

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA**

MARIO FELIPE GUTIÉRREZ REYES

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZINCO E COBRE EM
DOIS SISTEMAS ADESIVOS UNIVERSAIS, NAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS,
MECÂNICAS E ADESIVAS À DENTINA HÍGIDA E ARTIFICIALMENTE AFETADA
POR CÁRIE**

**PONTA GROSSA
2018**

MARIO FELIPE GUTIÉRREZ REYES

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZINCO E COBRE EM
DOIS SISTEMAS ADESIVOS UNIVERSAIS, NAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS,
MECÂNICAS E ADESIVAS À DENTINA HÍGIDA E ARTIFICIALMENTE AFETADA
POR CÁRIE**

Tese apresentada para obtenção do título Doutor em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Doutorado em Odontologia - Área de Concentração: Clínica Integrada. Linha de Pesquisa: Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais Odontológicos

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Jessica Mendes Nadal

PONTA GROSSA

2018

G984 Gutierrez Reyes, Mario Felipe
Efeito da incorporação de nanopartículas de zinco e cobre em dois sistemas adesivos universais, nas propriedades biológicas, mecânicas e adesivas à dentina hígida e artificialmente afetada por cárie/ Mario Felipe Gutierrez Reyes. Ponta Grossa, 2018.

110f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia - Área de Concentração Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

Coorientadora: Profa. Dra. Jessica Nadal

1. Zinco. 2. Cobre. 3. Nanopartículas. 4. Adesivos universais. 5. Dentina. I. Farago, Paulo Vitor. II. Nadal, Jessica. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Clínica Integrada. IV. T.

CDD: 617.6

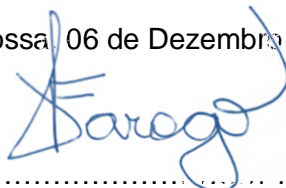
TERMO DE APROVAÇÃO

MARIO FELIPE GUTIÉRREZ REYES

EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZINCO E COBRE EM DOIS SISTEMAS ADESIVOS UNIVERSAIS, NAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS, MECÂNICAS E ADESIVAS À DENTINA HÍGIDA E ARTIFICIALMENTE AFETADA POR CÁRIE

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 em Clínica Integrada

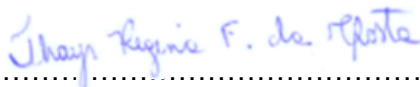
Ponta Grossa, 06 de Dezembro de 2018




.....
Prof. Dr. Paulo Vitor Farago – Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG



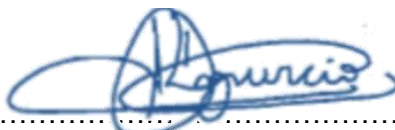
.....
Prof^a. Dr^a. Gabriela Queiroz de Melo Monteiro
Universidade de Pernambuco - UPE



.....
Prof^a. Dr^a. Thays Costa
Universidade Federal do Paraná - UFPR



.....
Prof. Dr. Eduardo Fernández Godoy
Universidade do Chile - UdeCh



.....
Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

DADOS CURRICULARES

MARIO FELIPE GUTIÉRREZ REYES

NASCIMENTO	26.11.1983 Santiago - Chile
FILIAÇÃO	Jeannette del Carmen Reyes García Mario Segundo Gutiérrez Cortés
2002 – 2007	Curso de Graduação em Odontologia da Universidad de Chile (UCh). Santiago – Chile.
2011 – 2013	Curso de Especialização em Reabilitação Oral, Universidade Finis Terrae (UFT). Santiago – Chile.
2014 – 2016	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), nível de Mestrado em Odontologia - Área de Concentração em Clínica Integrada.
2016 – 2018	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), nível de Doutorado em Odontologia - Área de Concentração em Clínica Integrada.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Jeannette Reyes e Mario Gutiérrez,

Pela sua paciência, por aceitar que a distância ia nos separar por mais um tempo mas que tudo valeria a pena. Por me ensinar o caminho certo desde sempre, e por me demonstrar que apenas os sonhadores cumprem os seus sonhos.

Aos meus irmãos Diego Gutiérrez Reyes e Ariel Gutiérrez Reyes, por sempre ser o apoio fraterno, por fazer com que a distância não exista e poder dar risadas como se estivéssemos juntos.

Aos meus avós, tios e primos, por nunca deixar de me apoiar, e por sempre acreditar e apoiar cada passo que eu dou.

A Florencia Reyes Suárez, minha afilhada, minha prima, e sobre tudo, a menina dos meus olhos, que me faz não desistir quando tudo parece se opor.

A Deus

Por sempre me mostrar o caminho, por nunca me deixar sozinho e acreditar em mim quando nem eu mesmo acreditava.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, por me aceitar novamente como orientado no Doutorado, pelo apoio e compreensão neste longo caminho. Muito obrigado pela confiança depositada em mim e por acreditar sempre neste novo projeto.

Aos Professores Dr. Alessandro Loguercio e Dr^a. Alessandra Reis, muito obrigado pela paciência, pela confiança, pelo carinho e pela amizade. Agradecerei sempre sua humildade em passar os seus conhecimentos, o incentivo e as oportunidades que vocês sempre me ofereceram.

Gostaria de agradecer ao Brasil, país abençoado por Deus e bonito por natureza, que me acolheu como um deles, e ao povo brasileiro, que sempre me faz sentir em casa.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, e ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Odontologia, na pessoa da sua coordenadora Prof^a. Dr^a. Denise Wambier e do seu vice coordenador Prof. Dr. Alessandro Loguercio.

À Faculdade de Odontologia da Universidade do Chile, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. Jorge Gamonal, pela confiança e mim depositada.

Ao Instituto de Pesquisa em Ciências Odontológicas da Universidade do Chile, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. Germán Manríquez, por me permitir e facilitar em todo momento a realização do meu Mestrado, e pelo apoio sempre.

Ao grupo de Fisiologia da Universidade do Chile, carinhosamente chamado de “FisioTeam”, Professores Doutores Rodolfo Miralles, Saúl Valenzuela, Hugo Santander, Aler Fuentes, Claudia Zúñiga, Rosa Cordova, Carmen Palazzi e Natalia Gamboa, por ser sempre como uma família pra mim, e me aconselhar e ajudar sempre e em todo momento.

A Luisa Alegria, Luján Mendez e Alejandra Nuñez, por ser como umas irmãs, umas grandes parceiras neste longo caminho, e sempre estar dispostas a ajudar.

A Thalita, minha amiga, por ser sempre a felicidade no grupo, e pela sua ajuda inestimável. Você será uma grande pesquisadora sem dúvida alguma.

A Sibelli Parreiras, por ser sempre como uma irmã para mim, por sempre manter seu bom senso de humor, e por me ajudar sempre quando precisei.

A Taise Hanzen, Alexandra de Paula, Elisama Sutil, Adrielly Burey, Fabiana Simas, pela amizade, tempo dedicado e as intenções de sempre ajudar.

Aos meus amigos “*importados*”, Patrício Runnacles, Andrés Dávila.

A Vanessa, Raquel e Milton pelo apoio técnico nos laboratórios, e pela sua amizade.

A todos os professores do Programa de pós-graduação em Odontologia da UEPG que transmitiram seus conhecimentos durante o curso.

Aos funcionários do Programa de pós-graduação em Odontologia da UEPG.

RESUMO

GUTIÉRREZ MF. **Efeito da incorporação de nanopartículas de zinco e cobre em dois sistemas adesivos universais, nas propriedades biológicas, mecânicas e adesivas à dentina hígida e artificialmente afetada por cárie.** [Tese – Doutorado em Odontologia – Área de Concentração Clínica Integrada - Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2018].

Objetivos: Este estudo avaliou o efeito da adição de nanopartículas de óxido de zinco e cobre, em diferentes concentrações, em dois sistemas adesivos universais, nas propriedades biológicas, mecânicas e adesivas à dentina hígida e artificialmente afetada por cárie. *Material e métodos:* Seis sistemas adesivos universais experimentais foram formulados de acordo com a adição de nanopartículas de óxido de zinco e cobre (ZnO/CuNp) (0% zinco/0% cobre [controle], 5% zinco/0,1% cobre, 5% zinco/0,2% cobre) no sistema adesivo Prime&Bond Active [PBA; Dentsply-Sirona] e Ambar Universal [AMB; FGM]. Foi testada a atividade antimicrobiana (AAM) dos adesivos formulados contra *Streptococcus mutans* por meio de ensaios de difusão em ágar, a citotoxicidade (CTX) sobre células Saos-2 e o potencial de inibição de MMP-2, -8 e -9 por meio do teste de fluorescência. Para resistência máxima tração (RMT) e microdureza (MD), as amostras foram testadas depois de 24 h e 28 dias. Para o grau de conversão (GC) *in vitro* as amostras foram construídas e testadas após 24 h por meio de espectrofotometria no infravermelho com Transformação de Fourier (FTIR) e espectroscopia de micro-Raman. Para sorção (SO) e solubilidade (SB), depois de confeccionados os espécimes, eles foram armazenados em água e as propriedades medidas por 28 dias. Para liberação de zinco/cobre (LZC), as amostras foram armazenadas em solução de ácido nítrico a 2% e as propriedades medidas durante 28 dias. O esmalte oclusal de duzentos e dezesseis dentes foi removido e os adesivos foram aplicados na superfície da dentina hígida e artificialmente afetada por cárie, na estratégia convencional e autocondicionante. Depois de restaurações em resina composta, os espécimes foram seccionados longitudinalmente para se obter espécimes (palitos) de resina-dentina (0,8 mm²). Para resistência de união (RU), os espécimes foram testados em tensão a 0,5 mm/min no tempo imediato (IM). Para nanoinfiltração (NI), 2 espécimes de cada dente foram preparados e analisados em MEV e testados no IM. Para microinfiltração (MI), 2 espécimes de cada dente foram preparados e analisados em microscópio confocal e testados no IM. Para GC *in situ*,

2 espécimes foram preparados e analisados sob espectroscopia de micro-Raman. A significância estatística foi predefinida em $\alpha = 0,05$. *Resultados:* A adição de nanopartículas de zinco e cobre adicionou propriedades antimicrobianas aos adesivos em todas as concentrações ($p < 0,05$), sem aumentar a citotoxicidade, ou influenciar negativamente a RMT, MD, GC *in vitro* e GC *in situ* ($p > 0,05$). O efeito da adição de nanopartículas de óxido de zinco e cobre sobre a SO e SB foi dependente do sistema adesivo. LZC elevadas foram observadas em adesivos com maior concentração de nanopartículas de zinco e cobre ($p < 0,05$). No tempo imediato, a adição de nanopartículas de óxido de zinco e cobre não influenciou negativamente os valores de RU ($p > 0,05$), mas diminuiu os valores de NI em todos os grupos ($p < 0,05$), quando aplicados de modo convencional e autocondicionante, em dentina hígida e artificialmente afetada por cárie. Adicionalmente, a combinação de nanopartículas de zinco e cobre mostrou ter atividade anti-MMP -2, -8 e -9. *Conclusão:* A adição de Zn/CuNp em sistemas adesivos universais pode ser uma alternativa para fornecer propriedades antimicrobianas e aumentar a estabilidade das interfaces resina-dentina, tanto hígida quanto artificialmente afetada por cárie, sem riscos biológicos e sem reduzir as propriedades mecânicas.

Palavras-chave: Zinco; Cobre; Nanopartículas; Dentina; Adesivos universais; Propriedades biológicas; Propriedades mecânicas; Propriedades adesivas.

ABSTRACT

GUTIÉRREZ MF. **Effect of inclusion of zinc and copper nanoparticles in two universal adhesive systems on biological and mechanical properties, and the durability of resin–dentine interfaces on sound and artificially caries-affected dentin.** [Thesis – Doctorate in Dentistry – Concentration Area: Integrated Clinic - State University of Ponta Grossa; 2018].

Objectives: This study evaluated the effect of addition of zinc oxide and copper nanoparticles (ZnO/CuNp) in different concentrations into two universal adhesives systems, on biological, mechanical and adhesive properties on sound and artificially caries-affected dentin. *Materials and methods:* ZnO/CuNp (0% [control]; 5/0.1 and 5/0.2 wt%) were added in Prime&Bond Active [PBA; Dentsply-Sirona] and Ambar Universal [AMB; FGM]. The antimicrobial activity (AMA) was evaluated against *Streptococcus mutans*. For cytotoxicity (CTX), Saos-2 cell-line was used, and the anti-MMP -2, -8 and -9 activity of the ZnO/CuNp was evaluated. For ultimate tensile strength (UTS) and microhardness (MH), specimens were tested after 24h and 28d. For *in vitro* degree of conversion (DC), specimens were evaluated after 24h by Fourier Transformed Infrared (FTIR) and micro-Raman spectroscopy. For water sorption (WS) and solubility (So), specimens were tested for 28d. For zinc oxide/copper release (ZnO-CuR), the samples were stored in 2% nitric acid solution and the properties measured for 28d. The occlusal enamel of two hundred and sixteen teeth was removed and the adhesives were applied to the surface of sound and artificially caries-affected dentin, in etch-and-rinse and self-etch strategy. After, composite resin build-ups, specimens were sectioned to obtain resin–dentine sticks. It was evaluated in resin–dentine microtensile bond strength (μ TBS), nanoleakage (NL), microleakage evaluation by confocal laser scanning microscopy (ML) and *in situ* DC after 24h of water storage. ANOVA and Tukey's test were applied ($\alpha = 0.05$). *Results:* The addition of ZnO/CuNp increase AMA when compared to control ($p < 0.05$) without increasing cytotoxicity ($p > 0.05$) or negatively influencing UTS, MH, *in vitro* DC and *in situ* DC ($p > 0.05$). The effect of the addition of ZnO/CuNp on the WS and SO was adhesive system dependent. High ZnO-CuR was observed in adhesives with highest concentration of ZnO/CuNp ($p < 0.05$). μ TBS values were maintaining with ZnO/CuNp addition. However, lower NL ($p < 0.05$) and ML was observed for ZnO/CuNp groups. In addition, ZnO/CuNp present anti-MMP-2, -8 and -9 activity. *Conclusions:* The addition

of ZnO/CuNp in the tested concentrations in universal adhesive systems may be an alternative to provide antimicrobial activity and improves the integrity of the hybrid layer, without jeopardizing biological, adhesives and mechanical properties.

Keywords: Zinc; Copper; Nanoparticles; Dentin; Universal adhesives; Biological properties; Mechanical properties; Bonding properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Adesivos universais utilizados neste estudo.....	32
Figura 2.	Diagrama explicativo das etapas do trabalho.....	35
Figura 3.	Confecção de corpos de prova de adesivo (CPA) para o teste de resistência máxima à tração.....	39
Figura 4.	Sequência para o teste máxima resistência máxima à tração.....	40
Figura 5.	Confecção de corpos de prova de adesivo (CPA) para o teste de microdureza.....	41
Figura 6.	Espectros (FTIR) representativos, obtidos dos sistemas adesivos não polimerizados, e após sua fotoativação.....	43
Figura 7.	Espectrômetro micro-Raman utilizado neste estudo.....	45
Figura 8.	Espectros (micro-Raman) representativos, obtidos dos sistemas adesivos não polimerizados, e após sua fotoativação.....	45
Figura 9.	Preparo da superfície de dentina (desgaste do esmalte oclusal).....	50
Figura 10.	Preparo da superfície de dentina (desgaste do esmalte proximal).....	52
Figura 11.	Estratégia adesiva.....	53
Figura 12.	Restauração dos dentes após aplicação das variáveis adesivas.....	53
Figura 13.	Sequência de corte para a obtenção dos palitos.....	54
Figura 14.	Sequência para o teste de microtração.....	55
Figura 15.	Preparação de amostras para nanoinfiltração.....	57
Figura 16.	Representação da captura da imagem nos canais dos lasers do CSLM	59
Figura 17.	Avaliação de grau de conversão do adesivo, na zona da camada híbrida, na interface de união à dentina.....	61
Figura 18.	Tamanho de partícula medido através de microscopia de força atômica (AFM).....	63

Figura 19.	Histograma de tamanhos de partícula e sua frequência (%), medido através de Zeta Sizer.....	64
Figura 20.	Tamanho de partícula medido através de microscópio eletrônico de varredura por efeito de campo (FEG).....	64
Figura 21.	Análise composicional das nanopartículas de zinco e cobre, obtida por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS).....	65
Figura 22.	Resultados de citotoxicidade das nanopartículas de zinco e cobre, incorporadas em água destilada e nos adesivos experimentais.....	67
Figura 23.	Resultados da atividade anti-MMPs das nanopartículas de óxido de zinco e cobre.....	69
Figura 24.	Liberação de cobre (ppm acumulativo) de todas as condições experimentais, após 28 dias de armazenamento em solução aquosa de 2% de ácido nítrico (Adesivo Prime&Bond Active).....	75
Figura 25.	Liberação de cobre (ppm acumulativo) de todas as condições experimentais, após 28 dias de armazenamento em solução aquosa de 2% de ácido nítrico (Adesivo Ambar Universal).....	75
Figura 26.	Imagens (MEV) representativas da interface de união à dentina hígida e afetada por cárie, obtidas em cada condição experimental, no adesivo Prime&Bond Active.....	80
Figura 27.	Imagens (CSLM) representativas da interface de união à dentina hígida e afetada por cárie, obtidas em cada condição experimental, no adesivo Prime&Bond Active.....	81
Figura 28.	Imagens (MEV) representativas da interface de união à dentina hígida e afetada por cárie, obtidas em cada condição experimental, no adesivo Ambar Universal.....	82
Figura 29.	Imagens (CSLM) representativas da interface de união à dentina	

hígida e afetada por cárie, obtidas em cada condição experimental, no adesivo Ambar Universal.....	83
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características e especificações das nanopartículas de óxido de zinco e cobre.....	30
Tabela 2.	Sistema adesivo utilizado, composição, modo de aplicação e número de lote.....	33
Tabela 3.	Modelos matemáticos relacionados aos experimentos de liberação de óxido de zinco e cobre.....	48
Tabela 4.	Média e desvio padrão do tamanho dos halos de inibição contra <i>S. mutans</i> , obtidos em cada condição experimental.....	66
Tabela 5.	Média e erro padrão de células viáveis (%), obtidas em cada condição experimental, em células Saos-2.....	68
Tabela 6.	Médias e desvios-padrão dos dados da resistência máxima à (RMT, Mpa), tração obtidos em cada condição experimental.....	70
Tabela 7.	Médias e desvios-padrão dos dados de microdureza (KHN) obtidos em cada condição experimental.....	71
Tabela 8.	Médias e desvios-padrão dos dados de grau de conversão, obtidos em cada condição experimental, por meio de FTIR e micro-Raman.....	72
Tabela 9.	Médias e desvios-padrão dos dados de sorção de água e solubilidade ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) aos 28 dias de armazenamento em água, obtidos em cada condição experimental.....	73
Tabela 10.	Médias e desvios-padrão dos dados de liberação de zinco e cobre a partir dos corpos de prova de adesivo Prime&Bond Active, ajustados à equação biexponencial.....	73

Tabela 11.	Médias e desvios-padrão dos dados de liberação de zinco e cobre a partir dos corpos de prova de adesivo Ambar Universal, ajustados à equação biexponencial.....	74
Tabela 12.	Liberação de cobre em % e ppm de todas as condições experimentais, após 28 dias de armazenamento em solução aquosa de 2% de ácido nítrico.....	74
Tabela 13.	Médias e desvios-padrão dos dados de resistência de união à dentina (RU, Mpa), obtidos em cada condição experimental no sistema adesivo Prime&Bond Active.....	76
Tabela 14.	Médias e desvios-padrão dos dados de resistência de união à dentina (RU, Mpa), obtidos em cada condição experimental no sistema adesivo Ambar Universal.....	76
Tabela 15.	Médias e desvios-padrão dos dados de nanoinfiltração (NI, %), obtidos em cada condição experimental no sistema adesivo Prime&Bond Active.....	77
Tabela 16.	Médias e desvios-padrão dos dados de nanoinfiltração (NI, %), obtidos em cada condição experimental no sistema adesivo Ambar Universal.....	77
Tabela 17.	Médias e desvios-padrão dos dados de grau de conversão <i>in situ</i> (GC, %), obtidos em cada condição experimental no sistema adesivo Prime&Bond Active.....	79

Tabela 18. Médias e desvios-padrão dos dados de grau de conversão <i>in situ</i> (GC, %), obtidos em cada condição experimental no sistema adesivo Ambar Universal.....	79
--	-----------

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5/0,1	5% zinco/0,1% cobre
5/0,2	5% zinco/0,2% cobre
A	Fratura adesiva
AC	Estratégia Adesiva Autocondicionante
AAM	Atividade antimicrobiana
AMA	do inglês <i>Antimicrobial activity</i>
A/M	Fratura adesiva/mista
AMB	Ambar Universal
ANOVA	do inglês <i>Analysis of Variance</i>
C	Fraturas coesivas
CHX	Clorexidina
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CON ou Con	Estratégia Adesiva Convencional
CPA	Corpo de prova de adesivo
CTs	Cisteínas catepsinas
CTX	Citotoxicidade ou do inglês <i>Cytotoxicity</i>
DC	do inglês <i>Degree of Conversion</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FP	Número de falhas prematuras
FTIR	Espectrofotometria no infravermelho com transformação de Fourier
GC	Grau de conversão
IM	Imediato
LZC	Liberação de Óxido de zinco/cobre
LED	Diodo emissor de luz, pela frase em inglês <i>Light Emitting Diode</i>
MD	Microdureza

MDP	10-Metacriloiloxidecil dihidrogênio fosfato
MDPB	Brometo de 12- metacriloxi dodecil piridínio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MH	do inglês <i>Microhardness</i>
ML	do inglês <i>Microleakage</i>
MMP	Metaloproteinases
NI	Nanoinfiltração
NL	do inglês <i>Nanoleakage</i>
np	Não polimerizado
p	Polimerizado
PBA	Prime&Bond Active
pH	Potencial hidrogeniônico
QADM	Quaternário de amônio dimetacrilato
RMT	Resistência máxima à tração
RU	Resistência de União à microtração
SO	Sorção cumulativa de água
So	do inglês <i>Solubility</i>
SB	Solubilidade
SiC	Carbeto de silício
UTS	do inglês <i>Ultimate Tensile Strength</i>
μTBS	do inglês <i>Microtensile Bond Strength</i>
WS	do inglês <i>Water Sorption</i>
ZnO	Nanopartículas de óxido de zinco
ZnO/CuNp	Nanopartículas de óxido de zinco e cobre (do inglês <i>Zinc Oxide/Copper Nanoparticles</i>)
ZnO/CuR	do inglês <i>Zinc Oxide/Copper Release</i>

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

α	Nível de significância
%	Porcentagem
=	Igual
<	Menor que
>	Maior que
\pm	Mais ou menos
μm	Micrômetro
\approx	Aproximadamente
$^{\circ}\text{C}$	Grau (s) Celsius
cm^{-1}	Centímetro (s) recíproco (s) ou centímetro (s) inverso (s)
d	Dias (s)
h	Hora (s)
min	Minuto (s)
MPa	Mega Pascal
mm	Milímetro (s)
mm^2	Milímetro (s) quadrado (s)
mm/min	Milímetro (s) por minuto
mW	MiliWatts
mW/cm^2	MiliWatts por centímetro (s) quadrado
N° ou n	Número
N	Newton
nm	Nanômetro
p	Valor de probabilidade

ppm	partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo (s)
X	Número de vezes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	29
2.1. OBJETIVO GERAL	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ZINCO E COBRE	31
3.1.1. Análise Morfológica	32
3.1.1.1. Microscopia de força atômica (AFM)	32
3.1.1.2. Z-Sizer.....	32
3.1.1.3. Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG)	32
3.1.2. Análise composicional.....	32
3.1.2.1. Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)	32
3.2. SISTEMAS ADESIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
3.3. EXPERIMENTO 1 (PROPRIEDADES BIOLÓGICAS)	36
3.3.1. Teste de atividade antimicrobiana (AAM).....	36
3.3.1.1. Teste de difusão em ágar.....	36
3.3.2. Ensaio de Citotoxicidade (CTX).....	37
3.3.2.1. Cultura de células.....	37
3.3.2.2. Estimulação celular	38
3.3.2.3. Avaliação da citotoxicidade usando o teste MTT	38
3.3.3. Atividade anti-MMP	39
3.4. EXPERIMENTO 2 (PROPRIEDADES MECÂNICAS)	40
3.4.1. Teste de resistência máxima à tração (RMT).....	40
3.4.2. Microdureza Knoop (MD)	41
3.4.3. Grau de conversão (GC) de corpos-de-prova de adesivo (<i>in vitro</i>)	43
3.4.3.1. Espectrometria no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	43
3.4.3.2. Espectrometria micro-Raman.....	44
3.4.4. Sorção de água (SO) e solubilidade (SB)	47
3.4.5. Comportamento de liberação do zinco e cobre a partir de corpos de prova de adesivos.....	48
3.5. EXPERIMENTO 3 (PROPRIEDADES ADESIVAS À DENTINA).....	51
3.5.1. Preparo dos dentes hígidos.....	52
3.5.2. Preparo dos dentes cariados artificialmente.....	52

3.5.3. Procedimentos adesivos	53
3.5.4. Teste de resistência de união à dentina por microtração (RU)	56
3.5.5. Avaliação da Nanoinfiltração (NI) por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)	57
3.5.6. Análise da interface de união e microinfiltração por meio de Microscopia Eletrônica Confocal Laser (MI).....	59
3.5.7. Grau de conversão (GC) de adesivo na interface de união à dentina	60
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
4. RESULTADOS	64
4.1. TESTES MORFOLÓGICOS E COMPOSICIONAIS	64
4.2. EXPERIMENTO 1 (PROPRIEDADES BIOLÓGICAS)	67
4.2.1. Atividade antimicrobiana (AAM)	67
4.2.2. Ensaio de Citotoxicidade (CTX).....	67
4.2.3. Atividade anti-MMP	70
4.3. EXPERIMENTO 2 (PROPRIEDADES MECÂNICAS)	71
4.3.1. Resistência máxima à tração (RMT)	71
4.3.2. Microdureza Knoop (MD)	72
4.3.3. Grau de conversão (GC) de corpos-de-prova de adesivo (<i>in vitro</i>)	72
4.3.4. Sorção de água (SO) e solubilidade (SB)	73
4.3.5. Comportamento de liberação do zinco e cobre a partir de corpos de prova de adesivos.....	74
4.4. EXPERIMENTO 3 (PROPRIEDADES ADESIVAS À DENTINA).....	77
4.4.1. Resistência de união à microtração (RU).....	77
4.4.2. Nanoinfiltração (NI)	78
4.4.3. Análise da interface de união e microinfiltração	79
4.4.4. Grau de conversão (GC) de adesivo na interface de união à dentina	79
5. DISCUSSÃO	85
6. CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	92
ANEXO A – Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)	105
ANEXO B – Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Chile (UdeCh)	109

1. INTRODUÇÃO

Durante décadas, diversos materiais têm sido usados em restaurações diretas em dentes posteriores, tais como amálgama e resina composta. Nos últimos anos, devido à uma crescente demanda por restaurações estéticas, resinas compostas ganharam um papel proeminente, tornando-se o material restaurador mais amplamente utilizado, representando 65% das restaurações colocadas atualmente nos Estados Unidos (Christensen ¹ 2010; Lynch et al. ² 2014; Rasines Alcaraz et al. ³ 2014; Moraschini et al. ⁴ 2015). Sua alta resistência ao desgaste, a estética natural e a facilidade de colocação tornam a resina composta desejável para pacientes e clínicos (Khalichi et al. ⁵ 2004), e seu baixo custo e maior preservação da estrutura dental remanescente sadia, são vantagens quando comparado com as restaurações indiretas (Brunthaler et al. ⁶ 2003; da Rosa Rodolpho et al. ⁷ 2006; Da Rosa Rodolpho et al. ⁸ 2011; Opdam et al. ⁹ 2014). Apesar do aumento no seu uso e o significativo desenvolvimento científico, a preocupação mais importante a respeito de restaurações adesivas diretas atualmente, é a sua limitada durabilidade *in vivo* (Peumans et al. ¹⁰ 2005; Heintze et al. ¹¹ 2010), o que resulta em um grande gasto com assistência odontológica destinada à troca deste tipo de restauração, superando os 5 bilhões de dólares anualmente nos Estados Unidos (Jokstad et al. ¹² 2001; Spencer et al. ¹³ 2010).

Dentistas ainda gastam uma quantidade significativa de tempo substituindo restaurações, contribuindo para o ciclo repetitivo restaurador descrito por Elderton há mais de 3 décadas (Elderton ¹⁴ 1988). Fatores relacionados ao paciente, operador, dente, tamanho da cavidade e materiais têm sido relatados na literatura como potencialmente relevantes para falhas das restaurações (da Rosa Rodolpho et al. ⁷ 2006; Da Rosa Rodolpho et al. ⁸ 2011; Opdam et al. ⁹ 2014; Bernardo et al. ¹⁵ 2007; Opdam et al. ¹⁶ 2010), embora evidências sobre esses fatores ainda sejam limitadas.

A longevidade de restaurações pode ser afetada, em especial, pelo acúmulo de biofilme e placa *in vivo*, em comparação com outros materiais restauradores (Beyth et al. ¹⁷ 2007). A produção de ácido a partir do biofilme pode levar à cárie adjacente nas margens das restaurações. Essa reincidência é a principal razão para o fracasso da restauração e é uma das maiores causas de sua substituição, estimada atualmente entre 50 e 70% de todas as restaurações realizadas (Jokstad et al. ¹² 2001; Deligeorgi

et al.¹⁸ 2001; Featherstone¹⁹ 2004; Sakaguchi²⁰ 2005; ten Cate²¹ 2006; Demarco et al.²² 2012).

Essa falha pode estar relacionada à falta de selamento da interface dente/restauração, o que resulta na diminuição de resistência nessa região aos agentes internos - enzimas proteolíticas - e externos - fluidos e microrganismos (Spencer et al.¹³ 2010; Perdigão et al.²³ 2013; Tjäderhane et al.²⁴ 2013). Essa interface adesiva dente/restauração é produzida pela interação de um sistema adesivo sobre os tecidos dentários duros, após a substituição de minerais removidos desses tecidos por monômeros resinosos, formando um polímero interligado micro-mecanicamente com os substratos dentais (Nakabayashi et al.²⁵ 1982).

Por outro lado, a biodegradação das interfaces adesivas tem sido o foco de estudos recentes e esse processo ainda não está completamente elucidado (Liu et al.²⁶ 2011). No entanto, sabe-se que a biodegradação inicia-se com a extração dos monômeros resinosos que se infiltraram na matriz de dentina, através de espaços vazios nanométricos cheios de água, seguido pelo ataque enzimático das fibrilas de colágeno expostas (Spencer et al.¹³ 2010; Sano²⁷ 2006; Reis et al.²⁸ 2013).

Cerca de 50% do volume dentinário é composto de minerais, sendo o restante colágeno do tipo I, proteínas não-colagenosas (30% em vol.) e água (20% em vol.) (Tjäderhane et al.²⁹ 2012). Durante a adesão de restaurações de resina composta, o componente mineral da superfície e subsuperfície da dentina é removido, ou totalmente pelo condicionamento ácido prévio nos adesivos convencionais (CON) (*etch-and-rinse*, do Inglês), ou parcialmente com *primers* acídicos em adesivos autocondicionantes (AC) (*self-etch*, do inglês). A matriz de colágeno exposta em seguida, é infiltrada com monômeros resinosos adesivos. Na realidade, os monômeros adesivos não são capazes de encapsular completamente a matriz de colágeno, deixando fibras de colágeno expostas totalmente ou parcialmente, na parte inferior da camada híbrida, sem a proteção de resina polimerizada (Spencer et al.¹³ 2010; Spencer e Swafford³⁰ 1999; Wang e Spencer³¹ 2002; Wang e Spencer³² 2003). A falta de proteção de monômeros resinosos e da presença de água deixa as fibras de colágeno desmineralizadas vulneráveis à degradação hidrolítica dependente do tempo. A degradação das fibras de colágeno e componentes hidrofílicos do adesivo leva à destruição da camada híbrida e a perda de força de união à dentina ao longo do tempo (Reis et al.²⁸ 2013).

Pashley e *co/s.* foram os primeiros a demonstrar o papel de enzimas derivadas do hospedeiro sobre a degradação das fibrilas colágenas por meio de análise da atividade colagenolítica exercida por metaloproteinases (MMPs) da dentina (Pashley et al. ³³ 2004). Essas MMPs já haviam sido investigadas previamente e comprovada sua presença e expressão no complexo dentino pulpar (Tjäderhane et al. ³⁴ 1998; Sulkala et al. ³⁵ 2001; Sulkala et al. ³⁶ 2002).

Alguns autores, recentemente, estudaram em detalhe a presença, o papel e a função das enzimas metaloproteinases (MMPs) que degradam a matriz de colágeno, e cisteínas catepsinas (CTs) em dentina (Tjäderhane et al. ³⁷ 2013; Vidal et al. ³⁸ 2014). O aumento do conhecimento sobre a função dessas enzimas na degradação da camada híbrida levou a extensa atividade de pesquisa com o objetivo de evitar a atividade preteolítica/colagenolítica na interface de união à dentina. Essa avaliação incide sobre as diferentes estratégias que têm sido desenvolvidas para controlar e prevenir a perda do colágeno da camada híbrida e força adesiva, relacionada com enzimas hidrolíticas.

As MMPs constituem uma família de endopeptidases zinco- e cálcio-dependentes, que são capazes de degradar os componentes da matriz extracelular (Verma e Hansch ³⁹ 2007; Visse e Nagase ⁴⁰ 2003), e que regulam os mecanismos fisiológicos e patológicos dos tecidos à base de colágeno na sua forma natural ou desnaturada (Carrilho et al. ⁴¹ 2009; Collares et al. ⁴² 2013). Formas latentes de MMPs são liberadas, a partir da dentina, após a dissolução de compostos inorgânicos, como resultado do pH ácido local. No entanto, o mecanismo exato de ativação das MMPs em meio ácido necessita ainda ser melhor elucidado (Perdigao et al. ²³ 2013). De um modo semelhante, como observado durante o processo da doença cárie, as MMPs podem também ser liberadas a partir da matriz de dentina, durante o passo de condicionamento ácido (Mazzoni et al. ⁴³ 2006) ou com uso de *primers* acídicos (Nishitani et al. ⁴⁴ 2006) nos protocolos adesivos. As fibras colágenas expostas sem proteção mineral tornam-se susceptíveis à degradação enzimática, que pode ser mediada por MMPs da dentina que são expostas e ativadas durante o ataque ácido (Pashley et al. ³³ 2004).

Para tentar resolver esses problemas (lesões de cárie adjacente à margem da restauração e degradação da camada híbrida), têm sido incorporados antimicrobianos e inibidores de MMPs e CTs, ao protocolo adesivo ou incorporados aos sistemas adesivos (Perdigao et al. ²³ 2013). A clorexidina (CHX) é um agente antimicrobiano

muito utilizado, que tem um amplo espectro de atividade contra as bactérias orais (Mohammadi e Abbott ⁴⁵ 2009) e grande substantividade (Carrilho et al. ⁴⁶ 2010). Além disso, tem sido recentemente estudada como o mais importante inibidor de proteases (Pashley et al. ³³ 2004) e CTs (Scaffa et al. ⁴⁷ 2012) ajudando na preservação da camada híbrida. Por outro lado, epigalocatequina -3-galato (Du et al. ⁴⁸ 2012; Yun et al. ⁴⁹ 2004), galardina (Breschi et al. ⁵⁰ 2010), tetraciclinas (Stanislawczuk et al. ⁵¹ 2011), sais de quaternário de amônio, como o brometo de 12-metacriloxi dodecil piridínio (MDPB) (Donmez et al. ⁵² 2005; Tezvergil-Mutluay et al. ⁵³ 2011) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Jacques e Hebling ⁵⁴ 2005; Sauro et al. ⁵⁵ 2009) também têm mostrado efeitos antimicrobianos e/ou inibidores das MMPs e CTs, preservando a camada híbrida.

Alguns autores (Melo et al. ⁵⁶ 2013; Zhang et al. ⁵⁷ 2012) recentemente estudaram a incorporação de quaternário de amônio dimetacrilato (QADM) e nanopartículas de prata em *primers* e em adesivos dentinários, mostrando capacidade antimicrobiana, provocando uma diminuição na viabilidade do biofilme, sem interferir na resistência da adesão.

As propriedades antimicrobianas das nanopartículas de prata são bem estabelecidas (Kim et al. ⁵⁸ 2007; Rai et al. ⁵⁹ 2009; Sondi e Salopek-Sondi ⁶⁰ 2004) e os mecanismos de ação bactericida foram propostos. Contudo, as propriedades antimicrobianas das nanopartículas de cobre têm sido pouco estudadas, mesmo apresentando um potencial como agente bactericida na Odontologia (Ingle et al. ⁶¹ 2014; Ruparelia et al. ⁶² 2008; Thneibat et al. ⁶³ 2008; Usman et al. ⁶⁴ 2013; Argueta-Figueroa et al. ⁶⁵ 2015; Sabatini et al. ⁶⁶ 2015; Gutierrez et al. ⁶⁷ 2017; Gutierrez et al. ⁶⁸ 2017).

Yoon et al. relataram os efeitos antibacterianos de nanopartículas de prata e cobre usando cepas de *E. coli* e *Bacillus subtilis*, onde as nanopartículas de cobre demonstraram atividade antibacteriana superior em comparação com as nanopartículas de prata (Yoon et al. ⁶⁹ 2007). Além da atividade antimicrobiana superior, o cobre é mais barato, e mais disponível em relação à prata, portanto, a síntese de nanopartículas de cobre tem um melhor custo-benefício. Uma vantagem adicional de nanopartículas de cobre é que elas oxidam e formam nanopartículas de óxido de cobre, as quais podem facilmente misturar-se com polímeros ou macromoléculas e serem relativamente estáveis em termos de propriedades químico-físicas (Usman et al. ⁷⁰ 2012).

A incorporação de cobre também foi avaliada em vários materiais dentários, como o ionômero de vidro (Renne et al. ⁷¹ 2017), adesivos dentais (Argueta-Figueroa et al. ⁶⁵ 2015; Sabatini et al. ⁶⁶ 2015; Gutierrez et al. ⁶⁷ 2017; Gutierrez et al. ⁶⁸ 2017) e até mesmo em implantes dentários (Gosau et al. ⁷² 2016; Rosenbaum et al. ⁷³ 2017). Dentro dos adesivos dentários, estudos recentes utilizaram nanopartículas de cobre e avaliaram seu efeito na durabilidade da interface dentina-resina, mostrando que a incorporação de cobre ajuda a manter a integridade da camada híbrida após 2 anos (Gutierrez et al. ⁶⁷ 2017).

O zinco, por sua vez, pode ser usado para proteger as fibrilas colágenas da atividade de metaloproteinases e cisteínas catépsinas (Santos et al. ⁷⁴ 2001; Osorio et al. ⁷⁵ 2011; Ito et al. ⁷⁶ 2002; Altinci et al. ⁷⁷ 2017). Estudos anteriores (Carrilho et al. ⁴¹ 2009; Toledano et al. ⁷⁸ 2013; Toledano et al. ⁷⁹ 2012; Osorio et al. ⁸⁰ 2011; Barcellos et al. ⁸¹ 2016) observaram a durabilidade da interface resina-dentina quando o zinco foi adicionado a adesivos comerciais. As MMPs exigem que os íons Zn^{2+} mantenham a estrutura terciária apropriada e os locais ativos funcionais (Tezvergil-Mutluay et al. ⁸² 2010), porém o zinco pode se unir em locais de clivagem de colagenase em moléculas de colágeno que protegem o colágeno da atividade das metaloproteinase, reduzindo a degradação do colágeno mediada pelas mesmas (Toledano et al. ⁷⁸ 2013; Toledano et al. ⁷⁹ 2012). A incorporação de Zn em adesivos comerciais também resultou na formação de cristais de hidroxiapatita nas fibrilas de colágeno, favorecendo a mineralização da dentina (Toledano et al. ⁷⁹ 2012), (Osorio et al. ⁷⁵ 2011; Toledano et al. ⁷⁹ 2012), podendo inibir a desmineralização da mesma (Takatsuka et al. ⁸³ 2005) e a remineralização do esmalte (Lynch et al. ⁸⁴ 2011).

No entanto, qualquer alteração na composição química dos sistemas adesivos envolve possíveis falhas mecânicas e físico-químicas e riscos biológicos. Portanto, a inserção de zinco em sistemas adesivos como alternativa para preservar a longevidade da restauração, apesar de ter resultados promissores, requer novas revisões, devido à possibilidade de alteração das propriedades biológicas, físico-químicas e mecânicas dos sistemas adesivos e, conseqüentemente, o seu desempenho clínico.

Baseado no exposto, a concentração ideal de zinco e cobre que pode ser adicionada a um adesivo universal para expressar atividade antimicrobiana e produzir interfaces de união à dentina estáveis, sem comprometer outras propriedades mecânicas, deve ser investigada. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito

da incorporação de nanopartículas de zinco e cobre em dois sistemas adesivos universais, em diferentes concentrações, sobre a atividade antimicrobiana, biocompatibilidade e capacidade de inibição de metaloproteinases, resistência máxima à tração, microdureza, grau de conversão, sorção, solubilidade e liberação de cobre ao longo do tempo, bem como sobre as propriedades adesivas (resistência de união, nanoinfiltração, microinfiltração, grau de conversão, nanodureza e presença de zinco e cobre na interface) sobre dentina hígida e artificialmente afetada por cárie, no tempo imediato.

Foram testadas as seguintes hipóteses nulas: (1) as diferentes concentrações de zinco e cobre não irão resultar em diferenças nas propriedades biológicas do adesivo (2) as diferentes concentrações de zinco e cobre não irão resultar em diferenças nas propriedades mecânicas do adesivo; (3) as diferentes concentrações de zinco e cobre não irão resultar em diferenças na resistência de união, nanoinfiltração, microinfiltração e grau de conversão *in situ* na camada híbrida, no tempo imediato.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de zinco e cobre em diferentes concentrações, em dois sistemas adesivos universais, nas propriedades biológicas, mecânicas e adesivas à dentina hígida e artificialmente afetada por cárie.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da combinação de nanopartículas de zinco e cobre (5% zinco/0,1% cobre; 5% zinco/0,2% cobre) na atividade antimicrobiana, citotoxicidade e capacidade de inibição de metaloproteinases (MMPs) 2, 8 e 9.

Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de nanopartículas de zinco e cobre (0%; 5% zinco/0,1% cobre; 5% zinco/0,2% cobre) em dois sistemas adesivos universais Prime&Bond Active [PBA; Dentsply-Sirona] e Ambar Universal [AMB; FGM] na atividade antimicrobiana e citotoxicidade.

Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de nanopartículas de zinco e cobre (0%; 5% zinco/0,1% cobre; 5% zinco/0,2% cobre) em dois sistemas adesivos universais Prime&Bond Active [PBA; Dentsply-Sirona] e Ambar Universal [AMB; FGM] na resistência máxima à tração, microdureza, grau de conversão *in vitro*, sorção, solubilidade e liberação de cobre ao longo do tempo.

Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de nanopartículas de zinco e cobre (0%; 5% zinco/0,1% cobre; 5% zinco/0,2% cobre) em dois sistemas adesivos universais Prime&Bond Active [PBA; Dentsply-Sirona] e Ambar Universal [AMB; FGM] aplicados no modo convencional sobre dentina hígida, nas propriedades adesivas (resistência de união, nanoinfiltração, microinfiltração e grau de conversão *in situ*) no tempo imediato.

Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de nanopartículas de zinco e cobre (0%; 5% zinco/0,1% cobre; 5% zinco/0,2% cobre) em dois sistemas adesivos universais Prime&Bond Active [PBA; Dentsply-Sirona] e Ambar Universal [AMB; FGM] aplicados no modo autocondicionante sobre dentina hígida, nas propriedades adesivas (resistência de união, nanoinfiltração, microinfiltração e grau de conversão *in situ*) no tempo imediato.

Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de nanopartículas de zinco e cobre (0%; 5% zinco/0,1% cobre; 5% zinco/0,2% cobre) em dois sistemas adesivos universais Prime&Bond Active [PBA; Dentsply-Sirona] e Ambar Universal [AMB; FGM] aplicados no modo convencional sobre dentina artificialmente afetada por cárie, nas propriedades adesivas (resistência de união, nanoinfiltração, microinfiltração e grau de conversão *in situ*) no tempo imediato.

Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de nanopartículas de zinco e cobre (0%; 5% zinco/0,1% cobre; 5% zinco/0,2% cobre) em dois sistemas adesivos universais Prime&Bond Active [PBA; Dentsply-Sirona] e Ambar Universal [AMB; FGM] aplicados no modo autocondicionante sobre dentina artificialmente afetada por cárie, nas propriedades adesivas (resistência de união, nanoinfiltração, microinfiltração e grau de conversão *in situ*) no tempo imediato.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Brasil) sob o parecer número 2.399.496, (Anexo A) e pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Chile (Chile) (Anexo B). Este estudo foi financiado parcialmente pela Comissão Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica (CONICYT *em espanhol*), Chile, sob o projeto número 1170575 do Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FONDECYT *em espanhol*).

3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ZINCO E COBRE

As nanopartículas de zinco (99.8% puro, 10-30 nm, SkySpring Nanomaterials, Inc., Houston, TX, EUA, www.ssnano.com) e cobre (99.9% puro, 40-60 nm, SkySpring Nanomaterials, Inc., Houston, TX, EUA, www.ssnano.com) foram caracterizadas morfologicamente (microscopia de força atômica [AFM], Z-sizer, microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo [FEG]) e quimicamente (espectroscopia de energia dispersiva de raios X [EDS]). A **Tabela 1** mostra as propriedades das nanopartículas de zinco e cobre.

Tabela 1. Características e especificações das nanopartículas de zinco e cobre.

Tipo de partículas/número de lote/fabricante	Especificações
Nanopartículas de Zinco (Zn) 8410DL Skyspring nanomaterials, Inc*	Pureza: 99.8% metálico Aparência: Nano-pó branco ~ amarelo claro Tamanho médio de partícula: 10–30 nm Área específica da superfície: 30-50 m ² /g
Nanopartículas de Cobre (Cu) 0820XH Skyspring nanomaterials, Inc*	Pureza: 99.9% metálico Aparência: Nano-pó preto. Tamanho médio de partícula: 40–60 nm Área específica da superfície: 12 m ² /g Morfologia: esférico Densidade aparente: 0.19 g/cm ³ Densidade real: 8.9 g/cm ³

(*) www.ssnano.com
Fonte: O Autor.

3.1.1. Análise Morfológica

3.1.1.1. Microscopia de força atômica (AFM)

O tamanho das nanopartículas de cobre foi analisado em um microscópio de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) da marca Shimadzu (SPM-9600: Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). As imagens foram obtidas no modo contato intermitente, empregando-se um cantilever com constante elástica de aproximadamente 0,06 N/m (valor nominal) e uma ponta com raio de aproximadamente 12 nm (modelo SNL-10). A taxa de varredura foi de 1 Hz.

3.1.1.2. Z-Sizer

O tamanho das nanopartículas de cobre foi analisado pelo Zetasizer (Nano-Zs90 Nanoseries; Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido), usando espalhamento dinâmico de luz com um ângulo de 90°, medindo a difusão das partículas movendo-se por movimento Browniano, e convertendo o tamanho e a distribuição de tamanhos utilizando à relação de Stokes Einstein.

3.1.1.3. Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG)

O tamanho das nanopartículas de cobre foi analisado em um microscópio eletrônico de varredura por efeito de campo (FEG) (MIRA3 LM; Tescan, Warrendale, PA, EUA). Foi utilizado uma tensão de aceleração de elétrons de 10 kV e ampliação das imagens em 40 e 60 kx. A partir das fotomicrografias obtidas pelo FEG, foi possível determinar o tamanho médio das partículas pelo programa de computador Mira^{TC} do FEG.

3.1.2. Análise composicional

3.1.2.1. Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)

A análise por EDS foi realizada para determinar a pureza das nanopartículas de zinco e cobre, medindo a porcentagem de zinco e cobre das nanopartículas em

pó, e para determinar se existe mistura com outros elementos. Para efetuar a análise composicional foi utilizado FEG acoplado com EDS.

3.2. SISTEMAS ADESIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram formulados adesivos experimentais utilizando dois sistemas adesivos universais (Ambar [FGM] e Prime&Bond Active [Dentsply-Sirona]). Esses adesivos podem ser utilizados com a técnica de condicionamento ácido previamente à aplicação do adesivo (convencional; CON), ou com a técnica sem condicionamento ácido previamente (autocondicionante; AC) e se apresentam em um único frasco. A **Figura 1** mostra os adesivos universais utilizados, e a **Tabela 2** mostra a sua composição detalhada, modo de aplicação e número de lote.

Figura 1. Adesivos universais utilizados neste estudo.



Fonte: Prime&Bond
<https://www.fgm.com.br>

Active: <https://www.dentsplysirona.com;>

Ambar Universal:

Tabela 2. Sistema adesivo utilizado, composição, modo de aplicação e número de lote

Sistema adesivo universal, número de lote e pH	Composição (*)	Modo de aplicação Convencional	Modo de aplicação Autocondicionante
Prime&Bond Active (PBA – Dentsply-Sirona, Konstanz, Baden-Württemberg, Alemanha) (1703000452) pH= ~ 2,5	Ácido fosfórico modificado com acrilato de resina, acrilato multifuncional, acrilato bifuncional, acrilatos acídicos, isopropanol, iniciadores, estabilizadores, água (10-MDP e PENTA)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aplicar ácido fosfórico na dentina por 15 s. 2. Lavar por 15 s. Secar com suave jato de ar e papel absorvente. Manter a dentina úmida. 3. Aplicar vigorosamente uma camada de adesivo por 10 s. 4. Aplicar suavemente jato de ar por 10 s para evaporar o solvente 5. Polimerizar por 10 s. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aplicar vigorosamente uma camada de adesivo por 10 s 2. Aplicar suavemente jato de ar por 10 s para evaporar o solvente 3. Polimerizar por 10 s
Ambar Universal (AMB – FGM Prod. Odontológicos, Joinville, Santa Catarina, Brasil) (310516) pH= 2,6 - 3,0	Monômeros metacrilatos (UDMA e 10-MDP), fotoiniciadores, co-iniciadores, estabilizadores, nanopartículas de sílica inerte, etanol e água	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aplicar ácido fosfórico na dentina por 15 s. 2. Lavar por 15 s. Secar com suave jato de ar e papel absorvente. Manter a dentina úmida. 3. Aplicar vigorosamente duas camadas de adesivo por 20 s (10 s por cada camada). 4. Aplicar suavemente jato de ar por 10 s para evaporar o solvente 5. Polimerizar por 10 s. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aplicar vigorosamente duas camadas de adesivo por 20 s (10 s por cada camada) 2. Aplicar suavemente jato de ar por 10 s para evaporar o solvente 3. Polimerizar por 10 s

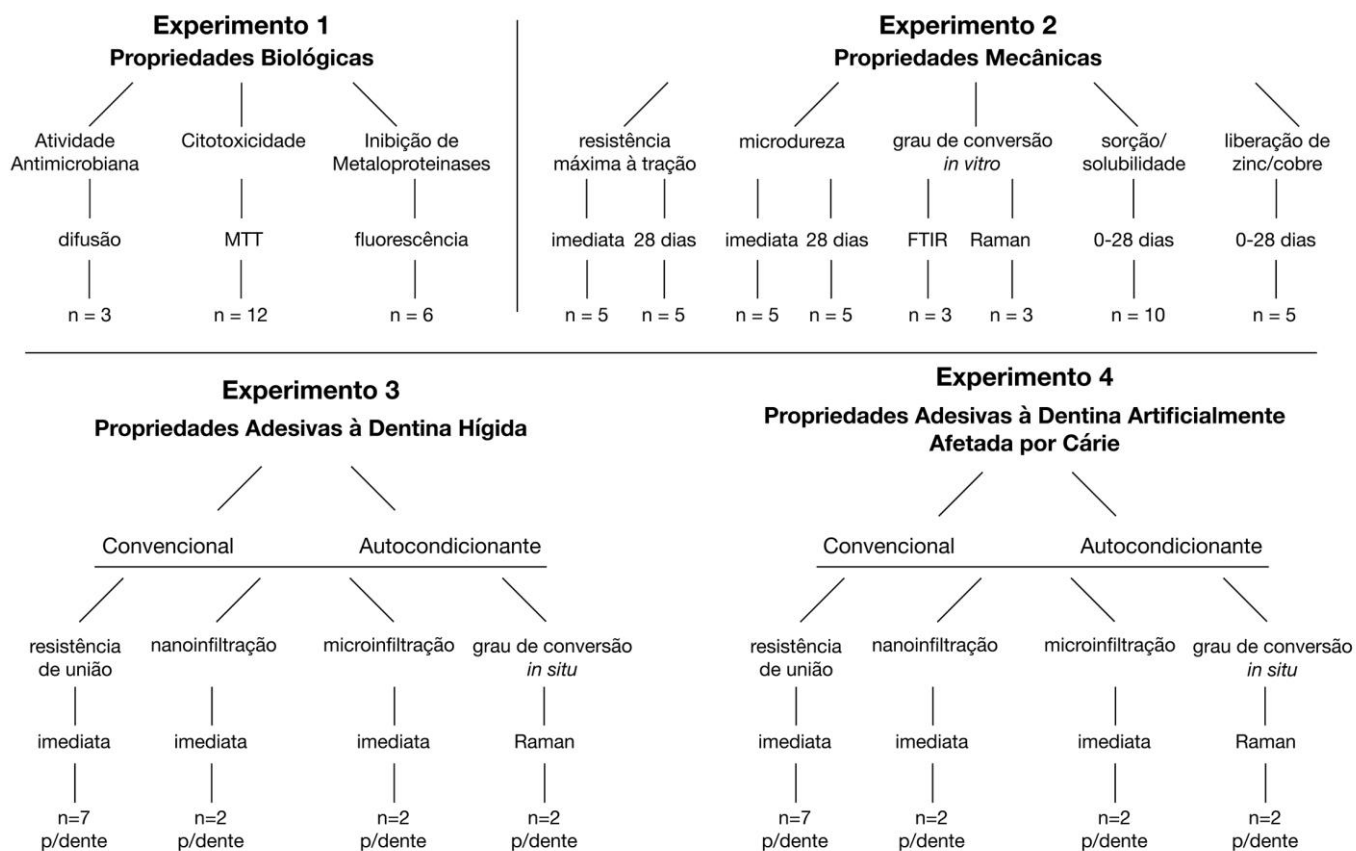
(*) **UDMA** = Uretano dimetacrilato; **MDP**= metacrilatoiloxidecil dihidrogenofosfato; **PENTA**= monofosfato de dipentaeritriol penta acrilato.

Fonte: O Autor.

Os sistemas adesivos selecionados sofreram um acréscimo em sua fórmula original de nanopartículas de zinco e cobre em diferentes concentrações (% em peso): 0% (controle, material comercial); 5% zinco/0,1% cobre; 5% zinco/0,2% cobre. Inicialmente, um estudo piloto foi realizado utilizando as concentrações de 5% de zinco, 0,1% cobre e 0,2% cobre. As nanopartículas de zinco e cobre foram adicionadas aos adesivos por agitação em um misturador Speedmix (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA). O estudo foi dividido em quatro etapas descritas a seguir (**Figura 2**):

- (i) Avaliação do potencial microbiológico, citotoxicidade e potencial inibitório de metaloproteinases -2, -8 e -9.
- (ii) Avaliação de resistência máxima à tração, microdureza, grau de conversão *in vitro*, sorção e solubilidade e liberação de cobre em corpos de prova de adesivo.
- (iii) Avaliação imediata das propriedades adesivas de resistência de união, nanoinfiltração, análise da microinfiltração e grau de conversão *in situ* sobre dentina hígida.
- (iv) Avaliação imediata das propriedades adesivas de resistência de união, nanoinfiltração, análise da microinfiltração e grau de conversão *in situ* sobre dentina artificialmente afetada por cárie.

Figura 2. Diagrama explicativo das etapas do trabalho.



Fonte: O Autor.

3.3. EXPERIMENTO 1 (PROPRIEDADES BIOLÓGICAS)

3.3.1. Teste de atividade antimicrobiana (AAM)

Nesta etapa foi testada a atividade antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), das nanopartículas de zinco/cobre em solução aquosa, assim como incorporadas nos adesivos experimentais (Bottino et al. ⁸⁵ 2013; Feitosa et al. ⁸⁶ 2014).

3.3.1.1. Teste de difusão em ágar

S. mutans foi cultivado aerobiamente em caldo de soja trípico (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) durante 72 h em 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, 100 µL da suspensão bacteriana foi semeada sobre BHI (Agar infusão cérebro e coração,

Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) para criar o cultivo (Gregson et al. ⁸⁷ 2012; Huang et al. ⁸⁸ 2012).

O método de difusão foi utilizado para medir a sensibilidade de *S. mutans* aos grupos de adesivos experimentais (descritos acima) e a uma solução aquosa de nanopartículas nas mesmas concentrações descritas para os adesivos experimentais (0% [controle, água destilada]; 5 / 0,1 e 5 /0,2).

Discos de papel de filtro de 5 mm de diâmetro foram preparados a partir do papel de filtro Whatman nº1, colocados numa placa de petri e esterilizados numa estufa de ar quente a 160 °C durante 2 h. Posteriormente, os discos foram impregnados de acordo com o seguinte: 1) com 20 µL de cada solução aquosa e colocado imediatamente sobre a placa; 2) com 20 µL de cada adesivo experimental, evaporando o solvente por 15 s e colocado imediatamente sobre as placas; 3) com 20 µL de cada adesivo experimental, evaporando o solvente por 15 s e fotopolimerizado por 20 s com uma fonte de luz LED a 1.000 mW/cm² (VALO, Ultradent Products, South Jordan, UT, EUA), e colocado imediatamente sobre as placas.

As placas foram incubadas em jarra anaeróbica (5% CO₂) por 48 h a 37 °C. O diâmetro da zona de inibição de crescimento em torno de cada amostra foi determinado em milímetros, com um paquímetro digital (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Kanagawa, Tóquio, Japão), após 48 h de incubação em condições microaerofílicas a 35 ± 0,5 °C. Os testes foram realizados em triplicata.

3.3.2. Ensaio de Citotoxicidade (CTX)

3.3.2.1. Cultura de células

Células da linhagem Saos-2 (ATCC® HTB-85™) foram utilizadas para a determinação da citotoxicidade das nanopartículas de zinco/cobre em solução aquosa, assim como incorporadas nos adesivos experimentais, tal como descrito para teste de atividade antimicrobiana.

As células Saos-2 foram cultivadas em meio DMEM (*do inglês* Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; BI Biological Industries) e 1% de solução de estreptomicina + penicilina (10.000 U/100 µg/mL) em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar a 37 °C.

O meio foi trocado a cada 2-3 dias. Após atingirem a confluência de 70%, as células foram lavadas com solução salina tamponada de fosfato (PBS; Thermo Fisher Scientific) e separadas com uma solução de tripsina-EDTA a 0,05% durante 5 min (Thermo Fisher Scientific). Uma fração de células foi corada com uma solução azul de tripan (Sigma-Aldrich, Munique, Alemanha) e quantificadas em câmara hemocitométrica de Neubauer, para o posterior plaqueamento.

3.3.2.2. Estimulação celular

Todos os experimentos de estimulação foram realizados em placas de 96 poços em triplicata, e repetidos ao menos por quatro vezes. Após isso, 10.000 células por poço foram semeadas e incubadas por 24 h. As células foram incubadas com três diferentes diluições (1, 0,1 e 0,01% v/v) dos adesivos experimentais e soluções aquosas em 100 μ L de meio de cultura de células por 24 h a 37 °C (Kraus et al. ⁸⁹ 2017). A incubação com meio de cultura simples foi utilizada como controle de viabilidade de 100%, enquanto o metanol a 20% foi utilizado como controle de apoptose.

3.3.2.3. Avaliação da citotoxicidade usando o teste MTT

A citotoxicidade celular foi determinada utilizando o kit de ensaio de Proliferação Celular Vybrant® MTT (Thermo Fisher Scientific). Após estimulação por 24 h, o meio foi removido e substituído por 100 μ L de meio de cultura fresco. Dez μ L de solução estoque de MTT 12 mM (preparado de acordo com as instruções do fabricante) foram adicionados a cada poço e incubados a 37 °C durante 2 h. Depois disso, 100 μ L de solução de SDS-HCl (preparada de acordo com as instruções do fabricante) foram adicionados a cada poço e completamente misturados por pipetagem. A microplaca foi incubada a 37 °C por 4 h, seguida pela medição da absorbância a 490 nm com correção de 670 nm de comprimento de onda num leitor de microplacas. A viabilidade celular foi calculada e normalizada para o controle (= 100%).

3.3.3. Atividade anti-MMP

Os ensaios de atividade anti-MMP foram conduzidos utilizando MMP-2, MMP-8 e MMP-9 recombinantes com kits de ensaio fluorimétrico (Sensolyte; AnaSpec, Fremont, CA, EUA) (Hashimoto et al. ⁹⁰ 2015) seguindo as recomendações do fabricante. As ZnO/CuNp em concentrações de 5/0,1 e 5/0,2 e MMPs ativas (pre-incubadas com APMA 10 mM) foram misturadas com substrato peptídico de transferência de energia de ressonância de fluorescência 5-FAM / QXLTM 520 (FRET) em tampão de ensaio utilizando placas de 96 poços. Para o peptídeo FRET intacto, a fluorescência de 5-FAM foi extinta por QXL 520. Como consequência da clivagem em 2 fragmentos separados pelas MMPs, a fluorescência de 5-FAM foi recuperada e monitorizada em comprimentos de onda de excitação/emissão (490/520 nm, respectivamente). Depois de 1 h de incubação, a fluorescência foi lida por um leitor de microplaca (Synergy HT; Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT, EUA) e expresso como unidades relativas de fluorescência. MMPs ativas diluídas foram usadas como controles positivos (C+), 25 µM de Ilomastat foi utilizado como controle de inibição (C-), e compostos de teste controle sem MMP foram adicionados para avaliar a sua auto-imunofluorescência. Seis amostras de cada grupo foram realizadas para cada ensaio de MMP.

3.4. EXPERIMENTO 2 (PROPRIEDADES MECÂNICAS)

3.4.1. Teste de resistência máxima à tração (RMT)

Dez corpos de prova de adesivo (CPA) (n=10) de cada condição experimental foram produzidos em uma matriz metálica no formato de ampulheta (10 mm de comprimento, 2 mm de largura, e 1 mm de profundidade; Odeme Prod Odont Ltda, Joaçaba, SC, Brasil). Aplicou-se vaselina na base da matriz, em seguida, uma matriz de poliéster foi colocada em contato com a base da matriz. Depois de isolar a matriz com vaselina, os adesivos experimentais foram gotejados dentro da matriz até o completo preenchimento. Todas as bolhas de ar visíveis dos adesivos foram cuidadosamente retiradas com auxílio de um microaplicador (Microbrush® FGM, Prod. Odont. Ltda, Joinville, SC, Brasil). Em seguida, eles foram submetidos à evaporação do solvente com jato de ar livre de água por 40 s a uma distância de 10 cm.

Figura 3. Confeção de corpos de prova de adesivo (CPA), para teste de resistência máxima à tração



Fonte: Gutiérrez, 2016.

Uma matriz de vidro foi colocada sobre o adesivo e a superfície foi fotoativada com um aparelho fotopolimerizador a base de LED por 60 s com uma intensidade de 1000 mW/cm² (VALO, Ultradent Products, South Jordan, UT, EUA). A densidade de

energia adotada ($4,8 \text{ J/cm}^2$) permitiu a remoção dos espécimes da matriz sem sofrer deformação permanente. Os CPA foram removidos cuidadosamente da matriz com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo também removidas todas as rebarbas de adesivo (**Figura 3**).

Metade dos espécimes ($n=5$) foi testada imediatamente [IM] após o preparo e a outra metade ($n=5$) depois de ser armazenados em água por 28 dias [28 d] a 37°C . Os espécimes foram fixados individualmente em garras de Geraldeli aplicando em cada um dos extremos do CPA cola de cianoacrilato gel (Loctite Superbonder Power Easy Gel, Henckel, São Paulo, São Paulo, Brasil). Após o tempo de polimerização da cola, as garras com os CPA foram acopladas na máquina de ensaios universal (Kratos Dinamômetros, Cotia, São. Paulo, Brasil) e estes foram testados por tração a uma velocidade de $0,5 \text{ mm/min}$ com célula de carga de 100 N até rompimento da interface (Stanislawczuk et al. ⁹¹ 2014) (**Figura 4**).

Figura 4. Sequência para o teste de máxima resistência máxima à tração.



Fonte: Gutiérrez, 2016.

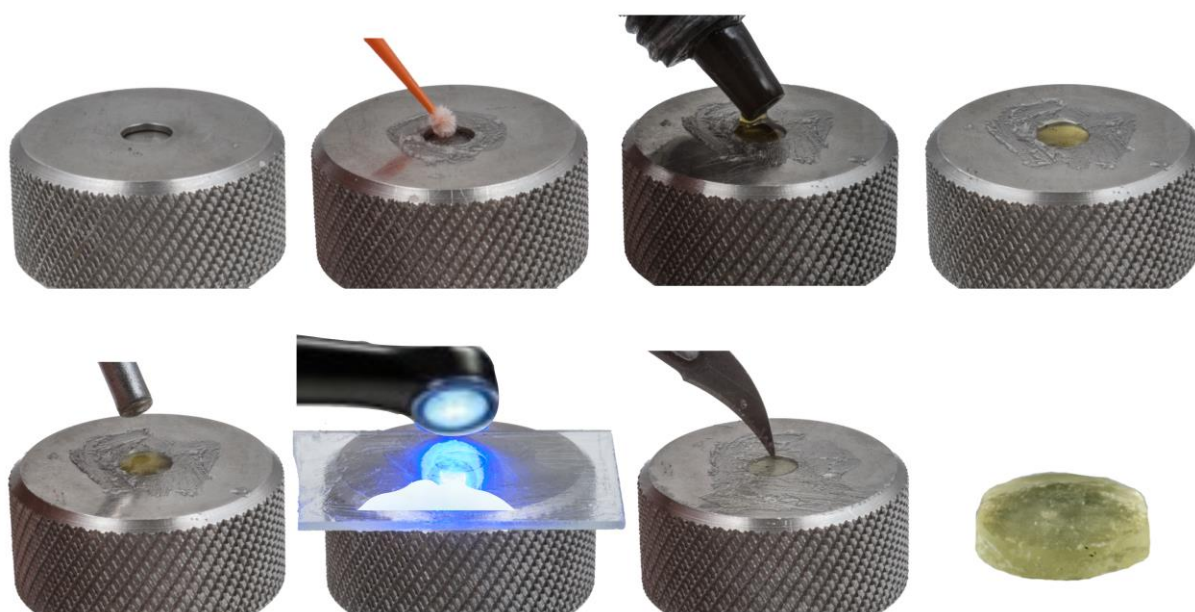
3.4.2. Microdureza Knoop (MD)

Cinco CPA de cada condição experimental ($n=5$) foram produzidos em uma matriz metálica cilíndrica ($5,0 \text{ mm}$ de diâmetro e $1,0 \text{ mm}$ de espessura; Odeme Prod Odont Ltda, Joaçaba, SC, Brasil). Aplicou-se vaselina na base da matriz, em seguida,

uma matriz de poliéster foi colocada em contato com a base da matriz. Depois de isolar a matriz com vaselina, os adesivos experimentais foram gotejados dentro da matriz até o completo preenchimento. Todas as bolhas de ar visíveis dos adesivos foram cuidadosamente retiradas com auxílio de um microaplicador (Microbrush® FGM, Prod. Odont. Ltda, Joinvile, SC, Brasil). Em seguida, eles foram submetidos à evaporação do solvente com jato de ar livre de água por 40 s a uma distância de 10 cm.

Uma matriz de vidro foi colocada sobre o adesivo e a superfície foi fotoativada com um aparelho fotopolimerizador a base de LED por 60 s com uma intensidade de 1000 mW/cm^2 (VALO, Ultradent Products, South Jordan, UT, EUA). A densidade de energia adotado (60 J/cm^2) permitiu a remoção dos espécimes da matriz sem sofrer deformação permanente. Os CPA foram removidos cuidadosamente da matriz com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo também removidas todas as rebarbas de adesivo (**Figura 5**).

Figura 5. Confeção de corpos de prova de adesivo (CPA) para o teste de microdureza.



Fonte: Gutiérrez, 2016.

Após a preparação, os espécimes foram armazenados em um frasco escuro durante 24 h. Os espécimes foram então testados após 24 h [IM] e depois de ser armazenados em água por 28 dias [28 d] a 37°C , num microdurômetro HMV 2

(Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com uma ponta indentadora Knoop. Foram realizadas cinco medidas em cada espécime com uma carga de 10 g por 15 s. A primeira medição foi realizada no centro do CPA. As outras quatro medidas foram realizadas 100 μm e 200 μm para a esquerda e para a direita da primeira. Os valores obtidos para o mesmo espécime foram calculados para fins estatísticos (Martins et al.⁹² 2014).

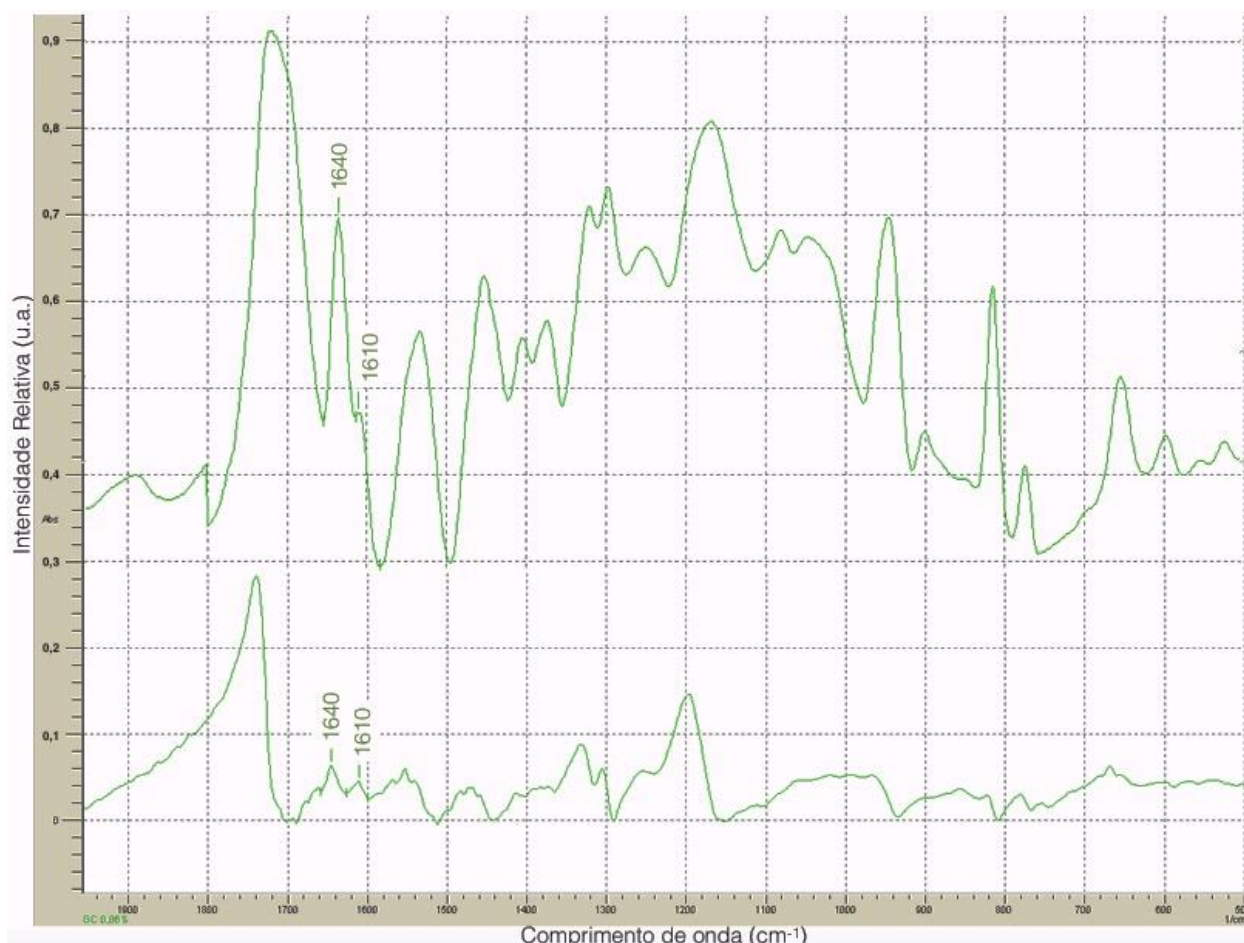
3.4.3. Grau de conversão (GC) de corpos-de-prova de adesivo (*in vitro*)

3.4.3.1. Espectrometria no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Uma gota (10 μL) da solução de adesivo de cada uma das concentrações estudadas foram colocados individualmente entre tiras de acetato de 8 mm x 8 mm para obter uma película fina de aproximadamente 8 mm de diâmetro. Antes de cobrir as gotas de adesivo com as tiras de acetato, foi aplicado sobre elas um jato de ar (10 s) para permitir a evaporação do solvente.

Um espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR; IRPrestige-21, Shimadzu, Tóquio, Japão) do material não polimerizado foi registrado e, em seguida as amostras foram fotoativadas durante 10 s com uma intensidade de 1000 mW/cm^2 (VALO, Ultradent Products, South Jordan, UT, EUA). Cada amostra foi cuidadosamente removida com uma lâmina de bisturi fina e armazenada durante 24 h em ambiente escuro e seco, até que a análise FTIR do GC fosse realizada. O espectro foi obtido com 32 varreduras a 1 cm^{-1} de resolução pelo método de transmissão. A percentagem de ligações carbônicas duplas que não reagiram (% C = C) foi determinada a partir da razão das intensidades de absorbância de C = C alifática (altura do pico, a 1640 cm^{-1}) contra o padrão interno, antes e depois da polimerização do espécime. A absorbância da ligação aromática carbono-carbono (altura do pico, a 1610 cm^{-1}) foi usada como um padrão interno. O GC foi determinado subtraindo a % de C = C de 100%. Três amostras foram testadas para cada grupo (**Figura 6**).

Figura 6. Espectros (FTIR) representativos, obtidos dos sistemas adesivos não polimerizados, e após sua fotoativação.



As setas indicam os picos de referência (1610 cm^{-1}) e reativo (1640 cm^{-1})

Fonte: Gutiérrez, 2016.

3.4.3.2. Espectrometria micro-Raman

Três CPA ($n=3$) de cada condição experimental foram produzidos (como descrito para microdureza) para análise do grau de conversão, medido por meio de espectrometria de micro-Raman (Senterra equipment, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha) (**Figura 7**). Antes das análises, o equipamento foi calibrado para redefinir o zero utilizando padrões de silício com valores de coeficientes conhecidos. As análises foram realizadas sob os seguintes parâmetros: laser de Neônio com 532 nm de comprimento de onda a 5 mW de potência; resolução espacial de $\approx 3\text{ }\mu\text{m}$; resolução espectral de $\approx 5\text{ cm}^{-1}$, com 10 s de tempo de acumulação e 5 coadições, em magnificação de $20\times$ para um laser de $\approx 1\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro. A análise iniciou obtendo-se os espectros com os picos de referência dos adesivos não

polimerizados (np). Para isso, cada sistema adesivo não polimerizado (np) foi dispensado em uma placa de vidro, a qual foi levada ao espectrofotômetro para leitura conforme os parâmetros já descritos.

A leitura dos adesivos polimerizados (p) foi realizada diretamente nos corpos de prova. Considerando as ligações duplas dos carbonos alifáticos (1639 cm⁻¹, pico reativo, no qual são detectadas as mudanças) e aromáticos (1609 cm⁻¹, pico referência, estável sem mudanças) (**Figura 8**). Para ambas as análises (np e p) foram determinados os valores da integrada (i) e a altura (a) dos picos registrados utilizando o software do equipamento Opus Spectroscopy 6.5 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha).

Assim, o GC das ligações duplas do monômero convertido em polímero foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: (Stanislawczuk et al. ⁹¹ 2014)

$$GC \% = \left[1 - \frac{I_{Reativo(p)_{1639}} / I_{Referência(p)_{1609}}}{I_{Reativo(np)_{1639}} / I_{Referência(np)_{1609}} \right] \times 100$$

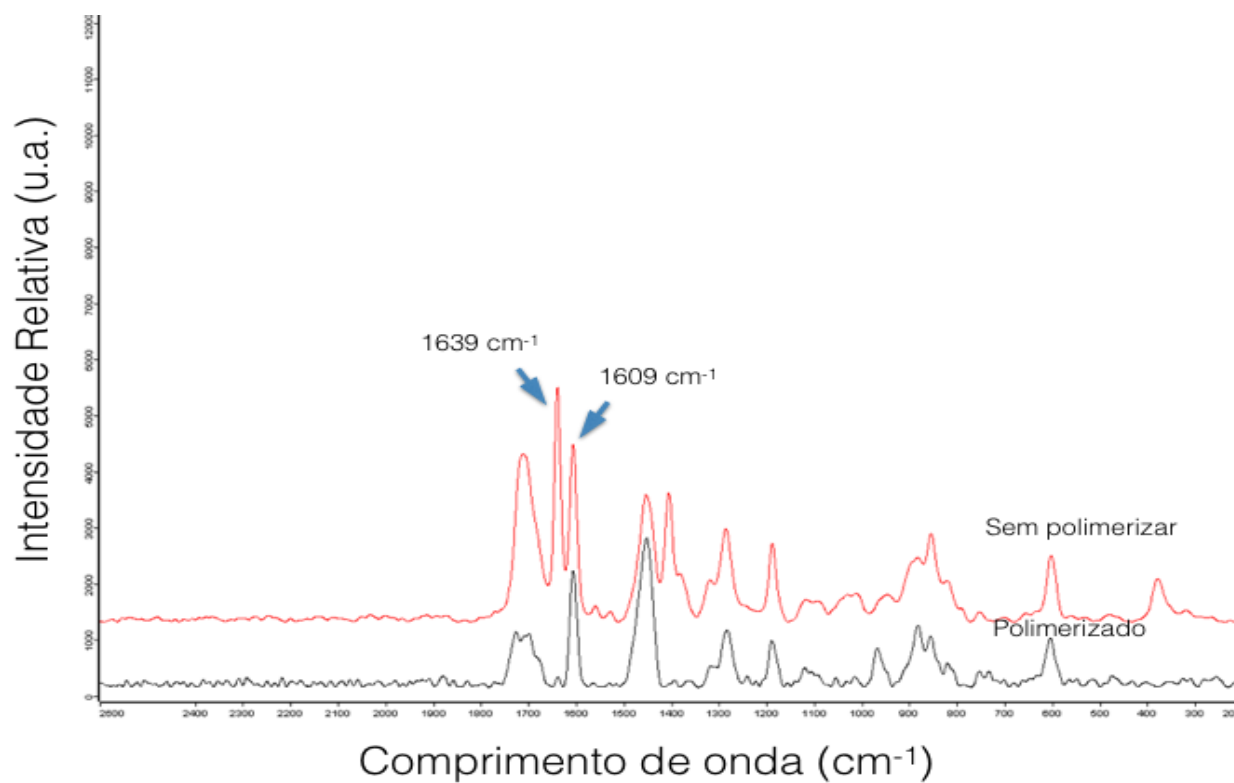
As análises espectrais foram obtidas de três sítios aleatoriamente selecionados em cada CPA. A partir disso, foi possível a obtenção das médias de cada CPA, as quais foram utilizadas na análise estatística (n = 3). As leituras iniciais (np) também foram realizadas em triplicata.

Figura 7. Espectrômetro micro-Raman utilizado neste estudo.



Fonte: <http://www.horiba.com>

Figura 8. Espectros (micro-Raman) representativos, obtidos dos sistemas adesivos não polimerizados, e após sua fotoativação.



As setas indicam os picos de referência (1609 cm^{-1}) e reativo (1639 cm^{-1}).
Fonte: Gutiérrez, 2016.

3.4.4. Sorção de água (SO) e solubilidade (SB)

Dez CPA de cada condição experimental ($n=10$) foram produzidos (como descrito para microdureza).

A especificação ISO 4049 foi empregada na determinação da SO e SB⁽⁹³⁾; Ito et al.⁹⁴ 2005; Malacarne et al.⁹⁵ 2006; Reis et al.⁹⁶ 2007). Imediatamente após a polimerização, os espécimes foram colocados em dessecadores, os quais foram transferidos para uma estufa pré-condicionada a 37°C, e deixados em repouso por 5 dias. Depois disso, foram pesados em intervalos de 24 h até que a variação de massa entre dois dias consecutivos fosse menor que 0,2 mg. Um paquímetro digital foi usado para medir a espessura e o diâmetro dos espécimes, com precisão de 0,01 mm, para calcular o volume (V) de cada amostra (em mm^3).

Em seguida, cada espécime foi colocado num eppendorf selado contendo 10 mL de água destilada (pH 7,2) a 37°C. Após intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 28 dias de tempo de armazenamento, cada espécime foi removido da estufa e deixado à temperatura ambiente durante 30 min. Em seguida, as peças foram lavadas em água corrente, limpas delicadamente com um papel macio e absorvente, e pesadas em uma balança analítica (m_2), retornando para os frascos com 10 mL de água fresca.

Após o tempo de armazenamento de 28 dias, as amostras foram secas em dessecadores contendo sílica gel a 37°C, as quais permaneceram em repouso durante 10 dias ou até que as variações de massa fossem inferiores a 0,2 mg, obtendo-se uma massa constante (m_3). Em seguida, foi medido cada resultado de massa contra a massa pré-eppendorf (m_1) para o cálculo da variação da massa depois de cada intervalo de tempo fixo, durante os 28 dias de armazenamento em água. Foram relacionadas as mudanças na massa contra o tempo de armazenamento para obter a cinética de SO durante todo o período de armazenamento em água. A SO e a SB ao longo dos 28 dias de armazenamento de água foram calculados utilizando as seguintes fórmulas: $SO = (m_2 - m_3) / V$ e $SB = (m_1 - m_3) / V$ (Stanislawczuk et al.⁹¹ 2014).

3.4.5. Comportamento de liberação do zinco e cobre a partir de corpos de prova de adesivos

Foi utilizada uma série de soluções padrão contendo 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1 ppm ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de zinco e cobre para se obter uma curva com uma regressão linear entre os valores de absorção e concentrações de zinco e cobre, usando espectrometria de absorção atômica de chama (AA240FS Fast Sequential Atomic Absorption Spectrometer; Varian Inc., Lake Forest, CA, EUA). Confirmou-se a absorbância máxima de zinco em 213,9 nm e de cobre em 324,8 nm (Thermo Fisher Scientific ⁹⁷).

Foram produzidos cinco novos CPA de cada material, os quais foram armazenados individualmente em 10 mL de uma solução pré-misturada de água ultra pura e de ácido nítrico, em concentração de 2% (V/V) de HNO_3 . Em intervalos de tempo apropriados (1, 3 e 12 h e 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias), utilizou-se 1 mL dessas soluções de armazenamento, ao qual foram adicionados 100 μL de ácido nítrico, e em seguida, foi completado até um volume final de 5 mL com água ultrapura. Foram obtidos os valores de absorção dessas soluções em 213,9 nm e 324,8 nm, os quais foram convertidos para quantidade de zinco e cobre (software SpectrAA CFR; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), considerando a curva analítica de regressão linear. Uma quantidade igual de solução de HNO_3 a 2% foi adicionada nas soluções de armazenamento para substituir o volume removido. Depois de cada adição da solução de HNO_3 a 2%, foi feita uma correção matemática (Correção de Bolton) para compensar a diluição. A liberação cumulativa foi obtida para 28 dias e foi representada como ppm (mg/L) de zinco e cobre liberado de cada condição experimental.

A avaliação matemática dos perfis de liberação *in vitro* foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo monoexponencial, ao modelo biexponencial, ao modelo de ordem zero, ao modelo de Weibull e ao modelo Monolag (**Tabela 3**), considerando os resultados do critério de seleção de modelo (MSC), do coeficiente de correlação, do ajuste gráfico e da coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade para cada modelo.

Tabela 3. Modelos matemáticos relacionados aos experimentos de liberação de oxido de zinco e cobre

Modelo	Equação
Monoexponencial	$\%D = 100(1 - e^{-kt})$
Biexponencial	$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$
Ordem zero	$\%D = kt$
Weibull	$\%D = 100[1 - e^{-(t/TD)^b}]$
Monolag	$\%D = 100[1 - e^{-k(t-x)}]$

Onde: % D, o percentual do fármaco dissolvido no tempo; t, k, α e β , as constantes cinéticas de dissolução verificadas; A e B, as concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução; TD, o tempo no qual 63,2 % do fármaco é dissolvido; b, o parâmetro relacionado às características estruturais e geométricas da forma farmacêutica.

Fonte: O Autor.

O modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas ou lei das potências foi também aplicado, permitindo a obtenção dos parâmetros a e n, com a finalidade de ampliar a informação sobre o mecanismo de liberação do óxido de zinco e cobre a partir dos corpos de prova de adesivo seguindo a seguinte fórmula

$$ft = at^n$$

Onde: a, a constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica; n, o expoente de liberação que é indicativo do mecanismo de liberação; ft representa a fração do fármaco dissolvido no tempo t.

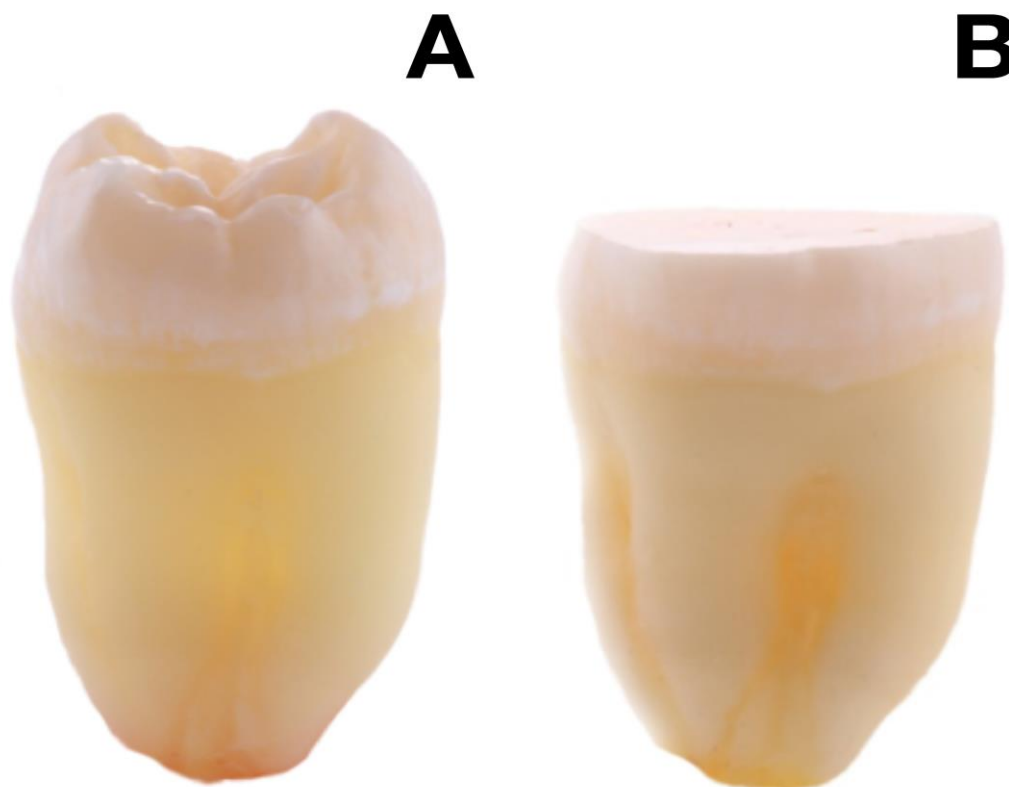
Para sistemas esféricos, a lei das potências apresenta duas interpretações físico-químicas distintas. Quando n assume um valor inferior a 0,43, isso indica que a liberação da substância é controlada por difusão (mecanismo de transporte Fickiano). Quando n é superior a 0,85, indica que a liberação é controlada pelo inchamento do polímero (transporte caso II ou mecanismo de transporte não-Fickiano). Valores de n entre 0,43 e 0,85 estão relacionados com a sobreposição de ambos os fenômenos, denominado de transporte anômalo (Siepmann e Peppas ⁹⁸ 2001; Siepmann e

Peppas⁹⁹ 2001). Os métodos modelo-dependentes destinados à avaliação dos perfis de liberação foram aplicados com o auxílio do software MicroMath Scientist[®] (versão 2.01, SL, EUA). O software MathWorks Matlab[®] R2012a (Natick, MA, EUA) foi utilizado para obter um intervalo de tempo necessário para se atingir uma liberação de 50% do zinco e do cobre liberado

3.5. EXPERIMENTO 3 (PROPRIEDADES ADESIVAS À DENTINA)

Duzentos e dezesseis molares humanos livres de cárie, obtidos de pacientes com idade entre 18 e 35 anos, foram utilizados. Os dentes foram desinfetados em cloramina 0,5% e armazenados em água destilada trocada semanalmente até sua utilização, em um prazo máximo de até 3 meses após extração. Com o auxílio de uma politriz (Arotec E, Cotia, São Paulo, Brasil) e usando lixa de carbeto de silício de granulação #180, sob irrigação constante, foi retirado o esmalte oclusal e planificada a superfície dos molares até exposição da dentina (**Figura 9**). Após isso, os dentes foram aleatoriamente assinados em dois grupos (n = 108). No primeiro grupo foram realizados os procedimentos adesivos sob dentina hígida. No segundo grupo, foi realizada uma indução microbiológica de cárie, e os procedimentos adesivos foram realizados sob dentina afetada por cárie.

Figura 9. Preparo da superfície de dentina (desgaste do esmalte oclusal)



(A) dente hígido; (B) superfície oclusal planificada em dentina.

Fonte: Gutiérrez, 2016.

3.5.1. Preparo dos dentes hígidos

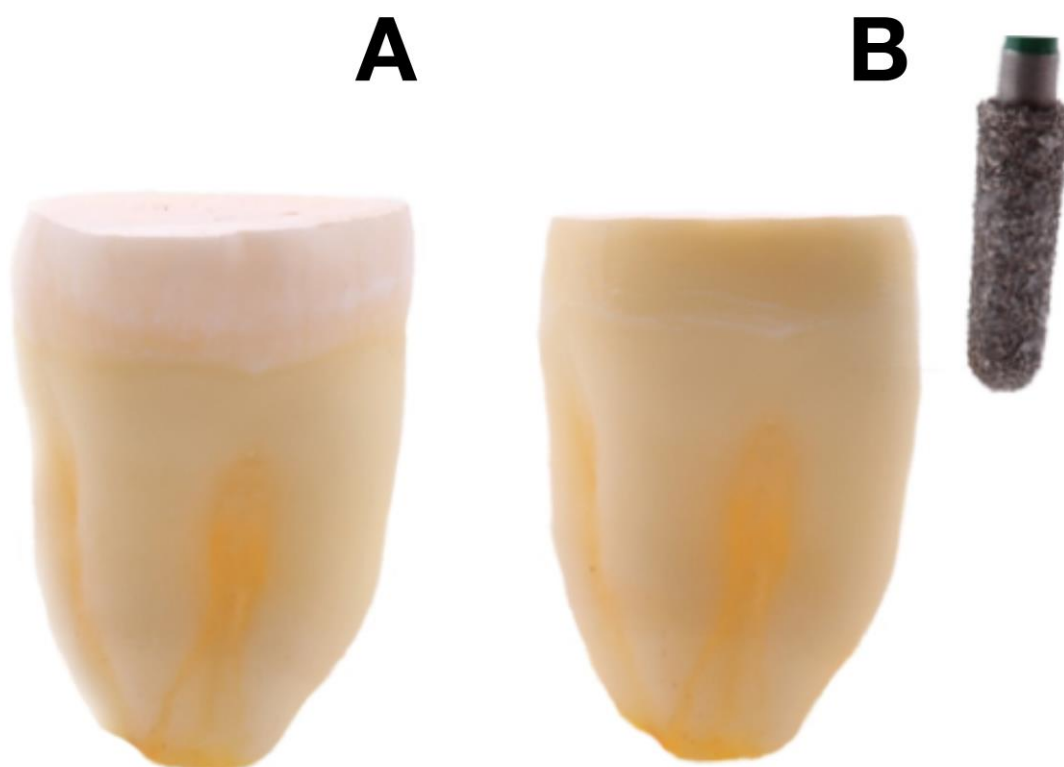
As bordas periféricas de esmalte (n = 108) foram totalmente desgastadas com pontas diamantadas nº 4137 (KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil) em alta rotação e irrigação constante, deixando unicamente tecido dentinário. A seguir, as superfícies de dentina foram polidas manualmente sob irrigação por 60 s para a padronização da *smear layer* utilizando lixas de carbeto de silício de granulação #600 (Extec, Enfield, Connecticut, EUA) (Gutierrez et al. ⁶⁸ 2017)(**Figura 10**).

3.5.2. Preparo dos dentes cariados artificialmente

Lesões artificiais foram induzidas na superfície oclusal dos 91 dentes, usando o método microbiológico descrito por Marquezan (Marquezan et al. ¹⁰⁰ 2009) et al. Em todas as superfícies do dente, com exceção da superfície oclusal, o esmalte circundante foi mantido para evitar a formação de lesões de cárie nestas regiões. Os espécimes foram esterilizados e depois transferidos assepticamente a um tubo falcon estéril com a solução de cárie artificial. A solução foi composta de: 3.7 g de ágar de infusão de cérebro-coração (BHI) (Sigma Aldrich, St Luis, Misuri, EUA), 0,5 g de extrato de levedura (Sigma Aldrich, St Luis, Misuri, EUA), 2.0 g de sacarose, 1.0 g de glucose por cada 100 mL de água destilada e 100 µL de cultivo primário de *Streptococcus mutans* (ATCC25175), com um pH ao redor de 4.0. Cada dente foi imerso individualmente em 25 mL da solução de cárie em um tubo falcon. Os espécimes foram incubados em 5% de CO₂ a 37°C em uma jarra microaerofílica (BBL, GasPak system, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, EUA). A cada 48 h os espécimes foram transferidos a um novo tubo falcon contendo uma solução de cárie artificial nova. Após 14 dias, os espécimes foram esterilizados e lavados com água destilada (Marquezan et al. ¹⁰⁰ 2009).

Posteriormente, as bordas periféricas de esmalte foram totalmente desgastadas com pontas diamantadas nº 4137 (KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil) em alta rotação e irrigação constante, deixando apenas tecido dentinário. A seguir, as superfícies de dentina foram polidas manualmente sob irrigação por 30 s para a eliminação da dentina infetada por cárie, utilizando lixas de carbeto de silício de granulação #600 (Extec, Enfield, Connecticut, EUA) (**Figura 10**).

Figura 10. Preparo da superfície de dentina (desgaste do esmalte proximal).

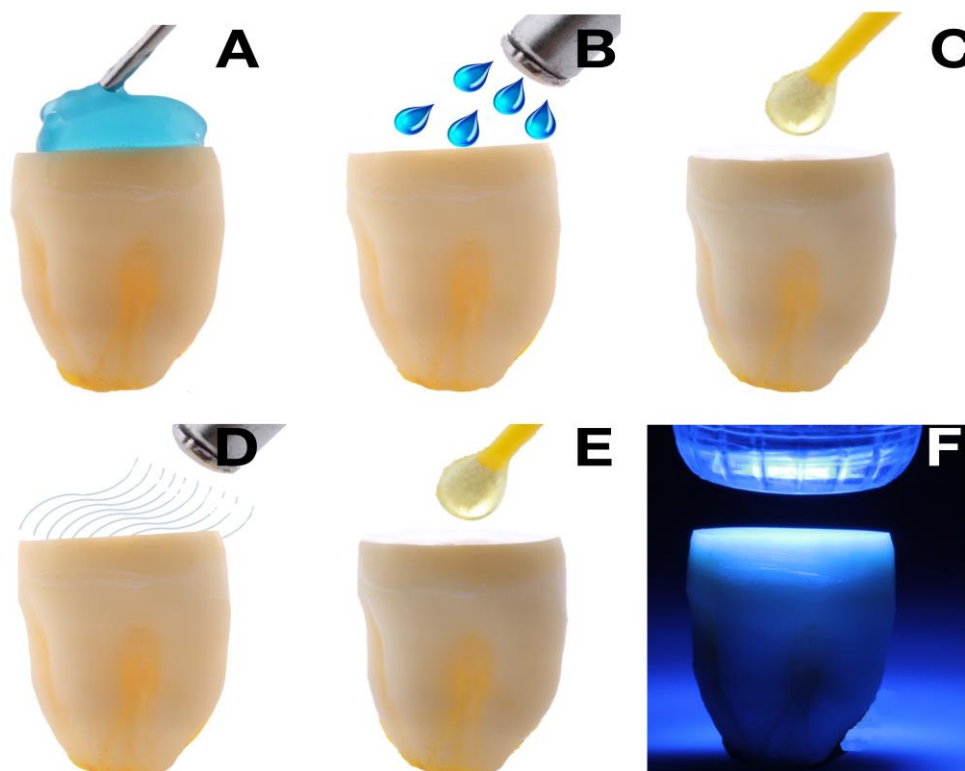


(A) superfície oclusal planificada em dentina; (B) desgaste de todas as bordas periféricas de esmalte.
Fonte: Gutiérrez, 2016.

3.5.3. Procedimentos adesivos

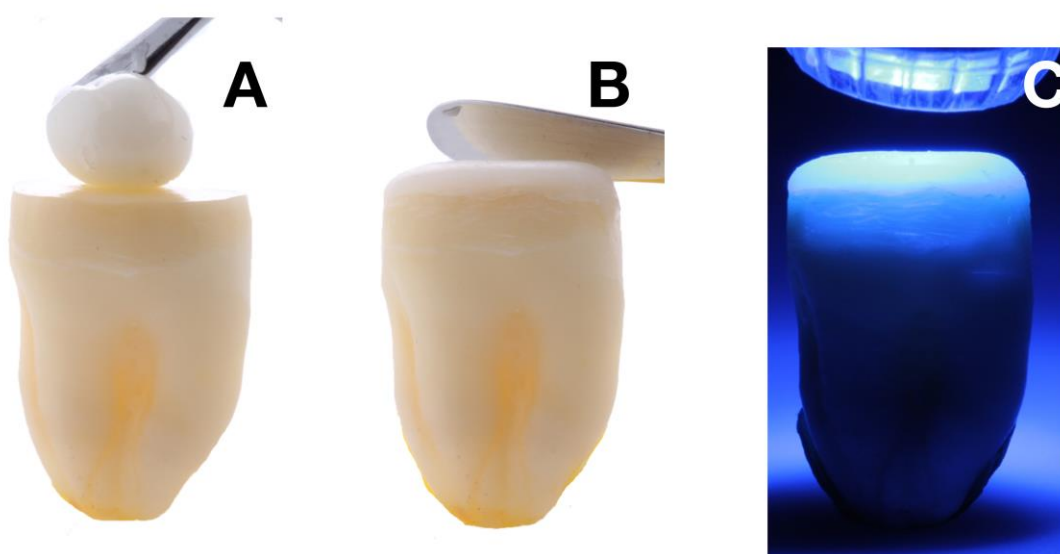
Os adesivos em todas as concentrações, foram aplicados segundo as indicações do fabricante (Tabela 2) (**Figura 11**). Os sistemas adesivos foram fotoativados por 10 s usando um aparelho fotopolimerizador a base de LED com uma intensidade de 1000 mW/cm^2 (VALO, Ultradent Products, South Jordan, UT, EUA) (**Figura 11**). Após os procedimentos adesivos, todos os dentes foram restaurados com uma resina composta microhíbrida (Opallis, FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) em três incrementos de 1 mm, sendo cada incremento fotoativado por 40 s com o mesmo aparelho fotopolimerizador (VALO, Ultradent Products, South Jordan, UT, EUA) (**Figura 12**). Um único operador realizou todos os procedimentos adesivos. Cinco dentes foram utilizados para cada grupo experimental.

Figura 11. Estratégia adesiva



(A) condicionamento ácido; (B) lavagem e secagem; (C) aplicação do adesivo; (D) secagem para evaporação do solvente; (E) aplicação de segunda camada do adesivo; (F) fotoativação. Todos os procedimentos realizados segundo as indicações do fabricante, os quais se mostram na Tabela 1.
Fonte: Gutiérrez, 2016.

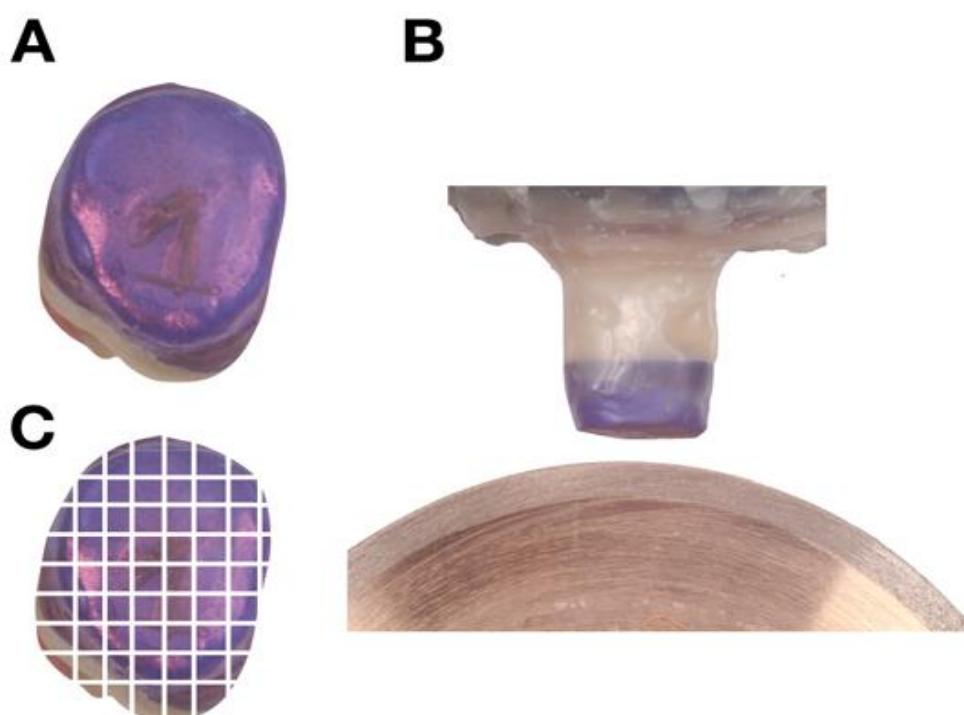
Figura 12. Restauração dos dentes após aplicação das variáveis adesivas.



(A) Colocação da resina composta; (B) adaptação de cada incremento (3); (C) fotoativação de cada incremento.
Fonte: Gutiérrez, 2016.

Os dentes restaurados foram armazenados em água destilada a 37° C por 24 h e levados a uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, Illinois, EUA). Com ajuda de um disco diamantado (15 HC-4in, Buehler Ltd., Lake Bluff, Illinois, EUA), sob irrigação a 300 rpm, os dentes foram seccionados em cortes perpendiculares no eixo “x” e outra no eixo “y”, obtendo-se espécimes no formato de “palitos” com uma área de secção transversal de $0,8 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ (**Figura 13**). O número de falhas prematuras (FP) por dente durante a preparação dos palitos foi registrada. A área de secção transversal foi medida com um paquímetro digital e registrada para o subsequente cálculo de microtração (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Kanagawa, Tóquio, Japão).

Figura 13. Sequência de corte para a obtenção dos palitos.



(A) superfície oclusal das coroas de resina compostas pintadas com caneta marcadora permanente 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, permitiram a obtenção dos palitos para o teste de resistência de união. Fonte: Gutiérrez, 2016.

3.5.4. Teste de resistência de união à dentina por microtração (RU)

Os palitos obtidos foram colados individualmente em garras de Geraldeli (Odeme Biotechnology, Joaçaba, Santa Catarina, Brasil) (Perdigão et al. ¹⁰¹ 2002) aplicando em cada um dos extremos do palito cola de cianocrilato gel (Loctite Superbonder Power Easy Gel, Henckel, São Paulo, São Paulo, Brasil) de forma a não contaminar a interface dente-restauração. Após o tempo de polimerização da cola, as garras com os palitos foram acopladas na máquina de ensaios universal (Kratos Dinamômetros, Cotia, São. Paulo, Brasil) e estes foram testados por tração a uma velocidade de 0,5 mm/min com célula de carga de 100 N até rompimento da interface (**Figura 14**).

Figura 14. Sequência para o teste de microtração.



(A) mensuração da largura e da espessura do mesmo palito, com paquímetro digital, para o cálculo da área da interface adesiva. (B) cola de cianocrilato em gel (que permite controle da aplicação). (C) aplicação da cola nas extremidades do palito, protegendo a interface e posicionamento do palito nas garras de microtração deixando a interface adesiva no espaço central da garra; (D) adaptação das garras na máquina de ensaios universais após a polimerização da cola.

Fonte: Gutiérrez, 2016.

Utilizando uma lupa estereoscópica com 100x de magnificação (Olympus SZ40, Shinjuku-ku, Tóquio, Japão), a falha de cada palito foi classificada segundo o tipo de fratura como:

- Adesiva, falha na interface adesiva dente/restauração;
- Coesiva em dentina, falha exclusivamente em dentina;
- Coesiva em resina, falha exclusivamente em resina composta;
- Adesiva/Mista, falha na interface adesiva dente/restauração, mas que incluiu falha coesiva dos substratos vizinhos;
- Falhas prematuras, palitos que quebraram antes dos testes.

3.5.5. Avaliação da Nanoinfiltração (NI) por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Dois palitos provenientes de cada dente para os tempos IM e 1A, foram reservados para análise de NI. Utilizando eppendorfs (OA12, Odeme Biotechnology, Joaçaba, SC, Brasil), os palitos foram imersos em uma solução aquosa (pH=7,0) de nitrato de prata amoniacal 50% em peso (Tay et al. ¹⁰² 2002) e armazenados por 24 h em ausência de luz. Após o tempo de infiltração, os palitos foram lavados com água destilada abundantemente e imersos em solução reveladora (Kodak, Rochester, Nova Iorque, EUA) por 8 h sob luz fluorescente, para a redução dos íons de prata ao longo das nanoporosidades da interface de união.

Depois, os palitos foram novamente lavados em água corrente e fixados com cianocrilato em *stubs* de alumínio para facilitar o polimento uniforme das amostras, que foi realizado em uma politriz de bancada (ALM 4, Arotec, Cotia, São Paulo, Brasil) sob escoamento contínuo da água com lixas de granulações 1000, 1200, 1500, 2000, 2500 e 4000 e pastas diamantadas com granulações decrescentes de 6, 3, 1 e 0,25 μm (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA). Entre cada lixa e as pastas de polimento, as amostras foram lavadas em cuba ultrassônica por 8 min seguidos de escoamento de água sobre a superfície por 2 min. As amostras foram deixadas então, por 30 min em cuba ultrassônica. Para o processo de desidratação as amostras foram deixadas em um dessecador contendo sílica coloidal por 24 h para, então, serem metalizadas em carbono/ouro (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) (**Figura 15**).

Figura 15. Preparação de amostras para nanoinfiltração



(A) palitos imersos em uma solução aquosa de nitrato de prata (pH=7,0) armazenados por 24 h sob total escuridão; (B) após lavagem, imersos em solução reveladora por 8 h sob luz fluorescente; (C) palitos revelados, montados em stubs de alumínio para facilitar o polimento uniforme; (D) palitos dessecados em sílica por 24 h; (E) palitos metalizados para a análise de MEV (F).
Fonte: Gutiérrez, 2016.

As interfaces resina-dentina foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (VEGA SB; Tescan, Warrendale, PA, EUA) em modo de elétrons retroespalhados. Um operador, que desconhecia a origem dos palitos a serem analisados, realizou três fotomicrografias com aumento 1200X da interface dente-restauração de cada um dos palitos, sendo uma no centro e outras duas 3 μm à esquerda e à direita do centro, para padronizar a aquisição das imagens. A porcentagem relativa de nitrato de prata nas áreas ocupadas pela camada híbrida e camada de adesivo foram consideradas na mensuração automatizada da NI utilizando o Image J software para Mac OS (National Institutes of Health, EUA)(Schneider et al. 2012) operado por apenas um avaliador, o qual desconhecia a que grupo experimental pertencia a imagem. Assim, foram obtidas as médias dos valores percentuais de NI dos palitos, no tempo IM.

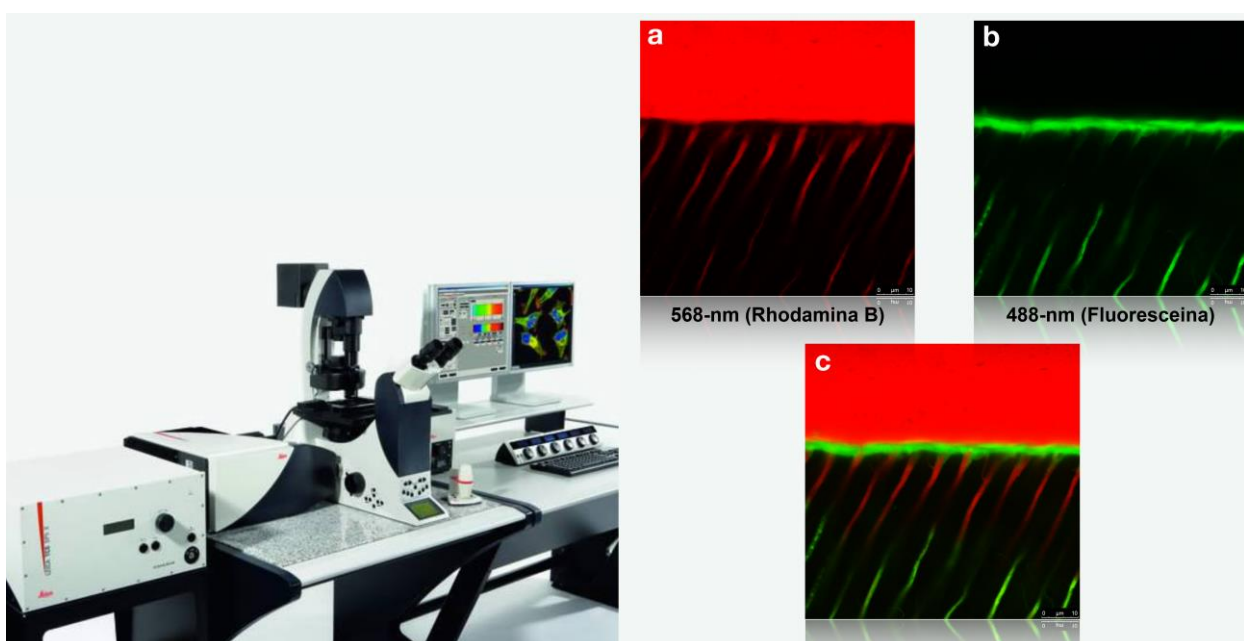
3.5.6. Análise da interface de união e microinfiltração por meio de Microscopia Eletrônica Confocal Laser (MI)

Para este teste, previamente à restauração dos dentes, a resina e o adesivo foram misturados com 0.2 % (peso) de Rhodamina B (Sigma Aldrich, EUA) com o intuito de serem detectados na análise em Microscopia Eletrônica Confocal Laser (MECL). Uma vez obtida uma mistura homogênea destes materiais, os procedimentos restauradores foram realizados como descrito no item 3.5.3.

Dois dentes foram aleatoriamente alocados em cada um dos grupos experimentais, tanto em dentes hígidos, quanto em dentes afetados por cárie. Após 24 h da restauração dos dentes, todos os espécimes foram cortados longitudinalmente até obter 2 fatias de 1,2 mm de espessura. Uma das fatias foi imersa numa solução de fluoresceína (Sigma Aldrich, EUA) ao 0,1 % (peso) por 4 h. Após este tempo, todos os espécimes foram limpos em cuba ultrassônica com água destilada por 8 min e finalmente polidos utilizando lixas de carbetto de silício de granulação #1200 (Extec, Enfield, Connecticut, EUA) por 1 min (Toledano et al. ¹⁰⁴ 2014; Sauro et al. ¹⁰⁵ 2012).

Um microscópio eletrônico confocal à laser MECL (Leica TCLS, Leica, Heidelberg, Alemanha) equipado com uma lente de imersão em óleo de 63x/4 NA, um laser de Ar/Kr em modo de excitação de 488-nm (excitação da Fluoresceína), e um laser de He/Ne em modo de excitação de 568-nm (excitação da Rhodamina B) foi empregado para análise das interfaces adesivas. A emissão fluorescente foi coletada a 512-538 e 585-650 nm, respectivamente. Duas regiões diferentes de cada fatia foram selecionadas após feita uma análise geral da amostra com visão de 0,75 x de zoom ao longo do espécime. Imagens ópticas da reflexão da fluorescência e da Rhodamina B foram capturadas a partir da sub-superfície do espécime, com 5 µm e 10 µm de profundidade (intervalos Z de 5 µm) abaixo da superfície externa da amostra e convertidas em imagens únicas usando o programa de processamento de imagem Leica LAS X (Leica, Heidelberg, Alemanha) (Sauro et al. ¹⁰⁶ 2012). A configuração do sistema foi padronizada e usada ao mesmo nível durante todo o estudo. Em seguida, as imagens foram avaliadas qualitativamente por dois avaliadores. (**Figura 16**).

Figura 16. Representação da captura da imagem nos canais dos lasers do CSLM.



A) Excitação do Laser 568 nm (Rhodamina B). B) Excitação do laser 488 nm (Fluoresceina). C) Superposição de Imagens A + B.
Fonte: O Autor.

3.5.7. Grau de conversão (GC) de adesivo na interface de união à dentina

Dois dentes foram aleatoriamente alocados em cada um dos grupos experimentais, tanto em dentes hígidos, quanto em dentes afetados por cárie. Após 24 h da restauração dos dentes, todos os espécimes foram cortados longitudinalmente até obter 2 fatias de 1,2 mm de espessura.

As fatias ($n = 2$) foram selecionadas aleatoriamente e submetidas ao teste de GC. Previamente ao teste, as fatias receberam breve polimento com lixa de SiC de granulação #4000 (Buehler Ltd., Lake Bluff, Illinois, EUA) no sentido contrário à interface de união, durante 30 s. A seguir as fatias foram lavadas em cuba ultrassônica (Dabi Atlante – 3L, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) por 10 min e armazenados em água destilada a 37°C por 24 h antes da leitura de GC.

A análise de GC foi realizada na camada híbrida com um espectrofotômetro de micro-Raman (Senterra equipment, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha). Antes das análises, o equipamento foi calibrado para redefinir o zero utilizando padrões de silício com valores de coeficientes conhecidos.

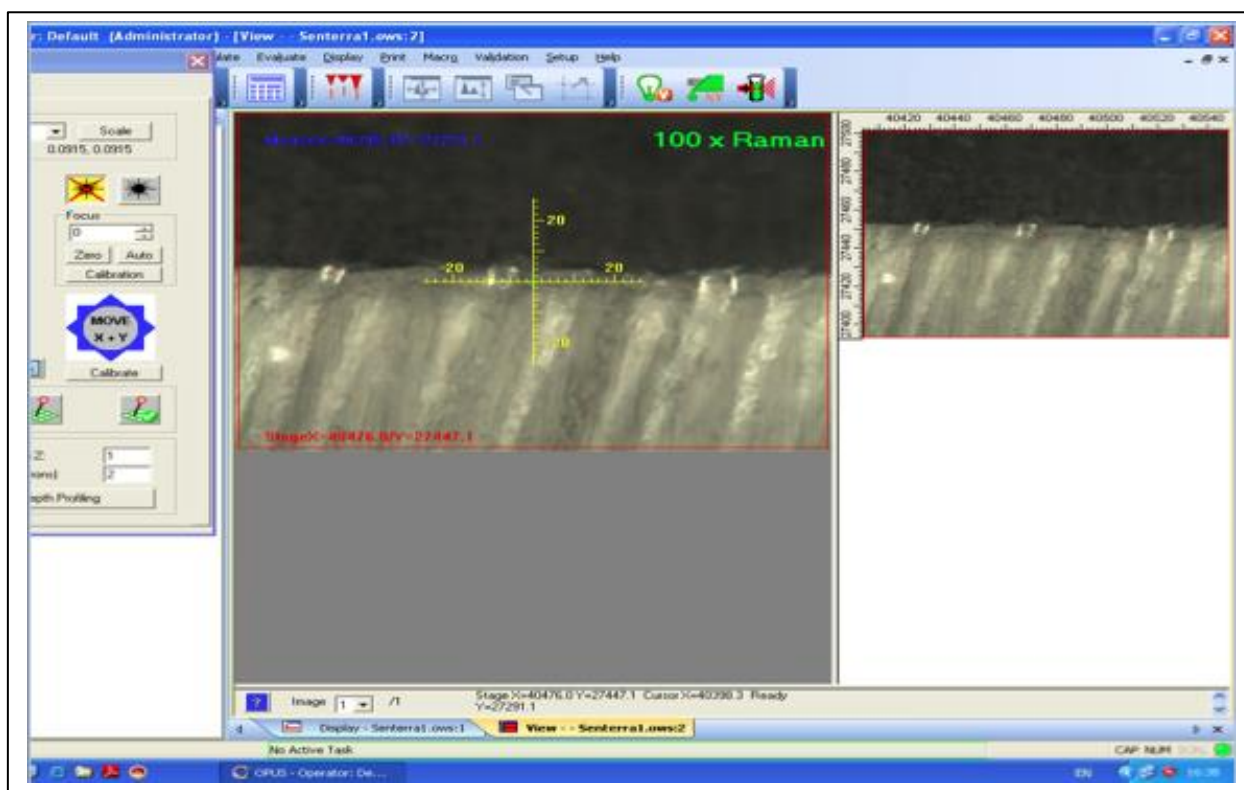
As análises foram realizadas sob os seguintes parâmetros: laser de Neônio

com 532 nm de comprimento de onda a 20 mW de potência; resolução espacial de $\approx 3 \mu\text{m}$; resolução espectral de $\approx 5 \text{ cm}^{-1}$, com 30 s de tempo de acumulação e 6 condições, em magnificação de 100x para um laser de $\approx 1 \mu\text{m}$ de diâmetro. A análise iniciou obtendo-se os espectros com os picos de referência dos adesivos não polimerizados (np). Para isso, cada sistema adesivo foi dispensado e misturado em uma placa de vidro, a qual foi levada ao espectrofotômetro para leitura conforme os parâmetros já descritos. A leitura dos adesivos polimerizados (p) foi realizada diretamente na camada híbrida. Considerando as ligações duplas dos carbonos alifáticos (1639 cm^{-1} , pico reativo, para os quais foram verificadas mudanças) e aromáticos (1609 cm^{-1} , pico referência, estáveis sem mudanças). Para ambas as análises (np e p) foram determinados os valores da integrada (I) dos picos registrados utilizando o software do equipamento Opus Spectroscopy 6.5 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha). Assim, o GC das ligações duplas do monômero convertido em polímero foi calculado com a seguinte fórmula: (Stanislawczuk et al. ⁹¹ 2014)

$$GC \% = \left[1 - \frac{I \text{ Reativo } (p)_{1639} / I \text{ Referência } (p)_{1609}}{I \text{ Reativo } (np)_{1639} / I \text{ Referência } (np)_{1609}} \right] \times 100$$

As análises espectrais foram obtidas de três sítios aleatoriamente selecionados na região intertubular da camada híbrida de cada palito (**Figura 17**). A partir disso foi possível a obtenção das médias de cada dente, as quais foram utilizadas na análise estatística ($n = 3$). As leituras iniciais (np) também foram realizadas em triplicata.

Figura 17. Avaliação de grau de conversão do adesivo, na zona da camada híbrida, na interface de união à dentina.



Fonte: Hass, 2015.

Dois palitos provenientes de cada dente para os tempos IM e 1A, foram reservados para análise de EDS, para identificação da presença de zinco e cobre na camada híbrida. A análise foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura por efeito de campo (FEG) (MIRA3 LM; Tescan, Warrendale, PA, EUA). Foi utilizado uma tensão de aceleração de elétrons de 10 kV e ampliação das imagens em 40 e 60 kx.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

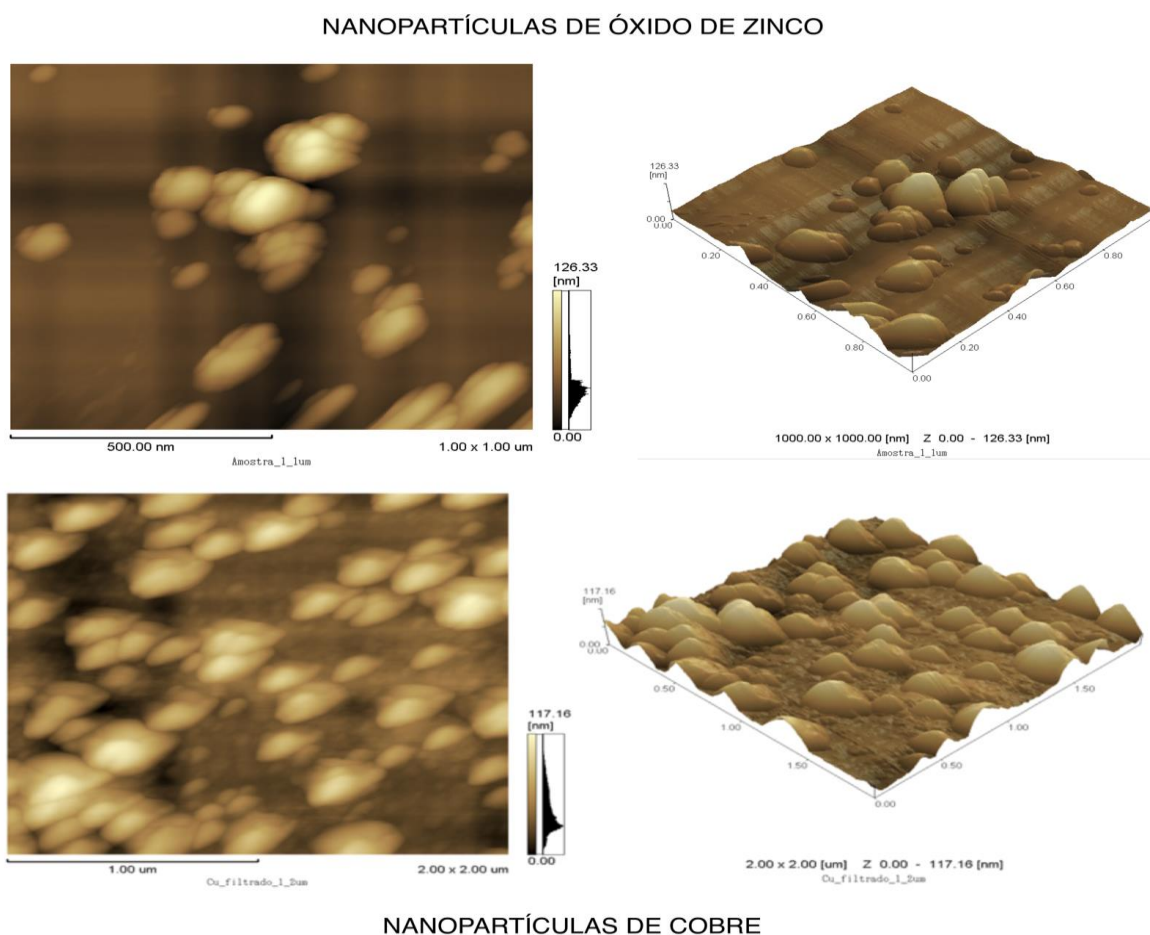
As médias e desvios-padrão da AAM (mm), CTX (%), atividade anti-MMP (URF), RMT (MPa), MD (KNH) GC *in vitro* e *in situ* (%), SO e SB ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) e liberação de cobre (% e ppm), assim como os dados de RU (MPa) e NL (%) foram calculados para todas as condições experimentais. Os dados de AAM, atividade anti-MMP, GC *in vitro* e *in situ*, SO, SB e liberação de zinco e cobre os dados foram analisados por uma análise de variância de 1 fator. Os dados de CTX, RT e MD foram analisados por uma análise de variância de 2 fatores. Para RU e NI, de cada adesivo foram submetidos a análise de variância de 2 fatores para medidas repetidas. A medida repetida foi o dente. Também foi feito o teste *post hoc* de Tukey para múltiplas comparações. A significância estatística foi predefinida em $\alpha = 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. TESTES MORFOLÓGICOS E COMPOSICIONAIS

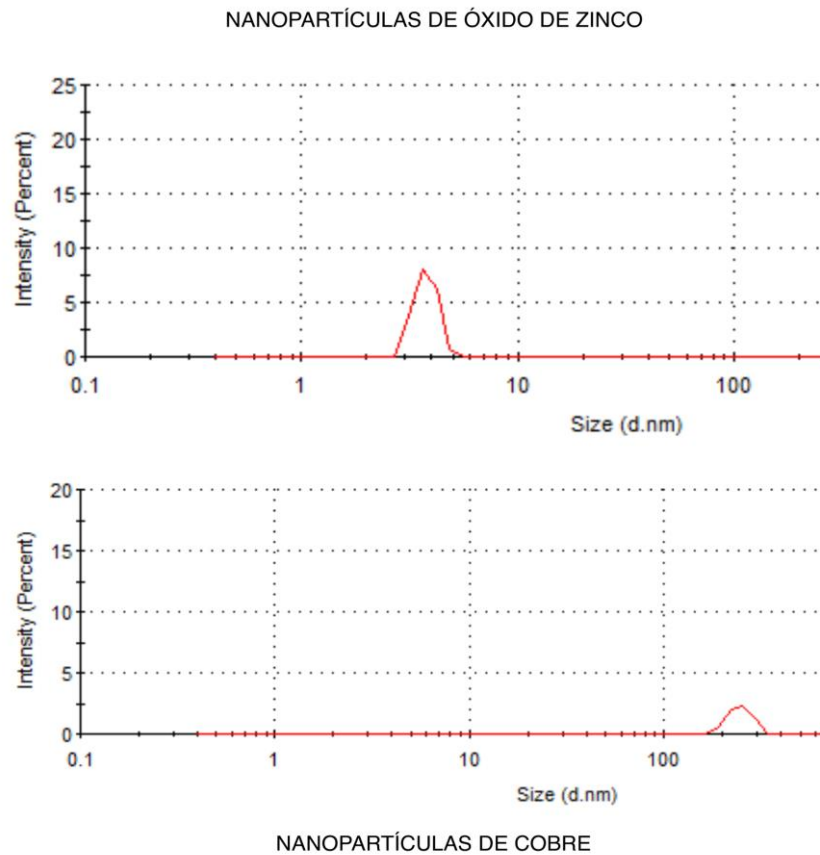
As análises morfológicas conduzidas por microscopia de força atômica (AFM), Z-size, microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG) (**Figuras 18 a 20**) mostraram um tamanho de partículas entre 48 e 58 nm pra o zinco e entre 117 e 265 nm pra o cobre. A análise composicional (espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)) revelou que as amostras apresentaram alta percentagem de átomos de zinco (**Figura 21a**) e de cobre (**Figura 21b**), sem contaminação com outros elementos.

Figura 18. Tamanho de partícula medido através de microscopia de força atômica (AFM).



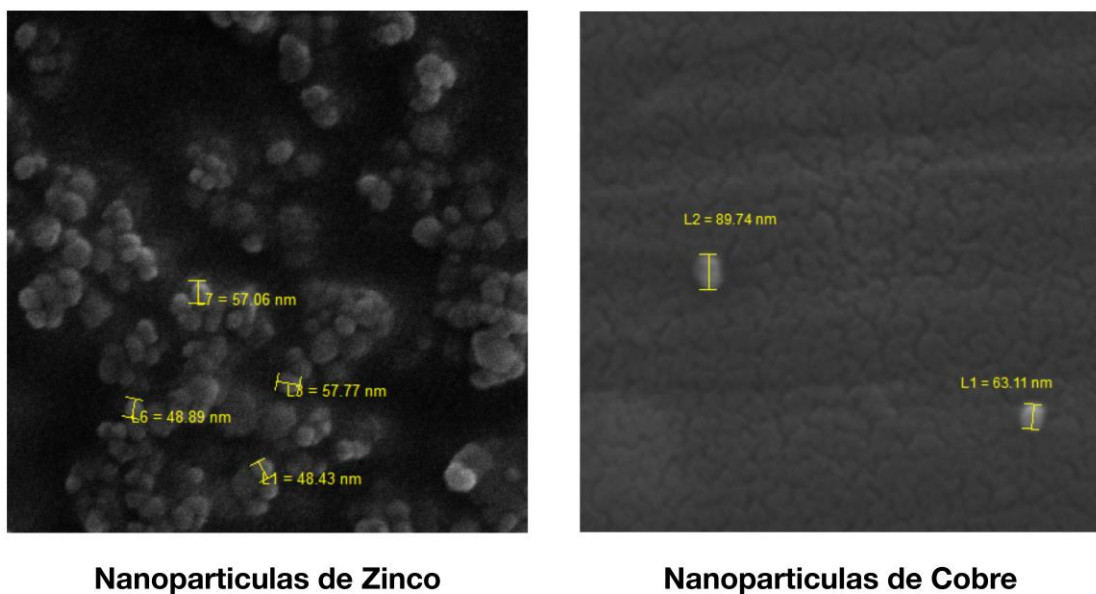
Fonte: O Autor

Figura 19. Histograma de tamanhos de partícula e sua frequência (%), medido através de Zeta Sizer.



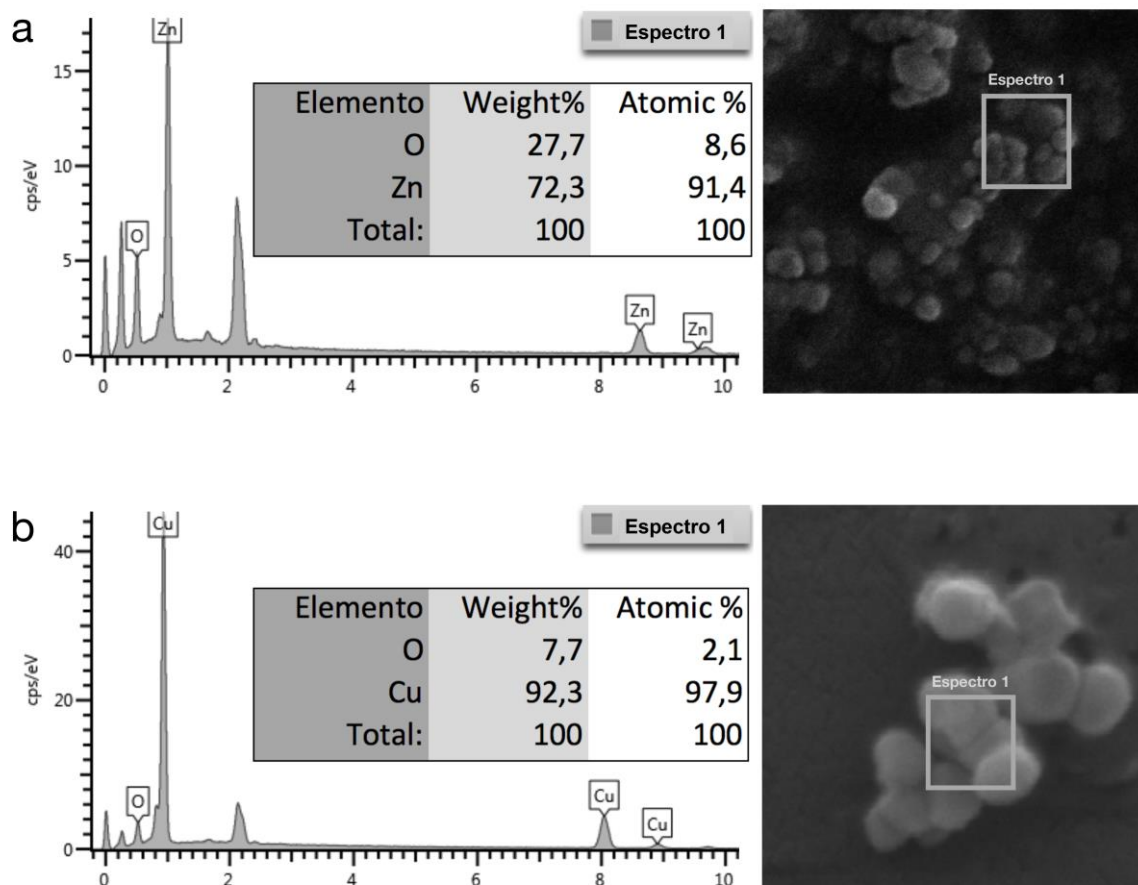
Fonte: O Autor.

Figura 20. Tamanho de partícula medido através de microscópio eletrônico de varredura por efeito de campo (FEG).



Fonte: O Autor.

Figura 21. Análise composicional das nanopartículas de zinco (a) e cobre (b), obtida por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS).



Fonte: O Autor.

4.2. EXPERIMENTO 1 (PROPRIEDADES BIOLÓGICAS)

4.2.1. Atividade antimicrobiana (AAM)

A **Tabela 4** mostra que, quando as nanopartículas de óxido de zinco e cobre foram diluídas em água destilada, mostraram uma grande atividade antimicrobiana contra *S. Mutans*. Quando foram incorporadas no adesivo, e o adesivo não foi polimerizado, as duas concentrações de nanopartículas de zinco/cobre mostraram atividade antimicrobiana quando comparadas com o controle, em ambos sistemas adesivos. Quando o adesivo foi polimerizado, só a concentração de 5/0,2 mostrou atividade antimicrobiana quando comparado com o controle, em ambos sistemas adesivos.

Tabela 4. Média e desvio padrão do tamanho dos halos de inibição contra *S. mutans*, obtidos em cada condição experimental.

Concentração Zn/Cu (%)	Solução aquosa	Prime&Bond Active		Ambar Universal	
		Não polimerizado	Polimerizado	Não polimerizado	Polimerizado
0 (controle)	5,73 ± 0,02 _A	9,2 ± 0,9 ^A	6,7 ± 0,5 ^a	8,1 ± 0,3 _A	5,7 ± 0,4 _a
5 / 0,1	15,77 ± 0,33 _B	12,9 ± 0,6 ^B	7,9 ± 0,7 ^{a,b}	11,1 ± 1,2 _B	6,7 ± 0,8 _{a,b}
5 / 0,2	17,34 ± 1,19 _B	13,0 ± 1,0 ^B	8,8 ± 0,9 ^b	12,0 ± 1,0 _B	7,6 ± 0,6 _b

(*) As comparações são válidas só dentro de cada coluna. Para cada coluna, letras maiúsculas, minúsculas, sobescritos ou superscritos iguais indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0,05$).

Fonte: O Autor

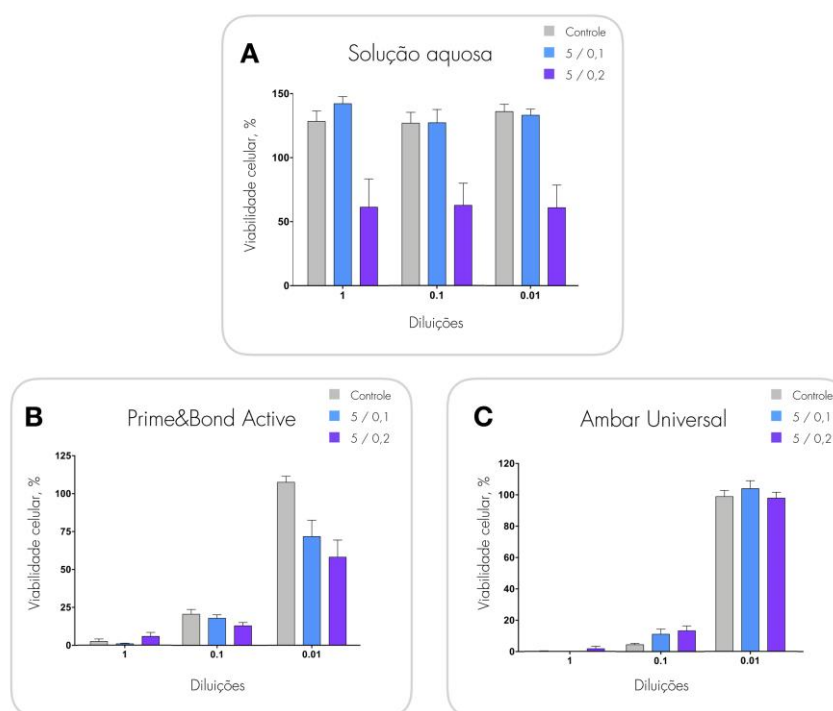
4.2.2. Ensaio de Citotoxicidade (CTX)

Quando as nanopartículas de zinco e cobre foram diluídas em água destilada, só a mais alta concentração de zinco/cobre (5/0,2) mostrou uma grande citotoxicidade quando comparada com o controle (água destilada) nas 3 diluições (**Tabela 5**; 1 ($p < 0,01$), 0,1 ($p < 0,05$), e 0,01 v/v% ($p < 0,05$) respectivamente). Não foram observadas diferenças entre as diluições (**Tabela 5**; $p > 0,05$). Quando comparado com o controle de viabilidade (meio de cultura), nenhum grupo mostrou diferenças significativas (**Tabela 5**; $p > 0,05$) (**Figura 22A**).

Quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no adesivo Prime&Bond Active, os grupos 5/0,1 e 5/0,2 mostraram uma significativa maior citotoxicidade quando comparados com o adesivo controle só na diluição de 0,01% v/v. (**Tabela 5**; $p < 0,001$). Em relação as diluições, as de 1 e 0,1% v/v mostraram mais citotoxicidade quando comparadas com a diluição 0,01% v/v, em todos os grupos (**Tabela 5**; $p < 0,001$). Quando comparado com o controle de viabilidade (meio de cultura), diluições 0,1 e 1% mostraram uma maior citotoxicidade em todos os grupos (**Tabela 5**; $p < 0,05$) (**Figura 22B**).

Quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no adesivo Ambar Universal, nenhuma diferença em citotoxicidade foi observada entre os grupos 5/0,1 e 5/0,2 e o adesivo controle, em nenhuma das diluições (**Tabela 5**; $p > 0,05$). Em relação as diluições, as de 1 e 0,1% v/v mostraram mais citotoxicidade quando comparadas com a diluição 0,01% v/v, em todos os grupos (**Tabela 5**; $p < 0,001$). Quando comparado com o controle de viabilidade (meio de cultura), diluições 1 e 0,1% mostraram uma maior citotoxicidade em todos os grupos (**Tabela 5**; $p < 0,01$) (**Figura 22C**).

Figura 22. Resultados de citotoxicidade das nanopartículas de zinco e cobre, incorporadas em água destilada e nos adesivos experimentais.



Fonte: O Autor

Tabela 5 - Média e erro padrão de células viáveis (%), obtidas em cada condição experimental, em células Saos-2 (*, **)

Concentração ZnO/Cu	Diluições (%)	Solução aquosa			Prime&Bond Active			Ambar Universal		
		1	0,1	0,01	1	0,1	0,01	1	0,1	0,01
0 (controle)		128,32 ± 8,15 ^{A,B}	126,83 ± 8,46 ^{A,B}	136,03 ± 5,68 ^A	2,44 ± 1,59 ^C	20,55 ± 3,10 ^C	107,45 ± 4,01 ^A	0,17 ± 0,17 ^c	4,40 ± 0,85 ^{b,c}	98,75 ± 4,00 ^a
		=	=	=	≠	≠	=	≠	≠	=
5 / 0,1		142,21 ± 5,45 ^A	127,22 ± 10,33 ^{A,B}	133,16 ± 4,80 ^A	0,89 ± 0,42 ^C	17,89 ± 2,23 ^C	71,63 ± 10,87 ^B	0,00 ± 0,00 ^c	11,08 ± 3,26 ^{b,c}	103,88 ± 5,02 ^a
		=	=	=	≠	≠	=	≠	≠	=
5 / 0,2		61,35 ± 22,05 ^C	62,71 ± 17,27 ^C	71,24 ± 17,58 ^{B,C}	5,79 ± 2,59 ^C	12,88 ± 2,15 ^C	58,09 ± 11,25 ^B	1,71 ± 1,63 ^{b,c}	13,25 ± 3,11 ^b	97,77 ± 3,82 ^a
		=	=	=	≠	≠	=	≠	≠	=

(*) As comparações são válidas só dentro de cada solução/adensivo. Medias identificadas com a mesma letra maiúscula, minúscula e sobrescritas indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0,05$)

(**) As comparações são válidas só dentro de cada solução/adensivo. Medias identificadas com o signo igual (=) indicam resultados estatisticamente similares com o controle de viabilidade celular (100%) (Dunn's test, $p \geq 0,05$)

Fonte: O Autor

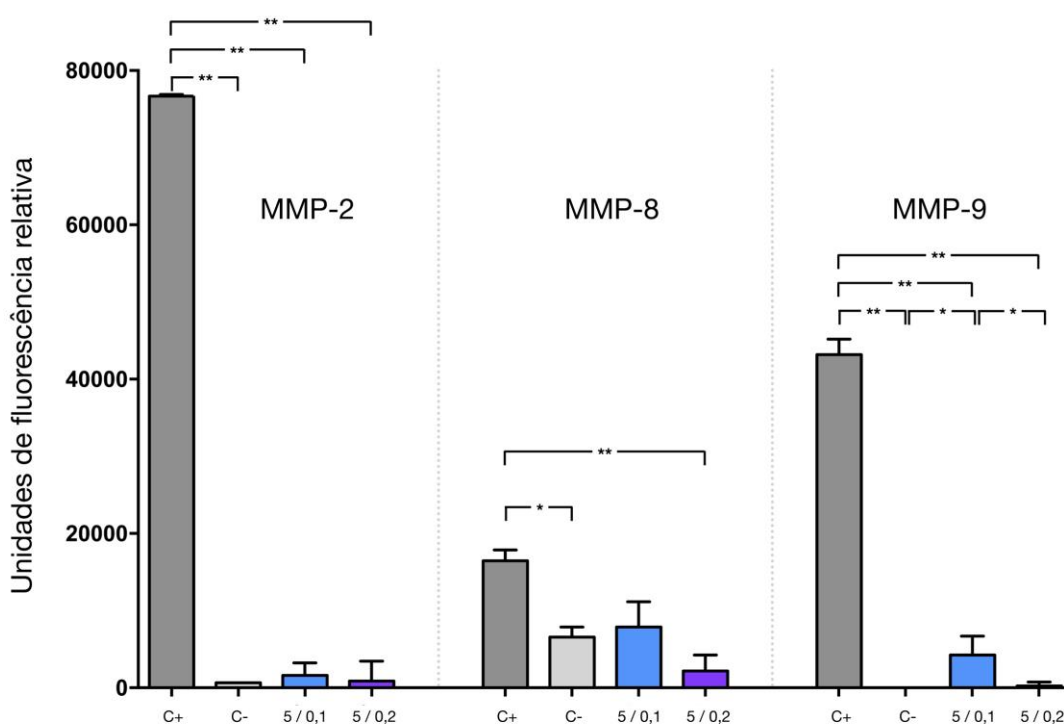
4.2.3. Atividade anti-MMP

Para MMP-2, os grupos 5/0,1 e 5/0,2 apresentaram valores significativamente menores de fluorescência quando comparados com o controle positivo, mostrando atividade inibitória ($p < 0,01$). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos 5/0,1 e 5/0,2 e o controle de inibição ($p > 0,05$) (**Figura 23**).

Para MMP-8, o grupo 5/0,2 apresentou valores significativamente menores de fluorescência quando comparado com o controle positivo, mostrando atividade inibitória ($p < 0,01$). O grupo 5/0,1 não apresentou atividade inibitória ($p > 0,05$). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos 5/0,1 e 5/0,2 e o controle de inibição ($p > 0,05$) (**Figura 23**).

Para MMP-9, os grupos 5/0,1 e 5/0,2 apresentaram valores significativamente menores de fluorescência quando comparados com o controle positivo, mostrando atividade inibitória ($p < 0,01$). O grupo 5/0,1 apresentou valores significativamente maiores de RFU quando comparado com o controle de inibição e o grupo 5/0,2 ($p < 0,05$) (**Figura 23**).

Figura 23. Resultados da atividade anti-MMPs das nanopartículas de óxido de zinco e cobre.



Fonte: O Autor

4.3. EXPERIMENTO 2 (PROPRIEDADES MECÂNICAS)

4.3.1. Resistência máxima à tração (RMT)

Os resultados de resistência máxima à tração, testados após 24 h (IM) e depois de 28 dias (28d), estão apresentados na **Tabela 6**.

Quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no adesivo Prime&Bond Active, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos 5/0,1 e 5/0,2 quando comparados ao adesivo controle, após 24 e após 28 dias ($p > 0,05$). Uma diminuição significativa na resistência máxima à tração após 28 dias de armazenamento de água foi observada em todos os grupos ($p < 0,001$).

Quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no Ambar Universal, os grupos 5/0,1 e 5/0,2 apresentaram maiores valores de resistência máxima à tração quando comparados com o adesivo controle, após 24h e 28 dias ($p < 0,001$). Não foram observadas diferenças significativas na resistência máxima à tração após 28 dias de armazenamento de água, em nenhum grupo ($p > 0,05$).

Tabela 6. Médias e desvios-padrão dos dados de resistência máxima à tração (RMT, Mpa), obtidos em cada condição experimental (*)

Concentração Zn/Cu (%)	Prime&Bond Active		Ambar Universal	
	24 h	28 dias	24 h	28 dias
0 (controle)	5,97 ± 0,32 A	3,35 ± 0,34 B	17,20 ± 1,67 a	17,00 ± 1,54 a
5 / 0,1	5,77 ± 0,79 A	3,57 ± 0,40 B	23,85 ± 1,01 b	22,94 ± 1,76 b
5 / 0,2	6,97 ± 1,38 A	3,60 ± 0,66 B	24,00 ± 0,94 b	23,85 ± 1,68 b

(*) As comparações são válidas só dentro de cada adesivo. Letras maiúsculas e minúsculas iguais indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0,05$).

Fonte: O Autor

4.3.2. Microdureza Knoop (MD)

Os resultados de microdureza, testados após 24 h (IM) e depois de 28 dias (28d), estão apresentados na **Tabela 7**.

Quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no adesivo Prime&Bond Active, não foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes grupos, tanto no tempo imediato quanto após 28 dias ($p = 0,63$).

Quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no adesivo Ambar Universal, os grupos 5/0,1 e 5/0,2 apresentaram maiores valores de microdureza Knoop quando comparados ao adesivo controle, após 24 e 28 dias ($p < 0,01$).

Tabela 7. Médias e desvios-padrão dos dados de microdureza (KHN), obtidos em cada condição experimental (*)

Concentração Zn/Cu (%)	Prime&Bond Active		Ambar Universal	
	24 h	28 dias	24 h	28 dias
0 (controle)	12,09 ± 0,22 ^A	14,49 ± 1,38 _A	8,02 ± 0,14 _A	10,73 ± 0,60 _a
5 / 0,1	12,33 ± 0,25 ^A	14,45 ± 1,07 _A	13,24 ± 0,83 _B	17,86 ± 0,77 _b
5 / 0,2	12,76 ± 1,31 ^A	14,15 ± 0,36 _A	16,71 ± 1,36 _C	21,54 ± 0,54 _c

(*) As comparações são válidas só dentro de cada adesivo. Letras maiúsculas, minúsculas, sobrescritas ou subscritas iguais indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0,05$).

Fonte: O Autor

4.3.3. Grau de conversão (GC) de corpos-de-prova de adesivo (*in vitro*)

FTIR: Não foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes grupos quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no adesivo Prime & Bond Active (Tabela 8; $p = 0,20$) ou no adesivo Ambar Universal (**Tabela 8**; $p = 0,84$).

Micro-Raman: Quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no adesivo Prime&Bond Active não foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes grupos (**Tabela 8**; $p = 0,76$).

Quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no adesivo Ambar Universal, foram observados valores significativos de grau de conversão quando comparados ao adesivo controle (**Tabela 8**; $p < 0,001$).

Tabela 8. Médias e desvios-padrão dos dados de grau de conversão, obtidos em cada condição experimental, por meio de FTIR e micro-Raman (*)

Concentração Zn/Cu (%)	Prime&Bond Active		Ambar Universal	
	FTIR	micro-Raman	FTIR	micro-Raman
0 (controle)	52,33 ± 1,04 ^A	69,61 ± 0,37 _a	67,69 ± 3,70 A	92,06 ± 0,59 a
5 / 0,1	54,59 ± 1,50 ^A	71,28 ± 5,22 _a	68,86 ± 2,09 A	95,74 ± 0,51 b
5 / 0,2	55,17 ± 2,44 ^A	71,48 ± 2,49 _a	68,58 ± 0,92 A	95,82 ± 0,35 b

(*) As comparações são válidas só dentro de cada coluna. Letras maiúsculas, minúsculas, sobrescritas ou subscritas iguais indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0,05$).

Fonte: O Autor

4.3.4. Sorção de água (SO) e solubilidade (SB)

Quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no adesivo Prime&Bond Active, para a sorção cumulativa de água aos 28 dias, foram observados valores significativamente maiores nos grupos 5/0,1 e 5/0,2 quando comparados ao adesivo controle (**Tabela 9**; $p = 0,001$). Para a solubilidade, apenas o grupo 5/0,2 apresentou solubilidade significativamente maior que o adesivo controle (**Tabela 9**; $p < 0,05$).

Quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no adesivo Ambar Universal, apenas o grupo 5/0,2 apresentou sorção cumulativa de água significativamente maior do que o adesivo controle (**Tabela 9**; $p < 0,01$). Todos os adesivos Ambar Universal contendo nanopartículas de zinco/cobre apresentaram solubilidade significativamente menor do que o adesivo controle (**Tabela 9**; $p = 0,001$).

Tabela 9. Médias e desvios-padrão dos dados de sorção de água e solubilidade ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) aos 28 dias de armazenamento em água, obtidos em cada condição experimental (*)

Concentração Zn/Cu (%)	Prime&Bond Active		Ambar Universal	
	Sorção de água	Solubilidade	Sorção de água	Solubilidade
0 (controle)	260,52 \pm 16,09 ^A	92,82 \pm 7,75 ^a	110,75 \pm 9,93 A	140,19 \pm 12,96 a
5 / 0,1	323,72 \pm 43,30 ^B	99,05 \pm 6,44 ^{a,b}	118,19 \pm 8,76 A,B	71,12 \pm 8,34 b
5 / 0,2	374,77 \pm 22,66 ^C	107,01 \pm 11,66 ^b	125,68 \pm 8,68 B	73,27 \pm 6,11 b

(*) As comparações são válidas só dentro de cada coluna. Letras maiúsculas, minúsculas e sobrescritas iguais indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0,05$).

Fonte: O Autor

4.3.5. Comportamento de liberação do zinco e cobre a partir de corpos de prova de adesivos

A curva analítica de regressão linear, entre os valores de absorbância e as concentrações de zinco e cobre, apresentou um coeficiente de correlação de $r = 0,99987$ e $r = 0,99981$, sendo adequada para determinar a liberação de zinco e cobre dos adesivos. Foi realizada uma avaliação matemática dos perfis de liberação *in vitro* e foi selecionado o melhor modelo, considerando o coeficiente de correlação (r), o critério de seleção de modelo (MSC), o ajuste gráfico e a coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade para cada modelo, sendo a equação biexponencial a mais adequada para explicar os resultados experimentais. **Tabela 10 e 11** mostra os dados de ajuste ao modelo biexponencial. A **Figura 24 e 25** resume as taxas de liberação de zinco e cobre

Tabela 10. Médias e desvios-padrão dos dados de liberação de zinco e cobre a partir dos corpos de prova de adesivo Prime&Bond Active, ajustados à equação biexponencial

Zinco e cobre no adesivo (%)	Modelo biexponencial *			
	MSC	R	α (h^{-1})	β (h^{-1})
5 / 0,1 Zinc	4,01	0,995	$6,07 \times 10^{-2}$	$1,81 \times 10^{-4}$
5 / 0,1 Copper	8,75	0,996	$4,73 \times 10^{-2}$	$1,76 \times 10^{-4}$
5 / 0,2 Zinc	3,96	0,998	$5,15 \times 10^{-2}$	$1,77 \times 10^{-4}$
5 / 0,2 Copper	6,50	0,994	$7,79 \times 10^{-2}$	$1,69 \times 10^{-4}$

(*) MSC, Critério de seleção de modelo; R, coeficiente de correlação; α e β , constantes cinéticas.

Fonte: O Autor.

Tabela 11. Médias e desvios-padrão dos dados de liberação de zinco e cobre a partir dos corpos de prova de adesivo Ambar Universal, ajustados à equação biexponencial

Zinco e cobre no adesivo (%)	Modelo biexponencial *			
	MSC	R	α (h ⁻¹)	β (h ⁻¹)
5 / 0,1 Zinc	5,61	0,998	$6,69 \times 10^{-2}$	$1,76 \times 10^{-4}$
5 / 0,1 Copper	9,60	0,997	$5,81 \times 10^{-2}$	$1,71 \times 10^{-4}$
5 / 0,2 Zinc	4,92	0,996	$8,65 \times 10^{-2}$	$1,58 \times 10^{-4}$
5 / 0,2 Copper	6,94	0,997	$5,57 \times 10^{-2}$	$1,88 \times 10^{-4}$

(*) MSC, Critério de seleção de modelo; R, coeficiente de correlação; α e β , constantes cinéticas.

Fonte: O Autor.

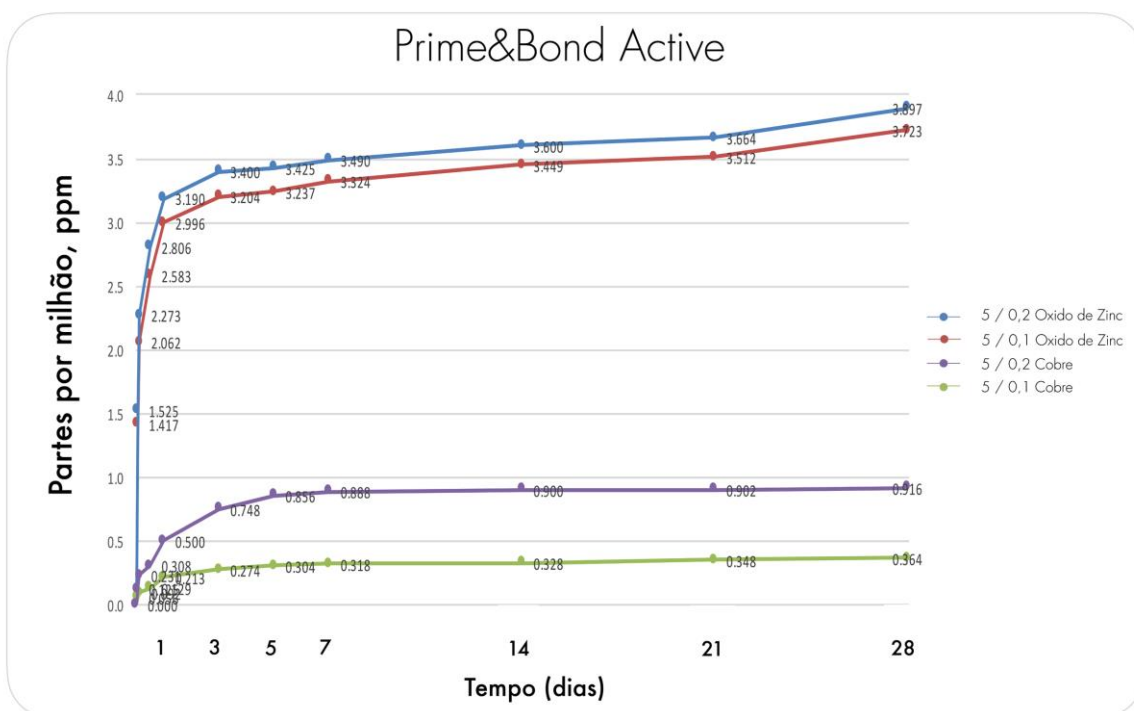
Tabela 12. Liberação de cobre em % e ppm de todas as condições experimentais, após 28 dias de armazenamento em solução aquosa de 2% de ácido nítrico (*)

Adesivo	Liberação de óxido de zinco		Liberação de cobre	
	% da concentração inicial	ppm	% da concentração inicial	ppm
5 / 0,1 Prime&Bond Active	0,0074 ± 0,0005 A	3,723 ± 0,29 A	0,0364 ± 0,0065 A	0,364 ± 0,67 A
5 / 0,2 Prime&Bond Active	0,0078 ± 0,0010 A	3,897 ± 0,41 A	0,0458 ± 0,0022 B	0,916 ± 0,18 B
5 / 0,1 Ambar Universal	0,0030 ± 0,0003 a	1,537 ± 0,24 a	0,0221 ± 0,0032 a	0,221 ± 0,03 a
5 / 0,2 Ambar Universal	0,0037 ± 0,0005 a	1,860 ± 0,25 a	0,0410 ± 0,0039 b	0,820 ± 0,04 b

(*) As comparações são válidas só dentro de cada coluna e dentro de cada sistema adesivo. Letras maiúsculas ou minúsculas iguais indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0,05$)

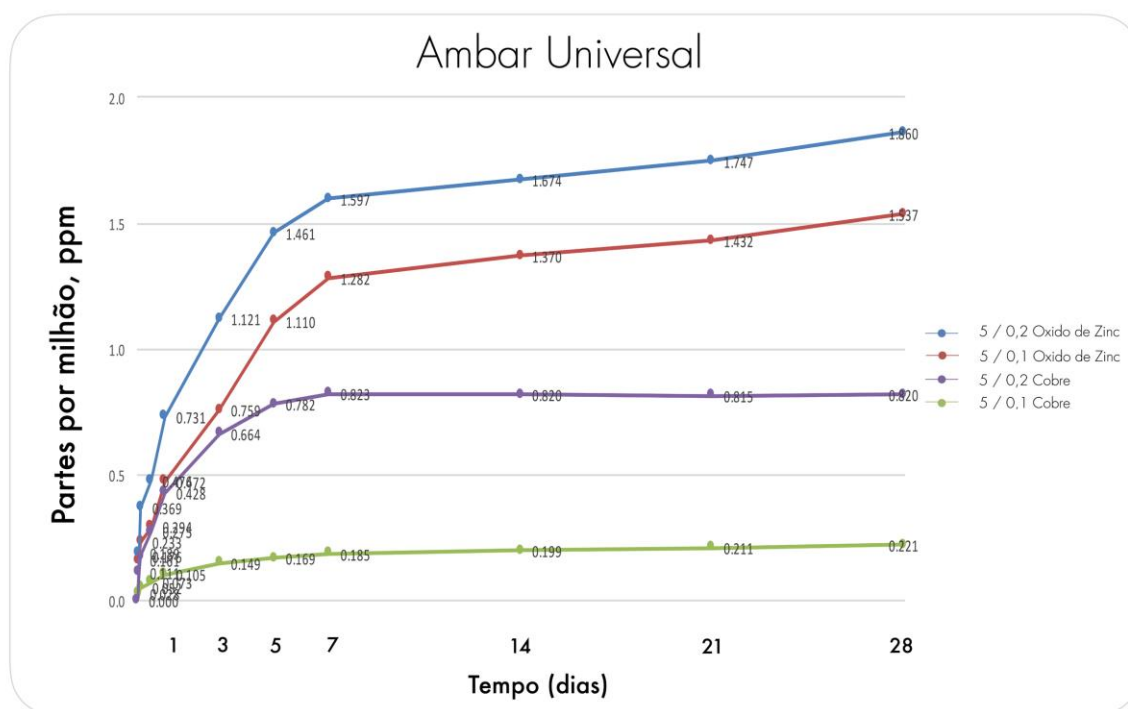
Fonte: O Autor.

Figura 24. Liberação de cobre (ppm acumulativo) de todas as condições experimentais, após 28 dias de armazenamento em solução aquosa de 2% de ácido nítrico (Adesivo Prime&Bond Active).



Fonte: O Autor.

Figura 25. Liberação de cobre (ppm acumulativo) de todas as condições experimentais, após 28 dias de armazenamento em solução aquosa de 2% de ácido nítrico (Adesivo Ambar Universal).



Fonte: O Autor.

4.4. EXPERIMENTO 3 (PROPRIEDADES ADESIVAS À DENTINA)

4.4.1. Resistência de união à microtração (RU)

Quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no sistema adesivo Prime & Bond Active e Ambar Universal, e os adesivos foram aplicados tanto em dentina hígida quanto em dentina artificialmente afetada por cárie, não foram observadas diferenças significativas na resistência de união à microtração no tempo imediato entre todos os grupos, em ambas as estratégias adesivas (**Tabela 13 e 14**; $p > 0,05$). Quando foram comparadas as estratégias adesivas entre si, foram observados valores significativamente menores na estratégia autocondicionante quando comparada com a estratégia convencional no grupo 5/0,1 do adesivo Prime & Bond Active (dentina hígida) (**Tabela 13**; $p < 0,05$), e no grupo controle do adesivo Ambar Universal (dentina hígida e artificialmente afetada por cárie) (**Tabela 14**; $p < 0,05$).

Tabela 13. Médias e desvios-padrão dos dados de resistência de união à dentina (RU, Mpa), obtidos em cada condição experimental no sistema adesivo Prime&Bond Active (*)

Concentração Zn/Cu (%)	Hígida		Artificialmente afetada por cárie	
	Convencional	Autocondicionante	Convencional	Autocondicionante
0 (controle)	51,16 ± 4,12 A	47,04 ± 3,92 A,B	27,7 ± 5,9 a	30,6 ± 3,4 a
5 / 0,1	50,34 ± 6,78 A	46,63 ± 5,83 B	28,3 ± 5,3 a	29,0 ± 6,4 a
5 / 0,2	53,54 ± 5,65 A	47,61 ± 4,11 A,B	27,2 ± 5,0 a	30,7 ± 4,3 a

(*) As comparações são válidas só dentro de cada tipo de dentina. Letras maiúsculas ou minúsculas iguais indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0,05$).

Fonte: O Autor

Tabela 14. Médias e desvios-padrão dos dados de resistência de união à dentina (RU, Mpa), obtidos em cada condição experimental no sistema adesivo Ambar Universal (*)

Concentração Zn/Cu (%)	Hígida		Artificialmente afetada por cárie	
	Convencional	Autocondicionante	Convencional	Autocondicionante
0 (controle)	46,19 ± 2,63 A	38,43 ± 3,65 B	30,3 ± 2,54 a	18,9 ± 6,3 b
5 / 0,1	46,13 ± 5,89 A	41,96 ± 5,29 A,B	30,1 ± 5,45 a	24,4 ± 3,4 a,b
5 / 0,2	48,15 ± 5,52 A	42,32 ± 4,21 A,B	33,6 ± 5,52 a	24,9 ± 2,8 a,b

(*) As comparações são válidas só dentro de cada tipo de dentina. Letras maiúsculas ou minúsculas iguais indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0,05$).

Fonte: O Autor

4.4.2. Nanoinfiltração (NI)

Quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no sistema adesivo Prime & Bond Active e Ambar Universal, e os adesivos foram aplicados tanto em dentina hígida quanto em dentina artificialmente afetada por cárie, foram observados valores de nanoinfiltração significativamente menores entre os grupos 5/0,1 e 5/0,2 quando comparados com o adesivo controle, em ambas as estratégias adesivas (**Tabela 15 e 16**; $p < 0,05$). Quando foram comparadas as estratégias adesivas entre si, foram observados valores de nanoinfiltração significativamente menores na estratégia autocondicionante quando comparada com a estratégia convencional no grupo controle do adesivo Ambar Universal (dentina hígida e artificialmente afetada por cárie) (**Tabela 15 e 16**; $p < 0,05$) (**Figuras 26 e 28**)

Tabela 15. Médias e desvios-padrão dos dados de nanoinfiltração (NI, %), obtidos em cada condição experimental no sistema adesivo Prime&Bond Active (*)

Concentração Zn/Cu (%)	Hígida		Artificialmente afetada por cárie	
	Convencional	Autocondicionante	Convencional	Autocondicionante
0 (controle)	19,42 ± 2,51 A	18,12 ± 4,52 A	13,1 ± 2,7 a	14,0 ± 2,7 a
5 / 0,1	12,31 ± 2,26 B	10,48 ± 2,82 B	8,1 ± 1,6 b	8,5 ± 1,4 b
5 / 0,2	10,29 ± 2,21 B	9,92 ± 1,90 B	7,3 ± 1,8 b	7,3 ± 1,6 b

(*) As comparações são válidas só dentro de cada tipo de dentina. Letras maiúsculas ou minúsculas iguais indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0,05$).

Fonte: O Autor.

Tabela 16. Médias e desvios-padrão dos dados de nanoinfiltração (NI, %), obtidos em cada condição experimental no sistema adesivo Ambar Universal (*)

Concentração Zn/Cu (%)	Hígida		Artificialmente afetada por cárie	
	Convencional	Autocondicionante	Convencional	Autocondicionante
0 (controle)	15,49 ± 4,81 A	10,45 ± 1,19 B	13,2 ± 4,1 a	7,2 ± 2,7 b
5 / 0,1	7,00 ± 2,07 C	6,56 ± 0,89 C	4,0 ± 1,3 b,c	3,2 ± 1,1 c
5 / 0,2	4,33 ± 0,97 C	6,89 ± 0,61 C	3,4 ± 1,3 c	3,0 ± 0,6 c

(*) As comparações são válidas só dentro de cada tipo de dentina. Letras maiúsculas ou minúsculas iguais indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0,05$).

Fonte: O Autor.

4.4.3. Análise da interface de união e microinfiltração

Os resultados qualitativos de microinfiltração na interface de união à dentina, testados após 24 h de armazenamento em água, em dentina hígida e artificialmente afetada por cárie estão apresentados nas Figuras 27 e 29, para os adesivos Ambar Universal e Prime&Bond Active, respetivamente. Podemos observar que existe uma correlação com os resultados mostrados pelo teste de nanoinfiltração. As imagens de CSLM mostraram áreas de infiltração na base da camada híbrida em todos os grupos, tanto na dentina hígida quanto na dentina cariada, observando-se maiores áreas de infiltração de corante no grupo controle

4.4.4. Grau de conversão (GC) de adesivo na interface de união à dentina

Quando as nanopartículas de zinco/cobre foram incorporadas no sistema adesivo Prime & Bond Active e Ambar Universal, e os adesivos foram aplicados tanto em dentina hígida quanto em dentina artificialmente afetada por cárie, apenas foram observadas diferenças significativas no grau de conversão imediato no adesivo Ambar, entre todos os grupos, em ambas as estratégias adesivas, só na dentina hígida. (Tabela 17 e 18; $p > 0,05$). Quando foram comparadas as estratégias adesivas entre si, não foram observadas diferenças.

Tabela 17. Médias e desvios-padrão dos dados de grau de conversão *in situ* (GC, %), obtidos em cada condição experimental no sistema adesivo Prime&Bond Active (*)

Concentração Zn/Cu (%)	Hígida		Artificialmente afetada por cárie	
	Convencional	Autocondicionante	Convencional	Autocondicionante
0 (controle)	69.32 ± 0.18 A	66.55 ± 4.90 A	54.5 ± 2.9 a	53.4 ± 3.8 a
5 / 0,1	70.08 ± 0.48 A	66.41 ± 1.29 A	55.0 ± 0.8 a	55.5 ± 1.8 a
5 / 0,2	70.89 ± 0.72 A	68.23 ± 2.32 A	54.5 ± 2.6 a	55.4 ± 7.2 a

(*) As comparações são válidas só dentro de cada tipo de dentina. Letras maiúsculas ou minúsculas iguais indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0,05$).

Fonte: O Autor.

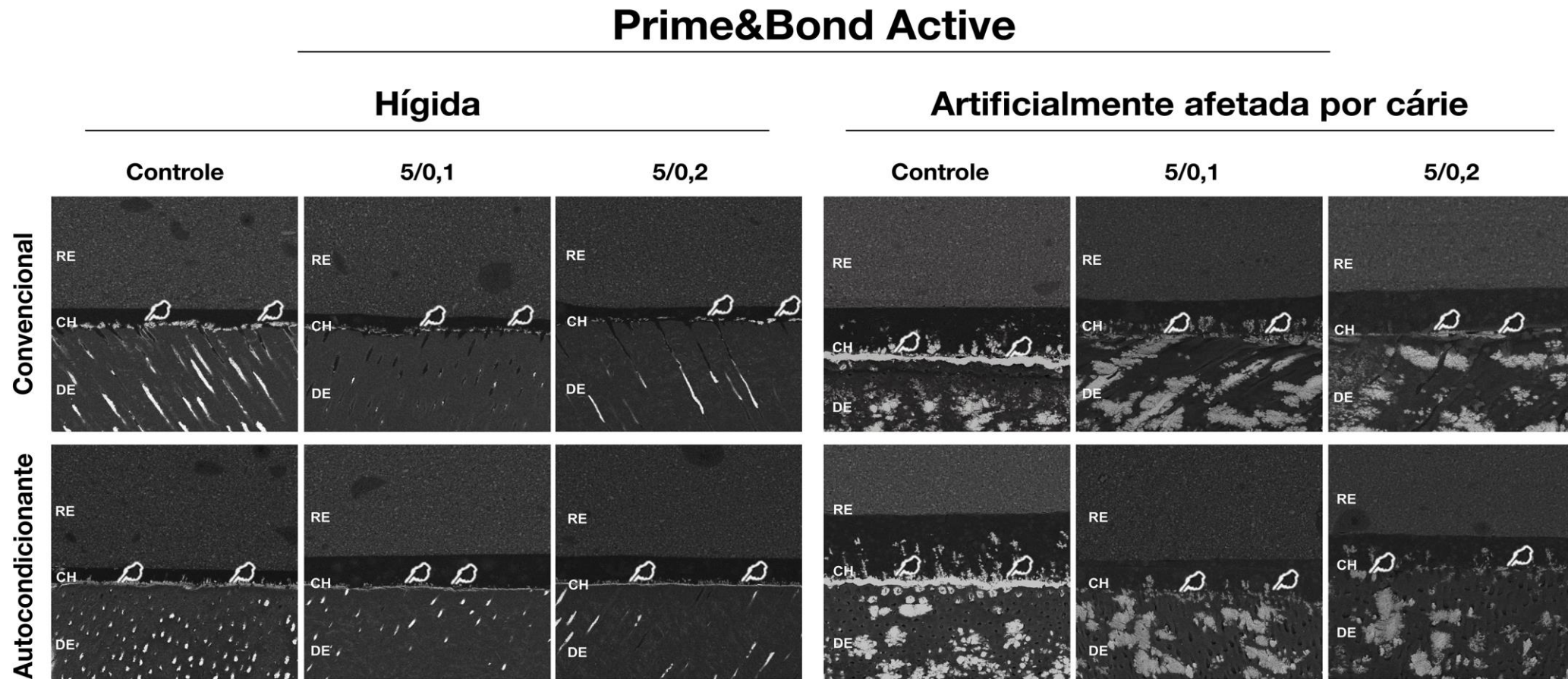
Tabela 18. Médias e desvios-padrão dos dados de grau de conversão *in situ* (GC, %), obtidos em cada condição experimental no sistema adesivo Ambar Universal (*)

Concentração Zn/Cu (%)	Hígida		Artificialmente afetada por cárie	
	Convencional	Autocondicionante	Convencional	Autocondicionante
0 (controle)	71.95 ± 0.29 B	71.10 ± 2.52 B	63.4 ± 1.3 a	62.4 ± 2.2 a
5 / 0,1	76.82 ± 4.60 A	74.91 ± 2.13 A,B	65.9 ± 2.7 a	63.6 ± 3.6 a
5 / 0,2	77.62 ± 3.93 A	75.77 ± 2.89 A	65.2 ± 4.5 a	65.3 ± 2.1 a

(*) As comparações são válidas só dentro de cada tipo de dentina. Letras maiúsculas ou minúsculas iguais indicam resultados estatisticamente similares (Tukey test, $p \geq 0,05$).

Fonte: O Autor.

Figura 26. Imagens (MEV) representativas da interface de união à dentina hígida e afetada por cárie, obtidas em cada condição experimental, no adesivo Prime&Bond Active.

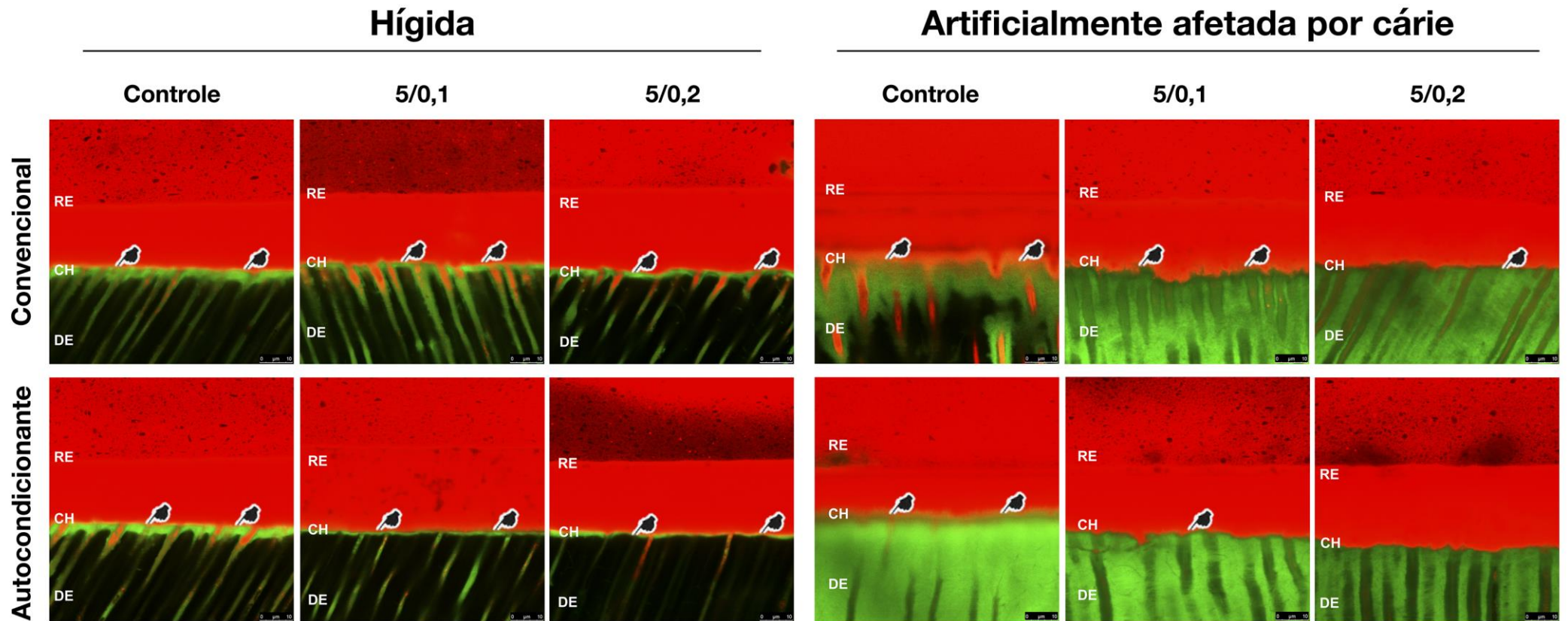


RE, resina; CH, camada híbrida; DE, dentina.

Fonte: O Autor.

Figura 27. Imagens (CSLM) representativas da interface de união à dentina hígida e afetada por cárie, obtidas em cada condição experimental, no adesivo Prime&Bond Active.

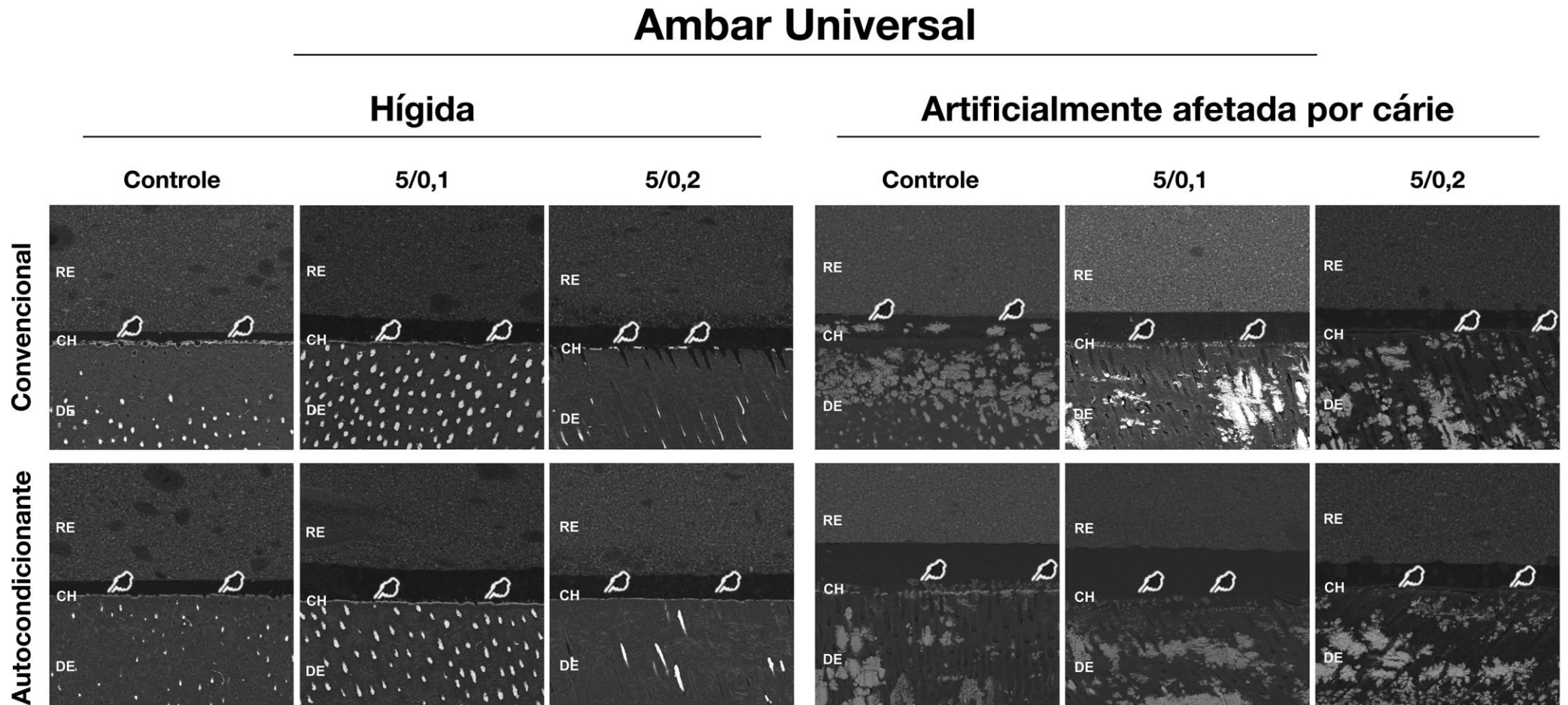
Prime&Bond Active



RE, resina; CH, camada híbrida; DE, dentina.

Fonte: O Autor.

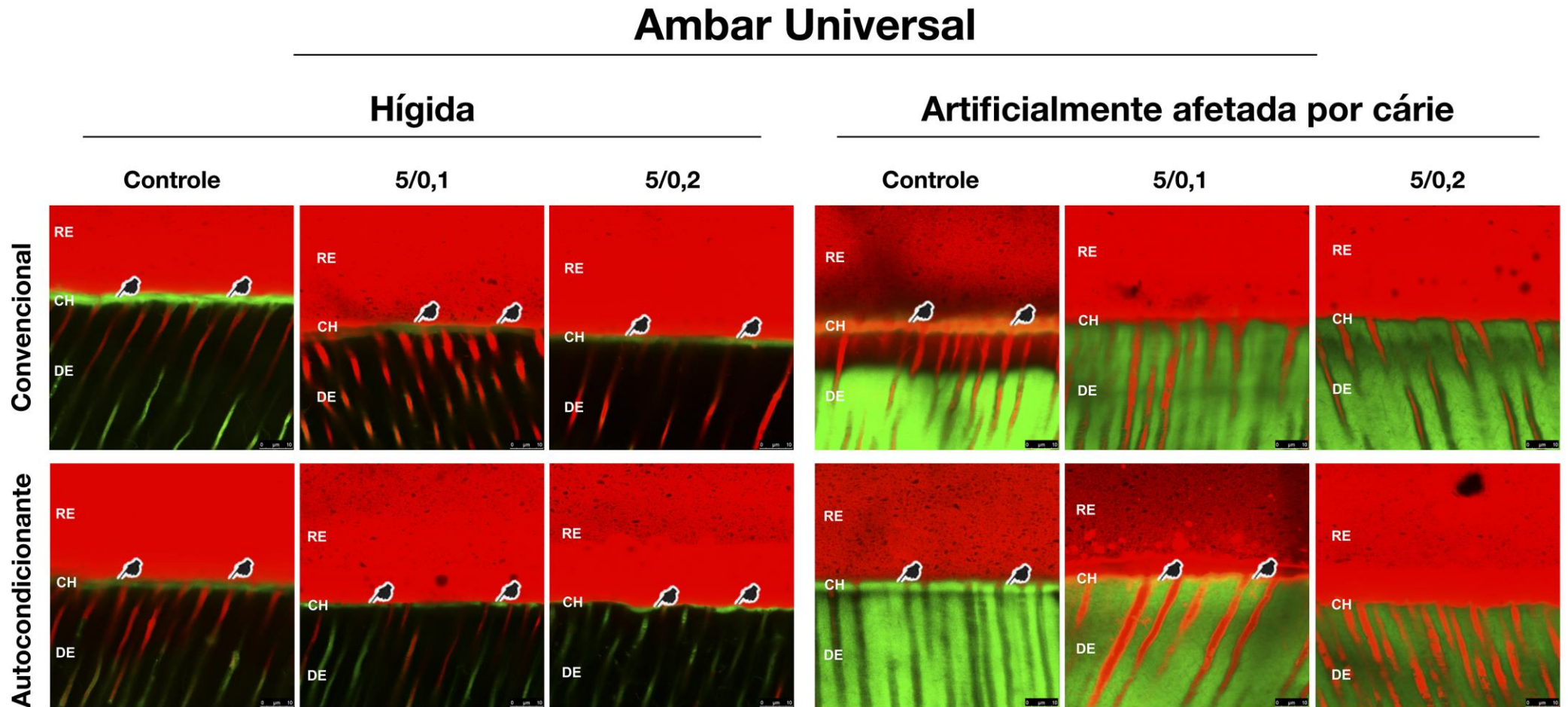
Figura 28. Imagens (MEV) representativas da interface de união à dentina hígida e afetada por cárie, obtidas em cada condição experimental, no adesivo Ambar Universal.



RE, resina; CH, camada híbrida; DE, dentina.

Fonte: O Autor.

Figura 29. Imagens (CSLM) representativas da interface de união à dentina hígida e afetada por cárie, obtidas em cada condição experimental, no adesivo Ambar Universal.



RE, resina; CH, camada híbrida; DE, dentina.

Fonte: O Autor.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo foi capaz de demonstrar que a combinação de ZnONp e CuNp apresenta propriedades antimicrobianas contra *S. mutans*. Vários estudos mostraram as propriedades antimicrobianas de ZnONp (Soren et al. ¹⁰⁷ 2018; Hernandez-Sierra et al. ¹⁰⁸ 2008) e CuNp (Amiri et al. ¹⁰⁹ 2017; Ramazanzadeh et al. ¹¹⁰ 2015) como entidades únicas contra *S. mutans*, mas não há muitas evidências sobre se a combinação melhora o efeito sinergicamente. Um estudo anterior (Kaali et al. ¹¹¹ 2011) descobriu que a presença de Zn²⁺ ou Cu²⁺ como íons individuais em biomateriais não resulta em atividade antimicrobiana significativa, mas a combinação Zn²⁺-Cu²⁺ diminuiu o número de bactérias viáveis (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida tropicalis*) na superfície de biomateriais, mostrando que os íons metálicos são mais eficazes no combate de bactérias em conjunto do que como entidades únicas.

No presente estudo, para solução aquosa, todas as combinações de ZnO/CuNp (5/0,1 e 5/0,2) apresentaram propriedades antibacterianas contra *S. mutans* significativamente superiores ao controle, assim como foi anteriormente demonstrado para outras bactérias (Wang et al. ¹¹² 2016). Estes resultados sugerem que as soluções aquosas contendo íons metálicos combinados tiveram efeitos antibacterianos sinérgicos. No entanto, os mecanismos antibacterianos sinérgicos subjacentes dos íons metálicos multicomponentes requerem investigações adicionais.

Por outro lado, existem estudos que demonstraram atividade antimicrobiana contra *S. mutans* de adesivos dentais incorporando ZnONp (Saffarpour et al. ¹¹³ 2016) e CuNp (Argueta-Figueroa et al. ⁶⁵ 2015; Sabatini et al. ⁶⁶ 2015; Gutierrez et al. ⁶⁷ 2017; Gutierrez et al. ⁶⁸ 2017). No entanto, a capacidade antimicrobiana da combinação de ZnO/CuNp incorporada no mesmo adesivo dental nunca foi avaliada. No presente estudo, observamos que, quando os adesivos não foram polimerizados, todas as soluções contendo ZnO/CuNp apresentaram propriedades antibacterianas contra *S. mutans* significativamente superiores ao controle, diferentemente quando os adesivos foram polimerizados onde apenas os grupos 5/0,2 apresentaram propriedades antibacterianas significativamente maiores que o respectivo controle. A ausência de potencial antimicrobiano observado para os grupos 5/0,1 é contrário aos resultados de estudos anteriores quando as mesmas concentrações de ZnONp (5%) (Saffarpour et al. ¹¹³ 2016) e CuNp (0,1%) (Gutierrez et al. ⁶⁷ 2017; Gutierrez et al. ⁶⁸

2017) foram incorporadas em adesivos convencionais. Diversas diferenças metodológicas podem ser responsáveis por essas diferenças. Por exemplo, neste estudo foram utilizados discos de papel de filtro com uma espessura de 180 µm (Sigma-Aldrich, Munique, Alemanha), impregnados com cada adesivo experimental, evaporando o solvente e fotopolimerizados. Essa fina camada de adesivo, uma vez polimerizada, deve comprometer a capacidade de difusão dos íons metálicos nessa concentração. De qualquer forma, nós escolhemos esse método porque acreditamos que ele reflete com mais fidelidade o que acontece na prática clínica, simulando a espessura do sistema adesivo ao aplicar o adesivo na superfície dentinária.

As maiores propriedades antibacterianas contra *S. mutans* dos grupos 5/0,2 do que o respectivo adesivo controle pode ser explicado porque as nanopartículas de óxido de zinco e, particularmente neste caso, as nanopartículas de cobre, tem uma atividade antibacteriana que é dependente do tamanho e concentração (Azam et al. ¹¹⁴ 2012; Pandiyarajan et al. ¹¹⁵ 2013; Almoudi et al. ¹¹⁶ 2018; Padmavathy e Vijayaraghavan ¹¹⁷ 2008). À medida que aumentamos a concentração de nanopartículas de cobre duas vezes, pode ser que os íons metálicos de cobre possam difundir e, eventualmente, arrastar íons metálicos de óxido de zinco. Vários mecanismos têm sido propostos pelos quais as ZnONp e CuNp poderiam exercer seu efeito antimicrobiano (Palza ¹¹⁸ 2015; Dizaj et al. ¹¹⁹ 2014; Hajipour et al. ¹²⁰ 2012; Raghunath e Perumal ¹²¹ 2017; Sabella et al. ¹²² 2014). Uma teoria mais recente é chamada de “efeito cavalo de Tróia”, onde o ambiente lisossômico ácido (pH 5,5) é capaz de promover a degradação/corrosão das nanopartículas, que converte os metais em íons e, portanto, em substâncias tóxicas. Além disso, o efeito das ZnONp e CuNp nem sempre dependem da bactéria que internaliza as nanopartículas; essas nanopartículas podem alterar localmente os microambientes próximos às bactérias e produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) ou aumentar a solubilidade das nanopartículas, o que pode induzir o mau funcionamento de outras organelas, interações com grupos –SH das principais enzimas microbianas, levando à desnaturação das proteínas bacterianas e dano ao DNA, alterando a replicação do DNA dos microrganismos (Dizaj et al. ¹¹⁹ 2014; Sabella et al. ¹²² 2014; Heinlaan et al. ¹²³ 2008).

Neste estudo, a viabilidade da linhagem de células semelhantes a osteoblastos Saos-2 foi testada. Vários estudos mostraram o potencial de citotoxicidade das ZnONp

(Saptarshi et al. ¹²⁴ 2015; Seker et al. ¹²⁵ 2014) e CuNp (Ingle et al. ⁶¹ 2014; Wang et al. ¹²⁶ 2012), mas pouca atenção tem sido dada aos efeitos da co-exposição. As interações entre esses materiais podem ocorrer no nível das nanopartículas, mas as nanopartículas de cada metal também podem influenciar os processos ou a toxicidade causada pelos íons liberados pelas outras. Nesse sentido, um estudo recente mostrou que o acúmulo de grandes quantidades de ZnONp na linhagem de hepatoma humano HepG2 (Li et al. ¹²⁷ 2015) e na linhagem de hepatoma de peixes PLHC-1 (Hernandez-Moreno et al. ¹²⁸ 2016) altera as membranas celulares e a citotoxicidade das CuNp é aumentada. Isso poderia explicar por que o grupo 5/0,2 apresentou alta citotoxicidade quando comparado ao controle (água destilada) nas três diluições (1, 0,1 e 0,01 v / v%). Por outro lado, quando comparado com o controle de viabilidade (meio de cultura), não foram observadas diferenças com os grupos experimentais. De acordo com a normatização ISO 10993-5, se a viabilidade for reduzida para menos de 70%, o material apresenta potencial citotóxico (ISO ¹²⁹ 2009), portanto, apesar de não haver diferenças significativas com o controle de viabilidade, no caso de soluções aquosas, o grupo 5/0,2 nas diluições 1 e 0,1 v/v% seria citotóxico.

No caso dos adesivos, o teste de viabilidade é muito importante porque foi relatado que componentes biologicamente ativos e não polimerizados dos sistemas adesivos podem difundir pelos túbulos dentinários subjacentes e atingir o tecido pulpar, e podem modificar o metabolismo celular da polpa quando os materiais são usados em cavidades profundas apesar de existir uma barreira de dentina (Koulaouzidou et al. ¹³⁰ 2009; Sengun et al. ¹³¹ 2011). Para os adesivos Prime & Bond Active e Ambar Universal, não foram observadas diferenças na citotoxicidade entre as concentrações de ZnO/CuNp e o controle (material comercial), nas diluições de 1 e 0,1 v/v%. Além disso, quando comparado com o controle de viabilidade (meio de cultura), diferenças significativas foram observadas em todos os grupos nas diluições 1 e 0,1 v/v%. Isso pode ser explicado, pois os adesivos dentais são altamente citotóxicos, devido aos monômeros em sua composição, que podem mascarar a capacidade citotóxica das ZnONp e CuNp. Vários estudos mostraram o potencial citotóxico de vários monômeros (Kraus et al. ⁸⁹ 2017; Ratanasathien et al. ¹³² 1995). Por exemplo, os adesivos Prime & Bond Active e Ambar Universal contém 10-MDP, o qual foi mostrado que exerce efeitos comparáveis aos do monômero TEGDMA com

relação à citotoxicidade, diferenciação odontoblástica e resposta inflamatória em células de polpa dental humana (Kim et al. ¹³³ 2015).

Entretanto, algumas diferenças também foram observadas entre os sistemas adesivos testados. Para o adesivo Prime&Bond Active, não foram observadas diferenças significativas em todos os grupos na diluição de 0,01 v/v%, quando comparados com o controle de viabilidade. No entanto, de acordo com a normatização ISO 10993-5 mencionada acima, o grupo 5/0,2 apresentou potencial citotoxicidade (58% de viabilidade celular). Além disso, os grupos 5/0,1 e 5/0,2 apresentaram maior citotoxicidade quando comparados ao controle (material comercial).

Estes resultados podem ser explicados em termos da solubilidade do adesivo Prime&Bond Active, porque a adição de 5/0,1 e 5/0,2% de ZnO/CuNp aumentou a solubilidade do adesivo e, portanto, íons de óxido de zinco e cobre podem difundir e exercer seu efeito citotóxico combinado. Este aumento na solubilidade pode ser explicado pela presença de isopropanol, um solvente altamente solúvel em água (¹³⁴) na composição adesiva (Dentsply Sirona FAQs ¹³⁵). No entanto, o Prime & Bond Active também apresentou aumento da sorção de água com a adição de ZnO/CuNp. Provavelmente, no caso do Prime & Bond Active, a adição de ZnO/CuNp não produz uma boa mistura química entre as nanopartículas e os componentes do adesivos, aumentando a sorção de água e, conseqüentemente, a eluição de alguns monômeros inadequadamente polimerizados e outros componentes de resina junto com as nanopartículas.

Por outro lado, para Ambar Universal não foram observadas diferenças significativas em todos os grupos na diluição de 0,01% v/v, e não foram observadas diferenças na citotoxicidade entre as concentrações de ZnO/CuNp e o controle (material comercial), e estes resultados podem ser explicados pela baixa sorção de água e solubilidade que os grupos 5/0,1 e 5/0,2 apresentaram em relação ao controle, o que significa que as nanopartículas não são liberadas tão rapidamente, não produzindo efeito citotóxico.

Apesar de não ser objetivo do presente estudo fazer uma comparação entre os adesivos universais, observa-se que a sorção de água do Prime & Bond Active é mais que o dobro do Ambar Universal, sugerindo uma maior hidrofiliidade, o que pode ser explicado pela presença do monômero *monofosfato de dipentaeritriol penta acrilato* (PENTA), um monômero de resina muito hidrofílico que pode ter contribuído para a

maior sorção de água. Além disso, os grupos 5/0,1 e 5/0,2 no Prime&Bond Active mostraram mais sorção de água que o controle. No entanto a microdureza e o grau de conversão *in vitro* e *in situ* de Prime&Bond Active não foram significativamente afetados pela adição de ZnO/CuNp.

Vários estudos mostraram que a microdureza é aumentada quando partículas de zinco ou cobre são incorporadas em sistemas adesivos (Gutierrez et al. ⁶⁷ 2017; Pomacondor-Hernandez et al. ¹³⁶ 2015) porque pode existir uma correlação positiva entre a fração volumétrica da carga e a microdureza de materiais à base de resina (Chung e Greener ¹³⁷ 1990), desde que partículas de carga são mais duras que a fase orgânica do material. No caso de Prime&Bond Active, a maior sorção de água nos grupos 5/0,1 e 5/0,2 poderia influenciar negativamente o efeito das partículas de ZnO/CuNp na microdureza, explicando os valores de microdureza similares entre os grupos ZnO/CuNp e o controle.

Por outro lado, a adição de ZnO/CuNp no adesivo Ambar Universal apenas produz um ligeiro aumento na absorção de água, o que permitiria às nanopartículas aumentar a microdureza devido ao seu efeito como carga. O mesmo efeito pode ocorrer para a resistência máxima à tração e grau de conversão, onde a leve sorção de água dos grupos 5/0,1 e 5/0,2 no adesivo Ambar Universal não neutraliza o efeito catalítico do cobre, o que pode melhorar os graus de polimerização e reação escura, formando redes reticuladas homogêneas de baixa tensão dentro do adesivo (Song et al. ¹³⁸ 2016), aumentando a resistência máxima à tração e o grau de conversão *in vitro* e *in situ* em ambas as estratégias adesivas.

Embora algumas diferenças significativas nas propriedades mecânicas dos sistemas adesivos testados possam ser influenciadas pela adição de ZnO/CuNp, para ambos os sistemas adesivos universais, todos os grupos contendo ZnO/CuNp apresentaram valores semelhantes de resistência de união resina-dentina e uma diminuição significativa dos valores de nanoinfiltração para ambas as estratégias adesivas. A nanoinfiltração evidencia os defeitos na interface resina-dentina que podem constituir vias de degradação da união resina-dentina ao longo do tempo. Os íons de nitrato de prata ocupam espaços do tamanho nanométricos ao redor das fibrilas de colágeno desprotegidas, onde o adesivo não conseguiu se infiltrar ou onde a água residual/solvente não foram deslocados (Tay et al. ¹³⁹ 2005).

Várias hipóteses podem ajudar a entender os resultados da nanoinfiltração. Isso pode ser explicado porque o cobre pode aumentar a força da rede de colágeno, um dos componentes da camada híbrida, porque a enzima de reticulação de colágeno, a lisil oxidase (LOX), é dependente de cobre (Marelli et al. ¹⁴⁰ 2015; Rucker et al. ¹⁴¹ 1998) e, assim, o cobre tem um efeito indireto como um agente reticulador. Outro estudo mostrou que, a incorporação do ZnONp resultou na formação de cristais de apatita nas fibrilas de colágeno, favorecendo a mineralização da dentina (Toledano et al. ⁷⁸ 2013) e melhorando o efeito de reticulação. Essa ação reticuladora de ambas as nanopartículas sozinhas pode aumentar a resistência do colágeno, deixando-o menos suscetível aos efeitos de enzimas proteolíticas, como MMPs e CTs, diminuindo indiretamente a nanoinfiltração imediata, assim como foi anteriormente mostrado em adesivos com nanopartículas de cobre (Gutierrez et al. ⁶⁷ 2017; Gutierrez et al. ⁶⁸ 2017) e zinco sozinho (Toledano et al. ¹⁴² 2017; Almeida et al. ¹⁴³ 2017).

Além disso, no presente estudo, demonstramos que a combinação de ZnONp e CuNp inibe as MMP-2, MMP-8 e MMP-9, o que ajudaria a manter a estabilidade da interface resina dentina, tanto hígida como artificialmente afetada por cárie ao longo do tempo. Nesse sentido, avaliações de longevidade em termos de estabilidade da camada híbrida (resistência de união e nanoinfiltração) são necessárias para avaliar estes resultados. Por outro lado, novos estudos ainda são necessários para avaliar se as interfaces adesivas contendo ZnO/CuNp são menos propensas à degradação sob condições mais desafiadoras, como em ambientes cariogênicos ou erosivos.

6. CONCLUSÃO

A adição de nanopartículas de óxido de zinco e cobre em concentrações de até 5/0,2% em dois sistemas adesivos universais é uma abordagem viável e pode ser uma alternativa para fornecer propriedades antimicrobianas e inibidoras de MMPs, e aumentar a estabilidade das interfaces resina-dentina, sem reduzir as propriedades mecânicas.

REFERÊNCIAS

1. CHRISTENSEN, GJ. Should resin-based composite dominate restorative dentistry today? J Am Dent Assoc. 2010; Dec;141(12):1490-3.
2. LYNCH, CD. Guidance on posterior resin composites: Academy of Operative Dentistry - European Section. Journal of dentistry. 2014; Apr;42(4):377-83.
3. RASINES ALCARAZ, MG. Direct composite resin fillings versus amalgam fillings for permanent or adult posterior teeth. Cochrane Database Syst Rev. 2014;3:Cd005620.
4. MORASCHINI, V. Amalgam and resin composite longevity of posterior restorations: A systematic review and meta-analysis. J Dent. 2015; Sep;43(9):1043-50.
5. KHALICHI, P. Effect of composite resin biodegradation products on oral streptococcal growth. Biomaterials. 2004; Nov;25(24):5467-72.
6. BRUNTHALER, A. Longevity of direct resin composite restorations in posterior teeth. Clinical oral investigations. 2003; Jun;7(2):63-70.
7. DA ROSA RODOLPHO, PA. A clinical evaluation of posterior composite restorations: 17-year findings. Journal of dentistry. 2006; Aug;34(7):427-35.
8. DA ROSA RODOLPHO, PA. 22-Year clinical evaluation of the performance of two posterior composites with different filler characteristics. Dental materials. 2011; Oct;27(10):955-63.
9. OPDAM, NJ. Longevity of Posterior Composite Restorations: A Systematic Review and Meta-analysis. Journal of dental research. 2014; Jul 21.
10. PEUMANS, M. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials. Dent Mater 2005; Sep;21(9):864-81.
11. HEINTZE, SD. Clinical performance of cervical restorations--a meta-analysis. Dent Mater. 2010; Oct;26(10):993-1000.

12. JOKSTAD, A. Quality of dental restorations. FDI Commission Project 2-95. *Int Dent J.* 2001;51(3):117-58.
13. SPENCER, P. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng.* 2010; Jun;38(6):1989-2003.
14. ELDERTON, R. Restorations without conventional cavity preparations. *International dental journal.* 1988;38(2):112-8.
15. BERNARDO, M. Survival and reasons for failure of amalgam versus composite posterior restorations placed in a randomized clinical trial. *Journal of american dental association.* 2007;138(6):775-83.
16. OPDAM, NJ. 12-year survival of composite vs. amalgam restorations. *J Dent Res.* 2010; Oct;89(10):1063-7.
17. BEYTH, N. An in vitro quantitative antibacterial analysis of amalgam and composite resins. *J Dent.* 2007; Mar;35(3):201-6.
18. DELIGEORGI, V. An overview of reasons for the placement and replacement of restorations. *Prim Dent Care.* 2001;8(1):5-11.
19. FEATHERSTONE, JD. The Continuum of Dental Caries--Evidence for a Dynamic Disease Process. *Journal of dental research.* 2004;83(suppl 1):C39-C42.
20. SAKAGUCHI, RL. Review of the current status and challenges for dental posterior restorative composites: clinical, chemistry, and physical behavior considerations. *Dental materials.* 2005; Jan;21(1):3-6.
21. TEN CATE, JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology.* 2006; Sep;94(1):1-9.
22. DEMARCO, FF. Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. *Dental materials.* 2012; Jan;28(1):87-101.
23. PERDIGAO, J. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *Journal of esthetic and restorative dentistry.* 2013; Aug;25(4):219-41.

24. TJÄDERHANE, L. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. *Dental materials*. 2013; Oct;29(10):999-1011.
25. NAKABAYASHI, N. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*. 1982; May;16(3):265-73.
26. LIU, Y. Limitations in Bonding to Dentin and Experimental Strategies to Prevent Bond Degradation. *Journal of dental research*. 2011;90(8):953-68.
27. SANO, H. Microtensile Testing, Nanoleakage, and Biodegradation of Resin-Dentin Bonds. *Journal of dental research*. 2006;85(1):11-4.
28. REIS, A. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. *Oper Dent*. 2013; Jul-Aug;38(4):E1-e25.
29. TJÄDERHANE, L. Dentin basic structure and composition—an overview. *Endodontic topics*. 2012;20(1):3-29.
30. SPENCER, P. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. *Quintessence Int*. 1999; Jul;30(7):501-7.
31. WANG, Y. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res*. 2002; Jan;59(1):46-55.
32. WANG, Y. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res*. 2003; Feb;82(2):141-5.
33. PASHLEY, DH. Collagen Degradation by Host-derived Enzymes during Aging. *J Dent Res*. 2004;83(3):216-21.
34. TJÄDERHANE, L. The Activation and Function of Host Matrix Metalloproteinases in Dentin Matrix Breakdown in Caries Lesions. *Journal of dental research*. 1998;77(8):1622-9.
35. SULKALA, M. The Effects of MMP Inhibitors on Human Salivary MMP Activity and Caries Progression in Rats. *Journal of dental research*. 2001;80(6):1545-9.
36. SULKALA, M. The Localization of Matrix Metalloproteinase-20 (MMP-20, Enamelysin) in Mature Human Teeth. *Journal of dental research*. 2002;81(9):603-7.

37. TJÄDERHANE, L. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dental materials*. 2013; Jan;29(1):116-35.
38. VIDAL, CM. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. *J Dent Res*. 2014; Mar;93(3):269-74.
39. VERMA, RP. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2007; Mar 15;15(6):2223-68.
40. VISSE, R. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*. 2003; May 2;92(8):827-39.
41. CARRILHO, MR. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; Jul;90(1):373-80.
42. COLLARES, FM. Chlorhexidine application in adhesive procedures: a meta-regression analysis. *Journal of adhesive dentistry*. 2013; Feb;15(1):11-8.
43. MAZZONI, A. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*. 2006; Sep;27(25):4470-6.
44. NISHITANI, Y. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(2):160-6.
45. MOHAMMADI, Z. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *International endodontic journal*. 2009; Apr;42(4):288-302.
46. CARRILHO, MR. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dental materials*. 2010; Aug;26(8):779-85.
47. SCAFFA, PM. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *Journal of dental research*. 2012; Apr;91(4):420-5.
48. DU, X. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive. *Journal of dentistry*. 2012; Jun;40(6):485-92.

49. YUN, JH. Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. *Journal of periodontal research*. 2004; Oct;39(5):300-7.
50. BRESCHI, L. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dental materials*. 2010; Jun;26(6):571-8.
51. STANISLAWCZUK, R. Effect of tetracycline on the bond performance of etch-and-rinse adhesives to dentin. *Brazilian oral research*. 2011;25(5):459-65.
52. DONMEZ, N. Ultrastructural Correlates of in vivo/in vitro Bond Degradation in Self-etch Adhesives. *Journal of dental research*. 2005;84(4):355-9.
53. TEZVERGIL-MUTLUAY, A. The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs. *Journal of dental research*. 2011; Apr;90(4):535-40.
54. JACQUES, P. Effect of dentin conditioners on the microtensile bond strength of a conventional and a self-etching primer adhesive system. *Dental materials*. 2005; Feb;21(2):103-9.
55. SAURO, S. EDTA or H₃PO₄/NaOCl dentine treatments may increase hybrid layers' resistance to degradation: a microtensile bond strength and confocal-micropermeability study. *Journal of dentistry*. 2009; Apr;37(4):279-88.
56. MELO, MA. Novel dental adhesives containing nanoparticles of silver and amorphous calcium phosphate. *Dent Mater*. 2013; Feb;29(2):199-210.
57. ZHANG, K. Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms. *Dent Mater*. 2012; Aug;28(8):842-52.
58. KIM, JS. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007; Mar;3(1):95-101.
59. RAI, M. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*. 2009; Jan-Feb;27(1):76-83.

60. SONDI, I. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*. 2004; Jul 1;275(1):177-82.
61. INGLE, AP. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014; Feb;98(3):1001-9.
62. RUPARELIA, JP. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater*. 2008; May;4(3):707-16.
63. THNEIBAT, A. Anticariogenic and antibacterial properties of a copper varnish using an in vitro microbial caries model. *Operative dentistry*. 2008; Mar-Apr;33(2):142-8.
64. USMAN, MS. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4467-79.
65. ARGUETA-FIGUEROA, L. An evaluation of the antibacterial properties and shear bond strength of copper nanoparticles as a nanofiller in orthodontic adhesive. *Aust Orthod J*. 2015; May;31(1):42-8.
66. SABATINI, C. Incorporation of bactericidal poly-acrylic acid modified copper iodide particles into adhesive resins. *J Dent*. 2015; May;43(5):546-55.
67. GUTIERREZ, MF. The role of copper nanoparticles in an etch-and-rinse adhesive on antimicrobial activity, mechanical properties and the durability of resin-dentine interfaces. *J Dent*. 2017; Jun;61:12-20.
68. GUTIERREZ, MF. Mechanical and microbiological properties and drug release modeling of an etch-and-rinse adhesive containing copper nanoparticles. *Dent Mater*. 2017; Mar;33(3):309-20.
69. YOON, KY. Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. *Sci Total Environ*. 2007; Feb 15;373(2-3):572-5.
70. USMAN, MS. Copper nanoparticles mediated by chitosan: synthesis and characterization via chemical methods. *Molecules*. 2012;17(12):14928-36.

71. RENNE, WG. Antibacterial properties of copper iodide-doped glass ionomer-based materials and effect of copper iodide nanoparticles on collagen degradation. *Clin Oral Investig*. 2017; Jan;21(1):369-79.
72. GOSAU, M. Antimicrobial effect and biocompatibility of novel metallic nanocrystalline implant coatings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016; Nov;104(8):1571-9.
73. ROSENBAUM, J. Antibacterial properties of nanostructured Cu-TiO₂ surfaces for dental implants. *Biomater Sci*. 2017; Feb 28;5(3):455-62.
74. SANTOS, MC. Inhibition of human gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9) activity by zinc oxide: a possible mechanism to enhance wound healing. *Br J Dermatol*. 2001; Nov;145(5):854-5.
75. OSORIO, R. Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants. *J Dent*. 2011; Feb;39(2):148-53.
76. ITO, A. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. *Materials Science and Engineering: C*. 2002; 2002/10/01;22(1):21-5.
77. ALTINCI, P. Zinc Inhibits Collagenolysis by Cathepsin K and Matrix Metalloproteinases in Demineralized Dentin Matrix. *Caries Res*. 2017; Oct 13;51(6):576-81.
78. TOLEDANO, M. A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dent Mater*. 2013; Aug;29(8):e142-52.
79. TOLEDANO, M. A ZnO-doped adhesive reduced collagen degradation favouring dentine remineralization. *J Dent*. 2012; Sep;40(9):756-65.
80. OSORIO, R. Zinc-doped dentin adhesive for collagen protection at the hybrid layer. *Eur J Oral Sci*. 2011; Oct;119(5):401-10.
81. BARCELLOS, DC. Zn-doped etch-and-rinse model dentin adhesives: Dentin bond integrity, biocompatibility, and properties. *Dent Mater*. 2016; Jul;32(7):940-50.

82. TEZVERGIL-MUTLUAY, A. The inhibitory effect of polyvinylphosphonic acid on functional matrix metalloproteinase activities in human demineralized dentin. *Acta Biomater.* 2010; Oct;6(10):4136-42.
83. TAKATSUKA, T. Inhibition of dentine demineralization by zinc oxide: in vitro and in situ studies. *Dent Mater.* 2005; Dec;21(12):1170-7.
84. LYNCH, RJ. Effects of zinc and fluoride on the remineralisation of artificial carious lesions under simulated plaque fluid conditions. *Caries Res.* 2011;45(3):313-22.
85. BOTTINO, MC. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *J Dent Res.* 2013; Nov;92(11):963-9.
86. FEITOSA, SA. Doxycycline-encapsulated nanotube-modified dentin adhesives. *J Dent Res.* 2014; Dec;93(12):1270-6.
87. GREGSON, KS. The impact of three strains of oral bacteria on the surface and mechanical properties of a dental resin material. *Clin Oral Investig.* 2012; Aug;16(4):1095-103.
88. HUANG, R. Effect of nicotine on growth and metabolism of *Streptococcus mutans*. *Eur J Oral Sci.* 2012; Aug;120(4):319-25.
89. KRAUS, D. In-vitro cytocompatibility of dental resin monomers on osteoblast-like cells. *J Dent.* 2017; Oct;65:76-82.
90. HASHIMOTO, M. Gold Nanoparticles Inhibit Matrix Metalloproteases without Cytotoxicity. *J Dent Res.* 2015; Jun 3;94(8):1085-91.
91. STANISLAWCZUK, R. Mechanical properties and modeling of drug release from chlorhexidine-containing etch-and-rinse adhesives. *Dental materials.* 2014; Apr;30(4):392-9.
92. MARTINS, GC. Effects of adding barium-borosilicate glass to a simplified etch-and-rinse adhesive on radiopacity and selected properties. *J Adhes Dent.* 2014; Apr;16(2):107-14.

93. International Standard Organization 4049. Dentistry: resin based dental fillings. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2000.
94. ITO, S. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials*. 2005; Nov;26(33):6449-59.
95. MALACARNE, J. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater*. 2006; Oct;22(10):973-80.
96. REIS, AF. Influence of water-storage time on the sorption and solubility behavior of current adhesives and primer/adhesive mixtures. *Oper Dent*. 2007; Jan-Feb;32(1):53-9.
97. THERMO FISHER SCIENTIFIC, AN. Iron, Copper and Zinc Determination in Wine using Flame Atomic Absorption Spectroscopy. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AN-43189-Iron-Copper-Zinc-Determination-Wine-using-Flame-Atomic-Absorption-Spectroscopy.pdf>. Accessed July 8 2015.
98. SIEPMANN, J. Mathematical modeling of controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; Jun 11;48(2-3):137-8.
99. SIEPMANN, J. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; Jun 11;48(2-3):139-57.
100. MARQUEZAN, M. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol*. 2009; Dec;54(12):1111-7.
101. PERDIGÃO, J. In vivo influence of residual moisture on microtensile bond strengths of one-bottle adhesives. *Journal of esthetic and restorative dentistry*. 2002;14(1):31-8.
102. TAY, FR. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent*. 2002;30(7-8):371-82.
103. SCHNEIDER, CA. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012; Jul;9(7):671-5.

104. TOLEDANO, M. Load cycling enhances bioactivity at the resin-dentin interface. *Dent Mater.* 2014; Jul;30(7):e169-88.
105. SAURO, S. Therapeutic effects of novel resin bonding systems containing bioactive glasses on mineral-depleted areas within the bonded-dentine interface. *J Mater Sci Mater Med.* 2012; Jun;23(6):1521-32.
106. SAURO, S. Influence of air-abrasion executed with polyacrylic acid-Bioglass 45S5 on the bonding performance of a resin-modified glass ionomer cement. *Eur J Oral Sci.* 2012; Apr;120(2):168-77.
107. SOREN, S. Evaluation of antibacterial and antioxidant potential of the zinc oxide nanoparticles synthesized by aqueous and polyol method. *Microb Pathog.* 2018; Jun;119:145-51.
108. HERNANDEZ-SIERRA, JF. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine.* 2008; Sep;4(3):237-40.
109. AMIRI, M. Antimicrobial Effect of Copper Oxide Nanoparticles on Some Oral Bacteria and *Candida* Species. *J Dent Biomater.* 2017; Mar;4(1):347-52.
110. RAMAZANZADEH, B. Comparison of Antibacterial Effects of ZnO and CuO Nanoparticles Coated Brackets against *Streptococcus Mutans*. *J Dent (Shiraz).* 2015; Sep;16(3):200-5.
111. KAALI, P. The influence of Ag⁺, Zn²⁺ and Cu²⁺ exchanged zeolite on antimicrobial and long term in vitro stability of medical grade polyether polyurethane. *Express Polym Lett.* 2011;5:1028-40.
112. WANG, X. The synergistic antibacterial activity and mechanism of multicomponent metal ions-containing aqueous solutions against *Staphylococcus aureus*. *J Inorg Biochem.* 2016; Oct;163:214-20.
113. SAFFARPOUR, M. Antimicrobial and bond strength properties of a dental adhesive containing zinc oxide nanoparticles. *Braz J Oral Sci.* 2016; 2016-10-13;15(1):66-9.

114. AZAM, A. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:3527-35.
115. PANDIYARAJAN, T. Synthesis and concentration dependent antibacterial activities of CuO nanoflakes. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013; May 1;33(4):2020-4.
116. ALMOUDI, MM. A systematic review on antibacterial activity of zinc against *Streptococcus mutans*. *Saudi Dent J*. 2018; 2018/06/18;30(4):283-91.
117. PADMAVATHY, N. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles-an antimicrobial study. *Sci Technol Adv Mater*. 2008; Jul;9(3):035004.
118. PALZA, H. Antimicrobial polymers with metal nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2015; Jan 19;16(1):2099-116.
119. DIZAJ, SM. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014; Nov;44:278-84.
120. HAJIPOUR, MJ. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol*. 2012; Oct;30(10):499-511.
121. RAGHUNATH, A. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *Int J Antimicrob Agents*. 2017; Feb;49(2):137-52.
122. SABELLA, S. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*. 2014; Jun 21;6(12):7052-61.
123. HEINLAAN, M. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*. 2008; Apr;71(7):1308-16.
124. SAPTARSHI, SR. Biological reactivity of zinc oxide nanoparticles with mammalian test systems: an overview. *Nanomedicine (Lond)*. 2015;10(13):2075-92.
125. SEKER, S. In vitro cytotoxicity of hydrothermally synthesized ZnO nanoparticles on human periodontal ligament fibroblast and mouse dermal fibroblast cells. *Toxicol In Vitro*. 2014; Dec;28(8):1349-58.

136. POMACONDOR-HERNANDEZ, C. Effect of zinc-doping in physicochemical properties of dental adhesives. *Am J Dent*. 2015; Oct;28(5):292-6.
137. CHUNG, KH. Correlation between degree of conversion, filler concentration and mechanical properties of posterior composite resins. *J Oral Rehabil*. 1990; Sep;17(5):487-94.
138. SONG, HB. Reduced shrinkage stress via photo-initiated copper(I)-catalyzed cycloaddition polymerizations of azide-alkyne resins. *Dent Mater*. 2016; Nov;32(11):1332-42.
139. TAY, FR. Water treeing in simplified dentin adhesives--deja vu? *Oper Dent*. 2005; Sep-Oct;30(5):561-79.
140. MARELLI, B. Newly identified interfibrillar collagen crosslinking suppresses cell proliferation and remodelling. *Biomaterials*. 2015; Jun;54:126-35.
141. RUCKER, RB. Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am J Clin Nutr*. 1998; May;67(5 Suppl):996s-1002s.
142. TOLEDANO, M. A zinc chloride-doped adhesive facilitates sealing at the dentin interface: A confocal laser microscopy study. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017; Oct;74:35-42.
143. ALMEIDA, GS. ZnCl₂ Incorporated into Experimental Adhesives: Selected Physicochemical Properties and Resin-Dentin Bonding Stability. *Biomed Res Int*. 2017;2017:5940479.

**ANEXO A – Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da inclusão de nanopartículas de zinco e cobre em sistemas adesivos universais.

Pesquisador: Paulo Vitor Farago

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 79730517.6.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.991.243

Apresentação do Projeto:

Efeito da inclusão de nanopartículas de zinco e cobre em sistemas adesivos universais.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de zinco e cobre, nas propriedades mecânicas e de união à dentina de diferentes sistemas adesivos universais

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não apresenta riscos para os pesquisadores.

Benefícios:

Os Benefícios para a ciência serão o possível desenvolvimento de um adesivo que poderia ser usado para manter a estabilidade da camada híbrida na interfase resina-dentina. Aquele adesivo representa uma contribuição social e científica na área de Materiais Dentários e Cariologia

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O objetivo deste estudo será avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de zinco e cobre, em diferentes concentrações (0%; 5% zinco/0,1% cobre; 5% zinco/0,2% cobre), em diferentes sistemas adesivos universais, nas propriedades de

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvararanas, Bloco M, Sala 116-B

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br

Continuação do Parecer: 2.991.243

resistência máxima à tração (RT), sorção de água (SA), solubilidade (SO), resistência de união à microtração (RU), nanoinfiltração (NI) e grau de conversão (GC). As nanopartículas serão incluídas nos sistemas adesivos Ambar Universal [AM] (FGM) e Prime&Bond Active [PBA] (Dentsply). Para RT (n = 7 para cada grupo), as amostras de adesivo serão construídas numa matriz metálica em forma de ampulheta. Metade das amostras serão testadas depois de 24 horas e após 6, 12 e 18 meses de armazenamento em água. Para SA e SO (n = 7 para cada grupo), discos de adesivos serão preparados em uma matriz metálica. Após a desidratação, os espécimes serão pesados e armazenados em água destilada para avaliação da SA, SO e liberação cumulativa de cobre. Para liberação de cobre (n = 7 para cada grupo), mensurações espectrofotométricas da solução de armazenamento serão realizadas para examinar a cinética da liberação de cobre. Para RU e NI, serão utilizados 240 molares extraídos que terão uma superfície plana de dentina exposta, e divididos aleatoriamente em 12 grupos (n=10) por adesivo ([AM] e [PBA]). Seguir-se-á a sequência clínica indicada pelo fabricante de cada sistema adesivo. Após a aplicação do adesivo, serão confeccionadas restaurações de resina composta em camadas. Em seguida, os espécimes serão preparados e submetidos a testes de microtração e nanoinfiltração em 24 horas [IM] e 12 meses [1A] de armazenamento em água a 37°C.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em anexo e de acordo com as normas 466/2012

Recomendações:

Enviar relatório final ao término da pesquisa

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 116-B
Bairro: Uvaranas **CEP:** 84.030-900
UF: PR **Município:** PONTA GROSSA
Telefone: (42)3220-3108 **E-mail:** coep@uepg.br

Continuação do Parecer: 2.991.243

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1018065.pdf	19/10/2018 10:16:09		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	bancodedentes.pdf	19/10/2018 10:15:54	Paulo Vitor Farago	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	08/11/2017 14:50:03	Paulo Vitor Farago	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROTOCOLO_FINAL_DOUTORADO.doc	22/10/2017 00:39:44	Paulo Vitor Farago	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTA GROSSA, 30 de Outubro de 2018

Assinado por:
ULISSES COELHO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvararanas, Bloco M, Sala 116-B
Bairro: Uvaranas **CEP:** 84.030-900
UF: PR **Município:** PONTA GROSSA
Telefone: (42)3220-3108 **E-mail:** coep@uepg.br

**ANEXO B – Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da
Universidade do Chile (UdeCh)**



**COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO DE LA FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
UNIVERSIDAD DE CHILE**

CERTIFICADO

Yo Marco Cornejo Ovalle, Presidente (S) del Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, declaro que el proyecto Fondecyt, titulado “Effect of the incorporation of copper and zinc nanoparticles into dental adhesives on their antimicrobial properties and dentinal matrix metalloproteinases activity: from molecular basis to clinical trials”, cuyo investigador principal es el Prof. Dr. Eduardo Fernández Godoy, se encuentra aprobado por este Comité con fecha 5 de mayo de 2017.


Dr. Marco Cornejo Ovalle
Presidente (S) CEC



Santiago, Mayo 2017.