudinally in the mesio-to-distal and buccal-to-lingual directions across the bonded interface, using a slow-speed diamond saw (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) to obtain resin–dentin bonded sticks with a cross-sectional area of approximately 0.8 mm<sup>2</sup>, as measured with digital calipers (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Tokyo, Japan). The number of sticks showing premature debonding (D) during specimen preparation was recorded for each tooth.

### **Microtensile bond strength**

Resin–dentin bonded sticks were attached to a Geraldeli's jig (16) with cyanoacrylate adhesive and tested under tension (Kratos Dynamometers, Cotia, SP,

Brazil) at 0.5 mm/min, until failure. The  $\mu$ TBS values (MPa) were calculated by dividing the load at failure by the cross-sectional bonding area.

The failure mode of the resin–dentin bonded sticks was classified as cohesive [(C) failure exclusively within the dentin or the resin composite], adhesive/mixed [(A/M) failure at the resin/dentin interface, or failure at the resin/dentin interface with partial cohesive failure of the neighboring substrates]. This classification was performed under a stereomicroscope at 100x magnification (Olympus SZ40, Tokyo, Japan). Specimens with premature failures (PF) were included in the tooth mean for statistical analysis.

### **Nanoleakage Evaluation**

Three bonded sticks from each tooth that were random not used in the microtensile test were evaluated for nanoleakage at each time-point. Ammoniacal silver nitrate was prepared according to the protocol previously described by Tay et al. 2002 (17). The sticks were placed in the ammoniacal silver nitrate solution in the dark for 24 h, rinsed thoroughly in distilled water, and immersed in photo-developing solution for 8 h under a fluorescent light to reduce silver ions to metallic silver grains within spaces along the bonded interface. Specimens were polished with a wet #600, 1000, 1200, 1500, 2000, and 2500-grit SiC paper, and 1- and 0.25 -  $\mu$ m diamond paste (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) using a polishing cloth. They were ultrasonically cleaned, air-dried, mounted on stubs, and coated with carbon-gold (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein). Resin-dentin interfaces were analyzed in a field-emission scanning electron microscope, operated in the backscattered mode (LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK).

Three images of each resin–dentin bonded stick were captured. (18) The percentage of nanofiltration within the adhesive and hybrid layers was measured by the public domain software Image J software program (version 1.42q; NIH, Bethesda, MD). The mean NL of all sticks from the same tooth was averaged for statistical purposes.

### **Morphological analysis of eroded dentin**

For the eroded dentin measurement, two teeth were used. The occlusal third was removed and these teeth were longitudinally sectioned in a buccal-to-lingual direction with a water-cooled low-speed diamond saw (Isomet 1000). After that, each

tooth were transversely sectioned in a buccal-to-lingual direction to obtain two halves (n = 4 specimens). Each specimen was divided according to control group and eroded surface. After cycling model, the surfaces were rinsed off with tap water for 30 seconds, followed by air-drying with an air spray for 5 seconds, keeping the dentin wet.

The specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 for 12 h at 4 °C, rinse with 20 mL of 0.2 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 for 1 h and dehydration in ascending grades of ethanol: 25% (20 min); 50% (20 min); 75% (20 min); 95% (30 min); 100% (60 min) (19).

The specimens were sputter coated with gold/palladium in a vacuum evaporator (SCD 050, Balzers, Schaan, Liechtenstein). The entire surface was examined under a scanning electron microscope (MIRA3 LM, TESCAN ORSAY HOLDING, Warrendale, PA, USA). Three photomicrographs of representative surface areas were taken at 5.000x magnification.

### **Statistical analysis**

The mean  $\mu$ TBS and the percentage of NL of all bonded sticks from the same tooth were averaged for statistical purposes so that the experimental unit in this study was the tooth. The  $\mu$ TBS (MPa) and NL (%) data were subjected to three-way repeated measures ANOVA (dentin surface vs adhesive system vs adhesive strategies) and Tukey's test with a level of significance of 5%.

## **Results**

### **Microtensile bond strength ( $\mu$ TBS)**

Most of the specimens (93 – 100%) showed adhesive/mixed failures (Table 2). In sound dentin, the ER mode resulted in a higher values  $\mu$ TBS than that SE mode. In eroded dentin, no difference in bonding effectiveness was observed among the adhesive strategies ( $p > 0.61$ ; Table 3).

Values of  $\mu$ TBS obtained for eroded dentin were lower than those of sound dentin ( $p < 0.01$ ; Table 3). FBU; PBE and XEN, showed  $\mu$ TBS values reached the lowest ranking of statistical significance among all adhesives for all substrates. ( $p < 0.001$ ; Table 3).



### **Nanoleakage (NL) evaluation**

Illustrative SEM images of bonding interface created for all groups are shown in Figures 1 and 2. In sound dentin, a statistically higher value of NL was observed for PUB and XEN in both adhesive strategies ( $p < 0.002$ ; Table 4).

A statistically increase in the silver nitrate deposition was observed for all adhesive systems in eroded dentin groups when compared to sound dentin ( $p < 0.002$ ; Table 4). PBE; PUB and XEN in both adhesive strategy the highest values of NL ( $p < 0.002$ ; Table 4).

### **Morphological analysis of eroded dentin**

SEM images of the dentin surface are present in the Figure 3. For the control group, irregular smear layer is observed on the dentin surface, with dentinal tubules obliterated. Eroded dentin showed a surface totally clean, the tubules are enlarged with partial loss of peritubular dentin.

### **Discussion**

In the present investigation, higher  $\mu$ TBS values are observed in sound dentin for the universal adhesives when they were used in ER strategies. It is known that the presence of the smear layer imposes a physical barrier against the penetration of resin monomers (20). Phosphoric acid etching promotes the total remove of the smear layer, demineralizes 6 - 9  $\mu$ m of the dentin (21, 22) and increases the impregnation of resin monomers, which leads to the formation of a thick hybrid layer integrated with the dentine (11, 13, 22-24). Thus, improved resin-dentin bond strength is expected compared to SE mode. Usually, SE adhesives result in thinner adhesive layers, which are prone to polymerization inhibition by oxygen (25).

Universal adhesive systems were designed under the "all-in-one" concept of already existing one-step self-etch adhesives, but incorporating the versatility of adapting them to the clinical situation (26, 27), by application under different etching modes. It is noteworthy that, despite of ER mode showed a higher  $\mu$ TBS values to sound dentine, SE and ER mode did not affect significantly their  $\mu$ TBS.

In ED, both adhesive strategies are showed a similar performance. It has been reported that the presence of an area not impregnated in DE due to etching could compromise the bonding to this substrate (4). Furthermore, also has been reported

that SE adhesive provide better adhesion because they reduce the discrepancy between demineralization and infiltration of the monomer in the eroded dentin (4, 9). Nevertheless, when universal adhesive in SE and ER mode were used in eroded dentin in the present study, similar  $\mu$ TBS means was found and our results were according to those of previous studies (10, 28, 29).

It is known that resin-eroded dentin interface is more complex than sound dentin. Eroded dentin exhibit a deeper demineralized layer with zone of dense fibrous collagen network with buffering properties (30). We hypothesized that these collagen fibers with the ability to protect against mineral loss during the process of erosion could also have influenced the performance of the universal adhesives when used in ER mode, obtaining values of bond strength statistically similar to SE mode.

This alteration in DE also justify the lowers  $\mu$ TBS values for this substrate, as well as that higher NL values when compared to sound dentin. Except to PUB, that showed the highest NL means independent of the substrate. PUB is a one aggressive SE adhesive solution, because it has a low pH (pH = 1.2) (12). It has previously been reported that unpolymerized, acidic and aggressive monomers from SE adhesives are able to continue to demineralize the dentine even after polymerization (31, 32). This is probably the result of hydrolysis of the ester bond from the acid monomer that results in a strong phosphoric acid (32) and might explain the intense silver nitrate deposition within the hybrid layer.

Citric acid is a simple, reproducible and inexpensive acid solution frequently used (33). In the present study, the SEM images showed that citric acid promoted more demineralized surface with more enlarged tubule. (Figure 3) Those findings are in agreements with several authors (34-36), since the erosive potential of an acid solution has been associated mainly with pH and acidity, but the pH is considered the principal predictor of erosion potential. Thus, the pH 2.3 of the citric acid together with demineralization time promoted a greater superficial alteration on the dentin, showing the lowest  $\mu$ TBS values for each adhesive system, independent of the adhesive strategy used. Moreover, this major erosive challenge provided a significantly higher value of the silver nitrate deposition in the hybrid layer (Figures 1 and 2).

Although the universal adhesive systems tested shared the same versatility of use, the differences in their compositions and number of steps could be a reason for the different performance of these materials. FBU; PBE and XEN showed the lowest  $\mu$ TBS among all adhesive for the sound and eroded dentin.

According to the manufacturer of the Xeno Select, two acidic monomers are responsible for the interaction of this adhesive with the dentin surface: an “inverse” functionalized phosphoric acid ester and an acryloyl amino alkyl sulfonic acid (37), that initially bond to calcium of hydroxyapatite, but they readily debond. (38, 39) This debonding was recently confirmed by Zhou et al (40). Through attenuated total reflection (ATR) spectroscopy. The authors did not observe any signal of chemical bonding of Xeno V (the predecessor of Xeno Select, that contains the same monomers) monomers to dentin surfaces, indicating low affinity of Xeno V to this substrate (40).

Prime & Bond Elect is an acetone-base and HEMA-free adhesive solution. It has been reported that acetone-based adhesive required a longer evaporation time than that recommended by the manufacturer, (41) because the high acetone content in bonding solutions may be difficult to evaporate, leaving residual solvent in the adhesive resin, which creates pores in the cured adhesive layer. (42)

The manufacturer of Futura Bond describes its functional monomer only as a phosphate monomethacrylate (26). Thus, the absence of MDP in formulation of the XEN, PBE e FBU may be a reasonable speculation for a lower bond strength results.

In general, the presence of the functional monomer 10-MDP in the universal adhesive promoted a significant influence on the microtensile bond strength values measured. These functional monomer forms a stable nanolayer together with a deposition of salts of MDP calcium at the adhesive interface (43), increasing the mechanical strength (43, 44) and protecting against hydrolysis. (45) Thus, it is known that this nanoleayering interact with the substrate into so-called ‘nano-layering’, a process driven by the deposition of 10-MDP-Ca salts with low solubility (43 - 46). Each nano-layering consists of two sublayers of parallel oriented 10-MDP monomers in opposite direction. 10-MDP's methacrylate group is directed inwards, enabling mutual co-polymerization between two opposed monomers. Its functional phosphate

group is directed outwards, capturing Ca released from dentin thanks to the etching effect of 10-MDP and so coupling adjacent nano-layers (47).

The null hypothesis was accepted since both adhesive strategies (ER and SE) resulted in diminished  $\mu$ TBS and NL values in ED when compared to sound dentin. However, studies are still needed to clarify the effect of pH cycling model under resin-eroded dentin interface after long-term function when universal adhesives systems are used.

### **Conclusion**

Considering the  $\mu$ TBS, universal adhesives can be used either in SE or ER modes. Eroded dentin decreased the  $\mu$ TBS and increase the NL of the resin-eroded dentin interface as well as removed totally the smear layer on the dentin surface and produced the major alteration on the surface.

## References

1. Salas MM, Nascimento GG, Huysmans MC, Demarco FF. Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis. *J Dent.* 2015;43(1):42-50.
2. Bartlett DW, Lussi A, West NX, Bouchard P, Sanz M, Bourgeois D. Prevalence of tooth wear on buccal and lingual surfaces and possible risk factors in young European adults. *J Dent.* 2013;41(11):1007-13.
3. Carvalho TS, Colon P, Ganss C, Huysmans MC, Lussi A, Schlueter N, et al. Consensus Report of the European Federation of Conservative Dentistry: Erosive tooth wear diagnosis and management. *Swiss Dent J.* 2016;126(4):342-6.
4. Zimmerli B, De Munck J, Lussi A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Long-term bonding to eroded dentin requires superficial bur preparation. *Clin Oral Investig.* 2012;16(5):1451-61.
5. Prati C, Montebugnoli L, Suppa P, Valdre G, Mongiorgi R. Permeability and morphology of dentin after erosion induced by acidic drinks. *J Periodontol.* 2003;74(4):428-36.
6. Gillam DG, Seo HS, Bulman JS, Newman HN. Perceptions of dentine hypersensitivity in a general practice population. *J Oral Rehabil.* 1999;26(9):710-4.
7. West NX, Sanz M, Lussi A, Bartlett D, Bouchard P, Bourgeois D. Prevalence of dentine hypersensitivity and study of associated factors: a European population-based cross-sectional study. *J Dent.* 2013;41(10):841-51.
8. Reis A, Carrilho M, Breschi L, Loguercio AD. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. *Oper Dent.* 2013;38(4):E1-E25.
9. Oliveira DC, Souza-Junior EJ, Prieto LT, Coppini EK, Maia RR, Paulillo LA. Color stability and polymerization behavior of direct esthetic restorations. *J Esthet Restor Dent.* 2014;26(4):288-95.
10. Cruz JB, Bonini G, Lenzi TL, Imparato JC, Raggio DP. Bonding stability of adhesive systems to eroded dentin. *Braz Oral Res.* 2015;29(1):1-6.
11. Hanabusa M, Mine A, Kuboki T, Momoi Y, Van Ende A, Van Meerbeek B, et al. Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. *J Dent.* 2012;40(6):475-84.
12. Munoz MA, Luque I, Hass V, Reis A, Loguercio AD, Bombarda NH. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent.* 2013;41(5):404-11.
13. Perdigao J, Sezinando A, Monteiro PC. Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. *Am J Dent.* 2012;25(3):153-8.
14. Rosa WL, Piva E, Silva AF. Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2015;43(7):765-76.
15. Flury S, Koch T, Peutzfeldt A, Lussi A, Ganss C. The effect of a tin-containing fluoride mouth rinse on the bond between resin composite and erosively demineralised dentin. *Clin Oral Investig.* 2013;17(1):217-25.

16. Perdigao J, Geraldeli S, Carmo AR, Dutra HR. In vivo influence of residual moisture on microtensile bond strengths of one-bottle adhesives. *J Esthet Restor Dent*. 2002;14(1):31-8.
17. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent*. 2002;30(7-8):371-82.
18. Reis A, Grande RH, Oliveira GM, Lopes GC, Loguercio AD. A 2-year evaluation of moisture on microtensile bond strength and nanoleakage. *Dent Mater*. 2007;23(7):862-70.
19. Kenshima S, Francci C, Reis A, Loguercio AD, Filho LE. Conditioning effect on dentin, resin tags and hybrid layer of different acidity self-etch adhesives applied to thick and thin smear layer. *J Dent*. 2006;34(10):775-83.
20. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent*. 2003;28(3):215-35.
21. Kanca J, 3rd. Resin bonding to wet substrate. II. Bonding to enamel. *Quintessence Int*. 1992;23(9):625-7.
22. Kenshima S, Reis A, Uceda-Gomez N, Tancredo Lde L, Filho LE, Nogueira FN, et al. Effect of smear layer thickness and pH of self-etching adhesive systems on the bond strength and gap formation to dentin. *J Adhes Dent*. 2005;7(2):117-26.
23. Proenca JP, Polido M, Osorio E, Erhardt MC, Aguilera FS, Garcia-Godoy F, et al. Dentin regional bond strength of self-etch and total-etch adhesive systems. *Dent Mater*. 2007;23(12):1542-8.
24. Taschner M, Nato F, Mazzoni A, Frankenberger R, Falconi M, Petschelt A, et al. Influence of preliminary etching on the stability of bonds created by one-step self-etch bonding systems. *Eur J Oral Sci*. 2012;120(3):239-48.
25. Nunes TG, Ceballos L, Osorio R, Toledano M. Spatially resolved photopolymerization kinetics and oxygen inhibition in dental adhesives. *Biomaterials*. 2005;26(14):1809-17.
26. Wagner A, Wendler M, Petschelt A, Belli R, Lohbauer U. Bonding performance of universal adhesives in different etching modes. *J Dent*. 2014;42(7):800-7.
27. Perdigao J, Kose C, Mena-Serrano AP, De Paula EA, Tay LY, Reis A, et al. A new universal simplified adhesive: 18-month clinical evaluation. *Oper Dent*. 2014;39(2):113-27.
28. Forgerini TV, Ribeiro JF, Rocha RO, Soares FZ, Lenzi TL. Role of Etching Mode on Bonding Longevity of a Universal Adhesive to Eroded Dentin. *J Adhes Dent*. 2017;19(1):69-75.
29. Lenzi TL, Soares FZ, Raggio DP, Pereira GK, Rocha RO. Dry-bonding Etch-and-Rinse Strategy Improves Bond Longevity of a Universal Adhesive to Sound and Artificially-induced Caries-affected Primary Dentin. *J Adhes Dent*. 2016;18(6):475-82.
30. Breschi L, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Ellis TH, Stangel I. High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic and citric acid. *Dent Mater*. 2002;18(1):26-35.

31. Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials*. 2005;26(9):1035-42.
32. Wang Y, Spencer P. Continuing etching of an all-in-one adhesive in wet dentin tubules. *J Dent Res*. 2005;84(4):350-4.
33. Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:69-77.
34. Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res*. 1999;33(1):81-7.
35. Murrell S, Marshall TA, Moynihan PJ, Qian F, Wefel JS. Comparison of in vitro erosion potentials between beverages available in the United Kingdom and the United States. *J Dent*. 2010;38(4):284-9.
36. Jensdottir T, Holbrook P, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A. Immediate erosive potential of cola drinks and orange juices. *J Dent Res*. 2006;85(3):226-30.
37. Fact file: XENO®Select. *Tandartspraktijk*. 2014;35(5):50-1.
38. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2011;27(1):17-28.
39. Maeda T, Yamaguchi K, Takamizawa T, Rikuta A, Tsubota K, Ando S, et al. pH changes of self-etching *primers* mixed with powdered dentine. *J Dent*. 2008;36(8):606-10.
40. Zhou L, Wang Y, Yang H, Guo J, Tay FR, Huang C. Effect of chemical interaction on the bonding strengths of self-etching adhesives to deproteinised dentine. *J Dent*. 2015;43(8):973-80.
41. Luque-Martinez IV, Perdigo J, Munoz MA, Sezinando A, Reis A, Loguercio AD. Effects of solvent evaporation time on immediate adhesive properties of universal adhesives to dentin. *Dent Mater*. 2014;30(10):1126-35.
42. Cho BH, Dickens SH. Effects of the acetone content of single solution dentin bonding agents on the adhesive layer thickness and the microtensile bond strength. *Dent Mater*. 2004;20(2):107-15.
43. Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, et al. Self-assembled Nano-layering at the Adhesive interface. *J Dent Res*. 2012;91(4):376-81.
44. Yoshihara K, Yoshida Y, Nagaoka N, Fukegawa D, Hayakawa S, Mine A, et al. Nano-controlled molecular interaction at adhesive interfaces for hard tissue reconstruction. *Acta Biomater*. 2010;6(9):3573-82.
45. Fukegawa D, Hayakawa S, Yoshida Y, Suzuki K, Osaka A, Van Meerbeek B. Chemical interaction of phosphoric acid ester with hydroxyapatite. *J Dent Res*. 2006;85(10):941-4.
46. Yoshihara K, Yoshida Y, Hayakawa S, Nagaoka N, Irie M, Ogawa T, Nanolayering of phosphoric acid ester monomer on enamel and dentin. *Acta Biomater*. 2011;7(8): 3187–95.

47. Yoshihara K , Nagaoka N, Okiharac T, Kuroboshic M, Hayakawad S, Maruoe Y , Nishigawa G, De Munckf J, Yoshida Y, Van Meerbeek B. Functional monomer impurity affects adhesive performance. *Dent Mater.* 2015;31(12):1493-501.



**Table 1.** Adhesive system (Batch number), composition and application mode of the adhesive systems according the manufacturer's instructions.

Adhesive (batch number)	Composition (*)	Application mode (**)	
		Self-etch	Total-etch
All-Bond Universal – Bisco Inc. (1500002859)	HEMA, 10-MDP, Bis-GMA, ethanol, water, initiators.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Apply two separate coats of adhesive, scrubbing the preparation with a microbrush for 10 – 15 s per coat</li> <li>2. Evaporated excess solvent by thoroughly air-drying with an air syringe for at least 10 s; no visible movement of the material was observed. The surface should have a uniform glossy appearance</li> <li>3. Light cured for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup></li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Apply etchant for 15 s</li> <li>2. Rinse thoroughly</li> <li>3. Remove excess water with absorbent pellet or high volume suction for 1 - 2 s</li> <li>4. Apply adhesive as for the self-etch mode</li> </ol>
Ambar Universal - FGM (210415)	Methacrylate monomers (UDMA and 10-MDP), photoinitiators, co-initiators, stabilizers, inert silica nanoparticles and ethanol	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Apply two coats vigorously by rubbing the adhesive for 20 s (10 s each)</li> <li>2. Gently air dried for 10 s to evaporate the solvent</li> <li>3. Light cured for 10 s</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Apply etchant for 15 s</li> <li>2. Rinse thoroughly</li> <li>3. Remove excess water with air</li> <li>4. Apply adhesive as for the self-etch mode</li> </ol>
Clearfil Universal - Kuraray (CR0002)	Bis-GMA, HEMA, ethanol, 10-MDP, hydrophilic aliphatic dimethacrylate, colloidal silica, CQ, silane coupling agent, accelerators, initiators, water	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Apply bond to the entire cavity with a micribrush and rub it in for 10 s</li> <li>2. Dried by blowing mild air for 5 s until the adhesive did not move</li> <li>3. Light cured for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup></li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Apply etchant for 15 s</li> <li>2. Rinse</li> <li>3. Dry</li> <li>4. Apply adhesive as for the self-etch mode</li> </ol>
Futurabond U - Voco (1346518)	HEMA, Bis-GMA, HEDMA, acidic adhesive monomer, urethane dimethacrylate, catalyst, silica nanoparticles, ethanol	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Apply the adhesive to the entire preparation with a microbrush and rub it for 20 s</li> <li>2. Directed a gentle stream of air</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Apply etchant for 15 s</li> <li>2. Rinse for 10 s</li> <li>3. Air dry 2s</li> <li>4. Apply adhesive as for the</li> </ol>

		over the liquid for about 5 sec until it no longer moved and the solvent was evaporated completely 3. Light cured for 10 s at 1200 mW/cm <sup>2</sup>	self-etch mode
One Coat 7 Universal - Coltene (F96836)	Methacrylates including 10-MDP, photoinitiators, ethanol, water	1. Rubbed with a disposable brush for 20 s 2. Dried gently with oil-free compressed air for 5 s 3. Light cured for 10 s at 1200 mW/cm <sup>2</sup>	1. Apply etchant for 15 s 2. Rinse for 10 s 3. Air dry 2s 4. Apply adhesive as for the self-etch mode
Peak Universal Bond– Ultradent (BB7D7)	Bis-GMA, ethyl alcohol, 0.2% chlorhexidine di(acetate), methacrylic acid, HEMA, 7.5% filler	1. Scrub Peak SE Primer into preparation for 20 s and air thin 2. Apply a puddle coat of Peak LC Bond and gently scrub for 10 s 3. Air dry with half pressure for 10 s 3. Light cured for 10 s at 1200 mW/cm <sup>2</sup>	1. Apply etchant for 15s 2. Rinse for 5 s 3. Dry 4. Apply adhesive as for the self-etch mode
Prime&Bond Elect – Dentsply Caulk (130811)	Mono-, di- and trimethacrylate resins; PENTA Diketone; organic phosphine oxide; stabilizers; cetylamine hydrofluoride; acetone; water	1. Apply the adhesive to the entire preparation with a microbrush and rub it in for 20 s. If necessary, rewet the disposable applicator during treatment 2. Direct a gentle stream of air over the liquid for about 5 s until it no longer moves and the solvent has evaporated completely 3. Light-cure for 10 s at 1200 mW/cm <sup>2</sup>	1. Apply etchant for 15 s 2. Rinse thoroughly with water spray 3. Air dry 4. Apply adhesive as for the self-etch mode

Scotchbond Universal - 3MESPE (523652)	10-MDP, dimethacrylate resins, HEMA, methacrylate-modified polyalkenoic acid copolymer, nanofiller, ethanol, water, initiators, silane	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Applied the adhesive to the entire preparation and left undisturbed for 20 sec.</li> <li>2. Directed a gentle stream of air over the liquid for about 5 sec until it no longer moved and the solvent was evaporated completely</li> <li>3. Light cured for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup></li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Apply etchant for 15 s</li> <li>2. Rinse for 10 s</li> <li>3. Air dry 2 s</li> </ol> <p>Apply adhesive as for the self-etch mode</p>
Tetric N-Bond Universal – Ivoclar Vivadent (U42905)	HEMA, 10-MDP, Bis-GMA, MCAP, D3MA, ethanol, water, highly dispersed silicon dioxide and CQ	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Applied one coat of adhesive to the entire preparation with a microbrush and rub it in for 20 s</li> <li>2. Gently air thinned for 5 s</li> <li>3. Light-cured for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup></li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Apply etchant for 10 - 15 s</li> <li>2. Rinse for 10 s</li> <li>3. Air dry 5 s</li> <li>4. Apply adhesive as for the self-etch mode</li> </ol>
Xeno Select – Dentsply DeTrey (1401001210)	Bifunctional acrylates, acidic acrylate, functionalized phosphoric acid ester (ethyl 2-[5-dihydrogen phosphoryl-5,2-dioxapentyl]acrylate), water, tert-butyl alcohol, initiator (canforquinone), co-initiator (DMABN), stabilizer	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Applied generous amount of adhesive to thoroughly wet all surfaces and agitated for 20 s</li> <li>2. Gently dried with clean air for at least 5 sec. Surface should have a uniform, glossy appearance</li> <li>3. Light cured for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup></li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Apply etchant for 10 - 15 s</li> <li>2. Rinse for 10 s</li> <li>3. Air dry 5 s</li> <li>4. Apply adhesive as for the self-etch mode</li> </ol>

(\*) 10-MDP= methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate; Bis-GMA= bisphenol glycidyl methacrylate; MCAP = methacrylated carboxylic acid polymer; CQ = camphorquinone; D3MA = decandiol dimethacrylate; DMABN = 4-(dimethylamino)benzointrile; HEDMA = hexamethylene dimethacrylate; HEMA = 2-hydroxy ethylmethacrylate; PENTA = dipentaerythritol penta acrylate monophosphate; UDMA = urethanedimethacrylate; EBPADMA (ethoxylated bisphenol A-dimethacrylate); TEGDMA (triethylene glycol dimethacrylate),

(\*\*) The intensity of light-photopolymerization was standardized for all materials.

**Table 2.** Number of specimens (%) according to fracture mode.

Adhesive system	Sound dentin						Eroded dentin					
	SE			ER			SE			ER		
	A/M	C	PF	A/M	C	PF	A/M	C	PF	A/M	C	PF
<b>ABU</b>	50(96.1)	2(3.9)	0(0.0)	51(96.2)	2(3.8)	0(0.0)	43(89.5)	0(0.0)	5(10.5)	43(91.5)	3(6.3)	1(2.2)
<b>AMB</b>	56(93.4)	3(3.3)	3(3.3)	56(96.5)	2(3.5)	0(0.0)	42(89.3)	0(0.0)	5(10.7)	42(93.3)	0(0.0)	3(6.7)
<b>CFU</b>	55(100)	0(0.0)	0(0.0)	56(100)	0(0.0)	0(0.0)	43(86.0)	0(0.0)	7(14.0)	44(91.6)	0(0.0)	4(8.4)
<b>FBU</b>	45(90.0)	0(0.0)	5(10.0)	47(94.0)	2(4.0)	1(2.0)	35(83.3)	0(0.0)	7(16.6)	37(84.0)	1(2.2)	6(13.6)
<b>OCU</b>	44(88.0)	3(6.0)	3(6.0)	47(100)	0(0.0)	0(0.0)	35(85.3)	0(0.0)	6(14.6)	39(92.8)	0(0.0)	3(7.2)
<b>PUB</b>	48(100)	0(0.0)	0(0.0)	47(97.0)	2(3.0)	0(0.0)	43(97.7)	0(0.0)	1(2.3)	44(97.7)	0(0.0)	1(2.3)
<b>PBE</b>	39(92.8)	0(0.0)	3(7.2)	42(100)	0(0.0)	0(0.0)	33(86.8)	0(0.0)	5(13.1)	30(83.3)	0(0.0)	6(16.7)
<b>SBU</b>	55(100)	0(0.0)	0(0.0)	55(96.5)	0(0.0)	2(3.5)	47(90.4)	0(0.0)	5(9.6)	48(94.1)	1(1.9)	2(4.0)
<b>TEU</b>	57(100)	0(0.0)	0(0.0)	58(100)	0(0.0)	0(0.0)	49(94.2)	0(0.0)	3(5.8)	49(92.4)	2(3.8)	2(3.8)
<b>XEN</b>	40(93.0)	0(0.0)	3(7.0)	40(95.2)	0(0.0)	2(4.8)	32(82.0)	0(0.0)	7(18.0)	33(84.6)	0(0.0)	6(15.4)

Abbreviations: A/M: adhesive/mixed fracture mode; C: cohesive fracture mode; PF: premature failures

**Table 3.** Means  $\pm$  standard deviations of microtensile bond strength ( $\mu$ TBS) of universal adhesives bonded to different substrates (\*).

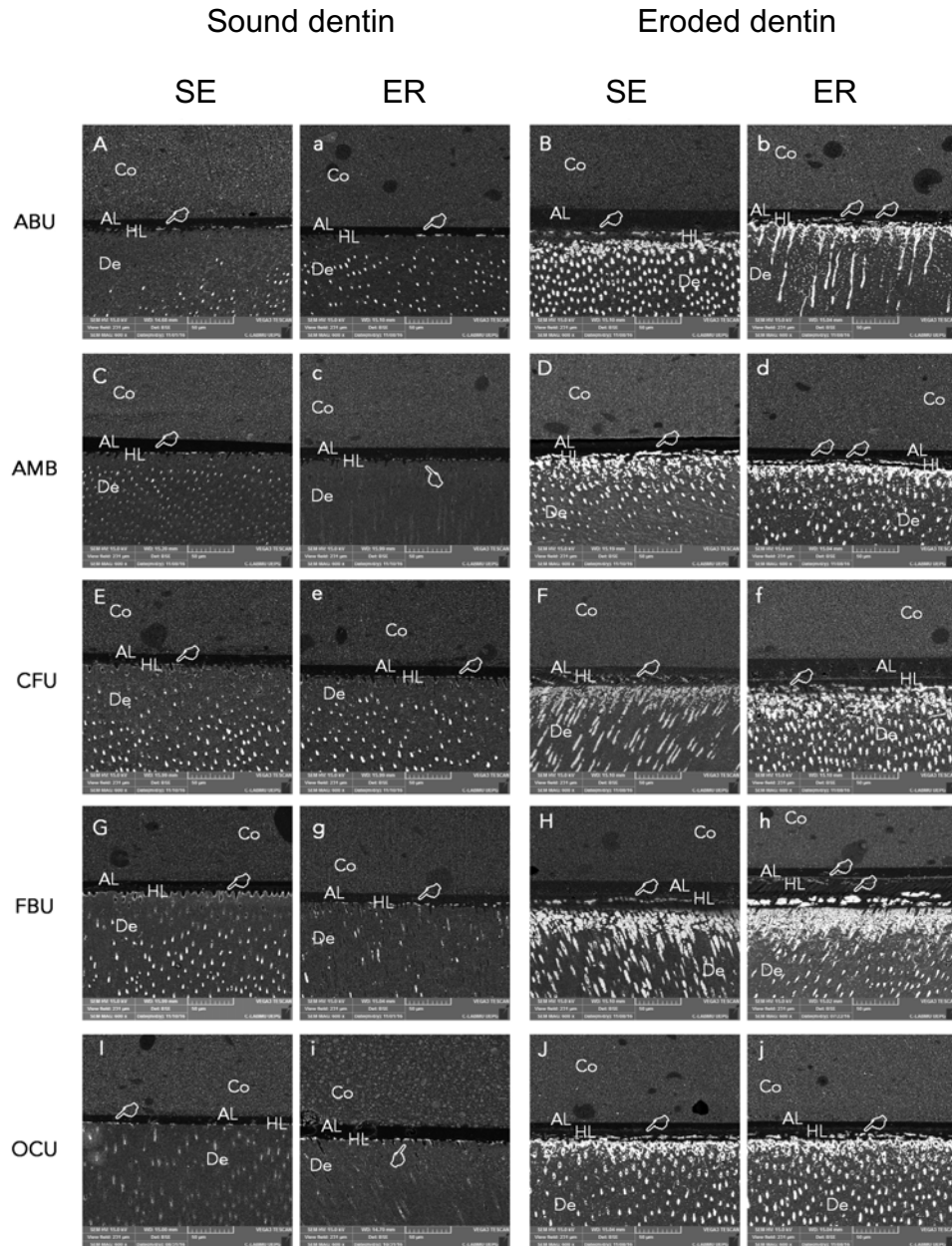
Adhesive system	Sound dentin		Eroded dentin	
	SE	ER	SE	ER
<b>ABU</b>	36.0 $\pm$ 4.9 C,D	39.6 $\pm$ 4.6 C	21.1 $\pm$ 5.1 F	18.9 $\pm$ 4.6 F
<b>AMB</b>	54.2 $\pm$ 5.3 A,B	55.7 $\pm$ 4.1 A,B	18.5 $\pm$ 3.3 F	19.5 $\pm$ 3.9 F
<b>CFU</b>	49.5 $\pm$ 5.4 B	56.6 $\pm$ 4.9 A,B	19.9 $\pm$ 3.0 F	21.7 $\pm$ 4.2 F
<b>FBU</b>	24.9 $\pm$ 3.9 E	32.2 $\pm$ 3.4 D	15.3 $\pm$ 2.5 G	16.8 $\pm$ 3.8 F,G
<b>OCU</b>	36.9 $\pm$ 4.5 C,D	40.3 $\pm$ 4.7 C	18.6 $\pm$ 3.3 F	21.9 $\pm$ 4.6 F
<b>PUB</b>	38.8 $\pm$ 4.8 C	42.9 $\pm$ 4.3 C	23.5 $\pm$ 3.8 E,F	24.6 $\pm$ 4.1 E
<b>PBE</b>	29.2 $\pm$ 3.7 D	30.5 $\pm$ 3.9 D	15.1 $\pm$ 3.4 G	15.8 $\pm$ 3.6 G
<b>SBU</b>	49.1 $\pm$ 5.3 B	54.9 $\pm$ 4.9 A,B	19.5 $\pm$ 4.7 F	21.2 $\pm$ 4.9 F
<b>TEU</b>	55.1 $\pm$ 5.2 A,B	58.0 $\pm$ 5.5 A	22.1 $\pm$ 4.4 E,F	22.2 $\pm$ 4.7 E,F
<b>XEN</b>	28.6 $\pm$ 2.9 D,E	32.5 $\pm$ 5.1 D	13.2 $\pm$ 4.3 G	15.1 $\pm$ 3.8 G

(\*) Different letters indicate means statistically different (Three-way ANOVA and Tukey test;  $p < 0.05$ ).

**Table 4.** Means  $\pm$  standard deviations of nanoleakage(NL) of universal adhesives bonded to different substrates (\*).

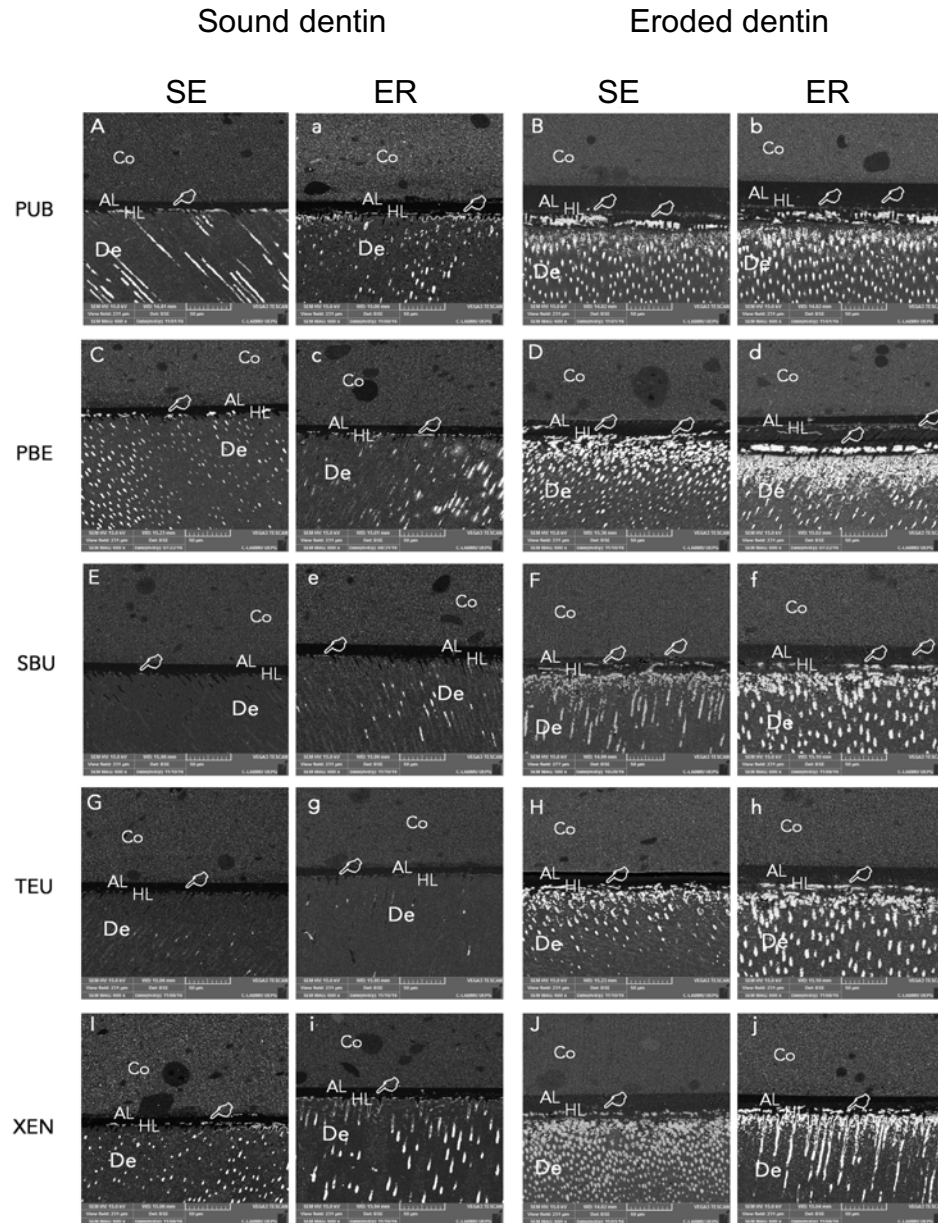
Adhesive system	Sound dentin		Eroded dentin	
	SE	ER	SE	ER
<b>ABU</b>	5.1 $\pm$ 1.0 A	6.6 $\pm$ 1.2 A	29.7 $\pm$ 2.5 E,F	32.2 $\pm$ 1.8 F
<b>AMB</b>	6.2 $\pm$ 1.0 A	6.1 $\pm$ 1.4 A	28.7 $\pm$ 1.4 E	26.9 $\pm$ 1.4 E
<b>CFU</b>	7.1 $\pm$ 1.2 A,B	8.0 $\pm$ 0.9 B	28.6 $\pm$ 2.9 E,F	32.9 $\pm$ 1.7 F
<b>FBU</b>	9.6 $\pm$ 1.8 B	7.8 $\pm$ 1.1 A,B	35.6 $\pm$ 1.8 G	39.0 $\pm$ 1.9 G
<b>OCU</b>	6.5 $\pm$ 1.5 A	7.1 $\pm$ 2.0 A,B	29.8 $\pm$ 1.7 E,F	32.4 $\pm$ 1.7 F
<b>PUB</b>	11.9 $\pm$ 1.3 C	18.0 $\pm$ 1.6 D	35.6 $\pm$ 1.1 F,G	34.2 $\pm$ 1.2 F,G
<b>PBE</b>	10.0 $\pm$ 1.2 B,C	7.9 $\pm$ 1.3 A,B	36.5 $\pm$ 1.4 G	35.6 $\pm$ 1.2 G
<b>SBU</b>	5.1 $\pm$ 1.1 A	6.9 $\pm$ 1.5 A	28.1 $\pm$ 1.8 E,F	31.5 $\pm$ 2.3 F
<b>TEU</b>	6.6 $\pm$ 2.0 A	9.3 $\pm$ 1.9 B,C	28.0 $\pm$ 3.3 E,F	33.1 $\pm$ 2.3 F
<b>XEN</b>	11.0 $\pm$ 1.6 C	12.3 $\pm$ 1.4 C	39.1 $\pm$ 1.4 G	41.9 $\pm$ 2.1 H

(\*) Different letters indicate means statistically different (Three-way ANOVA and Tukey test;  $p < 0.05$ ).



**Figure 1.** Representative back-scattered SEM images of the resin-eroded dentin interfaces for the All-Bond Universal (ABU); Ambar Universal (AMB); Clearfil Universal (CFU); Futurabond U (FBU); One Coat 7 Universal (OCU). A low and discontinuous silver deposits can be seen in the hybrid layer of the sound dentin (white pointer). For eroded dentin the amount of nanoleakage was higher than sound dentin for all adhesive systems (white pointer), independent of the adhesive strategy used and the increase silver nitrate deposition was mainly observed at the bottom of the hybrid layer (white point) for all adhesives. Original Magnification: 600x.

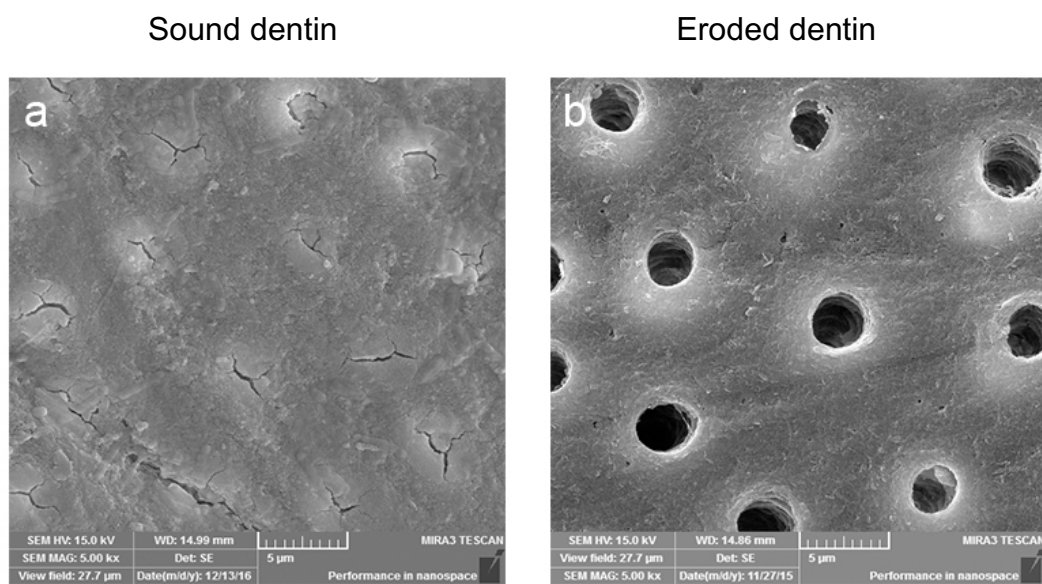
(Co = composite resin; AL = adhesive layer; HL = hybrid layer; De = dentin).



**Figure 2.** Representative back-scattered SEM images of the resin-eroded dentin interfaces for the Peak Universal Bond (PUB); Prime&Bond Elect (PBE); Scotchbond Universal Adhesive (SBU); Tetric N-Bond Universal (TEU); Xeno Select (XEN). Isolated spots of silver grains (hand pointers) were observed within the hybrid layer for the adhesives when applied in sound dentin, independent of the adhesive strategy used. The silver uptakes increased and spotted silver gains within the hybrid layer were observed for all adhesives when applied in eroded dentin (hand pointers). Original Magnification: 600x.

(Co = composite resin; AL = adhesive layer; HL = hybrid layer; De = dentin)





**Figure 3.** Representative morphology of sound dentin and eroded dentin treated with citric acid. In sound dentin, irregular smear layer is observed on the dentin surface, with dentinal tubules obliterated. Eroded dentin removed totally the smear layer and showed more enlarged tubules. Original Magnification: 5000x.

# Artigo 2

## **The use of collagen cross-linker primers as an alternative to improve the eroded dentin-bonding**

**Objective:** To investigate the effect of collagen cross-link primers on the resin-eroded dentin bond strength ( $\mu$ TBS), nanoleakage (NL) and the degree of conversion (DC) within the hybrid layer.

**Methods:** The eroded dentin surfaces (citric acid and soft drink) of ninety human molars were acid-etched and treated with primers containing: 6.5 wt% proanthocyanidin, or UVA-activated 0.1 wt% riboflavin. Following, dentin was bonded with Prime & Bond Elect, Scotchbond Bond Universal and Tetric N-Bond Universal; and restored with composite resin. The samples were sectioned into resin-dentin “sticks” and tested for  $\mu$ TBS. Bonded sticks from each tooth were used to evaluate NL and DC under micro-Raman spectroscopy. Two human molars were used for surface characterization under a scanning electron microscopy. Data from tests were submitted to appropriate statistical analysis ( $\alpha = 0.05$ ).

**Results:** Eroded dentin with citric acid resulted in a significant reduction in  $\mu$ TBS for each adhesive system ( $p < 0.001$ ). The incorporation of cross-linker primers into the eroded-dentin bonding protocol improve the immediate  $\mu$ TBS ( $p > 0.33$ ) and reduced significantly the NL ( $p < 0.004$ ) for all adhesive systems tested. Proanthocyanidin primer and riboflavin primer yielded similar bond strength means ( $p > 0.45$ ). The incorporation of cross-linker primers into the eroded-dentin bonding protocol improve the DC ( $p < 0.03$ ).

**Conclusion:** The use of collagen cross-linking agents improved the  $\mu$ TBS values and produced a significantly reduction of the NL without jeopardizing the adhesive polymerization in the resin-eroded dentin interface.

**Keywords:** Proanthocyanidin, Riboflavin, Tensile strength, Dentin Leakage, Spectrum Analysis Raman.

## INTRODUCTION

The dental erosion, process results in loss of mineral component from tooth structure driven by a chronic chemical removal without bacterial involvement (1, 2). Although this process involves typically the enamel surface, in severe cases, there is dentin exposure (3), releasing mineral from peritubular/intertubular dentin (4, 5). This results in a dentin tissue completely the demineralized, with the denatured collagen matrix exposed and widened tubules (1, 6). In fact, the effects of this process brings consequences such as tooth sensitivity and poor aesthetics, which requires restorative treatment for rehabilitation (1, 3).

Due to the severe modifications in dentin exposed to the erosive process, the bonding procedure, fundamental step for the success of the restorative treatment, can be compromised (7, 8). The erosives cycles leads to demineralization and exposes the dentin organic matrix, also have potential to lead to the activation and functional activity of host-derived proteases (from either saliva or dentin) (9). Along with the proteases activation, the degradation of organic matrix increases the rate of erosion progression (10, 11). In fact, it was previously demonstrated that the role of host-derived proteases on the degradation process of resin-dentin interfaces (12-14) along with the interplaying between these collagenolytic enzymes might govern the fate of the dentin organic matrix during erosive demineralization (9). So, alternatives to achieve this process, acting on collagen matrix degradation as well the activity of collagenolytic enzymes are fundamental and could benefit the erosive process reduction.

In light of this, the use of specific inhibitors of collagenolytic enzymes was investigated to reduce the further mineral loss such as the chlorhexidine and epigallocatechin gallate from green tea (15, 16). These substances were used as topic agents in rinse solutions or gels as the preventive strategies to reduce the erosive dentin demineralization (17, 18). However, these agents might be rinsed immediately after each erosive challenge, what is not practical for clinical application. Furthermore, due to dental tissue loss from the erosive process, several times the immediate restorative treatment is needed, requiring alternatives to improve the properties of the collagen organic matrix eroded dentin and synergistically reducing the enzymatic degradation. Although the chlorhexidine was previously investigated in bonding procedures, (19) this agent is not able to stablish chemical bond to the

collagen fibrils, and it is slowly leached out from dentin-bonding interfaces over time (20).

So, including these cross-linking agents into the bonding procedure on eroded dentin seems a rational alternative, since they are able to establish chemical bonds, improving the properties of collagen fibrils. Consequently, it may be important to define compartments within the tissue that become impregnated with minerals (21, 22) reducing the erosive process, and also, reducing the enzymatic activity within the dentin bonding interfaces (23-25). Thus, the aim of this study was to investigate the role of collagen cross-linking agents on eroded dentin (acid citric or soft drink) bonding properties, specifically the resin-dentin bond strength, nanoleakage, degree of conversion within the hybrid layer using different adhesive systems on etch-and-rinse mode and two *in vitro* erosion protocols. The null hypothesis of this study was that the use of collagen cross-linking agents doesn't affect the eroded dentin-bonding properties.

## **MATERIALS & METHODS**

### **Selection and Preparation of Teeth**

Ninety-two extracted, caries-free human molars were used. The Ethics Committee of the local university approved this research project (protocol number 1.652.555). The teeth were disinfected in 0.5% chloramine, stored in distilled water, and used within 6 months after extraction.

The teeth were sectioned parallel to the occlusal surface using a low-speed diamond saw (Isomet; Buehler, Evanston, IL, USA), under water cooling, to expose the mid-coronal dentin. All specimens had a smear layer standardized by polishing the flat dentin surface with 600-grit SiC paper under water for 60 s.

### **Experimental Design**

The teeth were then randomly assigned to eighteen groups (n = 90 dentin specimens to  $\mu$ TBS, NL, *in-situ* degree conversion) based on the combination of the main variables, i.e., (1) dentin eroded surface: eroded dentin with soft-drink (Coca-cola, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and eroded dentin with citric acid pH 2.3; (2) three etch-and-rinse adhesive system: (Prime&Bond Elect - PBE (Dentsply Culk, Milford, DE, USA); Scotchbond Universal Adhesive - SBU (3M ESPE, St. Paul, MN, USA, also known as Single Bond Universal in some countries); Tetric N-Bond Universal -

TEU (Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) and (3) collagen cross-linking primers: eroded dentin without collagen cross-linking treatment (ED); 6.5 wt% proanthocyanidin (ED + PA primer); light cure 0.1 wt% riboflavin (ED + Ri primer)

The composition, application mode, and batch numbers are described in Table 1.

### **pH cycling model**

For erosive demineralization with soft drink, the specimens were submitted to an erosive demineralization by immersion in a soft drink (Coca-Cola, pH  $\approx$  2.7 Brazil) four times daily for 90 s each, for 5 days (26, 27).

For erosive demineralization with citric acid, the specimens were subjected to a cyclic demineralization and remineralization procedure over a total of 10 days (5 days/week; 2 weeks). Molars were erosive demineralised with 0.05 M citric acid solution (pH 2.3, anhydrous citric acid) six times per day for 5 min (28).

For both erosive cycling, after each demineralization challenge, the specimens were rinsed with deionized water (10 s) and immersed in a remineralized solution for 60 min. (4.08 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 20.10 mM KCl, 11.90 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, and 1.98 mM CaCl<sub>2</sub> with a pH of 6.7) (28). The pH of the solutions was monitored periodically with the aid of a pH meter and between each cycle the solutions were renewed.

### **Restorative Procedures**

All step-by-step bonding procedures for all groups are described in Table 1. After erosive demineralization, the dentin of all teeth was etched for 15 s with 35% phosphoric acid gel (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil), rinsed with water (15s), air-dried (5 s) and kept slightly moist. The eroded acid-etched dentin surfaces were primed according to the experimental groups. For the riboflavin (RB), the dentin surfaces were further exposed to LED light-curing unit set at 1200 mW/cm<sup>2</sup> (Radii, SDI; Bayswater, Victoria, Australia), (29, 30) and air dried. The adhesive systems were applied according to the manufacturers instructions and composite resin buildups (Opallis, FGM, Joinville, Brazil) were constructed incrementally (three increments of 1.5-mm each) and individually light activated for 40 s each time, using a LED light-curing unit set at 1200 mW/cm<sup>2</sup> (Radii, SDI; Bayswater, Victoria, Australia). A single operator carried out all bonding procedures.

After storage in distilled water at 37 °C for 24 h, the specimens were sectioned longitudinally in the mesio-to-distal and buccal-to-lingual directions across the bonded interface, using a slow-speed diamond saw (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) to obtain resin–dentin bonded sticks with a cross-sectional area of approximately 0.8 mm<sup>2</sup>, as measured with digital calipers (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Tokyo, Japan). The number of sticks showing premature debonding (D) during specimen preparation was recorded for each tooth.

### **Microtensile bond strength (μTBS)**

Resin–dentin bonded sticks were attached to a Geraldini's jig (31) with cyanoacrylate adhesive and tested under tension (Kratos Dinamometros, Cotia, SP, Brazil) at 0.5 mm/min, until failure. The μTBS values (MPa) were calculated by dividing the load at failure by the cross-sectional bonding area.

The failure mode of the resin–dentin bonded sticks was classified as cohesive ([C] failure exclusively within the dentin or the resin composite), adhesive ([A/M] failure at the resin/dentin interface or with partial cohesive failure of the neighboring substrates). This classification was performed under a stereomicroscope at 100X magnification (Olympus SZ40, Tokyo, Japan). Specimens with premature failures (PF) were included in the tooth mean for statistical analysis.

### **Nanoleakage Evaluation (NL)**

Three bonded sticks from each tooth that were not used in the microtensile test were evaluated for nanoleakage at each time-point. Ammoniacal silver nitrate was prepared according to the protocol previously described by Tay et al (32). The sticks were placed in the ammoniacal silver nitrate solution in the dark for 24 h, rinsed thoroughly in distilled water, and immersed in photo-developing solution for 8 h under a fluorescent light to reduce silver ions to metallic silver grains within spaces along the bonded interface. Specimens were polished with a wet #600, 1000, 1200, 1500, 2000, and 2500-grit SiC paper, and 1- and 0.25-mm diamond paste (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) using a polishing cloth. They were ultrasonically cleaned, air-dried, mounted on stubs, and coated with carbon-gold (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein). Resin–dentin interfaces were analyzed in a field-emission scanning electron microscope, operated in the backscattered mode (VEGA 3 TESCAN, Shimadzu, Tokyo, Japan).

Three images of each resin–dentin bonded stick were captured (33). The percentage of nanofiltration within the adhesive and hybrid layers was measured by the specific public domain software Image J software program (version 1.42q; NIH, Bethesda, MD) (34).

### ***In situ* degree of conversion (DC) within adhesive/hybrid layers**

Two resin–dentin sticks were randomly selected to evaluate the DC immediately after sectioning. The sticks were wet polished using 1500- and 2000-grit SiC paper. The specimens were ultrasonically cleaned for 10 min and positioned into micro-Raman equipment (XploRA ONE™ Raman microscope, HORIBA Scientific, New Jersey, NY, USA), which was first calibrated for zero and then for coefficient values using a silicon sample. The samples were analyzed using a 785-nm diode laser through a X100/0.9 NA air objective. The Raman signal was acquired using a 600-lines/mm grating centered between 500 and 1800  $\text{cm}^{-1}$ , and the employed parameters were 100mW, the spatial resolution of 3  $\mu\text{m}$ , spectral resolution 5  $\text{cm}^{-1}$ , the accumulation time of 30 s with 5 co-additions. Spectra were obtained at the dentin-adhesive interface, at three random sites (per bonded stick) within the hybrid layer, in intertubular-infiltrated dentin. Spectra of uncured adhesives were taken as references. The ratio of double-bond content of monomer to polymer in the adhesive was calculated according to the following formula:  $\text{DC} (\%) = (1 - [R_{\text{cured}}/R_{\text{uncured}}]) \times 100$ , where 'R' is the ratio of aliphatic and aromatic peak intensities at 1639  $\text{cm}^{-1}$  and 1609  $\text{cm}^{-1}$  in cured and uncured adhesives.

### **Morphological analysis of erosion dentin**

For the dentin-eroded measurement, two teeth were used. The occlusal surface was removed and these teeth were longitudinally sectioned in a buccal-to-lingual direction with a water-cooled low-speed diamond saw (Isomet 1000). After that, each tooth were transversely sectioned in a buccal-to-lingual direction to obtain two halves for (n = 4 specimens). Each specimen was divided according to eroded dentin with soft drink or eroded surface with acid citric. After cycling model, the surfaces were rinsed off with tap water for 30 seconds, followed by air-drying with an air spray for 5 seconds, keeping the dentin wet.

The specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 for 12 h at 4 °C, rinse with 20 mL of 0.2 M sodium cacodylate buffer



at pH 7.4 for 1 h and dehydration in ascending grades of ethanol: 25% (20 min); 50% (20 min); 75% (20 min); 95% (30 min); 100% (60 min) (19).

The specimens were sputter coated with gold/palladium in a vacuum evaporator (SCD 050, Balzers, Schaan, Liechtenstein). The entire surface was examined under a scanning electron microscope (MIRA3 LM, TESCAN ORSAY HOLDING, Warrendale, PA, USA). Three photomicrographs of representative surface areas were taken at 5.000X magnification.

### **Statistical analysis**

The mean  $\mu$ TBS and the percentage of NL of all bonded sticks from the same tooth were averaged for statistical purposes so that the experimental unit in this study was the tooth. The  $\mu$ TBS (MPa); NL (%) and DC (%) data were subjected to three-way repeated measures ANOVA (dentin eroded surface vs adhesive system vs. collagen cross-linking primers) and Tukey's test with a level of significance of 5%.

## **Results**

### **Microtensile bond strength**

Most of the specimens showed adhesive/mixed failures (90.7 – 100%) Table 2. Few pre-test and cohesive failures were observed. In general, eroded dentin with citric acid resulted in a significantly reduction  $\mu$ TBS values when compared with eroded dentin with soft-drink for each adhesive system ( $p < 0.001$ ; Table 3). Independent of the pH cycling model used, the incorporation of cross-linkers primer into the eroded-dentin bonding protocol maintained or improve statistically the immediate  $\mu$ TBS values for all adhesive systems tested ( $p > 0.33$ ; Table 3). Proanthocyanidin primer and riboflavin primer yielded similar bond strength means ( $p > 0.45$ ; Table 3). The used of TEU and SBU resulted in statistically significantly higher mean  $\mu$ TBS than that PBE for each erosive pH-cycling ( $p < 0.01$ ). Except for the dentin group eroded with citric acid.

### **Nanoleakage (NL) evaluation**

None of the conditions exhibited a nanoleakage-free interface (Figure 1). Statistically significant differences in NL values were observed for both pH cycling model approaches ( $p < 0.001$ ; Table 4). Eroded dentin groups with citric acid, in general, resulted in a significant increase in the silver nitrate deposition ( $p < 0.001$ ;

Table 4). The inclusion of the cross-linker primer into the eroded bonding protocol reduced significantly the NL values ( $p < 0.004$ ; Table 4).

Independent of the pH cycling model, the used cross-linkers primer showed no significant difference between them ( $p > 0.55$ ; Table 4). The highest NL values were observed using PBE adhesive system.

### **Degree of conversion (DC)**

The incorporation of cross-linkers primer into the eroded-dentin bonding protocol improves the DC values for two of the three adhesive systems tested ( $p < 0.03$ ; Table 4). PBE showed the lower statistically significantly DC values in eroded dentin, even when the cross-linkers *primers* were used ( $p < 0.01$ ; Table 5).

### **Morphological analysis of eroded dentin**

SEM images of the dentin surface are present in the Figure 3. For the soft drink group, irregular smear layer is observed on the dentin surface, with partial dentinal tubules obliterated and the surface is more rough. Eroded dentin showed a surface totally clean, the tubules more enlarged with lost partial of peritubular dentin.

### **Discussion**

Due to the different erosive protocols found in the literature, we chose to use two simple, inexpensive and reproducible erosive solution, but with different pH, composition and duration of the erosive challenge. These differences on the erosive challenges used resulted in a decrease in the  $\mu$ TBS means and increase of the NL produced by citric acid when compared to soft drink.

Soft-drink is a simple acid solution with a more realistic erosive challenge but may have variations between batches, besides it contains sugars, gums, polyphenols and phosphoric acid (35). Due to the presence of phosphoric acid in its composition, a greater mineral dissolution of the dentin was expected, but the low concentration of this acid in the refrigerant (about 0.1%) (36), can explain the lowest change in the surface of the eroded dentine (Figure 3). On the other hand, citric acid is a simple, reproducible and inexpensive acid solution frequently used. Citric acid contains three carboxyl groups and  $H^+$  ions that interact with the substrate and produce mineral dissolution (37, 38).

Although these two substances are frequently used to produce erosive

changes, citric acid presented greater erosive power. This fact could be explained by the composition of the erosive solution. The solution of citric acid does not present other components in its composition (39), whereas soft-drink presents others components that could interfere in its erosive power, reducing the mineral loss. Furthermore, the pH of the acid solution plays an important role within the erosive challenge. It is known that pH of the acid solution is the principal predictor of the erosive demineralization (40) which increases the rate of erosion progression.

With an increase in the erosion progression, more exposure of the collagen fibrils on the superficial layer is observed (9), hindering the correct infiltration of the resin monomers into the underlying dentin, which compromises the quality of bonding (41, 42). Thus, we hypothesized that the lowest pH associated with the exposure time to the citric acid solution would promote a major rate of demineralization with an increase of the denatured collagen fibrils, compromising the good performance of the adhesive systems. These discrepancies into infiltration-demineralization can also be observed by the increase of the deposition of silver nitrate on the hybrid layer independent of the adhesive system used for the eroded dentin with citric acid. (Figure 1)

The acidity promoted by the erosive pH cycling may anticipate or potentiate the proteolytic activity on eroded dentin (9, 17). It is known that MMPs become activated at a low pH and that their degrading activity is enhanced by the subsequent neutralization of the pH (14) Furthermore, the repeatedly low pH that causes by the demineralization may activate the cysteine cathepsins (9).

So, including these cross-linking agents into the bonding procedure on eroded dentin was a rational idea, since the proanthocyanidins and riboflavin are proteases-inhibiting therapeutic primers (43), with the capacity to improve the biomechanical properties of collagen fibrils (44, 45), contributing to the establishment of a more stable hybrid layer. This is in agreement with our findings since the proanthocyanidins and riboflavin primers improved the  $\mu$ TBS values, maintained or improved the degree of conversion and decreased NL. This leads to the partial rejection of hypotheses null.

Proanthocyanidins are natural polyphenolic compounds that are widely used as food supplements. They have free-radical scavenging capacity, high affinity to protein and antioxidant potential, besides enhancing the mechanical properties of the

dentin collagen (46, 47) through different interactions mechanisms: covalent interaction, ionic interaction, hydrogen bonding interaction or hydrophobic interactions (48-50). Proline-rich proteins like collagen have an extremely high affinity to proanthocyanidin (51), forming a Proline-proanthocyanidin complex. This interaction primarily occurs through hydrogen bonding between the protein amide carbonyl group of the collagen and the phenolic hydroxyl group of the cross-linking agent (52).

Thus, the increased amount of the collagen fibrils exposed by erosion challenge with improved mechanical properties after application of the proanthocyanidin primer could justify the increase in  $\mu$ TBS values.

Riboflavin (vitamin B2) has also been tested as sound dentin cross-linking agent in conjunction with ultraviolet light type A (UVA) or dental light with good success (24, 30). It was been show the effective MMP inhibition and stabilization of the adhesive interfaces (24), as well as increased mechanical properties, stability, and resistance to dentin collagen degradation (53) by the principle of photo-oxidative cross-linking. The UVA radiation causes the release of reactive oxygen species that can induce the formation of covalent cross-links through oxidation (54). The reactive oxygen species can induce the formation of new covalent and strong cross-linking within collagen (54). This occurs through the binding of the functional hydroxyl groups in riboflavin to proline and/or lysine in the collagen (55).

It is known that during the erosive challenge, the demineralization is accompanied by the significant loss of mineral and loss of collagen periodicity (56), similar to that caries (14). The loss of collagen periodicity in demineralized dentin may be attributable to the telopeptidase activity of endogenous or salivary MMPs and/or cysteine cathepsins (9). It is expected that these spaces produced by the loss mineral and collagen periodicity in eroded dentin will be occupied by water. Thus, the cross-linking agents change the water tissue dynamic, displacing this water during collagen cross-linking application. The removal of the proteoglycans tightly bound to collagen fibrils (especially the proanthocyanidin), favors the resin diffusion (57), within interfibrillar spaces as well as increases the accessibility to the collagen fibrils (46). This process allows the creation of an allowing the adequate infiltration zone between dentin and resin, as observed by the significant decrease of NL for all adhesive systems and increased of the degree conversion values for two of the three adhesive systems used.

Although the application of the collagen cross-linking primer improved the bonding properties of the SBU and TEU in eroded dentin, PBE acetone/HEMA-free adhesive solution didn't show the same performance than that other two adhesive systems.

Despite that acetone has a higher vapor pressure than ethanol and water (58), 53 theoretically, resulting in a better evaporation of water due to the "azeotrope effect" (59) or "water-chasing effect" (60) of acetone, PBE requires a longer evaporation time than that recommended by the respective manufacturer (61). Therefore, the rapid acetone evaporation increases the concentration of monomers in the adhesives (62) which lowers the vapor pressure of the remaining residual solvents, especially water, making it more difficult to evaporate residual water (62, 63).

Indeed, Cho and Dicknes (64) showed that a high acetone content in bonding solutions may be difficult to evaporate, leaving residual solvent in the adhesive resin, which results in pores in the cured adhesive layer. Furthermore, HEMA-free solution did not form a uniform thickness adhesive layer by a consequence of very rapidly acetone evaporation (65), therefore not allowing enough time for the monomers to infiltrate adequately dentin. This may explain the differential performance of PBE when compared to SBU and TEU. PBE it's an only acetone-based adhesive used in the present study.

## **Conclusion**

The use of collagen cross-linking agents improved the  $\mu$ TBS values, produced a significant reduction of the NL and maintained or improved the degree of conversion of the eroded-dentin bonding.

## References

1. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res.* 2011;45(1):2-12.
2. Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2 ( Pt 2)):151-5.
3. Jaeggi T, Gruninger A, Lussi A. Restorative therapy of erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:200-14.
4. Murakami C, Oliveira LB, Sheiham A, Nahas Pires Correa MS, Haddad AE, Bonecker M. Risk indicators for erosive tooth wear in Brazilian preschool children. *Caries Res.* 2011;45(2):121-9.
5. Dugmore CR, Rock WP. The prevalence of tooth erosion in 12-year-old children. *Br Dent J.* 2004;196(5):279-82; discussion 3.
6. Meurman JH, Drysdale T, Frank RM. Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent Res.* 1991;99(6):457-62.
7. Zimmerli B, De Munck J, Lussi A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Long-term bonding to eroded dentin requires superficial bur preparation. *Clin Oral Investig.* 2012;16(5):1451-61.
8. Cruz JB LT, Tedesco TK, Guglielmi Cde A, Raggio DP. Eroded dentin does not jeopardize the bond strength of adhesive restorative materials. *Braz Oral Res.* 2012;26(4):306 - 12.
9. Tjaderhane L, Buzalaf MA, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'. *Caries Res.* 2015;49(3):193-208.
10. Ganss C, Klimek J, Schaffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2001;35(5):325-30.
11. Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Niehof J, Ten Cate JM. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *J Dent Res.* 1994;73(9):1523-9.
12. Liu Y, Tjaderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res.* 2011;90(8):953-68.
13. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004;83(3):216-21.
14. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998;77(8):1622-9.
15. Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res.* 2012;24(2):72-6.

16. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhaes AC, Pereira JC, et al. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J Dent Res*. 2012;91(12):1119-23.
17. Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent*. 2009;37(12):994-8.
18. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res*. 2010;89(5):468-72.
19. Francisconi-dos-Rios LF, Casas-Apayco LC, Calabria MP, Francisconi PA, Borges AF, Wang L. Role of chlorhexidine in bond strength to artificially eroded dentin over time. *J Adhes Dent*. 2015;17(2):133-9.
20. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci*. 2010;118(4):411-6.
21. Butler WT. Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res*. 1995;33(1-3):59-65.
22. Cheng P, Li D, Boruvka L, Rotenberg Y, Neumann AW. Automation of axisymmetric drop shape analysis for measurements of interfacial tensions and contact angles. *Colloids and Surfaces*. 1990;43:151-67.
23. Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;94(1):250-5.
24. Cova A, Breschi L, Nato F, Ruggeri A, Jr., Carrilho M, Tjaderhane L, et al. Effect of UVA-activated riboflavin on dentin bonding. *J Dent Res*. 2011;90(12):1439-45.
25. Hass V, Luque-Martinez IV, Gutierrez MF, Moreira CG, Gotti VB, Feitosa VP, et al. Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dent Mater*. 2016;32(6):732-41.
26. Zarella BL, Cardoso CA, Pela VT, Kato MT, Tjaderhane L, Buzalaf MA. The role of matrix metalloproteinases and cysteine-cathepsins on the progression of dentine erosion. *Arch Oral Biol*. 2015;60(9):1340-5.
27. Magalhaes AC, Levy FM, Souza BM, Cardoso CA, Cassiano LP, Pessan JP, et al. Inhibition of tooth erosion by milk containing different fluoride concentrations: an in vitro study. *J Dent*. 2014;42(4):498-502.
28. Flury S, Koch T, Peutzfeldt A, Lussi A, Ganss C. The effect of a tin-containing fluoride mouth rinse on the bond between resin composite and erosively demineralised dentin. *Clin Oral Investig*. 2013;17(1):217-25.
29. Brennan-Pierce EP, MacAskill I, Price RB, Lee JM. Riboflavin-sensitized photo-crosslinking of collagen using a dental curing light. *Biomed Mater Eng*. 2014;24(4):1659-71.
30. Fawzy AS, Nitisusanta LI, Iqbal K, Daood U, Neo J. Riboflavin as a dentin crosslinking agent: ultraviolet A versus blue light. *Dent Mater*. 2012;28(12):1284-91.

31. Perdigao J, Geraldeli S, Carmo AR, Dutra HR. In vivo influence of residual moisture on microtensile bond strengths of one-bottle adhesives. *J Esthet Restor Dent*. 2002;14(1):31-8.
32. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent*. 2002;30(7-8):371-82.
33. Reis A, Grande RH, Oliveira GM, Lopes GC, Loguercio AD. A 2-year evaluation of moisture on microtensile bond strength and nanoleakage. *Dent Mater*. 2007;23(7):862-70.
34. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5.
35. Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res*. 2011;45(1):69-77.
36. Addy M, Absi EG, Adams D. Dentine hypersensitivity. The effects in vitro of acids and dietary substances on root-planed and burred dentine. *J Clin Periodont*. 1987;14(5):274-9.
37. Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006;20(6): 66-6.
38. Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel dissolution in citric acid as a function of pH in the range 2.30 £ pH £ 6.30 – a nanoindentation study. *Eur J Oral Sci*. 2003;111(3): 258-62.
39. Scaramucci T, Hara AT, Zero DT, Ferreira SS, Aoki IV, Sobral MA. Development of an orange juice surrogate for the study of dental erosion. *Braz Dent J*. 2011;22(6): 473-8.
40. Jensdottir T, Holbrook P, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A. Immediate erosive potential of cola drinks and orange juices. *J Dent Res*. 2006;85(3):226-30.
36. Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int*. 1993;24(9):618-31.
37. Wang Y, Spencer P. Analysis of acid-treated dentin smear debris and smear layers using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res*. 2002;60(2):300-8.
38. Hass V, de Paula AM, Parreiras S, Gutierrez MF, Luque-Martinez I, de Paris Matos T, et al. Degradation of dentin-bonded interfaces treated with collagen cross-linking agents in a cariogenic oral environment: An in situ study. *J Dent*. 2016;49:60-7.
39. Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;80(1):268-72.
40. Daood U, Swee Heng C, Neo Chiew Lian J, Fawzy AS. In vitro analysis of riboflavin-modified, experimental, two-step etch-and-rinse dentin adhesive: Fourier transform infrared spectroscopy and micro-Raman studies. *Int J Oral Sci*. 2015;7(2):110-24.
41. Leme-Kraus AA, Aydin B, Vidal CM, Phansalkar RM, Nam JW, McAlpine J, et al. Biostability of the Proanthocyanidins-Dentin Complex and Adhesion Studies. *J Dent Res*. 2016.



42. Castellan CS, Pereira PN, Grande RH, Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent Mater.* 2010;26(10):968-73.
43. Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res A.* 2003;65(1):118-24.
44. Pierpoint WS. o-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides. *Biochem J.* 1969;112(5):609-16.
45. Loomis WD. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol.* 1974;31:528-44.
46. Hagerman AE, Butler LG. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J Biol Chem.* 1981;256(9):4494-7.
47. Hagerman AE, Klucher KM. Tannin-protein interactions. *Prog Clin Biol Res.* 1986;213:67-76.
48. Fawzy A, Nitisusanta L, Iqbal K, Daood U, Beng LT, Neo J. Characterization of riboflavin-modified dentin collagen matrix. *J Dent Res.* 2012;91(11):1049-54.
49. Sionkowska A. Flash photolysis and pulse radiolysis studies on collagen Type I in acetic acid solution. *J Photochem Photobiol B.* 2006;84(1):38-45.
50. Wollensak G, Aurich H, Pham DT, Wirbelauer C. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(3):516-21.
51. Deyhle H, Bunk O, Muller B. Nanostructure of healthy and caries-affected human teeth. *Nanomedicine.* 2011;7(6):694-701.
52. Mazzoni A, Pashley DH, Ruggeri A, Jr., Vita F, Falconi M, Di Lenarda R, et al. Adhesion to chondroitinase ABC treated dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;86(1):228-36.
53. Pashley EL, Zhang Y, Lockwood PE, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effects of HEMA on water evaporation from water-HEMA mixtures. *Dent Mater.* 1998;14(1):6-10.
54. Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater.* 2005;21(10):895-910.
55. Jacobsen T SK. Some effects of water on dentin bonding. *Dent Mater.* 1995;11(2):132-6.
56. Luque-Martinez IV, Perdigao J, Munoz MA, Sezinando A, Reis A, Loguercio AD. Effects of solvent evaporation time on immediate adhesive properties of universal adhesives to dentin. *Dent Mater.* 2014;30(10):1126-35.
57. Miettinen VM, Vallittu PK, Docent DT. Water sorption and solubility of glass fiber-reinforced denture polymethyl methacrylate resin. *J Prosthet Dent.* 1997;77(5):531-4.
58. Van Landuyt KL, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, et al. Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. *J Dent Res.* 2005;84(2):183-8.

59. Cho BH, Dickens SH. Effects of the acetone content of single solution dentin bonding agents on the adhesive layer thickness and the microtensile bond strength. *Dent Mater.* 2004;20(2):107-15.
60. Platt JA, Almeida J, Gonzalez-Cabezas C, Rhodes B, Moore BK. The effect of double adhesive application on the shear bond strength to dentin of compomers using three one-bottle adhesive systems. *Oper Dent.* 2001;26(3):313-7.

**Table 1.** Adhesive system (Batch number), composition, groups and application mode(\*)

Adhesive system (Batch number)	Composition	Groups	Application mode
Prime & Bond Elect (PBE) Dentsply Caulk (130811)	Mono-, di- and trimethacrylate resins; PENTA Diketone; organic phosphine oxide; stabilizers; cetylamine hydrofluoride; acetone; water	Eroded dentin (ED)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil) for 15 s;</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying;</li> <li>3. Applied generous amount of adhesive to thoroughly wet all surfaces and left undisturbed for 20 s;</li> <li>4. Gently dried with clean air for at least 5 sec. Surface should have a uniform, glossy appearance;</li> <li>5. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
		ED + Proanthocyanidin primer (ED + PA primer) (Mega Natural Gold, Madera, USA)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil) for 15 s;</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying;</li> <li>3. Applying actively Proanthocyanidin primer for 60 s;</li> <li>4. Air-drying for 5 s and kept slightly moist the surface;</li> <li>5. Applied generous amount of adhesive to thoroughly wet all surfaces and left undisturbed for 20 s;</li> <li>6. Gently dried with clean air for at least 5 sec. Surface should have a uniform, glossy appearance;</li> <li>7. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
		ED + Riboflavin primer (ED + Ri primer) (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil) for 15 s;</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying;</li> <li>3. Applying actively riboflavin primer for 60 s;</li> <li>4. Light cure for 2 min;</li> <li>5. Air-drying for 5 s and kept slightly moist the surface;</li> <li>6. Applied generous amount of adhesive to thoroughly wet all surfaces and left undisturbed for 20 s;</li> <li>7. Gently dried with clean air for at least 5 sec. Surface should have a uniform, glossy appearance;</li> <li>8. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>

Scotchbond Universal (SBU) 3MESPE (523652)	10-MDP, dimethacrylate resins, HEMA, methacrylate- modified polyalkenoic acid copolymer, nanofiller, ethanol, water, initiators, silane	Eroded dentin (ED)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil) for 15 s;</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying;</li> <li>3. Applied the adhesive to the entire preparation and left undisturbed for 20 s.*</li> <li>4. Directed a gentle stream of air over the liquid for about 5 sec until it no longer moved and the solvent was evaporated completely;</li> <li>5. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
		ED + Proanthocyanidin primer (ED + PA primer) (Mega Natural Gold, Madera, USA)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil) for 15 s;</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying;</li> <li>3. Applying actively Proanthocyanidin primer for 60 s;</li> <li>4. Air-drying for 5 s and kept slightly moist the surface;</li> <li>5. Applied the adhesive to the entire preparation and left undisturbed for 20 s;</li> <li>6. Directed a gentle stream of air over the liquid for about 5 sec until it no longer moved and the solvent was evaporated completely;</li> <li>7. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
		ED + Riboflavin primer (ED + Ri primer) (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil) for 15 s;</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying;</li> <li>3. Applying actively riboflavin primer for 60 s;</li> <li>4. Light cure for 2 min;</li> <li>5. Air-drying for 5 s and kept slightly moist the surface;</li> <li>6. Applied the adhesive to the entire preparation and left undisturbed for 20 s;</li> <li>7. Directed a gentle stream of air over the liquid for about 5 sec until it no longer moved and the solvent was evaporated completely;</li> <li>8. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>

Tetric N-Bond Universal (TEU) Ivoclar Vivadent (U42905)	HEMA, 10-MDP, Bis-GMA, MCAP, D3MA, ethanol, water, highly dispersed silicon dioxide and CQ	Eroded dentin (ED)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil) for 15 s;</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying;</li> <li>3. Applied one coat of adhesive to the entire preparation with a microbrush and rub it in for 20 s;</li> <li>4. Gently air thinned for 5 s;</li> <li>5. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
		ED + Proanthocyanidin primer (ED + PA primer) (Mega Natural Gold, Madera, USA)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil) for 15 s;</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying;</li> <li>3. Applying actively Proanthocyanidin primer for 60 s;</li> <li>4. Air-drying for 5 s and kept slightly moist the surface;</li> <li>5. Applied one coat of adhesive to the entire preparation with a microbrush and rub it in for 20 s;</li> <li>6. Gently air thinned for 5 s;</li> <li>7. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>
		ED + Riboflavin primer (ED + Ri primer) (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil) for 15 s;</li> <li>8. Rinsing for 15 s and air drying;</li> <li>9. Applying actively riboflavin primer for 60 s;</li> <li>10. Light cure for 2 min;</li> <li>11. Air-drying for 5 s and kept slightly moist the surface;</li> <li>12. Applied one coat of adhesive to the entire preparation with a microbrush and rub it in for 20 s;</li> <li>13. Gently air thinned for 5 s;</li> <li>14. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>

\*The materials were applied according to the recommendations of their respective manufacturers.

Bis-GMA, bisphenolglycidyl methacrylate; HEMA, 2-hydroxyethyl methacrylate; MDP, methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate; MCAP = methacrylated carboxylic acid polymer; CQ = camphorquinone; D3MA = decandiol dimethacrylate

**Table 2.** Number of specimens according to fracture mode.

<b>Groups</b>	<b>Soft-drink</b>			<b>Citric Acid</b>		
	<b>PBE</b>	<b>SBU</b>	<b>TEU</b>	<b>PBE</b>	<b>SBU</b>	<b>TEU</b>
ED	39/0/6	43/0/4	40/0/2	36/2/10	36/2/7	41/0/7
ED + PA primer	38/0/4	47/0/3	45/2/3	45/2/2	41/4/3	44/0/0
ED + Ri primer	49/0/3	39/0/4	48/0/0	37/2/7	47/0/0	46/0/0

Abbreviations: A/M: adhesive/mixed fracture mode; C: cohesive fracture mode; PF: premature failures.

**Table 3.** Means and standard deviations of  $\mu$ TBS (MPA) for all experimental groups (\*).

Groups	Soft-drink			Citric Acid		
	PBE	SBU	TEU	PBE	SBU	TEU
ED	23.3 ± 3.4 D	31.0 ± 4.3 C	30.6 ± 2.6 C	16.0 ± 3.6 E	20.1 ± 4.4 D,E	20.7 ± 2.8 D,E
ED + PA primer	28.2 ± 4.0 C,D	44.5 ± 5.4 A,B	37.4 ± 3.9 B	23.7 ± 3.1 D	29.3 ± 3.8 C	28.7 ± 3.6 C
ED + Ri primer	26.0 ± 3.2 C,D	51.4 ± 6.2 A	43.6 ± 5.7 A,B	23.8 ± 3.0 D	31.7 ± 4.2 C	33.1 ± 4.5 C

(\*) Different letters indicate means statistically different (Three-way ANOVA and Tukey test;  $p < 0.05$ ).

**Table 4.** Means and standard deviations of nanoleakage (%) for all experimental groups (\*).

Groups	Soft-drink			Citric Acid		
	PBE	SBU	TEU	PBE	SBU	TEU
ED	19.6 ± 2.3 C	13.0 ± 1.5 B	13.4 ± 2.2 B	35.8 ± 1.2 D	30.1 ± 3.1 D	33.1 ± 2.0 D
ED + PA primer	7.7 ± 1.1 A	7.0 ± 1.7 A	7.7 ± 1.4 A	22.8 ± 3.0 C	17.2 ± 1.4 B,C	17.7 ± 1.3 B,C
ED + Ri primer	7.1 ± 1.7 A	6.1 ± 1.6 A	6.5 ± 1.2 A	22.3 ± 2.0 C	16.3 ± 1.5 B,C	16.8 ± 2.1 B,C

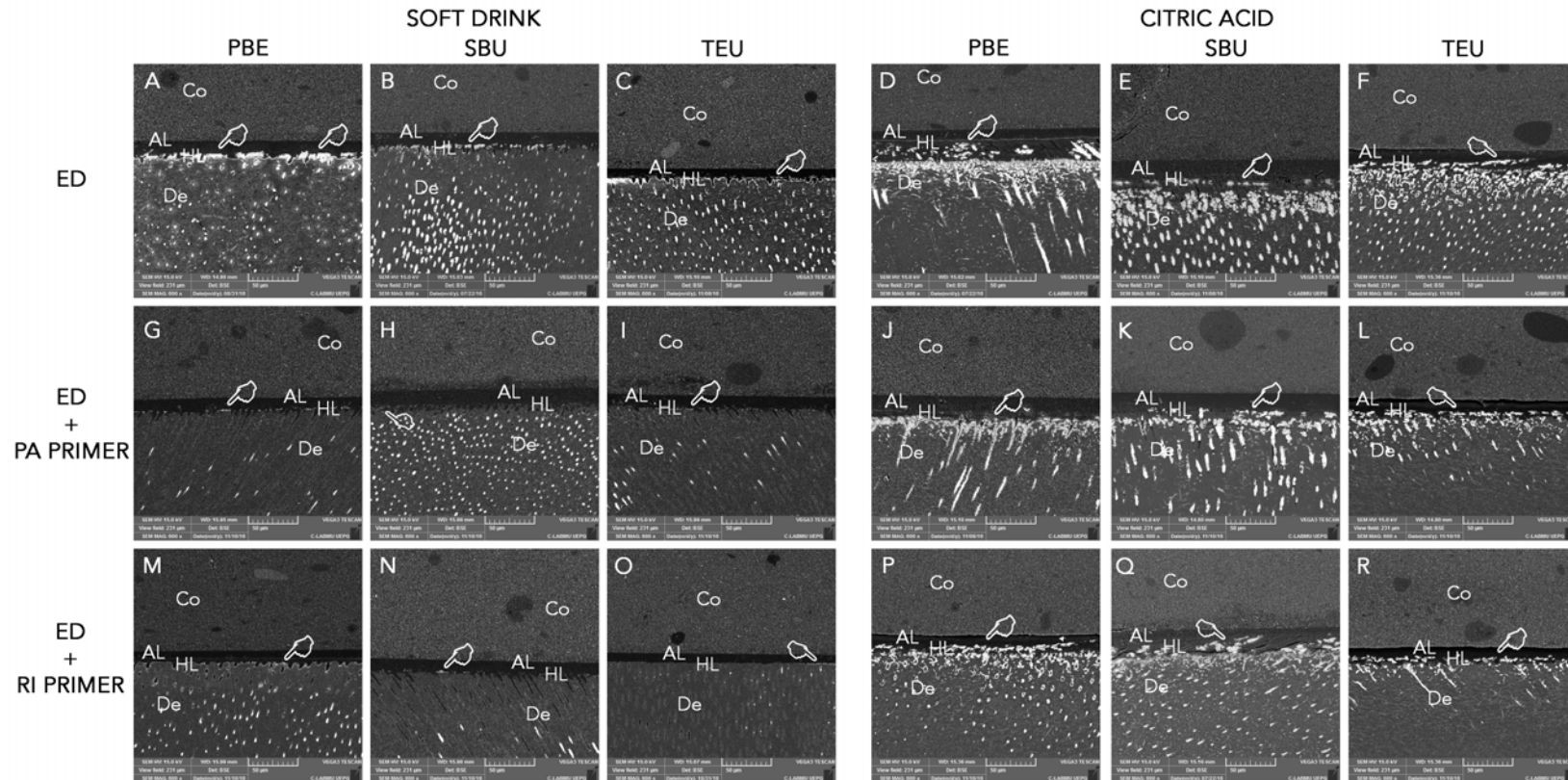
(\*) Different letters indicate means statistically different (Three-way ANOVA and Tukey test;  $p < 0.05$ ).



**Table 5.** Degree of conversion (DC) values (means  $\pm$  standard deviations) for all experimental groups (\*)

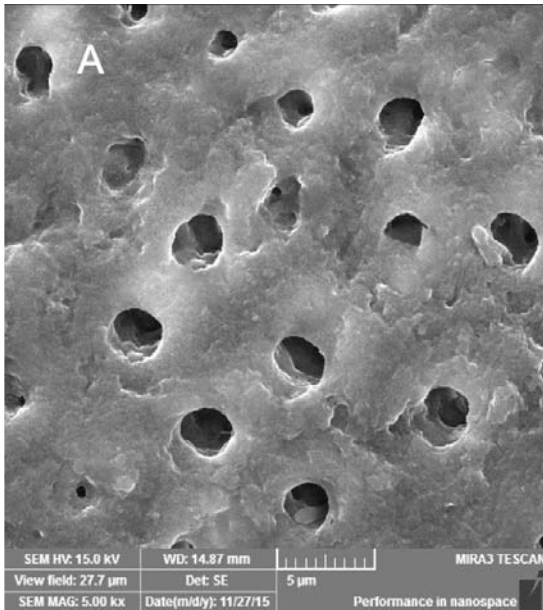
Groups	Soft-drink			Citric Acid		
	PBE	SBU	TEU	PBE	SBU	TEU
ED	56.6 $\pm$ 1.2 C	55.1 $\pm$ 2.6 C	55.2 $\pm$ 3.4 C	54.8 $\pm$ 2.7 C	51.8 $\pm$ 3.3 D	50.7 $\pm$ 5.7 D
ED + PA primer	55.3 $\pm$ 3.7 C	65.5 $\pm$ 3.0 A,B	61.9 $\pm$ 4.0 B	57.8 $\pm$ 2.0 C	60.2 $\pm$ 2.5 B,C	66.4 $\pm$ 1.7 A,B
ED + Ri primer	53.6 $\pm$ 3.9 C,D	61.1 $\pm$ 4.9 B,C	66.2 $\pm$ 2.4 A,B	53.0 $\pm$ 5.6 C,D	64.6 $\pm$ 4.1 A,B	70.9 $\pm$ 4.3 A

(\*) Different letters indicate means statistically different (Three-way ANOVA and Tukey test;  $p < 0.05$ ).

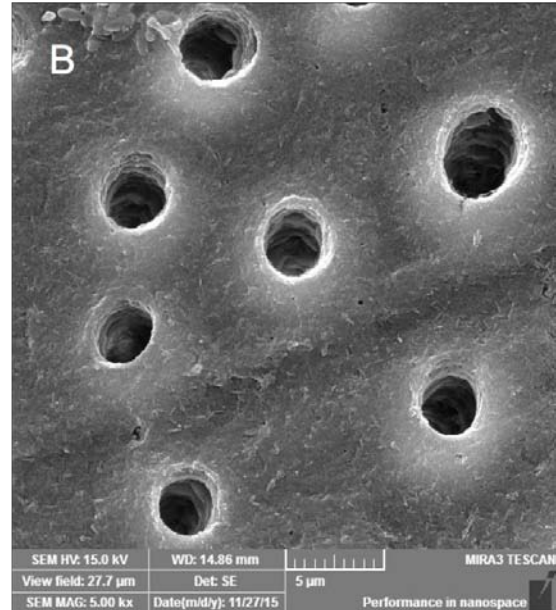


**Figure 1.** Representative back-scattered SEM images of the resin-eroded dentin interfaces bonded for different experimental groups. Silver nitrate (white hands) occurred within the hybrid layer in all groups. Eroded dentin (A, D, G, J, M, P) silver nitrate deposition increased within the hybrid layer for all resin-eroded dentin interface (white hands), especially for citric acid. (D, E, F) The inclusion of collagen cross-linking agents into the resin-eroded dentin interfaces decreases the silver deposition. (Co = composite resin; AL = adhesive layer; HL = hybrid layer; De = dentin).

## Soft drink



## Citric Acid



**Figure 3.** Representative morphology of soft drink group (a), irregular smear layer is observed on the dentin surface, with partial dentinal tubules obliterated and the surface is more rough. Eroded dentin with citric acid (b) showed a surface totally clean, the tubules more enlarged with lost partial of peritubular dentin. Original Magnification: 5000x.

# Artigo 3

## **The effect of experimental phosphoric acid containing MMP-inhibitor on resin eroded-dentin bonding properties**

### **Abstract**

**Objectives:** To evaluate the effects of two-protease inhibitor phosphoric acid gels [chlorhexidine (CHX, MMPs inhibitors) and proanthocyanidins (PA, collagen cross-linking agents)] compared with a conventional phosphoric acid gel on the immediate resin-eroded dentin bond strength ( $\mu$ TBS), nanoleakage (NL) and degree of conversion (DC) of three etch-and-rinse adhesives.

**Methods:** Ninety molars were randomly assigned into 18 experimental conditions according to the combination of the independent variables: dentin eroded: eroded dentin treated with soft-drink, eroded dentin treated with citric acid; the adhesive system used: Prime&Bond Elect-PBE; Scotchbond Universal Adhesive-SBU; Tetric N-Bond Universal-TEU and acid pre-treatment: control groups with phosphoric acid 37%; phosphoric acid containing 2% CHX; and phosphoric acid containing 3% proanthocyanidin. After restorations, specimens were sectioned into resin-dentine sticks ( $0.8 \text{ mm}^2$ ) tested under tension ( $0.5 \text{ mm/min}$ ). Selected beams from each tooth were used for NL and DC evaluation. The data were analyzed by three-way ANOVA and Tukey post test ( $\alpha = 0.05$ )

**Results:** Eroded dentin with citric acid resulted in significantly reduction  $\mu$ TBS values for each adhesive system ( $p < 0.001$ ). Independent of the pH cycling model, the protease inhibitor containing phosphoric acid improved statistically the immediate  $\mu$ TBS ( $p > 0.33$ ) and reduced the NL for all adhesive systems ( $p < 0.004$ ) and improved the DC values for two of the three adhesive systems tested ( $p < 0.03$ ).

**Conclusion:** The protease inhibitor phosphoric acid gels with (CHX and PA) increased the  $\mu$ TBS, reduced the NL in the resin-eroded dentin bond strength when compared with a phosphoric acid without inhibitors. Besides that, improved the DC for SBU and TEU.

**Keywords:** Eroded dentin, Proanthocyanidin, Chlorhexidine, Microtensile bond strength, Nanoleakage, Degree of conversion.

## INTRODUCTION

Due to increase in the prevalence of the eroded dentin (ED) in all ages and different populations, (1, 2) ED has attracted worldwide research interest.

Although this process involves typically the enamel surface, in most severe cases, this can result in dentin exposure (3), releasing mineral from peritubular/intertubular dentin (4, 5), resulting in a dentin tissue completely affected by the demineralization, with the denatured collagen matrix exposed and widened tubules (6, 7).

This mineral dissolution often causes aesthetic and functional impairment together with dentinal hypersensitivity (8, 9). Thus, restorative treatment is an alternative to reduce the progression and symptoms of the lesion. However, due to the severe modifications or the dentin exposed during the erosive process, the bonding to ED is a notoriously critical procedure (10).

It is known that the mechanism of adhesion relies on the formation of a hybrid zone, with micromechanical interlocking between the resin monomers and the collagen-rich dentin matrix. Unfortunately, complete resin monomers diffusion with etch and rinse (ER) adhesive systems dentin is a complex task. The presence of the incomplete resin infiltration at the bottom the hybrid layer is created by poorly monomer diffusion in the collagen meshwork after adhesive application (11-13).

Thus, fibrils that remain unprotected by hydrophobic resin coatings may be vulnerable to enzymatic degradation by host-derived collagen bound matrix metalloproteinases (MMPs) (14-16). Furthermore, the pH fall and neutralization (erosive challenge) by salivary buffers leads to demineralization that exposes the organic matrix, and it the also has potential to lead to the activation and functional activity of host-derived proteases (from either saliva or dentin) (17). So, alternatives to improve the quality of this process have been tested, acting on collagen matrix degradation as well the activity of collagenolytic enzymes are fundamental and could benefit the erosive process reduction, besides that improve the adhesive properties of the collagen matrix.

To increase the collagen stability, one might employ MMP inhibitors and collagen cross-linking agents. Exogenous MMP inhibitors, such as chlorhexidine (CHX), are capable of reducing the protease activity and to prolong the durability of

resin-dentin bonds (18-21). Furthermore, collagen cross-linkers, such as proanthocyanidin (PA), are effective in protecting collagen fibrils from degradation through enhancing the collagen's chemical and mechanical properties (22-25). These therapeutic agents can be used via application of primers, being incorporated into the bonding protocol (26, 27). But this is against the clinician's preference for simplification.

This fact has motivated some authors to combine MMPS inhibitors or cross-linking agents in the etchants (21, 28, 29). Thus, the aim of this study was to evaluate the immediate effectiveness of the modified phosphoric acid etchant through resin-dentin bond strength ( $\mu$ TBS), nanoleakage (NL) and the degree of conversion for the adhesives by *in situ* micro-Raman spectroscopy.

## **MATERIALS & METHODS**

### **Selection and Preparation of Teeth**

A ninety caries-free human molars were used. The Ethics Committee of the local university approved this research project (protocol number 1.652.555). The teeth were disinfected in 0.5% chloramine, stored in distilled water, and used within 6 months after extraction.

The teeth were sectioned parallel to the occlusal surface using a low-speed diamond saw (Isomet; Buehler, Evanston, IL, USA), under water cooling, to expose the mid-coronal dentin. All specimens had a smear layer standardized by polishing the flat dentin surface with 600-grit SiC paper under running water for 60 s.

### **Experimental Design**

The teeth were then randomly assigned to eighteen groups (N = 90 dentin specimens to  $\mu$ TBS, NL, *in-situ* degree conversion) based on the combination of the main variables, i.e., (1) eroded dentin: eroded dentin treated with soft-drink pH  $\approx$  2.7 (Coca-cola, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) eroded dentin treated citric acid pH 2.3; (2) the adhesive system used: [Prime&Bond Elect - PBE (Dentsply Culk, Milford, DE, USA); Scotchbond Universal Adhesive - SBU (3M ESPE, St. Paul, MN, USA); Tetric N-Bond Universal - TEU (Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein)] and (3) acid pre-treatment: control groups with phosphoric acid 37%; phosphoric acid containing 2% CHX; and phosphoric acid containing 3% proanthocyanidin. The composition, application mode, and batch numbers are described in Table 1.

### **pH cycling model**

For erosive demineralization with soft drink, the specimens were submitted to an erosive demineralization by immersion in a soft drink (Coca-Cola, pH  $\approx$  2.7, Brazil) four times daily for 90 s each, for 5 days (30, 31).

For erosive demineralization with citric acid, the specimens were subjected to a cyclic demineralization and remineralization procedure over a total of 10 days (5 days/week; 2 weeks). Molars were erosive demineralized with 0.05 M citric acid solution (pH 2.3, anhydrous citric acid) six times per day for 5 min.

For both erosive cycling, after each demineralization challenge the specimens were rinsed with deionized water (10 s) and immersed in a remineralized solution for 60 min. (4.08 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 20.10 mM KCl, 11.90 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , and 1.98 mM  $\text{CaCl}_2$  with a pH of 6.7) (32). The pH of the solutions was monitored periodically with the aid of a pH meter.

### **Restorative Procedures**

All step-by-step bonding procedures for all groups are described in Table 1. After erosive demineralization, for the control group, the dentin surfaces of all specimens were conditioned with a 35% phosphoric acid gel for 15 s (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil). In the experimental acid groups, an experimental etchant made of 3% PA, containing 10% phosphoric acid was prepared by mixing GSE powder, ethanol, distilled water, and 85% phosphoric acid to final concentrations (weight percentage with respect to total mass) of 3% PA-rich GSE, 20% ethanol and 10% phosphoric acid (28). The chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), except for the GSE which was purchased from Mega Natural Gold (Polyphenolics, Madera, CA, USA). For 37% phosphoric acid containing 2% CHX, the 85% phosphoric acid were mixed with 2% CHX, and ethanol. After etched according to the respective groups, were rinsed with distilled water for 30 s, air-dried for 5 s and kept slightly moist for the application of the two-step etch-and-rinse adhesive.

The adhesive systems were applied according to the manufactures instruction and composite resin buildups (Opallis, FGM, Joinville, Brazil) were then constructed incrementally (two increments of 1.5-mm each) and individually light activated for 40



s each time, using an LED light-curing unit set at 1200 mW/cm<sup>2</sup> (Radii, SDI; Bayswater, Victoria, Australia). A single operator carried out all bonding procedures.

After storage in distilled water at 37°C for 24 h, the specimens were sectioned longitudinally in the mesio-to-distal and buccal-to-lingual directions across the bonded interface, using a slow-speed diamond saw (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) to obtain resin–dentin bonded sticks with a cross-sectional area of approximately 0.8 mm<sup>2</sup>, as measured with digital calipers (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Tokyo, Japan). The number of sticks showing premature debonding (D) during specimen preparation was recorded for each tooth.

### **Microtensile bond strength**

Resin-dentin bonded sticks were attached to a Geraldini's jig (33) with cyanoacrylate adhesive (IC-GEL™, BSI, Atascadero, CA, USA) and tested under tension (Kratos Dinamometros, Cotia, SP, Brazil) at 0.5 mm/min with a load of 100N, until failure. The  $\mu$ TBS values (MPa) were calculated by dividing the load at failure by the cross-sectional bonding area.

The failure mode of the resin–dentin bonded sticks was classified as cohesive ([C] failure exclusively within the dentin or the resin composite), adhesive/mixed ([A/M] failure at the resin/dentin interface or with partial cohesive failure of the neighboring substrates). This classification was performed under a stereomicroscope at 100x magnification (Olympus SZ40, Tokyo, Japan). Specimens with premature failures (PF) were included in the tooth mean for statistical analysis.

### **Nanoleakage Evaluation**

Three bonded sticks from each tooth that were not used in the microtensile test were evaluated for nanoleakage at each time-point. Ammoniacal silver nitrate was prepared according to the protocol previously described by Tay et al (34). The sticks were placed in the ammoniacal silver nitrate solution in the dark for 24 h, rinsed thoroughly in distilled water, and immersed in photo-developing solution for 8 h under a fluorescent light to reduce silver ions to metallic silver grains within spaces along the bonded interface. Specimens were polished with a wet #600, 1000, 1200, 1500, 2000, and 2500 grit SiC paper, 1 and 0.25-mm diamond paste (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) using a polishing cloth. They were ultrasonically cleaned, air-dried, mounted on stubs, and coated with carbon-gold (MED 010, Balzers Union,

Balzers, Liechtenstein). Resin-dentin interfaces were analyzed in a field-emission scanning electron microscope, operated in the backscattered mode (LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK).

Three images of each resin-dentin bonded stick were captured (35). The relative percentage of NL within the adhesive and hybrid layers in each specimen was measured in all images using the public domain Image J software, a Java-based image processing software package developed at the National Institutes of Health (NIH) (36).

### **In situ degree of conversion (DC) within adhesive/hybrid layers**

Two resin-dentin sticks were randomly selected to evaluate the DC immediately after sectioning. The sticks were wet polished using 1500 and 2000 grit SiC paper. The specimens were ultrasonically cleaned for 10 min and positioned into micro-Raman equipment (XploRA ONE™ Raman microscope, HORIBA Scientific, New Jersey, NY, USA), which was first calibrated for zero and then for coefficient values using a silicon sample. The samples were analyzed using a 785-nm diode laser through a X100/0.9 NA air objective. The Raman signal was acquired using a 600-lines/mm grating centered between 500 and 1800  $\text{cm}^{-1}$ , and the employed parameters were 100mW, spatial resolution of 3  $\mu\text{m}$ , spectral resolution 5  $\text{cm}^{-1}$ , accumulation time of 30 s with 5 co-additions. Spectra were obtained at the dentin-adhesive interface, at three random sites (per bonded stick) within the hybrid layer, in intertubular-infiltrated dentin. Spectra of uncured adhesives were taken as references. The ratio of double-bond content of monomer to polymer in the adhesive was calculated according to the following formula:  $\text{DC (\%)} = (1 - [R_{\text{cured}}/R_{\text{uncured}}]) \times 100$ , where 'R' is the ratio of aliphatic and aromatic peak intensities at 1639  $\text{cm}^{-1}$  and 1609  $\text{cm}^{-1}$  in cured and uncured adhesives.

### **Statistical analysis**

The mean  $\mu\text{TBS}$  and the percentage of NL of all bonded sticks from the same tooth were averaged for statistical purposes so that the experimental unit in this study was the tooth. The  $\mu\text{TBS}$  (MPa); NL (%) and DC (%) data were subjected to three-way repeated measures ANOVA (dentin eroded surface vs adhesive system vs. acid pre-treatment) and Tukey's test with a level of significance of 5%.

## Results

### Microtensile bond strength

Most of the specimens showed adhesive/mixed failures (90.7 – 100%) (Table 2). Few pre-test and cohesive failures were observed. Eroded dentin with citric acid resulted in a significantly reduction in  $\mu$ TBS values when compared to eroded dentin with soft-drink for each adhesive system ( $p < 0.001$ ; Table 3). Independent of the pH cycling model used, the MMPs-inhibitor containing phosphoric acid improved statistically the immediate  $\mu$ TBS values for all adhesive systems tested ( $p > 0.33$ ; Table 3). PA-acid showed higher  $\mu$ TBS values than that CHX acid ( $p < 0.01$ ; Table 3).

### Nanoleakage (NL) evaluation

None of the conditions showed nanoleakage-free interface (Figure 1). Statistically significant differences in NL values were observed for to both pH cycling model approaches ( $p < 0.001$ ; Table 4). Eroded dentin groups with citric acid, in general, resulted in a significant increase in the silver nitrate deposition ( $p < 0.001$ ; Table 4). The inclusion of MMPs-inhibitor containing phosphoric acid into the eroded bonding protocol reduced significantly the NL values for all adhesive systems ( $p < 0.004$ ; Table 4).

### Degree of conversion (DC)

The incorporation of MMPs-inhibitor containing phosphoric acid into the eroded-dentin bonding protocol improve the DC values for two of three adhesive systems tested ( $p < 0.03$ ; Table 5). PBE showed the lower statistically significantly DC values in eroded dentin, even etching with MMPs-inhibitor containing phosphoric acid ( $p < 0.01$ ; Table 5).

## Discussion

In the literature, there are not consensus about the pH-cycling model to simulate erosion, we choose to use two different erosive cycling models. We found that erosive potential of the different pH-cycling used in the present study interferes significantly with the performance of the adhesive properties, which can be proved by the decrease in the  $\mu$ TBS means and increase of the NL produced by citric acid when compared to soft-drink.

It has been reported that the lower pH of acidic carbonated drinks such a soft drink may not be very erosive because these beverages have dissociated complexes that favour the remineralization (37). Furthermore, It is known that pH of the acid solution is the principal predictor of demineralization erosive (35) which increases the rate of erosion progression. In the present study, citric acid had a pH of 2.3, which together with the longer exposure time promoted by the chosen pH cycling model increased the erosive progression and interfered in the correct the infiltration of monomers.

The present study demonstrated that acid conditioner is a good carrier for protease inhibitor agents or cross linkers. In contrast to the conventional phosphoric acid, two experimental gels containing the therapeutic agents showed an increase of the immediate resin-eroded dentin bond strength values independent of the pH-cycling model used. The potential of the therapeutic agents studied herein with respect to their abilities to inhibit MMPs (15, 38-40) and cysteine cathepsins, available in the eroded dentin substrate (17), might explain the increase bond strength.

The enzyme inactivation effect of CHX is attributed to the amphipathic origin of its molecule that can bind to several proteins by a chelation mechanism (41). Through a similar mechanism, it is suggested that CHX prevents binding of ions such as  $Zn^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  to the MMPs structure, thereby inhibiting its catalytic activity (42). Moreover, CHX presents cationic properties with strong affinity for organic (collagen) and inorganic (hydroxyapatite) structures in dentin, especially when applied after acid etching (43).

Francisconi-dos-Rios showed that the application of 2% aqueous chlorhexidine solution did not immediately influence  $\mu$ TBS in eroded dentin (27). Theses finding are not in agreement with our study, because the incorporation of CHX in the acid conditioner produced an increase of the microtensile bond strength, significantly decrease of the NL and didn't influence the degree of conversion of the adhesive in the hybrid layer.

The results of this study are consistent with those from previous studies that have demonstrated that CHX-containing phosphoric acid gels are effective for preserving dentin-bonded interfaces (20, 21, 44), despite the short application time

with the dental structure. It is known that CHX have an inhibitory MMPs effect, even after application time of 10 s (45).

Furthermore, the higher porosity of eroded dentin matrix may promote a deeper penetration of CHX to inner vulnerable layers to MMPs, which could also justify a significant reduction of NL for groups treated with CHX-containing phosphoric acid gel.

Although CHX-containing acid gels showed promising results, they lack a chemical bond with the collagen fibrils. PA is a cross-linking agent promoting a chemical bond with the collagen fibrils (46) with a high affinity and specificity for interaction with the collagen proteins. This is achieved through several chemical mechanisms such as hydrogen bonding, hydrophobic interactions, covalent and ionic bonds (47-49) producing collagen cross-linking. This improves the mechanical properties of the demineralized dentin matrix, making it less prone to digestion by host-derived MMPs (50-52). Thus, the cross-linking collagen leads to stiffening of the collagen fibrils, making them less susceptible to collagen network collapse after air-drying (53). As a consequence, better adhesive infiltration may occur resulting in an adhesive interface less prone to hydrolytic and enzymatic breakdown. This can be confirmed by the significantly decreased silver nitrate deposition observed for all groups after PA acid etching.

Despite the significant reduction of NL, none of the experimental gels could produce a nanoleakage-free interface since the protocols herein tested did not alter the hydrophilic nature of the adhesive, improve water/solvent evaporation and/or produce less permeable adhesive interfaces, which are important parameters for nanoleakage (54-56).

A high degree of conversion for the adhesive is critical to produce a high cross-linked polymer within the hybrid layer and also yield adhesive interfaces that are less prone to degradation (54, 55, 57). Our findings showed that, after application of two experimental gels containing the therapeutic agents, there was an increase in the DC in two of three adhesive systems used. This increase of the DC can be attributed to the improvement of the biomechanical properties of the eroded collagen matrix. The difference on the adhesive performance can be justified by the different adhesive composition. PBE is the only one that contains acetone and water as solvent. As acetone has a lower boiling temperature (56.5 °C) and higher vapor

pressure (200 mmHg) when compared with ethanol (78.3 °C/43.9 mmHg) and water (100 °C/17.5 mmHg) (58), after evaporation, the adhesive layer of the acetone-based system can be thinner than that formed by the other solvent based materials, as has previously been demonstrated (59).

Although it is a subjective judgment, the stability of the resin–eroded dentin interfaces produced with two experimental gels containing the therapeutic agents can be attributed to several factors that work synergistically. With the ability of PA to interact with collagen even in an acidic environment and increase in the strength of collagen fibrils that makes it less susceptible to digestion by proteases, and the ability CHX to inactive the catalytic site of proteases. However, additional studies are still needed to clarify whether the use of the two experimental gels containing the therapeutic agents for preserves resin-eroded dentin interface after the long-term function

## **Conclusions**

The two-protease inhibitor phosphoric acid gels studied (chlorhexidine and proanthocyanidins) increased the  $\mu$ TBS, reduced significantly the NL in the resin-eroded dentin bond strength when compared with a phosphoric acid without inhibitors. The incorporation of MMPs-inhibitor containing phosphoric acid into the eroded-dentin bonding protocol improve the DC values for SBU and TEU. PBE showed the lower statistically significantly DC values in eroded dentin, even etching with MMPs-inhibitor containing phosphoric acid.

## References

1. Vargas-Ferreira F, Praetzel JR, Ardenghi TM. Prevalence of tooth erosion and associated factors in 11-14-year-old Brazilian schoolchildren. *J Public Health Dent.* 2011;71(1):6-12.
2. Bartlett DW, Lussi A, West NX, Bouchard P, Sanz M, Bourgeois D. Prevalence of tooth wear on buccal and lingual surfaces and possible risk factors in young European adults. *J Dent.* 2013;41(11):1007-13.
3. Jaeggi T, Gruninger A, Lussi A. Restorative therapy of erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:200-14.
4. Murakami C, Oliveira LB, Sheiham A, Nahas Pires Correa MS, Haddad AE, Bonecker M. Risk indicators for erosive tooth wear in Brazilian preschool children. *Caries Res.* 2011;45(2):121-9.
5. Dugmore CR, Rock WP. The prevalence of tooth erosion in 12-year-old children. *Br Dent J.* 2004;196(5):279-82; discussion 3.
6. Meurman JH, Drysdale T, Frank RM. Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent Res.* 1991;99(6):457-62.
7. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:2-12.
8. Gillam DG, Seo HS, Bulman JS, Newman HN. Perceptions of dentine hypersensitivity in a general practice population. *J Oral Rehabil.* 1999;26(9):710-4.
9. West NX, Sanz M, Lussi A, Bartlett D, Bouchard P, Bourgeois D. Prevalence of dentine hypersensitivity and study of associated factors: a European population-based cross-sectional study. *J Dent.* 2013;41(10):841-51.
10. Zimmerli B, De Munck J, Lussi A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Long-term bonding to eroded dentin requires superficial bur preparation. *Clin Oral Investig.* 2012;16(5):1451-61.
11. Nakabayashi N, Takarada K. Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dent Mater.* 1992;8(2):125-30.
12. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res.* 2000;79(6):1385-91.
13. Reis A, Carrilho M, Breschi L, Loguercio AD. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. *Oper Dent.* 2013;38(4):E1-E25.
14. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjaderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials.* 2006;27(25):4470-6.
15. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(2):160-6.

16. Tjaderhane L, Mehtala P, Scaffa P, Vidal C, Paakkonen V, Breschi L, et al. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on dentin bonding and nanoleakage of etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 2013;29(10):1055-62.
17. Tjaderhane L, Buzalaf MA, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'. *Caries Res.* 2015;49(3):193-208.
18. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldini S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* 2007;86(1):90-4.
19. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005;84(8):741-6.
20. Stanislawczuk R, Amaral RC, Zander-Grande C, Gagler D, Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin bonds. *Oper Dent.* 2009;34(4):481-90.
21. Loguercio AD, Hass V, Gutierrez MF, Luque-Martinez IV, Szezs A, Stanislawczuk R, et al. Five-year Effects of Chlorhexidine on the In Vitro Durability of Resin/Dentin Interfaces. *J Adhes Dent.* 2016;18(1):35-42.
22. Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;80(1):268-72.
23. Castellan CS, Pereira PN, Grande RH, Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent Mater.* 2010;26(10):968-73.
24. Liu Y, Chen M, Yao X, Xu C, Zhang Y, Wang Y. Enhancement in dentin collagen's biological stability after proanthocyanidins treatment in clinically relevant time periods. *Dent Mater.* 2013;29(4):485-92.
25. Xu C, Wang Y. Cross-linked demineralized dentin maintains its mechanical stability when challenged by bacterial collagenase. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011;96(2):242-8.
26. Sabatini C, Pashley DH. Mechanisms regulating the degradation of dentin matrices by endogenous dentin proteases and their role in dental adhesion. A review. *Am J Dent.* 2014;27(4):203-14.
27. Francisconi-dos-Rios LF, Casas-Apayco LC, Calabria MP, Francisconi PA, Borges AF, Wang L. Role of chlorhexidine in bond strength to artificially eroded dentin over time. *J Adhes Dent.* 2015;17(2):133-9.
28. Liu Y, Dusevich V, Wang Y. Addition of Grape Seed Extract Renders Phosphoric Acid a Collagen-stabilizing Etchant. *J Dent Res.* 2014;93(8):821-7.
29. Hass V, Luque-Martinez I, Munoz MA, Reyes MF, Abuna G, Sinhoreti MA, et al. The effect of proanthocyanidin-containing 10% phosphoric acid on bonding properties and MMP inhibition. *Dent Mater.* 2016;32(3):468-75.
30. Zarella BL, Cardoso CA, Pela VT, Kato MT, Tjaderhane L, Buzalaf MA. The role of matrix metalloproteinases and cysteine-cathepsins on the progression of dentine erosion. *Arch Oral Biol.* 2015;60(9):1340-5.



31. Magalhaes AC, Levy FM, Souza BM, Cardoso CA, Cassiano LP, Pessan JP, et al. Inhibition of tooth erosion by milk containing different fluoride concentrations: an in vitro study. *J Dent.* 2014;42(4):498-502.
32. Flury S, Koch T, Peutzfeldt A, Lussi A, Ganss C. The effect of a tin-containing fluoride mouth rinse on the bond between resin composite and erosively demineralised dentin. *Clin Oral Investig.* 2013;17(1):217-25.
33. Perdigao J, Geraldeli S, Carmo AR, Dutra HR. In vivo influence of residual moisture on microtensile bond strengths of one-bottle adhesives. *J Esthet Restor Dent.* 2002;14(1):31-8.
34. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent.* 2002;30(7-8):371-82.
35. Reis A, Grande RH, Oliveira GM, Lopes GC, Loguercio AD. A 2-year evaluation of moisture on microtensile bond strength and nanoleakage. *Dent Mater.* 2007;23(7):862-70.
36. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-5.
37. Addy M, Absi EG, Adams D. Dentine hypersensitivity. The effects in vitro of acids and dietary substances on root-planed and burred dentine. *J Clin Periodont.* 1987;14(5):274-9.
38. Botelho MG. The antimicrobial activity of a dentin conditioner combined with antibacterial agents. *Oper Dent.* 2005;30(1):75-82.
39. Kanca J, 3rd. One step bond strength to enamel and dentin. *Am J Dent.* 1997;10(1):5-8.
40. Skovron L, Kogeo D, Gordillo LA, Meier MM, Gomes OM, Reis A, et al. Effects of immersion time and frequency of water exchange on durability of etch-and-rinse adhesive. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;95(2):339-46.
41. Negrelo Newton AP, Cadena SM, Merlin Rocha ME, Skare Carnieri EG, Martinelli de Oliveira MB. New data on biological effects of chlorhexidine: Fe<sup>2+</sup> induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition. *Toxicol Lett.* 2004;151(3):407-16.
42. De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res.* 2009;88(12):1101-6.
43. Iskander M, Elkassas D, Mohsen MA. Effect of two matrix metalloproteinase inhibitors on the color stability of a nanofilled resin composite. *Oper Dent.* 2015;40(1):E11-20.
44. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *J Dent.* 2011;39(1):40-7.
45. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Gu LS, Zhang K, Agee KA, Carvalho RM, et al. The anti-MMP activity of benzalkonium chloride. *J Dent.* 2011;39(1):57-64.
46. Green B, Yao X, Ganguly A, Xu C, Dusevich V, Walker MP, et al. Grape seed proanthocyanidins increase collagen biodegradation resistance in the dentin/adhesive interface when included in an adhesive. *J Dent.* 2010;38(11):908-15.

47. Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res A*. 2003;65(1):118-24.
48. Hagerman AE, Butler LG. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J Biol Chem*. 1981;256(9):4494-7.
49. Bedran-Russo AK, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. *Acta Biomater*. 2011;7(4):1735-41.
50. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee KA, Cadenaro M, Turco G, et al. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. *Dent Mater*. 2014;30(2):227-33.
51. Cova A, Breschi L, Nato F, Ruggeri A, Jr., Carrilho M, Tjaderhane L, et al. Effect of UVA-activated riboflavin on dentin bonding. *J Dent Res*. 2011;90(12):1439-45.
52. Vidal CM, Aguiar TR, Phansalkar R, McAlpine JB, Napolitano JG, Chen SN, et al. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta Biomater*. 2014;10(7):3288-94.
53. Liu R, Fang M, Xiao Y, Li F, Yu L, Zhao S, et al. The effect of transient proanthocyanidins preconditioning on the cross-linking and mechanical properties of demineralized dentin. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22(11):2403-11.
54. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci*. 2005;113(6):525-30.
55. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y, et al. Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. *J Biomed Mater Res*. 2002;63(3):306-11.
56. Yiu CK, Pashley EL, Hiraishi N, King NM, Goracci C, Ferrari M, et al. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. *Biomaterials*. 2005;26(34):6863-72.
57. Hass V, Luque-Martinez I, Sabino NB, Loguercio AD, Reis A. Prolonged exposure times of one-step self-etch adhesives on adhesive properties and durability of dentine bonds. *J Dent*. 2012;40(12):1090-102.
58. Abate PF, Rodriguez VI, Macchi RL. Evaporation of solvent in one-bottle adhesives. *J Dent*. 2000;28(6):437-40.
59. Cho BH, Dickens SH. Effects of the acetone content of single solution dentin bonding agents on the adhesive layer thickness and the microtensile bond strength. *Dent Mater*. 2004;20(2):107-15.

**Table 1.** Adhesive system (Batch number), composition, groups and application mode(\*).

Adhesive system (Batch number)	Composition	Groups	Application mode
Prime&Bond Elect – Dentsply Caulk (130811)	Mono-, di- and trimethacrylate resins; PENTA Diketone; organic phosphine oxide; stabilizers; cetylamine hydrofluoride; acetone; water	Eroded dentin	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil) for 15 s</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying</li> <li>3. Applied generous amount of adhesive to thoroughly wet all surfaces and left undisturbed for 20 s</li> <li>4. Gently dried with clean air for at least 5 sec. Surface should have a uniform, glossy appearance</li> <li>5. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup></li> </ol>
		ED + CHX acid	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid containing 2% CHX for 15 s</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying</li> <li>3. Applied generous amount of adhesive to thoroughly wet all surfaces and left undisturbed for 20 s</li> <li>4. Gently dried with clean air for at least 5 sec. Surface should have a uniform, glossy appearance</li> <li>5. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup></li> </ol>
		ED + PA acid (Mega Natural Gold, Madera, USA)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 10% phosphoric acid containing 3% Proanthocyanidin for 60 s</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying</li> <li>3. Applied generous amount of adhesive to thoroughly wet all surfaces and left undisturbed for 20 s</li> <li>4. Gently dried with clean air for at least 5 sec. Surface should have a uniform, glossy appearance</li> <li>5. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup></li> </ol>
Scotchbond Universal - 3MESPE (523652)	10-MDP, dimethacrylate resins, HEMA, methacrylate-modified	Eroded dentin	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil) for 15 s</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying</li> <li>3. Applied generous amount of adhesive to thoroughly wet all surfaces and left undisturbed for 20 s</li> </ol>

	polyalkenoic acid copolymer, nanofiller, ethanol, water, initiators, silane		<ol style="list-style-type: none"> <li>4. Gently dried with clean air for at least 5 sec. Surface should have a uniform, glossy appearance</li> <li>5. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup></li> </ol>
		ED + CHX acid	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid containing 2% CHX for 15 s</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying</li> <li>3. Applied generous amount of adhesive to thoroughly wet all surfaces and left undisturbed for 20 s</li> <li>4. Gently dried with clean air for at least 5 sec. Surface should have a uniform, glossy appearance</li> <li>5. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup></li> </ol>
		ED + PA acid (Mega Natural Gold, Madera, USA)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 10% phosphoric acid containing 3% Proanthocyanidin for 60 s</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying</li> <li>3. Applied generous amount of adhesive to thoroughly wet all surfaces and left undisturbed for 20 s</li> <li>4. Gently dried with clean air for at least 5 sec. Surface should have a uniform, glossy appearance</li> <li>5. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup></li> </ol>
Tetric N-Bond Universal – Ivoclar Vivadent (U42905)	HEMA, 10-MDP, Bis-GMA, MCAP, D3MA, ethanol, water, highly dispersed silicon dioxide and CQ	Eroded dentin	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid (Condac, FGM Dental Products; Joinville, SC, Brazil) for 15 s</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying</li> <li>3. Applied generous amount of adhesive to thoroughly wet all surfaces and left undisturbed for 20 s</li> <li>4. Gently dried with clean air for at least 5 sec. Surface should have a uniform, glossy appearance</li> <li>5. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm<sup>2</sup></li> </ol>
		ED + CHX acid	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 37% phosphoric acid containing 2% CHX for 15 s</li> <li>2. Rinsing for 15 s and air drying</li> <li>3. Applied generous amount of adhesive to thoroughly wet all surfaces and left undisturbed for 20 s</li> <li>4. Gently dried with clean air for at least 5 sec. Surface should have a uniform, glossy appearance</li> </ol>

ED + PA acid (Mega Natural Gold, Madera, USA)	5. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm <sup>2</sup>
	1. 10% phosphoric acid containing 3% Proanthocyanidin for 60 s
	2. Rinsing for 15 s and air drying
	3. Applied generous amount of adhesive to thoroughly wet all surfaces and left undisturbed for 20 s
	4. Gently dried with clean air for at least 5 sec. Surface should have a uniform, glossy appearance
	5. Light cure for 10 s at 1200 mW/cm <sup>2</sup>

*\*The materials were applied according to the recommendations of their respective manufacturers.*

*Bis-GMA, bisphenolglycidyl methacrylate; HEMA, 2-hydroxyethyl methacrylate; MDP, methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate; MCAP = methacrylated carboxylic acid polymer; CQ = camphorquinone; D3MA = decandiol dimethadrylate.*

**Table 2.** Percentage (%) of specimens according to fracture mode.

<b>Groups</b>	<b>Soft-drink</b>			<b>Citric Acid</b>		
	<b>PBE</b>	<b>SBU</b>	<b>TEU</b>	<b>PBE</b>	<b>SBU</b>	<b>TEU</b>
Eroded dentin	45/0/5	45/0/5	44/0/2	38/0/4	45/0/3	46/0/3
ED + CHX acid	39/3/4	45/2/1	47/2/0	44/3/0	40/5/5	43/2/3
ED + PA acid	49/0/0	38/4/3	44/2/0	45/0/1	36/4/5	46/1/2

Abbreviations: A/M: adhesive/mixed fracture mode; C: cohesive fracture mode; PF: premature failures.

**Table 3.** Means and standard deviations of  $\mu$ TBS (MPA) for all experimental groups (\*).

Groups	Soft-drink			Citric Acid		
	PBE	SBU	TEU	PBE	SBU	TEU
Eroded dentin	22.0 $\pm$ 2.4 D	31.2 $\pm$ 3.3 C	30.9 $\pm$ 2.4 C	14.7 $\pm$ 2.3 E	20.4 $\pm$ 2.2 D	20.2 $\pm$ 2.5 D
ED + CHX acid	28.1 $\pm$ 2.4 C	37.7 $\pm$ 2.6 A,B	37.3 $\pm$ 2.8 A,B	24.8 $\pm$ 2.5 C,D	30.8 $\pm$ 3.6 C	31.6 $\pm$ 3.8 C
ED + PA acid	32.3 $\pm$ 2.3 C	44.6 $\pm$ 3.4 A	45.0 $\pm$ 3.3 A	30.8 $\pm$ 2.7 C	41.4 $\pm$ 4.4 B	42.2 $\pm$ 3.6 B

(\*) Different letters indicate means statistically different (Three-way ANOVA and Tukey test;  $p < 0.05$ ).

**Table 4.** Means and standard deviations of nanoleakage (%) for all experimental groups (\*).

Groups	Soft-drink			Citric Acid		
	PBE	SBU	TEU	PBE	SBU	TEU
Eroded dentin	16.9 ± 1.0 C	12.5 ± 2.1 B	13.4 ± 1.6 B	35.8 ± 1.1 F	30.6 ± 1.9 E	32.5 ± 2.2 E
ED + CHX acid	10.3 ± 1.8 A,B	7.1 ± 1.3 A	8.3 ± 1.3 A	28.1 ± 1.8 E	24.6 ± 2.0 D	25.0 ± 2.0 D
ED + PA acid	8.5 ± 1.2 A	7.1 ± 1.9 A	8.0 ± 1.2 A	21.1 ± 1.6 D	18.3 ± 1.8 C	19.3 ± 1.2 C,D

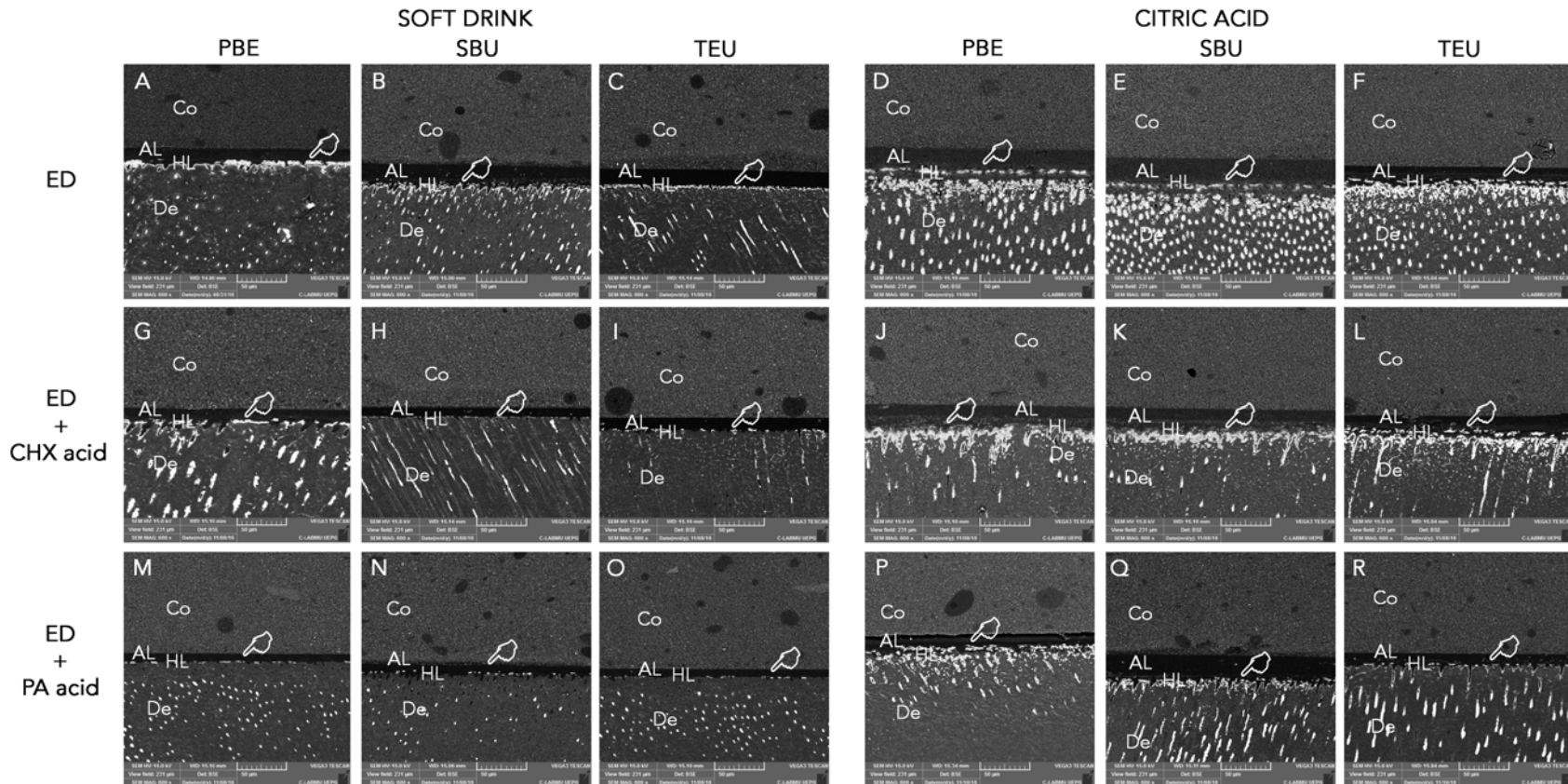
(\*). Different letters indicate means statistically different (Three-way ANOVA and Tukey test;  $p < 0.05$ ).



**Table 5.** Degree of conversion (DC) values (means  $\pm$  standard deviations) for all experimental groups (\*).

<b>Groups</b>	<b>Soft-drink</b>			<b>Citric Acid</b>		
	<b>PBE</b>	<b>SBU</b>	<b>TEU</b>	<b>PBE</b>	<b>SBU</b>	<b>TEU</b>
Eroded dentin	56.6 $\pm$ 1.2 C	54.0 $\pm$ 2.0 C	55.2 $\pm$ 3.4 C	55.1 $\pm$ 2.6 C	53.8 $\pm$ 3.2 C	52.1 $\pm$ 4.3 C
ED + CHX acid	54.4 $\pm$ 3.5 C	60.5 $\pm$ 2.8 B	70.3 $\pm$ 2.7 A	56.6 $\pm$ 1.9 C	68.2 $\pm$ 4.8 A	64.8 $\pm$ 4.6 A,B
ED + PA acid	55.3 $\pm$ 3.8 C	63.9 $\pm$ 3.5 B	70.7 $\pm$ 5.5 A	58.0 $\pm$ 2.2 C	66.6 $\pm$ 2.5A,B	68.6 $\pm$ 4.8 A

(\*) Different letters indicate means statistically different (Three-way ANOVA and Tukey test;  $p < 0.05$ ).



**Figure 1.** Representative back-scattered SEM images of the resin-eroded dentin interfaces bonded for different experimental groups. Eroded dentin (A - F) showed a higher silver nitrate deposition within the hybrid layer for all resin-eroded dentin interface (white hands), especially for citric acid. The experimental gels containing the therapeutic agents decreased the amount of silver nitrate deposition for all adhesive used. (white pointer).

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, maiores valores de  $\mu$ TBS foram observados na dentina sadia para o sistema adesivo universal quando foi empregada a estratégia ER. Sabe-se que a presença da camada de *smear layer* impõe uma barreira física contra a penetração dos monômeros resinosos (Van Meerbeek et al. <sup>46</sup> 2003). O condicionamento com ácido fosfórico promove a remoção total dessa camada, desmineralizando de 6-9  $\mu$ m da dentina (Kanca <sup>47</sup> 1992; Kenshima et al. <sup>48</sup> 2005) e aumenta a impregnação dos monômeros resinosos, o que leva à formação de uma camada híbrida espessa e integrada com a dentina (Kenshima et al. <sup>48</sup> 2005; Proenca et al. <sup>49</sup> 2007). Assim, uma melhor resistência de união na dentina, em relação a estratégia SE, é esperada. Normalmente, os adesivos SE resultam em camadas adesivas mais finas, as quais são suscetíveis à inibição de polimerização pelo oxigênio e menor GC (Nunes et al. <sup>50</sup> 2005).

Os sistemas adesivos universais foram projetados sob o conceito “*all-in-one*” dos adesivos autocondicionantes já existentes, mas incorporando a versatilidade de adaptá-los à situação clínica (Perdigão et al. <sup>51</sup> 2014; Wagner et al. <sup>52</sup> 2014), podendo ser utilizados sob diferentes modos de condicionamento. Vale ressaltar, que apesar do modo ER mostrar valores  $\mu$ TBS mais altos para a dentina sadia, a estratégia SE e ER não apresentou diferença estatística.

Em DE ambas estratégias adesivas mostraram um desempenho semelhante. Foi relatado que a presença de uma área não impregnada em DE devido ao condicionamento ácido poderia comprometer a adesão a este substrato (Zimmerli et al. <sup>5</sup> 2012). Além disso, também foi relatado que os adesivos SE proporcionam uma melhor adesão porque reduz a discrepância entre a desmineralização e infiltração dos monômeros na dentina erosionada (Zimmerli et al. <sup>5</sup> 2012). No entanto, no presente estudo quando os sistemas adesivos universais foram utilizados em ambas estratégias adesivas em dentina erosionada, foram encontradas médias de  $\mu$ TBS semelhantes e nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores (Cruz et al. <sup>32</sup> 2015, Lenzi et al. <sup>53</sup> 2016; Forgerini et al. <sup>38</sup> 2017).

Sabe-se que a interface de resina-dentina erosionada formada é mais complexa do que na dentina sadia. A dentina erosionada exibe uma camada desmineralizada mais profunda e a presença de uma matriz de colágeno fibroso

denso com capacidade tampão suficiente para proteger a dentina da desmineralização (Breschi et al. <sup>54</sup> 2002). Hipotetiza-se no presente estudo que, essas fibras de colágeno com a capacidade tampão contra perda mineral durante o processo erosivo, também poderiam ter influenciado o desempenho dos adesivos universais quando usado com o condicionamento ácido.

Esta alteração na DE também justifica a diminuição dos valores de  $\mu$ TBS para este substrato, assim como valores mais elevados de NI quando comparados com a dentina sadia. Exceto para PUB, que mostrou a maior NI independente do substrato. PUB é um adesivo autocondicionante agressivo, porque tem um pH baixo (pH = 1,2) (Munoz et al. <sup>35</sup> 2013). Foi anteriormente relatado que monômeros não polimerizados, ácidos e agressivos de adesivos SE são capazes de continuar a desmineralizar a dentina mesmo após a polimerização. Este é provavelmente o resultado da hidrólise da ligação éster do monômero ácido que resulta em um ácido fosfórico forte (Wang, Spencer <sup>55</sup> 2005) e o que pode justificar a maior deposição de nitrato de prata dentro da camada híbrida.

Foi utilizado uma ciclagem de pH frequentemente testada para reproduzir o desafio erosivo na superfície da dentina. O ácido cítrico é uma solução ácida simples, reprodutível e barata (Shellis et al. <sup>37</sup> 2011). No presente estudo, as imagens de MEV mostraram que a erosão provocada pelo ácido cítrico revelou uma dentina intertubular perfeitamente limpa e uma superfície mais desmineralizada com túbulos dentinários mais amplos. Esses achados estão de acordo com vários autores (Grenby <sup>56</sup> 1996; Larsen, Nyvad <sup>57</sup> 1999; Hannig et al. <sup>58</sup> 2005; Jensdottir et al. <sup>60</sup> 2006; Murrell et al. <sup>59</sup> 2010), que relataram que o potencial de erosão de uma solução ácida é esta associado principalmente ao pH e à acidez, porém o pH é considerado o principal preditor do potencial erosivo. Assim, o pH (2,3) do ácido cítrico associado com tempo de desmineralização promoveu uma grande alteração superficial na dentina, gerando os menores valores de  $\mu$ TBS para cada sistema adesivo, independentemente da estratégia adesiva utilizada. Além disso, este grande desafio erosivo proporcionou uma maior deposição de nitrato de prata na camada híbrida.

Embora os sistemas adesivos universais testados partilhem a mesma versatilidade de utilização, as diferenças nas suas composições e o número de passos podem ser uma razão para os diferentes desempenhos destes materiais.

FBU, PBE e XEN foram os adesivos para os quais os valores de  $\mu$ TBS atingiu o menor ranking de significância estatística entre todos os adesivos para os três substratos.

De acordo com o fabricante do Xeno Select, dois monômeros ácidos são responsáveis pela interação deste adesivo com a superfície da dentina: um éster de ácido fosfórico funcionalizado “inverso” e um ácido acrílico amino alquilsulfônico (Fact file: XENO Select. <sup>61</sup> 2014) que inicialmente se ligam ao Ca da hidroxiapatita, mas eles facilmente se desprendem (Maeda et al. <sup>62</sup> 2008; Van Meerbeek et al. <sup>63</sup> 2011). Esta falta de união foi recentemente confirmada por Zhou et al. (Zhou et al. <sup>64</sup> 2015) através da espectroscopia de refletância total atenuada (ATR). Os autores não observaram nenhum sinal de ligação química dos monômeros Xeno V (o precursor de Xeno Select, que contém os mesmos monômeros) às superfícies da dentina, indicando baixa afinidade de Xeno V a este substrato (Zhou et al. <sup>64</sup> 2015).

O fabricante de FBU descreve o seu monômero funcional apenas como monometacrilato de fosfato. Assim, a ausência de MDP na sua formulação pode ser uma especulação razoável para os resultados de resistência de união inferiores, uma vez que a sua presença não é revelada na bula do produto (Wagner et al. <sup>52</sup> 2014).

Em geral, a presença do monômero funcional 10-MDP no adesivo universal promoveu uma influência significativa sobre os valores de resistência de união. Estes monômeros funcionais formam uma camada estável juntamente com uma deposição de sais de cálcio na interface adesiva (Yoshida et al. <sup>65</sup> 2012), aumentando a resistência mecânica (Yoshihara et al. <sup>66</sup> 2010) e protegendo contra hidrólise (Fukeygawa et al. <sup>67</sup> 2006).

Por outro lado, sabe-se que a acidez promovida pela ciclagem de pH pode antecipar ou potencializar a atividade proteolítica na dentina erosionada (Magalhães et al. <sup>17</sup> 2009; Tjaderhane et al. <sup>10</sup> 2015). As MMPs são ativadas a um pH baixo e a sua atividade de degradação é aumentada pela subsequente neutralização (Tjaderhane et al. <sup>13</sup> 1998). Além disso, o pH repetidamente baixo causado pela desmineralização, pode ativar as cisteínas catépsinas (Tjaderhane et al. <sup>10</sup> 2015).

Portanto, em virtude dos baixos valores de resistência de união que encontramos quando os adesivos universais foram utilizados independentemente da

estratégia adesiva em dentina erosionada, a inclusão dos agentes reticulares no procedimento de adesão foi uma idéia racional, uma vez que as proantocianidinas e a rivo flavina são inibidores de proteases (Hass et al. <sup>68</sup> 2016), com a capacidade de melhorar as propriedades biomecânicas das fibras de colágeno (Bedran-Russo et al. <sup>20</sup> 2007; Daood et al. <sup>69</sup> 2015), o que contribui para o estabelecimento de uma camada híbrida mais estável, já comprovado em dentina sadia (Hass et al. <sup>68</sup> 2016).

Como na literatura ainda existe uma lacuna não explorada por investigadores sobre o agente erosivo e o modelo de ciclagem de pH para simular erosão, pois não é de conhecimento se propriedades adesivas na dentina erosionada são influenciadas pelos diferentes potenciais erosivos dos protocolos encontrados na literatura, optamos por introduzir um novo modelo de ciclagem erosiva com uma solução com um pH mais suave (Coca-cola) para o estudo de *primers* contendo agentes reticulares de colégeno.

Verificou-se que o potencial erosivo dos diferentes ciclos de pH utilizados no presente estudo interferiu significativamente no desempenho das propriedades adesivas, o que pode ser comprovado pela diminuição das médias de  $\mu$ TBS e aumento do NL produzido pelo ácido cítrico quando comparado com o refrigerante.

Refrigerante é uma solução ácida simples com um desafio erosivo mais realista, mas pode ter variações entre os lotes e apesar de conter ácido fosfórico, contém açúcares, gomas, polifenóis (Shellis et al. <sup>70</sup> 2011). Devido à presença de ácido fosfórico na sua composição, esperava-se uma maior dissolução mineral da dentina, mas a baixa concentração deste ácido no refrigerante (cerca de 0,1%) (Addy, Absi, Adams <sup>71</sup> 1987), pode explicar a menor alteração na superfície da dentina erosionada. Por outro lado, o ácido cítrico é uma solução ácida simples, reproduzível e barata frequentemente utilizada. O ácido cítrico contém três grupos carboxila e íons  $H^+$  para interagir com o substrato e produzir dissolução mineral (Featherstone, Lussi <sup>72</sup> 2006; Barbour et al. <sup>73</sup> 2003).

Embora essas duas substâncias sejam freqüentemente utilizadas para produzir alterações erosivas, o ácido cítrico apresentou maior poder erosivo. Esse fato pode ser explicado pela composição da solução erosiva. A solução de ácido cítrico não apresenta outros componentes em sua composição (Scaramucci et al. <sup>74</sup> 2011). O refrigerante apresenta outros componentes que podem interferir no seu

poder erosivo, reduzindo a perda mineral. Além disso, o pH da solução ácida desempenha um papel importante no desafio erosivo. Sabe-se que o pH da solução ácida é o principal preditor de desmineralização erosiva ( Jensdottir et al. <sup>75</sup> 2006), o que aumenta a taxa de progressão da erosão. Assim, o ácido cítrico com um pH menor do que o refrigerante, juntamente com o maior tempo de exposição, aumentou a progressão da erosão, promovendo uma maior dissolução mineral.

Assim, nós especulamos que o pH mais baixo associado ao maior tempo de exposição da solução de ácido cítrico promoveu uma maior taxa de desmineralização com um aumento da exposição das fibrilas de colágeno desnaturada, comprometendo o bom desempenho dos sistemas adesivos. Estas discrepâncias na infiltração-desmineralização também podem ser observadas pelo aumento da deposição de nitrato de prata na camada híbrida independente do sistema adesivo utilizado para a dentina erodida com ácido cítrico.

Quando foi aplicado o *primer* contendo proantocianidina existiu uma melhora das propriedades adesivas do substrato dentinário erosionado. As proantocianidinas são compostos polifenólicos naturais que são amplamente utilizados como suplementos alimentares. Possuem capacidade de eliminação de radicais livres, alta afinidade proteica e com o potencial antioxidante, além de melhorar as propriedades mecânicas do colágeno da dentina (Castellan et al. <sup>76</sup> 2010; Leme-Kraus et al. <sup>77</sup> 2016) através de diferentes mecanismos de interação: ligação covalente, iônica, pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. As proteínas ricas em prolina, como o colágeno, tem uma afinidade extremamente elevada com a proantociandina (Hagerman, Butler <sup>78</sup> 1981), formando um complexo prolina-proantociandina (Pierpoint <sup>79</sup> 1969; Loomis <sup>80</sup> 1974; Han et al. <sup>81</sup> 2003). Esta interação ocorre principalmente entre os grupos carbonila dos aminoácidos do colágeno, como a lisina, e os grupamentos hidroxila da proantocianidina. Deste modo, o aumento da quantidade de fibrilas de colágeno expostas na dentina erosionada devido à desmineralização, com melhoria das propriedades mecânicas após a aplicação do iniciador de proantociandina, poderia justificar a melhoria de nossos resultados.

A riboflavina (vitamina B2) foi testada em dentina sadia como agente reticular de colágeno em conjunto com luz UVA ou lâmpadas de LED com sucesso (Cova et al. <sup>21</sup> 2011), aumentando as propriedades mecânicas, estabilidade e resistência à degradação do colágeno dentinário (Fawzy et al. <sup>82</sup> 2012) pelo princípio da

reticulação foto-oxidativa. A radiação UVA provoca a libertação de espécies reativas de oxigênio que podem induzir a formação de ligações cruzadas covalentes através da oxidação (Sionkowska<sup>83</sup> 2006). As espécies reativas de oxigênio podem induzir a formação de novas ligações covalentes e fortes reticulações com o colágeno (Sionkowska<sup>83</sup> 2006). Isto ocorre através da ligação dos grupos funcionais hidroxilo na riboflavina a prolina e/ou lisina no colágeno (Wollensak et al.<sup>84</sup> 2007).

Sabe-se que durante o desafio erosivo, a desmineralização é acompanhada pela perda significativa de mineral e perda da periodicidade do colágeno, (Deyhle et al.<sup>85</sup> 2011) semelhante ao que ocorre com a cárie (Tjaderhane et al.<sup>13</sup> 1998). A perda de periodicidade do colágeno na dentina desmineralizada pode ser atribuída à atividade de telopeptídeos das MMPs endógenas ou salivares e/ou das cisteínas catepsinas (Tjaderhane et al.<sup>10</sup> 2015). Espera-se que estes espaços produzidos pela perda mineral e pela perda de periodicidade do colágeno na dentina erosionada sejam ocupados por água. Deste modo, os agentes de reticulação alteram a dinâmica da água do tecido, deslocando a água e removendo os proteoglicanos estreitamente ligados às fibrilas de colágeno (em especial as proantocianidinas), favorecendo a difusão dos monômeros resinosos (Mazzoni et al.<sup>86</sup> 2008) dentro dos espaços interfibrilares, bem como maior acessibilidade às fibrilas de colágeno (Leme-Kraus et al.<sup>77</sup> 2016).

A utilização dos *primers* contendo inibidores de MMPs foi uma alternativa interessante quando incorporados ao protocolo de adesão em dentina erosionada (Sabatini, Pashley<sup>87</sup> 2014; Francisconi-dos-Rios et al.<sup>88</sup> 2015). Mas isso vai de encontro à preferência dos clínicos pela simplificação da técnica. Por isso foi pensado na inclusão de inibidores de MMPs no agente de condicionamento.

Quando utilizamos o ácido fosfórico como veículo dos agentes inibidores de MMPs o condicionador ácido mostrou ser uma boa alternativa, devido ao potencial dos agentes terapêuticos aqui estudados no que diz respeito às suas capacidades para inibir as MMPs e as cisteínas catepsinas. (Kanca<sup>89</sup> 1997; Botelho<sup>90</sup> 2005; Nishitani et al.<sup>91</sup> 2006; Skovron et al.<sup>92</sup> 2010; Tjaderhane et al.<sup>10</sup> 2015) o que pode explicar o aumento da resistência de união.

O efeito de inativação enzimática da CHX é atribuído à origem anfipática de sua molécula que pode se ligar a várias proteínas por um mecanismo de quelação



(Negrelo Newton et al. <sup>93</sup> 2004). Através de um mecanismo semelhante, sugere-se que o CHX impede a ligação de íons tais como  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  à estrutura das MMPs, inibindo assim a sua atividade catalítica (De Munck et al. <sup>94</sup> 2009). Além disso, o CHX apresenta propriedades catiônicas com forte afinidade para estruturas orgânicas (colágeno) e inorgânicas (hidroxiapatita) na dentina, especialmente quando aplicadas após ataque ácido (Iskander et al. <sup>95</sup> 2015). Sabe-se que os géis de ácido fosfórico contendo CHX são eficazes na preservação de interfaces resina-dentina (Stanislawczuk et al. <sup>96</sup> 2009; Stanislawczuk et al. <sup>97</sup> 2011; Loguercio et al. <sup>98</sup> 2016) apesar do curto tempo de ação na estrutura dentária. Sabe-se que CHX tem um efeito inibitório de MMPs, mesmo após um tempo de aplicação de 10 s (Tezvergil-Mutluay et al. <sup>99</sup> 2011).

Vários fatores podem justificar o bom desempenho do agente condicionador contendo CHX. A maior porosidade da matriz dentinária erosionada pode beneficiar-se do pré-tratamento com CHX, pois permite uma maior penetração nas camadas mais profundas susceptíveis à degradação por MMPs. Além disso, quando a solução de CHX é aplicada à dentina desmineralizada, ela pode difundir-se para os espaços cheios de água que corresponde a 65% dessa matriz (Carvalho et al. <sup>100</sup> 1996). Ao fazer isso, a CHX se liga a fibrilas de colágeno expostas e tende a permanecer presa dentro dos espaços interfibrilar entre as fibrilas de colágeno. O que resulta em um aumento de mais de 8 vezes na captação de CHX por parte de matrizes desmineralizadas (Kin et al. <sup>101</sup> 2010).

Adicionalmente, sabe-se que CHX pode se ligar eletrostaticamente a grupos carboxilo negativos no colágeno e também pode formar pontes de hidrogênio com grupos carboxilo, especialmente em dentina desmineralizada. Embora os géis ácidos contendo CHX tenham mostrado resultados promissores, a utilização de um gel de ácido fosfórico com agentes reticuladores de colágeno (PA) foi idealizado devido as boas propriedades de reticulação.

Apesar da redução significativa da NI, nenhum dos inibidores de MMPs produziu uma interface livre de nano-infiltração uma vez que os protocolos aqui testados não podem alterar a natureza hidrofílica do adesivo, melhorar a evaporação de água/solvente e/ou produzir interfaces adesivas menos permeáveis, que são parâmetros importantes para NI (Hashimoto et al. <sup>102</sup> 2002; Cadenaro et al. <sup>103</sup> 2005; Yiu et al. <sup>104</sup> 2005).

Um elevado grau de conversão do adesivo é crítico para produzir um adequado polímero reticulado dentro da camada híbrida e também proporcionar interfaces adesivas menos propensas à degradação (Hashimoto et al. <sup>102</sup> 2002; Cadenaro et al. <sup>103</sup> 2005; Hass et al. <sup>105</sup> 2012). O aumento do GC de dois de três adesivos testados pode ser atribuído às melhorias das propriedades biomecânicas do colágeno na matriz erosionada. Porém, o pobre desempenho do PBE pode ser justificado pela composição diferente deste adesivo. Apesar da acetona ter uma maior pressão de vapor do que o etanol e a água (Pashley et al. <sup>106</sup> 1998), o que teoricamente resulta numa melhor evaporação da água devido ao "efeito azeotrópico" (Moszner et al. <sup>107</sup> 2005) ou "efeito de perseguição da água" (Jacobsen, Soderholm <sup>108</sup> 1995) pela acetona. Na prática, o PBE requer um tempo de evaporação mais longo do que o recomendado pelo respectivo fabricante (Luque-Martinez et al. <sup>109</sup> 2014), pois a rápida evaporação da acetona aumenta a concentração de monômeros no sistema adesivo (Miettinen et al. <sup>110</sup> 1997), o que diminui a pressão de vapor dos solventes residuais, tornando mais difícil a evaporação da água residual (Miettinen et al. <sup>110</sup> 1997; Van Landuyt et al. <sup>111</sup> 2005).

De fato, Cho e Dicknes (Cho, Dickens <sup>112</sup> 2004) mostraram que um teor elevado de acetona nos sistemas adesivos pode ser difícil de evaporar, deixando solvente residual no adesivo, o que resulta em poros na camada adesiva fotopolimerizada. Além disso, a solução livre de HEMA não forma uma camada adesiva de espessura uniforme devido a uma evaporação inicial muito rápida da acetona (Platt et al. <sup>113</sup> 2001), não permitindo assim tempo suficiente para que os monômeros infiltrem adequadamente à dentina.

Realmente o processo de manutenção das interfaces adesivas envolve uma sequência de eventos, que ainda não podem ser completamente compreendidos. Contudo, sabemos que esses eventos dependem da degradação polimérica, condição inerente dos sistemas adesivos, seguida da degradação da matriz colágena (Reis et al. <sup>114</sup> 2013). Por mais que o uso dos agentes reticuladores não altere a natureza dos sistemas adesivos, a sua inclusão parece interessante devido a melhora das propriedades do colágeno e por reduzirem a atividade colagenolítica por proteases, o que minimiza e retarda a degradação destas interfaces ao longo do tempo. Futuros estudos clínicos devem ser conduzidos para averiguar o potencial destes agentes em aumentar a longevidade de restaurações adesivas.

## 6. CONCLUSÃO

- Sistemas adesivos universais quando aplicados em dentina erosionada não apresentaram diferença nos valores de  $\mu$ TBS independente da estratégia adesiva utilizada.
- As propriedades adesivas em dentina erosionada são influenciadas pelos diferentes protocolos laboratoriais para produzir erosão.
- O uso de agentes reticuladores de colágeno (*primers*) melhorou  $\mu$ TBS, produziu uma significativa redução da nanoinfiltração e manteve ou melhorou o grau de conversão na interface resina-dentina erosionada.
- A utilização de dois inibidores de proteases contidas em ácido fosfórico incrementou a  $\mu$ TBS, diminuiu a nanoinfiltração e melhorou o grau de conversão para SBU e TEU.

## REFERÊNCIAS

1. Salas MM, Nascimento GG, Huysmans MC, Demarco FF. Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis. *J Dent.* 2015;43(1):42-50.
2. Bartlett DW, Lussi A, West NX, Bouchard P, Sanz M, Bourgeois D. Prevalence of tooth wear on buccal and lingual surfaces and possible risk factors in young European adults. *J Dent.* 2013;41(11):1007-1013.
3. Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2 ( Pt 2)):151-155.
4. Prati C, Montebugnoli L, Suppa P, Valdre G, Mongiorgi R. Permeability and morphology of dentin after erosion induced by acidic drinks. *J Periodontol.* 2003;74(4):428-436.
5. Zimmerli B, De Munck J, Lussi A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Long-term bonding to eroded dentin requires superficial bur preparation. *Clin Oral Investig.* 2012;16(5):1451-1461.
6. Gillam DG, Seo HS, Bulman JS, Newman HN. Perceptions of dentine hypersensitivity in a general practice population. *J Oral Rehabil.* 1999;26(9):710-714.
7. West NX, Sanz M, Lussi A, Bartlett D, Bouchard P, Bourgeois D. Prevalence of dentine hypersensitivity and study of associated factors: a European population-based cross-sectional study. *J Dent.* 2013;41(10):841-851.
8. Carvalho TS, Colon P, Ganss C, Huysmans MC, Lussi A, Schlueter N, et al. Consensus Report of the European Federation of Conservative Dentistry: Erosive tooth wear diagnosis and management. *Swiss Dent J.* 2016;126(4):342-346.
9. Cruz JB LT, Tedesco TK, Guglielmi Cde A, Raggio DP. Eroded dentin does not jeopardize the bond strength of adhesive restorative materials. *Braz Oral Res.* 2012;26(4):306 - 312.
10. Tjaderhane L, Buzalaf MA, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'. *Caries Res.* 2015;49(3):193-208.
11. Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Niehof J, Ten Cate JM. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *J Dent Res.* 1994;73(9):1523-1529.
12. Ganss C, Klimek J, Schaffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2001;35(5):325-330.
13. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998;77(8):1622-1629.
14. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004;83(3):216-221.

15. Liu Y, Tjaderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res.* 2011;90(8):953-968.
16. Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res.* 2012;24(2):72-76.
17. Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent.* 2009;37(12):994-998.
18. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res.* 2010;89(5):468-472.
19. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(4):411-416.
20. Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;80(1):268-272.
21. Cova A, Breschi L, Nato F, Ruggeri A, Jr., Carrilho M, Tjaderhane L, et al. Effect of UVA-activated riboflavin on dentin bonding. *J Dent Res.* 2011;90(12):1439-1445.
22. Bedran-Russo AK, Yoo KJ, Ema KC, Pashley DH. Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. *J Dent Res.* 2009;88(9):807-811.
23. Al-Ammar A, Drummond JL, Bedran-Russo AK. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;91(1):419-424.
24. Macedo GV, Yamauchi M, Bedran-Russo AK. Effects of chemical cross-linkers on caries-affected dentin bonding. *J Dent Res.* 2009;88(12):1096-1100.
25. Mazzoni A, Angeloni V, Apolonio FM, Scotti N, Tjaderhane L, Tezvergil-Mutluay A, et al. Effect of carbodiimide (EDC) on the bond stability of etch-and-rinse adhesive systems. *Dent Mater.* 2013;29(10):1040-1047.
26. Mazzoni A, Apolonio FM, Saboia VP, Santi S, Angeloni V, Checchi V, et al. Carbodiimide inactivation of MMPs and effect on dentin bonding. *J Dent Res.* 2014;93(3):263-268.
27. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee KA, Cadenaro M, Turco G, et al. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. *Dent Mater.* 2014;30(2):227-233.
28. Hass V, Luque-Martinez I, Munoz MA, Reyes MF, Abuna G, Sinhoreti MA, et al. The effect of proanthocyanidin-containing 10% phosphoric acid on bonding properties and MMP inhibition. *Dent Mater.* 2016;32(3):468-475.
29. Hass V, Luque-Martinez IV, Gutierrez MF, Moreira CG, Gotti VB, Feitosa VP, et al. Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dent Mater.* 2016;32(6):732-741.

30. Reis A, Carrilho M, Breschi L, Loguercio AD. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. *Oper Dent.* 2013;38(4):E1-E25.
31. Oliveira DC, Souza-Junior EJ, Prieto LT, Coppini EK, Maia RR, Paulillo LA. Color stability and polymerization behavior of direct esthetic restorations. *J Esthet Restor Dent.* 2014;26(4):288-295.
32. Cruz JB, Bonini G, Lenzi TL, Imparato JC, Raggio DP. Bonding stability of adhesive systems to eroded dentin. *Braz Oral Res.* 2015;29(1):1-6.
33. Hanabusa M, Mine A, Kuboki T, Momoi Y, Van Ende A, Van Meerbeek B, et al. Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. *J Dent.* 2012;40(6):475-484.
34. Perdigao J, Sezinando A, Monteiro PC. Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. *Am J Dent.* 2012;25(3):153-158.
35. Munoz MA, Luque I, Hass V, Reis A, Loguercio AD, Bombarda NH. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent.* 2013;41(5):404-411.
36. Rosa WL, Piva E, Silva AF. Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2015;43(7):765-776.
37. Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:69-77.
38. Forgerini TV, Ribeiro JF, Rocha RO, Soares FZ, Lenzi TL. Role of Etching Mode on Bonding Longevity of a Universal Adhesive to Eroded Dentin. *J Adhes Dent.* 2017;19(1):69-75.
39. Flury S, Koch T, Peutzfeldt A, Lussi A, Ganss C. The effect of a tin-containing fluoride mouth rinse on the bond between resin composite and erosively demineralised dentin. *Clin Oral Investig.* 2013;17(1):217-225.
40. Perdigao J, Geraldeli S, Carmo AR, Dutra HR. In vivo influence of residual moisture on microtensile bond strengths of one-bottle adhesives. *J Esthet Restor Dent.* 2002;14(1):31-38.
41. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent.* 2002;30(7-8):371-382.
42. Reis A, Grande RH, Oliveira GM, Lopes GC, Loguercio AD. A 2-year evaluation of moisture on microtensile bond strength and nanoleakage. *Dent Mater.* 2007;23(7):862-870.
43. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-675.
44. Magalhaes AC, Levy FM, Souza BM, Cardoso CA, Cassiano LP, Pessan JP, et al. Inhibition of tooth erosion by milk containing different fluoride concentrations: an in vitro study. *J Dent.* 2014;42(4):498-502.
45. Zarella BL, Cardoso CA, Pela VT, Kato MT, Tjaderhane L, Buzalaf MA. The role of matrix metalloproteinases and cysteine-cathepsins on the progression of dentine erosion. *Arch Oral Biol.* 2015;60(9):1340-1345.

46. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent*. 2003;28(3):215-235.
47. Kanca J, 3rd. Resin bonding to wet substrate. II. Bonding to enamel. *Quintessence Int*. 1992;23(9):625-627.
48. Kenshima S, Reis A, Uceda-Gomez N, Tancredo Lde L, Filho LE, Nogueira FN, et al. Effect of smear layer thickness and pH of self-etching adhesive systems on the bond strength and gap formation to dentin. *J Adhes Dent*. 2005;7(2):117-126.
49. Proenca JP, Polido M, Osorio E, Erhardt MC, Aguilera FS, Garcia-Godoy F, et al. Dentin regional bond strength of self-etch and total-etch adhesive systems. *Dent Mater*. 2007;23(12):1542-1548.
50. Nunes TG, Ceballos L, Osorio R, Toledano M. Spatially resolved photopolymerization kinetics and oxygen inhibition in dental adhesives. *Biomaterials*. 2005;26(14):1809-1817.
51. Perdigao J, Kose C, Mena-Serrano AP, De Paula EA, Tay LY, Reis A, et al. A new universal simplified adhesive: 18-month clinical evaluation. *Oper Dent*. 2014;39(2):113-127.
52. Wagner A, Wendler M, Petschelt A, Belli R, Lohbauer U. Bonding performance of universal adhesives in different etching modes. *J Dent*. 2014;42(7):800-807.
53. Lenzi TL, Soares FZ, Raggio DP, Pereira GK, Rocha RO. Dry-bonding Etch-and-Rinse Strategy Improves Bond Longevity of a Universal Adhesive to Sound and Artificially-induced Caries-affected Primary Dentin. *J Adhes Dent*. 2016;18(6):475-482.
54. Breschi L, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Ellis TH, Stangel I. High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic and citric acid. *Dent Mater*. 2002;18(1):26-35.
55. Wang Y, Spencer P. Continuing etching of an all-in-one adhesive in wet dentin tubules. *J Dent Res*. 2005;84(4):350-354.
56. Grenby TH. Lessening dental erosive potential by product modification. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(2 ( Pt 2)):221-228.
57. Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res*. 1999;33(1):81-87.
58. Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. *Arch Oral Biol*. 2005;50(6):541-552.
59. Murrell S, Marshall TA, Moynihan PJ, Qian F, Wefel JS. Comparison of in vitro erosion potentials between beverages available in the United Kingdom and the United States. *J Dent*. 2010;38(4):284-289.
60. Jensdottir T, Holbrook P, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A. Immediate erosive potential of cola drinks and orange juices. *J Dent Res*. 2006;85(3):226-230.
61. Fact file: XENO®Select. *Tandartspraktijk*. 2014;35(5):50-51.

62. Maeda T, Yamaguchi K, Takamizawa T, Rikuta A, Tsubota K, Ando S, et al. pH changes of self-etching primers mixed with powdered dentine. *J Dent*. 2008;36(8):606-610.
63. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2011;27(1):17-28.
64. Zhou L, Wang Y, Yang H, Guo J, Tay FR, Huang C. Effect of chemical interaction on the bonding strengths of self-etching adhesives to deproteinised dentine. *J Dent*. 2015;43(8):973-980.
65. Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, et al. Self-assembled Nano-layering at the Adhesive interface. *J Dent Res*. 2012;91(4):376-381.
66. Yoshihara K, Yoshida Y, Nagaoka N, Fukegawa D, Hayakawa S, Mine A, et al. Nano-controlled molecular interaction at adhesive interfaces for hard tissue reconstruction. *Acta Biomater*. 2010;6(9):3573-3582.
67. Fukegawa D, Hayakawa S, Yoshida Y, Suzuki K, Osaka A, Van Meerbeek B. Chemical interaction of phosphoric acid ester with hydroxyapatite. *J Dent Res*. 2006;85(10):941-944.
68. Hass V, de Paula AM, Parreiras S, Gutierrez MF, Luque-Martinez I, de Paris Matos T, et al. Degradation of dentin-bonded interfaces treated with collagen cross-linking agents in a cariogenic oral environment: An in situ study. *J Dent*. 2016;49:60-67.
69. Daood U, Swee Heng C, Neo Chiew Lian J, Fawzy AS. In vitro analysis of riboflavin-modified, experimental, two-step etch-and-rinse dentin adhesive: Fourier transform infrared spectroscopy and micro-Raman studies. *Int J Oral Sci*. 2015;7(2):110-124.
70. Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:69-77.
71. Addy M, Absi, EG, Adams D. Dentine hypersensitivity. The effects in vitro of acids and dietary substances on root-planed and burred dentine. *J Clin Periodont*. 1987;14(5):274-279.
72. Shellis PR, Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:163-179.
73. Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel dissolution in citric acid as a function of pH in the range 2.30 £ pH £ 6.30 – a nanoindentation study. *Eur J Oral Sci*. 2003;111(3):258-262.
74. Scaramucci T, Hara AT, Zero DT, Ferreira SS, Aoki IV, Sobral MA. Development of an orange juice surrogate for the study of dental erosion. *Braz Dent J*. 2011;22(6):473-8.
75. Jensdottir T, Holbrook P, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A. Immediate erosive potential of cola drinks and orange juices. *J Dent Res*. 2006;85(3):226-30.



76. Castellan CS, Pereira PN, Grande RH, Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent Mater.* 2010;26(10):968-973.
77. Leme-Kraus AA, Aydin B, Vidal CM, Phansalkar RM, Nam JW, McAlpine J, et al. Biostability of the Proanthocyanidins-Dentin Complex and Adhesion Studies. *J Dent Res.* 2017;96(4):406-412.
78. Hagerman AE, Butler LG. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J Biol Chem.* 1981;256(9):4494-4497.
79. Pierpoint WS. o-Quinones formed in plant extracts. Their reaction with bovine serum albumin. *Biochem J.* 1969;112(5):619-629.
80. Loomis WD. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol.* 1974;31:528-544.
81. Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res A.* 2003;65(1):118-124.
82. Fawzy A, Nitisusanta L, Iqbal K, Daood U, Beng LT, Neo J. Characterization of riboflavin-modified dentin collagen matrix. *J Dent Res.* 2012;91(11):1049-1054.
83. Sionkowska A. Flash photolysis and pulse radiolysis studies on collagen Type I in acetic acid solution. *J Photochem Photobiol B.* 2006;84(1):38-45.
84. Wollensak G, Aurich H, Pham DT, Wirbelauer C. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(3):516-521.
85. Deyhle H, Bunk O, Muller B. Nanostructure of healthy and caries-affected human teeth. *Nanomedicine.* 2011;7(6):694-701.
86. Mazzoni A, Pashley DH, Ruggeri A, Jr., Vita F, Falconi M, Di Lenarda R, et al. Adhesion to chondroitinase ABC treated dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;86(1):228-236.
87. Sabatini C, Pashley DH. Mechanisms regulating the degradation of dentin matrices by endogenous dentin proteases and their role in dental adhesion. A review. *Am J Dent.* 2014;27(4):203-214.
88. Francisconi-dos-Rios LF, Casas-Apayco LC, Calabria MP, Francisconi PA, Borges AF, Wang L. Role of chlorhexidine in bond strength to artificially eroded dentin over time. *J Adhes Dent.* 2015;17(2):133-139.
89. Kanca J, 3rd. One step bond strength to enamel and dentin. *Am J Dent.* 1997;10(1):5-8.
90. Botelho MG. The antimicrobial activity of a dentin conditioner combined with antibacterial agents. *Oper Dent.* 2005;30(1):75-82.
91. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(2):160-166.
92. Skovron L, Kogeo D, Gordillo LA, Meier MM, Gomes OM, Reis A, et al. Effects of immersion time and frequency of water exchange on durability of etch-and-rinse adhesive. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;95(2):339-346.

93. Negrelo Newton AP, Cadena SM, Merlin Rocha ME, Skare Carnieri EG, Martinelli de Oliveira MB. New data on biological effects of chlorhexidine: Fe<sup>2+</sup> induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition. *Toxicol Lett.* 2004;151(3):407-416.
94. De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res.* 2009;88(12):1101-1106.
95. Iskander M, Elkassas D, Mohsen MA. Effect of two matrix metalloproteinase inhibitors on the color stability of a nanofilled resin composite. *Oper Dent.* 2015;40(1):E11-20.
96. Stanislawczuk R, Amaral RC, Zander-Grande C, Gagler D, Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin bonds. *Oper Dent.* 2009;34(4):481-490.
97. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *J Dent.* 2011;39(1):40-47.
98. Loguercio AD, Hass V, Gutierrez MF, Luque-Martinez IV, Szezs A, Stanislawczuk R, et al. Five-year Effects of Chlorhexidine on the In Vitro Durability of Resin/Dentin Interfaces. *J Adhes Dent.* 2016;18(1):35-42.
99. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Gu LS, Zhang K, Agee KA, Carvalho RM, et al. The anti-MMP activity of benzalkonium chloride. *J Dent.* 2011;39(1):57-64.
100. Carvalho RM, Yoshiyama M, Brewer PD, Pashley DH. Dimensional changes of demineralized human dentine during preparation for scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol.* 1996;41(4):379-386.
101. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, et al. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dent Mater.* 2010;26(8):771-778.
102. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Sano H, Tay FR, Oguchi H, et al. Over-etching effects on micro-tensile bond strength and failure patterns for two dentin bonding systems. *J Dent.* 2002;30(2-3):99-105.
103. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(6):525-530.
104. Yiu CK, Pashley EL, Hiraishi N, King NM, Goracci C, Ferrari M, et al. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. *Biomaterials.* 2005;26(34):6863-6872.
105. Hass V, Luque-Martinez I, Sabino NB, Loguercio AD, Reis A. Prolonged exposure times of one-step self-etch adhesives on adhesive properties and durability of dentine bonds. *J Dent.* 2012;40(12):1090-1102.
106. Pashley EL, Zhang Y, Lockwood PE, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effects of HEMA on water evaporation from water-HEMA mixtures. *Dent Mater.* 1998;14(1):6-10.
107. Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater.* 2005;21(10):895-910.

108. Jacobsen TSK. Some effects of water on dentin bonding. *Dent Mater.* 1995;11(2):132-136.
109. Luque-Martinez IV, Perdigao J, Munoz MA, Sezinando A, Reis A, Loguercio AD. Effects of solvent evaporation time on immediate adhesive properties of universal adhesives to dentin. *Dent Mater.* 2014;30(10):1126-1135.
110. Miettinen VM, Vallittu PK, Docent DT. Water sorption and solubility of glass fiber-reinforced denture polymethyl methacrylate resin. *J Prosthet Dent.* 1997;77(5):531-534.
111. Van Landuyt KL, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, et al. Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. *J Dent Res.* 2005;84(2):183-188.
112. Cho BH, Dickens SH. Effects of the acetone content of single solution dentin bonding agents on the adhesive layer thickness and the microtensile bond strength. *Dent Mater.* 2004;20(2):107-115.
113. Platt JA, Almeida J, Gonzalez-Cabezas C, Rhodes B, Moore BK. The effect of double adhesive application on the shear bond strength to dentin of compomers using three one-bottle adhesive systems. *Oper Dent.* 2001;26(3):313-317.
114. Reis A, Carrilho M, Breschi L, Loguercio AD. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. *Oper Dent.* 2013;38(4):E1-e25.

## **ANEXO**

TERMO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
PONTA GROSSA - UEPG



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito do uso de agentes reticuladores de colágeno na dentina erosionada: Caracterização e procedimentos adesivos.

**Pesquisador:** João Carlos Gomes

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 58125416.0.0000.0105

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual de Ponta Grossa

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.652.555

#### **Apresentação do Projeto:**

Efeito do uso de agentes reticuladores de colágeno na dentina erosionada: Caracterização e procedimentos adesivos.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Caracterização da superfície erosionada, bem como avaliar a capacidade de reduzir o desgaste erosivo de diferentes agentes de ligação cruzada em dentina erosionada e sua capacidade de influenciar nas propriedades adesivas imediatas e ao longo do tempo de diferentes sistemas adesivos

Objetivo Secundário:

- Caracterização da superfície erosionada e tratada com agentes reticulares;
- Avaliar a influência da aplicação de agentes reticulares previamente ao procedimento restaurador na resistência de união, nanoinfiltração e grau de conversão em dentina erosionada.
- Avaliar a influência da aplicação de agentes reticulares previamente ao procedimento restaurador na resistência de união, nanoinfiltração e

**Endereço:** Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvararanas, Bloco M, Sala 100.

**Bairro:** Uvaranas **CEP:** 84.030-900

**UF:** PR **Município:** PONTA GROSSA

**Telefone:** (42)3220-3108

**E-mail:** coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 1.652.555

avaliação de atividades de MMP Imediata e após seis meses

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Não haverá riscos para os indivíduos

Benefícios:

Uma técnica para melhorar a resistência de união a dentina erosionada

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os experimentos que compõem o presente trabalho são: Experimento 1: Caracterização da superfície erosionada e tratada com agentes

reticuladores; Experimento 2: Avaliação do uso de agentes reticuladores de colágeno nas propriedades adesivas imediatas à dentina erosionada:

Resistência de união, nanoinfiltração, grau de conversão do adesivo na camada híbrida; Experimento 3:

Avaliação da longevidade nas propriedades

de união à dentina erosionada após uso de agentes reticuladores de colágeno: Resistência de união, nanoinfiltração, atividade de MMPs na camada

híbrida

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Em anexo e de acordo com a norma 466

**Recomendações:**

Solicita-se ao final do projeto o envio via plataforma brasil do relatório final por notificação para a Coep para evitar pendências para com a Propesp

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Solicita-se ao final do projeto o envio via plataforma brasil do relatório final por notificação para a Coep para evitar pendências para com a Propesp

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	26/07/2016		Aceito

**Endereço:** Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 100.

**Bairro:** Uvaranas **CEP:** 84.030-900

**UF:** PR **Município:** PONTA GROSSA

**Telefone:** (42)3220-3108

**E-mail:** coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 1.652.555

Básicas do Projeto	ETO_615369.pdf	22:51:41		Aceito
Folha de Rosto	folhaderostostkaner.pdf	26/07/2016 22:50:12	João Carlos Gomes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetocoeplibiana.doc	26/07/2016 22:16:36	João Carlos Gomes	Aceito
Outros	TermobancodentesFabiana.pdf	26/07/2016 22:05:17	João Carlos Gomes	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PONTA GROSSA, 28 de Julho de 2016

---

**Assinado por:**  
**ULISSES COELHO**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvarararas, Bloco M, Sala 100.  
**Bairro:** Uvarararas **CEP:** 84.030-900  
**UF:** PR **Município:** PONTA GROSSA  
**Telefone:** (42)3220-3108 **E-mail:** coep@uepg.br