

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

PÂMELA MALAQUIAS

**SISTEMAS ADESIVOS SIMPLIFICADOS CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE
ZINCO E COBRE: ESTUDO *IN VITRO***

**PONTA GROSSA
2020**

PÂMELA MALAQUIAS

**SISTEMAS ADESIVOS SIMPLIFICADOS CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE
ZINCO E COBRE: ESTUDO *IN VITRO***

Tese apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Doutora na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Odontologia, área de concentração em Dentística Restauradora.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

**PONTA GROSSA
2020**

M237 Malaquias, Pâmela
Sistemas adesivos simplificados contendo nanopartículas de zinco e cobre:
estudo *in vitro* / Pâmela Malaquias. Ponta Grossa, 2020.
47 f.

Tese (Doutorado em Odontologia - Área de Concentração: Dentística Restauradora), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

1. Adesivos dentinários. 2. Zinco. 3. Cobre. 4. Nanopartículas. I. Loguercio, Alessandro Dourado. II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Dentística Restauradora. IV.T.

CDD: 617.6

PÂMELA MALAQUIAS

Sistemas adesivos simplificados contendo nanopartículas de zinco e cobre: estudo in vitro.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Dentística Restauradora, linha de pesquisa de Propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais.

Ponta Grossa, 18 de fevereiro de 2020.



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

Prof^a. Dr^a. Gisele Maria Corre Nolasco
Universidade Positivo

Prof^a. Dr^a. Sandrine Bittencourt Berger
Universidade do Oeste do Paraná

Prof^a. Dr^a. Leticia Maira Wambier
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Andres Felipe Millan Cardenas
Universidade CEUMA

Dedico este trabalho à minha família, por todo cuidado e suporte quando precisei. Pela paciência e por acreditarem em mim e no meu potencial. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo seu cuidado, paciência e por essa oportunidade de crescimento e amadurecimento que Ele proporcionou. Gratidão em todo tempo e por todas as coisas. Para Ele e por Ele todas as coisas e tudo que tenho feito!

Ao meu marido, Victor, pela paciência, amor, carinho e cuidado em todas as horas. Pelo apoio e compreensão nesse tempo de escrita de tese. Obrigada por acreditar em mim e querer sempre o meu melhor!

Ao meus pais, Paulo e Letícia por todo amor e carinho. Por serem suporte sempre que precisei. Apenas gratidão pelas suas vidas e por tudo que têm feito por mim. Amo vocês!

Aos meus irmãos e cunhados, Tamirez, Gabriel, Conrado e Louise. Pelo amor, carinho, conversas e pela parceria em todas as coisas. Pelos momentos de descanso, risadas, viagens e passeios. Contem sempre comigo, amo vocês!

À minha sobrinha, Nicole, que um dia possa ler isso e saber que me proporcionou muitos momentos de alegria quando eu estava triste e indisposta. Tia Pâm te ama!

Às minhas amigas que a pós me presenteou, Adri, Thali, Lisa, Cin, Carol, Tatá, Kapri. Por todos os momentos de risadas e descontração, seja pessoalmente ou via whatsapp. Pelas ajudas e parecerias nos trabalhos. Amigas que levarei para toda vida!

Ao meu orientador Alessandro, pela paciência e disposição em ensinar. Desde a graduação me acompanhando e me dando oportunidades de trabalhos e de sempre melhorar.

Ao meu co-orientador Paulo Vitor que também me acompanha desde a graduação. Uma inspiração de inteligência, dedicação ao trabalho e de quem ama o que faz.

À melhor secretária que a pós poderia ter, Bianca. Sem palavras para descrever a dedicação e carinho que sempre demonstra, tanto para o trabalho quanto para a amizade. Obrigada por tudo e por toda ajuda sempre.

A todos os professores e funcionário da UEPG que de alguma forma contribuíram, seja direta ou indiretamente. Muito obrigada pelo seu trabalho e disposição em ajudar e servir.

“A voz de Deus nos diz constantemente: uma falsa ciência faz um homem ateu, mas uma verdadeira ciência leva o homem a Deus.” - Voltaire

DADOS CURRICULARES

PÂMELA MALAQUIAS

NASCIMENTO	25 de Abril de 1991 Ponta Grossa - Paraná
FILIAÇÃO	Paulo Malaquias Filho Leticia Simonetti Malaquias
2009 - 2013	Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG
2013 - 2014	Aperfeiçoamento em Implantodontia e Prótese da Associação Brasileira de Odontologia de Ponta Grossa - ABOPG
2014 - 2016	Mestrado em Dentística Restauradora do Programa de Pós-graduação da Universidade Estadual De Ponta Grossa – PPGO - UEPG
2016 - 2020	Doutorado em Dentística Restauradora do Programa de Pós-graduação da Universidade Estadual de Ponta Grossa – PPGO - UEPG

RESUMO

Malaquias, P. **Sistemas adesivos simplificados contendo nanopartículas de zinco e cobre: estudo *in vitro***. [Tese] Doutorado em Dentística Restauradora. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2020.

Objetivos: Avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações de nanopartículas (NP) de zinco e cobre em dois diferentes sistemas adesivos simplificados na resistência máxima à tração (RMT), grau de conversão (GC), sorção (SO) e solubilidade (SB). **Metodologias:** Previamente à inclusão, as nanopartículas foram caracterizadas através de microscopia de força atômica (AFM), potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS). As NP foram adicionadas aos sistemas adesivos Ambar (AMB) e Ambar com APS (APS) (FGM) nas concentrações: 0% (controle); 5% de zinco + 0,1% de cobre; 5% de zinco + 0,2% de cobre e 10% de zinco + 0,1% de cobre em peso. Para RMT foram confeccionados 10 corpos de prova de adesivo (CP) para cada concentração através de uma matriz metálica. Metade (n=5) foi testado imediatamente (IM) e a outra metade (n=5) após 28 dias de armazenamento em água. Para GC (n=3 por grupo) foram confeccionados discos de adesivos (n=3 para cada grupo) em uma matriz metálica (5,8 mm x 1,0 mm) e a leitura foi feita em espectrometria micro-Raman. Para SO e SB, foi utilizada a mesma matriz de GC (n=10) e os corpos de prova foram pesados em 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 24h, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 14 dias e 28 dias com armazenamento em água destilada. Os dados de RMT foram analisados por uma análise de variância de 3 fatores. Para GC, os dados foram analisados por análise de variância de dois. Para SO e SB os dados de 28 dias foram analisados por análise de variância de dois fatores e o teste de Tukey para múltiplas comparações. **Resultados:** As análises de caracterização mostraram resultados coerentes com tamanho de nanopartícula e pureza de partículas para zinco e cobre. RMT apresentou melhores resultados após 28 dias para ambos os grupos. A inclusão de NP não alterou o GC para AMB porém reduziu para APS. Na SO e SB a inclusão das NP não alterou os valores em relação aos grupos controle. **Conclusão:** A inclusão de nanopartículas de zinco e cobre em combinação pode ser uma alternativa viável para o melhor desempenho de sistemas adesivos.

Palavras chave: Adesivos Dentinários; Zinco; Cobre; Nanopartículas

ABSTRACT

Malaquias, P. **Simplified adhesive systems containing zinc and copper nanoparticles: an *in vitro* study**. Doctoral Thesis in Dentistry - Restorative Dentistry. Ponta Grossa: State University of Ponta Grossa; 2020

Objectives: To evaluate the effects of adding different concentrations of zinc and copper nanoparticles (NP) in two different simplified adhesive systems in maximum tensile strength (MTBS), degree of conversion (DC), sorption (SO) and solubility (SB). **Methodologies:** Prior to inclusion, nanoparticles were characterized by atomic force microscopy (AFM), zeta potential, field effect scanning electron microscopy (FEG) and X-ray dispersive energy spectroscopy (EDS). The NP were added to the adhesive systems Ambar (AMB) and Ambar with APS (APS) (FGM) in the concentrations: 0% (control); 5% zinc + 0.1% copper; 5% zinc + 0.2% copper and 10% zinc + 0.1% copper by weight. For RMT, 10 adhesive specimens (CP) were made for each concentration using a metallic matrix. Half (n = 5) was tested immediately (IM) and the other half (n = 5) after 28 days of storage in water. For GC (n = 3 per group), adhesive discs (n = 3 for each group) were made in a metallic matrix (5.8 mm x 1.0 mm) and the reading was made using micro-Raman spectrometry. For SO and SB, the same GC matrix was used (n = 10) and the specimens were weighed in 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 24h, 2 days, 3 days, 4 days, 5 days, 6 days, 7 days, 14 days and 28 days with storage in distilled water. RMT data were analyzed by a 3-factor analysis of variance. For CG, data were analyzed by analysis of variance of two. For SO and SB, the 28-day data were analyzed by two-way analysis of variance and the Tukey test for multiple comparisons. **Results:** Characterization analyzes showed results consistent with nanoparticle size and particle purity for zinc and copper. RMT showed better results after 28 days for both groups. The inclusion of NP did not change the GC to AMB but reduced to PHC. In SO and SB the inclusion of PN did not change the values in relation to the control groups. **Conclusion:** The inclusion of zinc and copper nanoparticles in combination may be a viable alternative the best performance of adhesive systems.

Keywords: Dentin Adhesives; Zinc; Copper; Nanoparticles

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Adesivos simplificados selecionados para o estudo.....	24
Figura 2 – Passo a passo da confecção de corpos de prova de adesivo para teste de resistência máxima à tração.....	26
Figura 3 – Sequência para o teste de máxima resistência a tração.....	26
Figura 4 – Confecção de corpos de prova cilíndrico para micro-Raman.....	27
Figura 5 – Espectros (micro-Raman) representativos, obtidos do sistema adesivo não polimerizado e após sua fotoativação.....	28
Figura 6 – Tamanho de partícula medido através de microscopia de força atômica (AFM).....	31
Figura 7 – Histograma de tamanhos de partícula e sua frequência (%), medido através de Potencial Zeta.....	32
Figura 8 – Tamanho de partícula através de microscópio eletrônico de varredura por efeito de campo (FEG).....	32
Figura 9 – Análise composicional das nanopartículas de zinco e cobre, obtida por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS).....	33
Quadro1 – Características e especificações das nanopartículas de zinco e cobre de acordo com os fabricantes.....	21
Quadro 2 – Sistemas adesivos e suas respectivas composições de acordo com os fabricantes.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características e especificações das nanopartículas de zinco e cobre...	21
Tabela 2 – Sistemas adesivos e suas respectivas composições.....	24
Tabela 3 – Médias e desvio padrão de resistência máxima à tração (RMT) para cada grupo experimental.....	34
Tabela 4 – Médias e desvio padrão de grau de conversão (GC) para cada grupo experimental.....	34
Tabela 5 – Médias e desvio padrão de sorção de água (SO) para cada grupo experimental.....	35
Tabela 6 – Médias e desvio padrão de solubilidade (SB) para cada grupo experimental.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica
APS	Adesivo com APS
BR	Brasil
cm	Centímetros
CONV	Adesivo Convencional
Cu	Cobre
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios X
EUA	Estados Unidos da América
FEG	Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo
IM	Imediato
JPN	Japão
LED	Diodo emissor de luz, pela frase em inglês Light Emitting Diode
MDP	Brometo meta-criloxidecil diidrogenosfosfato
MMPs	Metaloproteinases de matriz
mW	Miliwatts
Nº ou n	Número
nm	Nanômetros
pH	Potencial hidrogeniônico
RMT	Resistência Máxima à Tração
SB	Solubilidade
SiC	Carbeto de silício
SO	Sorção
UV	Ultravioleta
Zn	Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
=	Igual
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou menos
≈	Aproximadamente
μm	Micrometro
cm ⁻¹	Centímetro(s) recíproco (s) ou centímetro (s) inverso (s)
g/cm ³	Gramas por centímetro cúbico
h	Hora(s)
min	Minuto(s)
mg	Miligramas
mm ² /g	Milímetro quadrado por grama
mm	Milímetro(s)
mm ²	Milímetro(s) quadrado(s)
mm/min	Milímetro (s) por minuto
Mpa	Mega Pascal
mW	MiliWatts
mW/cm ²	MiliWatts por centímetro(s) quadrado
°C	Grau(s) Celsius
n	Número de corpos de prova
N	Newton
nm	Nanômetro
ppm	partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo(s)
α	Nível de significância
p	Valor de probabilidade
V	Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 PROPOSIÇÃO.....	20
2.1 PROPOSIÇÃO GERAL.....	20
2.2 PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ZINCO E COBRE.....	21
3.1.1 Análise Morfológica.....	22
3.1.1.1 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	22
3.1.1.2 Potencial Zeta.....	22
3.1.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura por Efeito de Campo (FEG)	22
3.1.2 Análise Composicional.....	23
3.1.2.1 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS).....	23
3.2 FORMULAÇÃO DOS SISTEMAS ADESIVOS.....	23
3.3 RESISTÊNCIA MÁXIMA À TRAÇÃO (RMT).....	25
3.4 GRAU DE CONVERSÃO (GC).....	27
3.5 SORÇÃO DE ÁGUA (SO) E SOLUBILIDADE (SB).....	29
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA E COMPOSICIONAL.....	31
4.2 RESISTÊNCIA MÁXIMA À TRAÇÃO (RMT).....	33
4.3 GRAU DE CONVERSÃO (GC).....	34
4.4 SORÇÃO DE ÁGUA (SO) E SOLUBILIDADE (SB).....	35
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos materiais para Odontologia adesiva está em constante crescimento e aprimoramento, com especial ênfase na longevidade das restaurações. Este foco torna-se necessário tendo em vista que a falha das restaurações ainda é recorrente e está diretamente ligada a alguns fatores como fratura de material e/ou dente, baixa resistência da união dente-restauração, lesões de cárie adjacente à margem da restauração e perda do selamento marginal (Alvanforoush et al. ¹ 2017; Koshiro et al. ² 2005; Jokstad et al. ³ 2001; Deligeorgi et al. ⁴ 2001; Sakaguchi ⁵ 2005).

Visto que o sucesso clínico das restaurações depende da efetividade e da durabilidade da interface de união, torna-se necessário o conhecimento sobre os substratos dentários nos quais os sistemas adesivos serão aplicados e o mecanismo pelo qual ocorre esta união, devido à alta heterogeneidade entre os substratos (Swift et al. ⁶ 1995; Van Meerbeek et al. ⁷ 2003). Basicamente, o mecanismo de união dos materiais restauradores ao esmalte e à dentina ocorre por um processo de troca, o qual envolve a substituição dos minerais dos tecidos dentais por monômeros resinosos, que se infiltram e são polimerizados nas porosidades criadas, promovendo uma adesão micromecânica (Nakabayashi et al. ⁸ 1982; Breschi et al. ⁹ 2008). Em relação aos substratos envolvidos no procedimento restaurador, temos dois opostos. A adesão ao esmalte é duradoura e efetiva (Frankenberger et al. ¹⁰ 2000), em contrapartida, a união adesivo-dentina constitui-se um desafio, uma vez que este substrato é intrinsecamente úmido, tornando o procedimento adesivo altamente sensível ao operador (Haller ¹¹ 2000; Hashimoto et al. ¹² 2000).

A estrutura do esmalte dentário é altamente mineralizada, constituída por 96% de mineral e 4% de substância orgânica e água. O conteúdo inorgânico é composto principalmente de cristais de hidroxiapatita e a matéria orgânica forma uma fina rede que aparece entre os cristais (Swift et al. ⁶ 1995; ten Cate ¹³ 2001). A adesão ao esmalte é conseguida através do condicionamento deste substrato com ácido fosfórico, o qual irá proporcionar um aumento das porosidades da superfície exposta mediante a desmineralização seletiva dos prismas de esmalte, criando microporosidades onde o sistema adesivo se infiltrará e será fotopolimerizado (Gwinnett ¹⁴ 1971; ten Cate ¹⁵ 1994; Gwinnett e Matsui ¹⁶ 1967). O aumento da

concentração e do tempo de aplicação do condicionamento ácido promove a formação de microporosidades mais evidentes, no entanto esses fatores parecem não influenciar de forma significativa a adesão dos compósitos à superfície do esmalte (Perdigão et al. ¹⁷ 2006; Kanca ¹⁸ 1992).

A dentina é um tecido duro, elástico e avascular que envolve a câmara pulpar. É composta por aproximadamente 70% de material inorgânico, 20% de material orgânico e 10% de água, o que a caracteriza como um substrato heterogêneo (Haller ¹¹ 2000; Pashley e Carvalho ¹⁹ 1997), com alterações fisiológicas e patológicas que tornam o mecanismo de adesão mais complexo. Seu componente inorgânico consiste, em sua maioria, de cristais de hidroxiapatita e a fase orgânica é constituída pelas fibrilas de colágeno (Marshall et al. ²⁰ 1997). Complementar a isso, a dentina caracteriza-se pela presença de múltiplos túbulos dentinários, preenchidos pelo fluido dentinário, dispostos muito próximos e que se estendem desde a junção amelodentinária até a polpa, tornando-a um substrato naturalmente úmido (Haller ¹¹ 2000).

Portanto, frente a essa característica, a dentina requer uma técnica úmida de adesão, o que favorece o desenvolvimento de sistemas adesivos com formulações cada vez mais hidrofílicas. Isto possibilita uma melhor infiltração dos monômeros resinosos à dentina e garante o sucesso imediato do procedimento adesivo, o que até então não havia sido alcançado, especialmente em dentina (Kanca ²¹ 1992). Porém, em médio e longo prazo, muitas das restaurações perdem a capacidade de selar e proteger os tecidos dentários adjacentes, levando à microinfiltração marginal e à recorrência de cárie, o que caracteriza o insucesso das restaurações adesivas (Chersoni et al. ²² 2004; Wang e Spencer ²³ 2002).

Apesar da constante evolução dos sistemas adesivos, a heterogeneidade da estrutura dentinária e a presença natural de umidade neste substrato, paradoxalmente, dificultam o procedimento adesivo, constituindo-se ainda um desafio clínico a ser superado. A degradação da interface adesiva, na ligação adesivo-dentina, é um dos principais focos de estudos na área (Breschi et al. ⁹ 2008; Peumans et al. ²⁴ 2005; Sano ²⁵ 2006; Reis et al. ²⁶ 2013), sendo tal ligação obtida pela formação de uma camada híbrida. No entanto, a longevidade dessa camada híbrida ainda tem sido amplamente questionada como consequência da degradação hidrolítica da

interface adesiva ao longo do tempo (Spencer et al. ²⁷ 2012; Barcellos et al. ²⁸ 2013; Spencer et al. ²⁹ 2014; Van Meerbeek et al. ³⁰ 1998).

No caso de adesivos em que o ácido fosfórico é previamente aplicado, a camada híbrida é formada quando o sistema adesivo penetra na superfície de dentina desmineralizada ou condicionada por ácido e se infiltra nas fibrilas de colágeno expostas. Durante o condicionamento ácido, a fase mineral é extraída de uma zona que mede entre 1 e 10 µm da superfície da dentina (Wang e Spencer ²³ 2002; Eick et al. ³¹ 1997; Wang e Spencer ³² 2004). A composição do substrato exposto difere radicalmente da dentina mineralizada. Por exemplo, a dentina mineralizada é 50% mineral, 30% colágeno e 20% água em volume (Marshall ³³ 1993), enquanto a dentina desmineralizada é 30% colágeno e 70% água (Eick et al. ³⁴ 1993; Pashley et al. ³⁵ 1993). Com a remoção da fase mineral, as fibrilas de colágeno são suspensas na água. Se houver uma zona substancial de desmineralização e a água que suporta a rede de colágeno for removida por secagem ao ar ou pela ação de uma seringa de ar, o colágeno entrará em colapso (Pashley et al. ³⁵ 1993; Gwinnett ³⁶ 1993). Uma rede de colágeno colapsada reduz a porosidade e inibe a penetração dos monômeros resinosos na camada de dentina desmineralizada (Pashley et al. ³⁵ 1993). Ele forma uma barreira entre a camada desmineralizada e a superfície dentinária intacta ou não reagida subjacente (Tam e Pilliar ³⁷ 1994). Uma rede de colágeno em colapso compromete severamente a ligação adesivo-dentina (Eick et al. ³⁴ 1993; Gwinnett ³⁶ 1993; Tam e Pilliar ³⁷ 1994).

Entre os vários fatores relacionados à degradação da camada híbrida, dois fatores recebem destaque na maioria dos estudos: hidrólise, ao longo do tempo, dos componentes resinosos presentes na camada híbrida (Wang e Spencer ²³ 2002; Sano et al. ³⁸ 1999; Carrilho et al. ³⁹ 2005) e a degradação da dentina desmineralizada com fibrilas de colágeno desprotegidas, pela deficiente infiltração de monômeros resinosos (Hashimoto et al. ¹² 2000; De Munck et al. ⁴⁰ 2003). Essas fibrilas colágenas desprotegidas podem ser hidrolisadas por várias enzimas, derivadas do hospedeiro, entre elas destacam-se as metaloproteinases (MMPs) e cisteínas de catepsinas (Carrilho et al. ⁴¹ 2009; Perdigão et al. ⁴² 2013).

As metaloproteinases 2, 8, 9 e 20 estão presentes na dentina e contribuem para a organização e mineralização da matriz da dentina. As MMPs desempenham um papel não apenas na modulação da matriz dentinária durante a progressão de lesões

de cárie (Tjaderhane et al. ⁴³ 1998; Boukpepsi et al. ⁴⁴ 2008), mas também na degradação do colágeno nas interfaces de ligação adesivo-dentina, comprometendo a longevidade das restaurações adesivas (Carrilho et al. ⁴¹ 2009; Chaussain-Miller et al. ⁴⁵ 2006; Hannas et al. ⁴⁶ 2007; Breschi et al. ⁴⁷ 2010). Uma diminuição da eficácia da adesão ao longo do tempo foi relatada e atribuída à ação das MMPs derivadas do hospedeiro (Hashimoto et al. ⁴⁸ 2003; Hebling et al. ⁴⁹ 2005; Pashley et al. ⁵⁰ 2004).

Portanto, uma das novas estratégias propostas que estão sendo estudadas, com o objetivo de aumentar a durabilidade da interface adesivo-dentina, é a inibição da atividade proteolítica das MMP nas fibrilas de colágeno desprotegidas (Perdigao et al. ⁴² 2013; Breschi et al. ⁴⁷ 2010; De Munck et al. ⁵¹ 2009). Alternativas têm sido propostas como forma de melhorar a adesão à dentina, como por exemplo, a inclusão de novos compostos e fármacos nos sistemas adesivos. Inibidores eficazes das MMPs incluídos nas interfaces de ligação adesivo-dentina podem proteger as fibrilas de colágeno da degradação, antes que possam ser remineralizadas (Liu et al. ⁵² 2011). Dentre os mais conhecidos podemos citar a clorexidina (Stanislawczuk et al. ⁵³ 2014; Malaquias et al. ⁵⁴ 2018), tetraciclina (Stanislawczuk et al. ⁵⁵ 2011), cloreto de benzalcônio (Sabatini et al. ⁵⁶ 2014) e alguns metais como cobre (Gutierrez et al. ⁵⁷ 2017; Gutierrez et al. ⁵⁸ 2017), prata (Zhang et al. ⁵⁹ 2012; Melo et al. ⁶⁰ 2013) e zinco (Zhang et al. ⁵⁹ 2012; Osorio et al. ⁶¹ 2011; Toledano et al. ⁶² 2013; Toledano et al. ⁶³ 2012).

Entre os agentes mais promissores com propriedades inibitórias de MMPs e antibacterianas estão as nanopartículas metálicas, que exibem maior atividade química e bactericida (Essa e Khallaf ⁶⁴ 2016; Morones et al. ⁶⁵ 2005). Recentemente, Gutierrez demonstrou que a inclusão de cobre em sistemas adesivos preservou a adesão à dentina, sem reduzir as propriedades mecânicas dos adesivos avaliados e que pode ser uma alternativa para conferir propriedades antimicrobianas ao adesivo (Gutierrez et al. ⁵⁷ 2017; Gutierrez et al. ⁵⁸ 2017). Além da atividade antimicrobiana superior, o cobre é o produto mais barato quando comparado aos outros materiais, facilmente disponível e a síntese de nanopartículas de cobre é rentável (Ingle et al. ⁶⁶ 2014). Uma vantagem adicional das nanopartículas de cobre é que elas são facilmente oxidáveis em meios aquosos ou ar produzindo nanopartículas de óxido de cobre. O óxido de cobre tem uma ação bactericida eficaz e pode ser facilmente misturado com polímeros ou macromoléculas produzindo polímeros estáveis em

relação às propriedades químicas e físicas (Schmidt et al. ⁶⁷ 2013; Usman et al. ⁶⁸ 2013; Usman et al. ⁶⁹ 2012; Wang et al. ⁷⁰ 2012).

Foi demonstrado que o cobre pode aumentar a força da matriz de colágeno, um dos componentes da camada híbrida, porque a enzima de reticulação do colágeno, lisil oxidase (LOX), depende do cobre (Marelli et al. ⁷¹ 2015; Rucker et al. ⁷² 1998). Portanto, este efeito indireto do cobre como agente de reticulação pode aumentar a resistência do colágeno, fato que indiretamente aumenta a resistência da união de forma geral, tornando esse substrato menos suscetível aos efeitos de enzimas proteolíticas, como as MMPs. Sabatini et al. (Sabatini et al. ⁷³ 2015) mostraram que o cobre tem a capacidade de inibir MMP-2 da dentina (de Souza et al. ⁷⁴ 2000) e a secreção de inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) (Simeon et al. ⁷⁵ 2000), causando menor padrão de degradação na interface resina-dentina.

Por outro lado, o uso do zinco (Zn) tem sido proposto pelo fato das MMPs serem uma família de endopeptidases dependentes de zinco estruturalmente relacionadas e requererem íons Zn^{2+} para manter sua estrutura terciária adequada e locais ativos funcionais (Tjaderhane et al. ⁴³ 1998; Tezvergil-Mutluay et al. ⁷⁶ 2010). Também o Zn pode ser usado para proteger o colágeno da atividade das MMPs, reduzindo sua expressão, assim como outros metais divalentes (de Souza et al. ⁷⁴ 2000; Santos et al. ⁷⁷ 2001; Osorio et al. ⁷⁸ 2011; Henn et al. ⁷⁹ 2012). Estudos anteriores (Osorio et al. ⁶¹ 2011; Toledano et al. ⁶² 2013; Toledano et al. ⁶³ 2012) observaram uma melhora na durabilidade da interface adesivo-dentina quando o Zn foi adicionado aos adesivos dentários comerciais. O Zn tem um papel estrutural nas proteínas, onde pode promover sutis alterações nas moléculas de colágeno, ligando-se em locais onde há a clivagem de collagenase em moléculas de colágeno, reduzindo a degradação mediada por MMPs (Toledano et al. ⁶² 2013; Toledano et al. ⁶³ 2012). A incorporação de Zn em adesivos comerciais também resultou na formação de cristalitos de hidroxiapatita nas fibrilas de colágeno, favorecendo a mineralização da dentina e inibindo a desmineralização da mesma (Toledano et al. ⁶³ 2012; Takatsuka et al. ⁸⁰ 2005), reduzindo a degradação do colágeno mediada por MMPs (Toledano et al. ⁶³ 2012; Osorio et al. ⁷⁸ 2011) e promovendo a remineralização do esmalte (Lynch et al. ⁸¹ 2011).

Recentemente também foi relatado que o zinco reduz efetivamente a degradação do colágeno mediada por MMP em espécimes de dentina armazenados

em uma solução rica em $ZnCl_2$ (Osorio et al. ⁷⁸ 2011). A concentração de zinco em torno das MMPs ligadas à matriz pode ser muito importante na determinação de sua atividade no colágeno da dentina.

A escolha pela inclusão desses agentes compostos nos sistemas adesivos deve-se ao fato da crescente tendência de simplificação de passos, a qual reflete o desejo do profissional por eficiência e redução de tempo clínico. Porém não tem vindo acompanhada de uma genuína evolução tecnológica uma vez que tem induzido a piores resultados em termos de durabilidade das ligações adesivas (Peumans et al. ²⁴ 2005). Isso pode ser justificado pela alteração na composição química dos sistemas adesivos a longo prazo. A inserção de nanopartículas de Zn e Cu combinadas, em sistemas adesivos, como alternativa para preservar a longevidade da restauração, foi estudada e testada apenas em adesivos universais (Gutierrez et al. ⁸² 2019). Portanto, novas investigações necessitam ser feitas para analisar seu potencial de degradação em um sistema adesivo simplificados para que não afete sua composição e o desempenho clínico das restaurações.

Frente a esses desafios, o presente estudo avaliou o desempenho das propriedades mecânicas e físico-químicas de dois diferentes sistemas adesivos comerciais contendo nanopartículas de zinco e cobre em diferentes concentrações. A hipótese nula testada foi: as diferentes concentrações de zinco e cobre não irão acarretar diferenças e alterações nas propriedades mecânicas e físico-químicas dos sistemas adesivos testados.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar o efeito da inclusão de nanopartículas de zinco e cobre, em diferentes concentrações, em dois sistemas adesivos simplificados nas propriedades mecânicas e físico-químicas.

2.2 PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA

1 – Caracterizar morfológicamente as nanopartículas de zinco e cobre através da análise de superfície por Microscopia de Força Atômica (AFM);

2 – Caracterizar morfológicamente as nanopartículas de zinco e cobre através da determinação do diâmetro médio das partículas por Potencial Zeta;

3 – Caracterizar morfológicamente as nanopartículas de zinco e cobre através de micrografias de alta resolução por Microscópio Eletrônico de Varredura por Efeito de Campo (FEG);

4 – Realizar análise composicional para determinar a pureza das nanopartículas de zinco e cobre através da Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS);

7 – Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de nanopartículas de zinco e cobre em dois sistemas adesivos simplificados na resistência máxima à tração;

8 – Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de nanopartículas de zinco e cobre em dois sistemas adesivos simplificados no grau de conversão;

9 – Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de nanopartículas de zinco e cobre em dois sistemas adesivos simplificados na sorção de água em 28 dias;

10 – Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de nanopartículas de zinco e cobre em dois sistemas adesivos simplificados na solubilidade em 28 dias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

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 morfológicamente por microscopia de força atômica (AFM), Potencial Zeta e microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG) e quimicamente através de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS). A Tabela 1 mostra as especificações das nanopartículas de zinco e cobre.

Quadro 1 – Características e especificações das nanopartículas de zinco e cobre de acordo com os fabricantes.

Categoria das partículas	Lote	Fabricante	Especificações
Nanopartículas de Zinco (Zn)	8410DL	Skyspring nanomaterials, Inc*	<p>Eficiência de encapsulação: 99.8% metálico</p> <p>Aparência: Nano-pó branco ~ amarelo claro</p> <p>Tamanho médio de partícula: 10–30 nm</p> <p>Área específica da superfície: 30-50 mm²/g</p>
Nanopartículas de Cobre (Cu)	0820XH	Skyspring nanomaterials, Inc*	<p>Eficiência de encapsulação: 99.9% metálico</p> <p>Aparência: Nano-pó preto.</p> <p>Tamanho médio de partícula: 40–60 nm</p> <p>Área específica da superfície: 12 mm²/g</p> <p>Morfologia: esférico</p> <p>Densidade aparente: 0.19 g/cm³</p> <p>Densidade real: 8.9 g/cm³</p>

3.1.1 Análise Morfológica

3.1.1.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)

O tamanho e a superfície das nanopartículas de zinco e cobre foram analisados em um microscópio de força atômica (AFM, do inglês Atomic Force Microscopy) da marca Shimadzu (SPM-9600: Shimadzu Corporation, Kyoto, JPN). As imagens foram obtidas no modo contato intermitente, empregando-se um cantiléver de nitreto de silício (Si_3N_4) com constante elástica de aproximadamente 0,06 N/m (valor nominal) e uma ponta com raio de aproximadamente 12 nm (modelo SNL-10). A frequência de varredura foi de 1 Hz.

3.1.1.2 Potencial Zeta (Z-Sizer)

O tamanho e a determinação do diâmetro médio das nanopartículas de zinco e cobre foram analisados pelo Zeta-sizer (Nano-Zs90 Nanoseries; Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK), 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. As partículas foram diluídas em água destilada na proporção 1 g para cada 1000 mL.

3.1.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura por Efeito de Campo (FEG)

A avaliação morfológica de alta resolução das nanopartículas de zinco e cobre foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura por efeito de campo (FEG) (MIRA3 LM; Tescan, Warrendale, PA, EUA). Após o preparo, as micrografias foram obtidas com 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 MiraTC 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 FORMULAÇÃO DOS SISTEMAS ADESIVOS

Nanopartículas de zinco e cobre foram incorporadas em dois sistemas adesivos simplificados comerciais, Ambar (AMB) e Ambar contendo APS (APS) [FGM]. Esses adesivos apresentam-se em um único frasco. A Figura 1 mostra os adesivos utilizados no estudo e a Tabela 2 mostra a composição detalhada de cada adesivo e número de lote.

Inicialmente, um estudo piloto foi realizado utilizando diversas concentrações de zinco e de cobre. Observou-se a mudança de coloração nos adesivos contendo 10% de zinco e acima de 0,5% de cobre. Ocorreu também uma degradação nos sistemas adesivos contendo concentrações acima de 10% de zinco e acima de 0,5% de cobre, sendo essa um processo de geleificação do adesivo, tornando-o impossível de utilizar.

Sendo assim, optou-se pelas seguintes concentrações (% em peso): 0% (controle, material comercial); 5% zinco + 0,1% cobre; 5% zinco + 0,2% cobre e 10% zinco + 0,1% cobre. As nanopartículas de zinco e cobre foram pesadas em balança analítica (AW220, Shimadzu, Kyoto, JPN) e adicionadas aos adesivos por agitação em um misturador Speedmix (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA).



Figura 1 – Adesivos simplificados selecionados para o estudo. Fonte: fgm.ind.br

Quadro 2 – Sistemas adesivos e suas respectivas composições de acordo com os fabricantes.

Sistema adesivo	Número de lote	Composição
AMBAR	300618	Ingredientes ativos: MDP (10-metacrilóiloxidecil dihidrogênio fosfato) monômeros metacrílicos, fotoiniciadores, co-iniciadores e estabilizante. Ingredientes inativos: carga inerte (nanopartículas de sílica) e veículo (etanol).
AMBAR APS	061217	Ingredientes ativos: MDP (10-metacrilóiloxidecil dihidrogênio fosfato) monômeros metacrílicos, complexo fotoiniciador (APS), co-iniciadores e estabilizantes. Ingredientes inativos: carga inerte (nanopartículas de sílica) e veículo (etanol).

3.3 RESISTÊNCIA MÁXIMA À TRAÇÃO (RMT)

Dez corpos de prova (CP) (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 espessura; Odeme Prod Odont Ltda, Joaçaba, SC, BR). Aplicou-se vaselina na base da matriz e, em seguida, uma matriz de poliéster foi colocada em contato com esta 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, BR). 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/cm² (VALO, Ultradent Products, South Jordan, UT, EUA). A densidade de energia adotada (4,8 J/cm²) permitiu a remoção dos espécimes da matriz sem sofrer deformação permanente. Os CP foram removidos cuidadosamente da matriz com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo também removidas todas as rebarbas de adesivo (Figura 2).

Metade dos CP (n=5) foram testadas imediatamente (IM) após o preparo e a outra metade (n=5) depois de serem armazenados em água destilada por 28 dias a 37°C. Os espécimes foram medidos em sua largura e espessura com um paquímetro digital (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Tóquio, JPN) e então foram fixados individualmente em garras de Geraldelli (Odeme Biotecnologia, Luzerna, SC, BR), aplicando em cada um dos extremos do espécime uma gota de cola de cianoacrilato gel (Bob Smith Industries, Atascadero, CA, EUA). Após o tempo de presa da cola, as garras com os espécimes foram acopladas na máquina de ensaios universal (Kratos Dinamômetros, Cotia, SP, BR) 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 (Stanislawczuk et al. ⁵³ 2014) (Figura 3).



Figura 2 – Passo a passo da confecção de corpos de prova de adesivo para teste de resistência máxima à tração.



Figura 3 – Sequência para o teste de máxima resistência a tração.

3.4 GRAU DE CONVERSÃO (GC)

Três CP (n=3) de cada condição experimental foram produzidos para análise do grau de conversão (GC), medido por meio de espectrometria de micro-Raman (Senterra equipment, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, GER). Os CP foram produzidos em uma matriz metálica cilíndrica de 5,0 mm de diâmetro e 1,0 mm de espessura (Odeme Prod Odont Ltda, Joaçaba, SC, BR). Aplicou-se vaselina na base da matriz e, 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, BR). 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 padrão de 1000 mW/cm² (VALO, Ultradent Products, South Jordan, UT, EUA). Os CP foram removidos cuidadosamente da matriz com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo também removidas todas as rebarbas de adesivo (Figura 4).

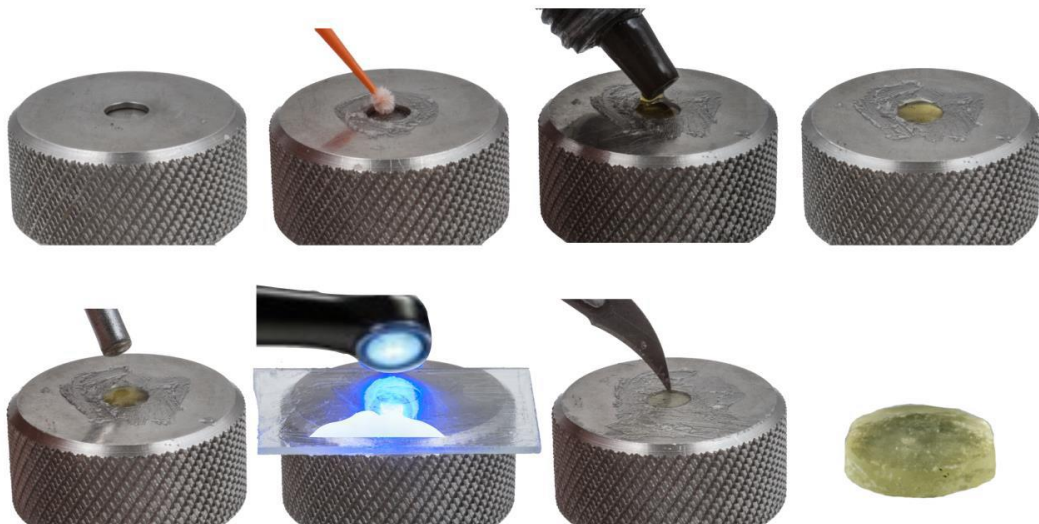


Figura 4 – Confeção de CP cilíndrico para micro-Raman.

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 $\approx 3 \mu\text{m}$; resolução espectral de $\approx 5 \text{ cm}^{-1}$, com 10 s de tempo de acumulação e 5 coadições, em magnificação de 20X 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 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 5). 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, GER).

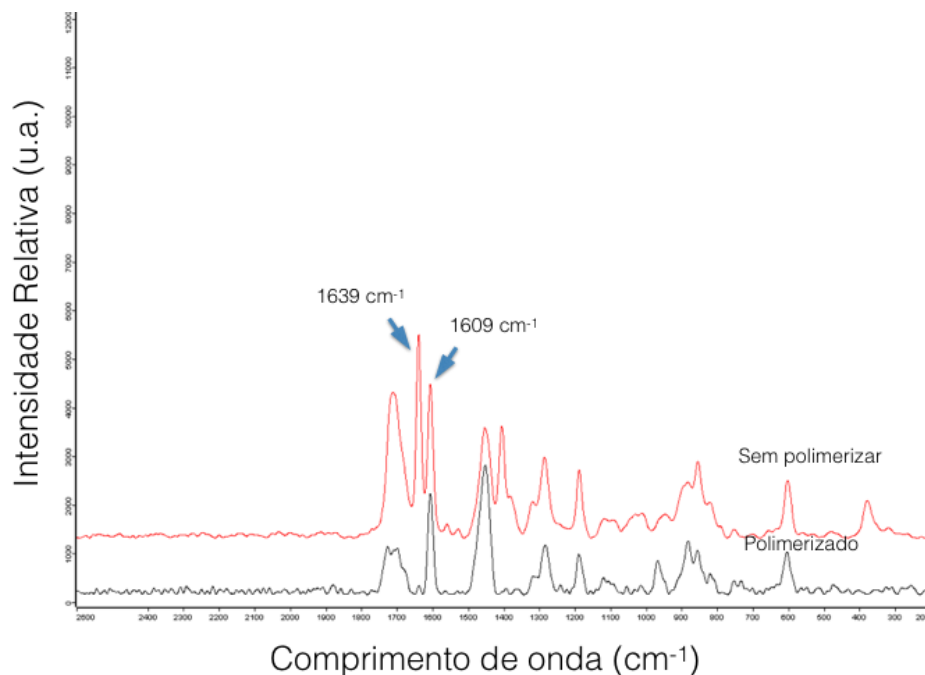


Figura 5 – Espectros (micro-Raman) representativos. As setas indicam os picos de referência aromático (1609 cm^{-1}) e reativo (1639 cm^{-1}).

Assim, o GC das ligações duplas do monômero convertido em polímero foi calculado de acordo com a seguinte fórmula (Stanislawczuk et al. ⁵³ 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 pontos aleatoriamente selecionados em cada CP. A partir disso, foi possível a obtenção das médias de cada CP, as quais foram utilizadas na análise estatística (n = 3). As leituras iniciais (np) também foram realizadas em triplicata.

3.5 SORÇÃO DE ÁGUA (SO) E SOLUBILIDADE (SB)

Dez discos de adesivo de cada condição experimental (n=10) foram produzidos (como descrito para micro-Raman). A especificação ISO 4049 foi empregada na determinação da SO e SB (Ito et al. ⁸³ 2005; Malacarne et al. ⁸⁴ 2006; Reis et al. ⁸⁵ 2007). Imediatamente após a polimerização, os CP 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 uma balança analítica (AW220, Shimadzu, Kyoto, JPN) em intervalos de 24h até que a variação de massa entre dois dias consecutivos fosse menor que 0,2 mg. Um paquímetro digital (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Tóquio, JPN) foi usado para medir a espessura e o diâmetro dos CP, com precisão de 0,01 mm, para calcular o volume (V) de cada amostra (em mm³).

Em seguida, cada CP foi colocado num *ependorf* 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, os CP foram lavados em água corrente, limpos delicadamente com um papel macio e absorvente, e pesados em uma balança analítica (m2), retornando para os frascos com 10 mL de água fresca.

Após o tempo de armazenamento de 28 dias, os CP foram secos em dessecadores contendo sílica gel a 37°C, os 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.⁵³ 2014).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias e desvios-padrão da RMT (MPa), SO (%) e SB (%) foram calculados para todas as condições experimentais. Os dados de RMT e MD foram analisados por uma análise de variância de 3 fatores com adesivo, concentração de zinco/cobre e período de armazenamento como os principais fatores. Para GC, os dados foram analisados por análise de variância de dois fatores (adesivo e concentração de zinco/cobre). Para SO, SB, e liberação de cobre, os dados de 28 dias foram analisados por análise de variância de dois fatores (adesivo e concentração de zinco/cobre). 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 ANÁLISE MORFOLÓGICA E COMPOSICIONAL

As análises morfológicas conduzidas por microscopia de força atômica (AFM) apresentaram uma leitura de superfície com tamanho médio das nanopartículas de 126,33 nm para o zinco e 117,16 nm para o cobre conforme apresentado na Figura 6. Na leitura em Potencial Zeta ocorreu um pico entre 1 e 10 d.nm para o zinco e um pico entre 100 e 1000 para o cobre, mostrando assim um alto potencial de aglomeração. Na microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG) as micrografias mostraram um tamanho de partículas entre 48 e 58 nm para o zinco e entre 60 e 90 nm para o cobre. A análise composicional por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) revelou que as amostras têm uma alta percentagem de átomos de zinco (Figura 9a) e de cobre (Figura 9b), sem contaminação com outros elementos.

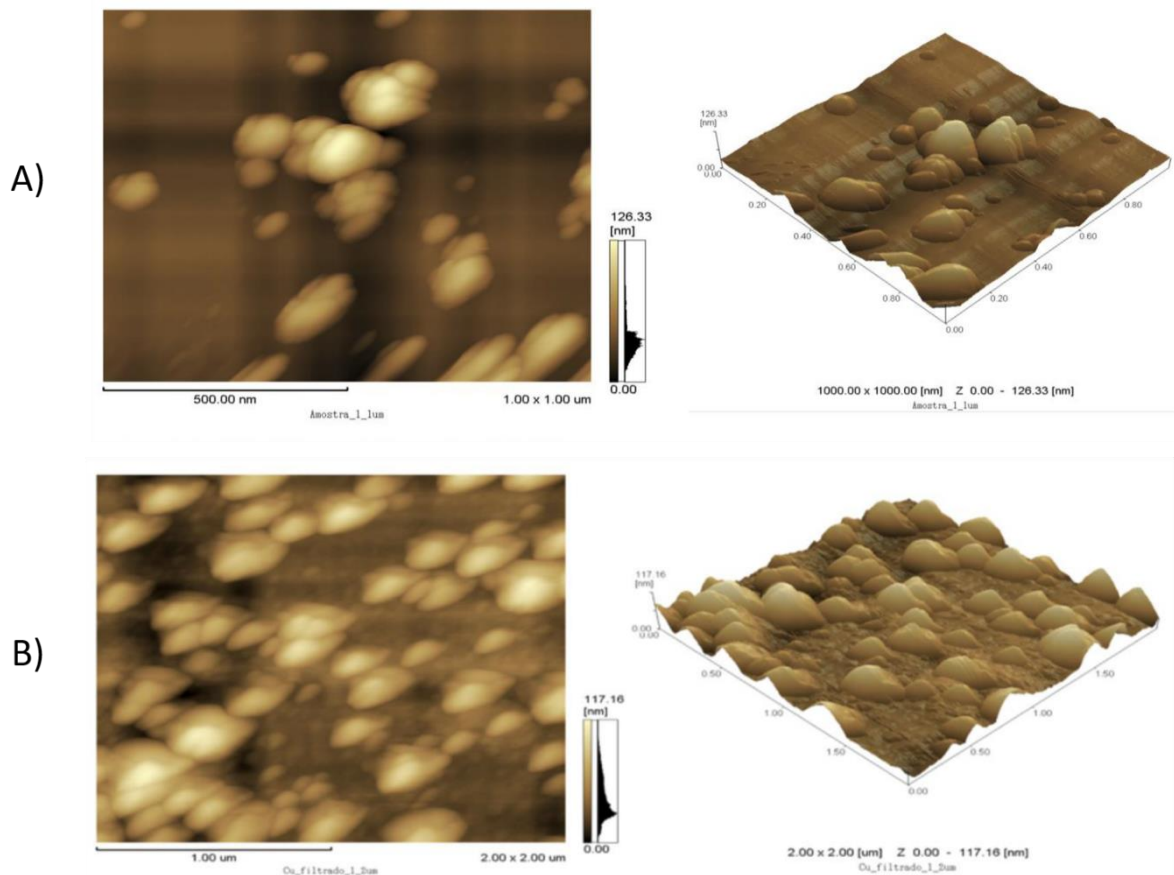


Figura 6: A) Nanopartículas de zinco; B) Nanopartículas de cobre. Tamanho de partícula medido através de microscopia de força atômica (AFM).

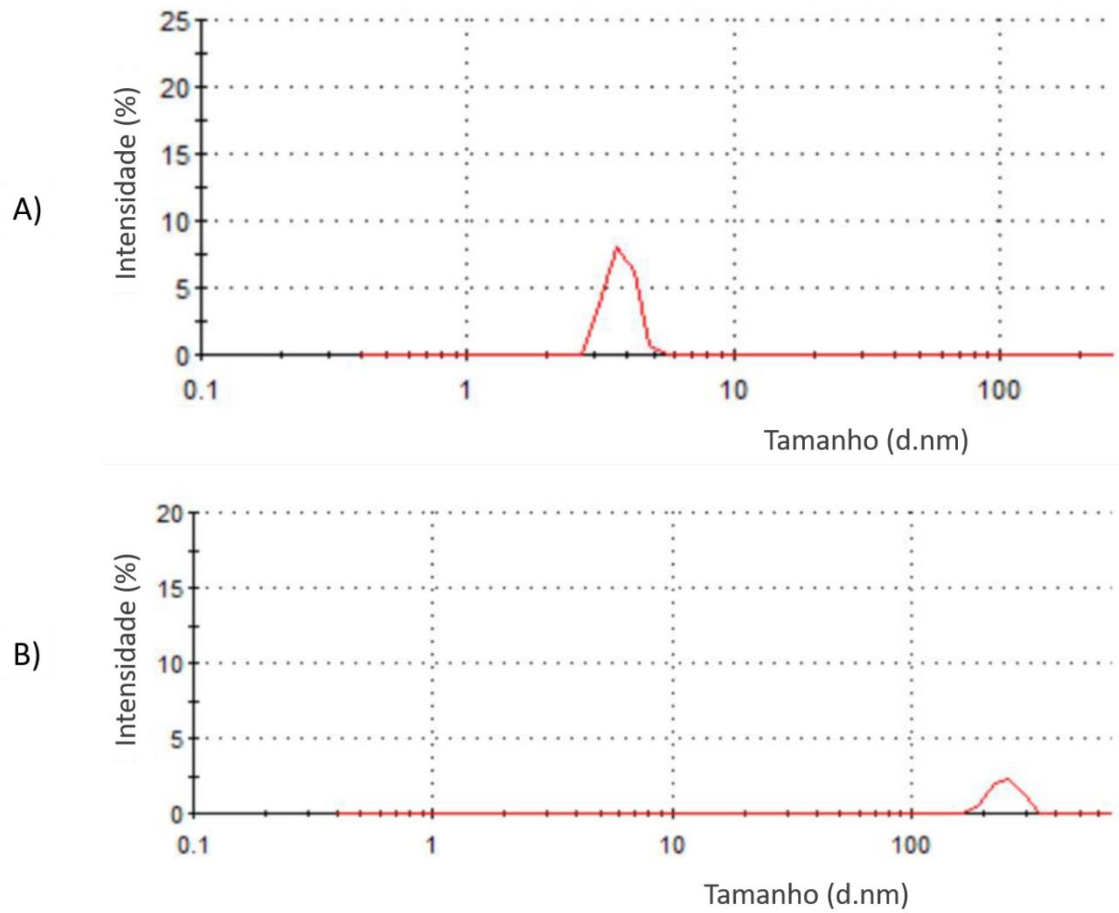


Figura 7: A) Nanopartículas de zinco; B) Nanopartículas de cobre. Histograma de tamanhos de partícula e sua frequência (%), medido através de Potencial Zeta.

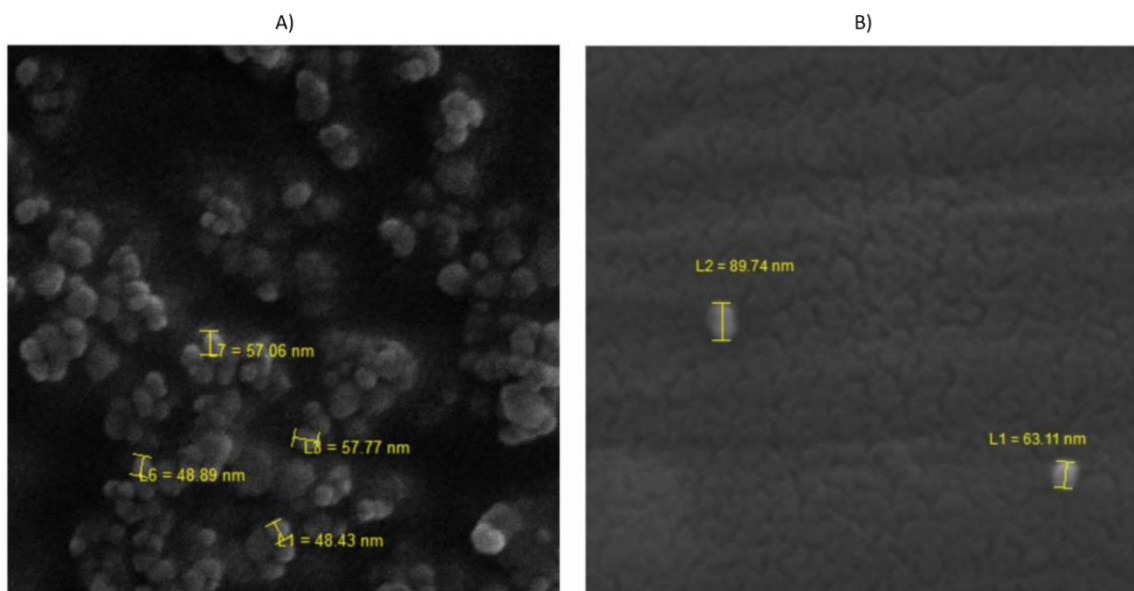


Figura 8: A) Nanopartículas de zinco; B) Nanopartículas de cobre. Tamanho de partícula através de microscópio eletrônico de varredura por efeito de campo (FEG).

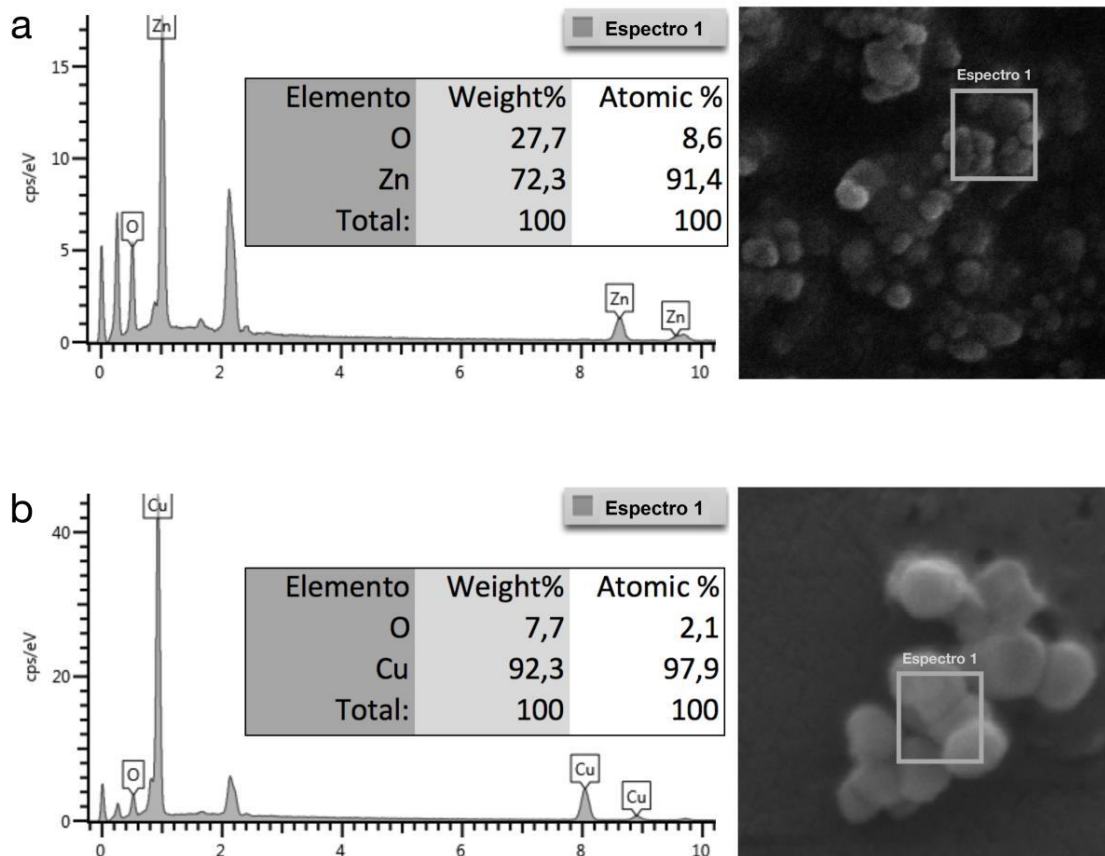


Figura 9: Análise composicional das nanopartículas de zinco (a) e cobre (b), obtida por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS).

4.2 RESISTÊNCIA MÁXIMA À TRAÇÃO (RMT)

As médias e desvio padrão de RMT são mostrados na Tabela 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de ambos os sistemas adesivos no tempo imediato (24h) e para o grupo APS no tempo 28 dias ($p > 0,05$). Houve um aumento nos valores de média para o grupo APS no tempo 28 dias em relação ao tempo imediato (24h), sendo esses os maiores valores de RMT ($p < 0,05$).

Houve diferença significativa estatisticamente entre as concentrações, no tempo 28 dias, para o grupo AMB sendo que a inclusão das nanopartículas proporcionou um aumento nos valores de média de RMT, tanto entre concentrações como em relação ao tempo, ocorrendo aumento da resistência após 28 dias de armazenamento em água ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Médias e desvio padrão de resistência máxima à tração (RMT) para cada grupo experimental. (*)

Concentração Zn-Cu (%)	Ambar		Ambar APS	
	24h	28 dias	24h	28 dias
0 (controle)	9,1 ± 1,4 C,D	12,9 ± 2,3 C	14,5 ± 1,8 B,C	19,3 ± 1,4 A
5 / 0,1	10,1 ± 2,6 C, D	15,8 ± 2,3 B, C	8,2 ± 1,9 C,D	18,8 ± 1,5 A
5 / 0,2	13,8 ± 2,8 C	18,2 ± 3,0 A,B	11,1 ± 2,4 C	21,2 ± 3,7 A
10 / 0,1	10,8 ± 1,4 C	14,5 ± 0,8 B	14,6 ± 2,0 B,C	19,6 ± 1,0 A

(*) Letras iguais significam médias estatisticamente semelhante ($p > 0,05$).

4.3 GRAU DE CONVERSÃO (GC)

Os valores de médias e desvio padrão para GC estão mostrados na Tabela 4. Não houve diferença estatística significativa para o grupo AMB ($p > 0,05$), porém quando comparado ao grupo APS ele apresentou valor inferior ao controle e superior às demais concentrações ($p < 0,05$). Para o grupo APS, houve diferença estatística significativa entre todas as concentrações, sendo o grupo controle (APS) o de maior valor de grau de conversão ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Médias e desvio padrão de grau de conversão (%) para cada grupo experimental. (*)

Concentração Zn-Cu (%)	Ambar	Ambar APS
0 (controle)	60,6 ± 3,0 B	73,56 ± 9,2 A
5 / 0,1	61,1 ± 2,1 B	43,8 ± 3,3 D
5 / 0,2	57,4 ± 3,8 B	37,3 ± 3,3 E
10 / 0,1	59,8 ± 3,3 B	53,1 ± 0,9 C

(*) Letras iguais significam médias estatisticamente semelhante ($p > 0,05$).

4.4 SORÇÃO (SO) E SOLUBILIDADE (SB)

Para SO foram utilizados os valores do tempo 28 dias e as médias e desvio padrão de cada grupo são mostrados na Tabela 5. Não houve diferença estatística significativa entre as concentrações para AMB ($p>0,05$), porém para APS a concentração 5%Zn+0,1%Cu apresentou maior valor de sorção de água. Entre sistemas adesivos, AMB apresentou uma maior sorção de água ($p<0,05$).

Os valores de SB são mostrados na Tabela 6. Não houve diferença estatística significativa para as diferentes concentrações de partículas de Zn e Cu entre um mesmo grupo ($p>0,05$). Contudo, APS sempre apresentou melhores valores de SB do que para AMB ($p<0,05$).

Tabela 5 – Médias e desvio padrão de sorção de água (SO) para cada grupo experimental.

Concentração Zn-Cu (%)	Ambar	Ambar APS
0 (controle)	15,9 ± 1,0 C	0,92 ± 0,6 A
5 / 0,1	18,9 ± 1,1 C	2,9 ± 2,3 B
5 / 0,2	17,6 ± 1,2 C	0,09 ± 0,6 A
10 / 0,1	19,7 ± 1,6 C	0,73 ± 1,2 A

Tabela 6 – Médias e desvio padrão de solubilidade (SB) para cada grupo experimental.

Concentração Zn-Cu (%)	Ambar	Ambar APS
0 (controle)	7,9 ± 0,8 B	3,2 ± 0,7 A
5 / 0,1	8,6 ± 2,8 B	3,4 ± 2,3 A
5 / 0,2	7,5 ± 0,7 B	6,1 ± 2,7 A
10 / 0,1	7,0 ± 0,6 B	4,4 ± 3,2 A

5 DISCUSSÃO

A caracterização de nanopartículas previamente à um estudo torna-se necessária e indispensável pois as nanopartículas possuem propriedades físicas e químicas dependentes do seu tamanho e forma (Jortner ⁸⁶ 2002). A escolha adequada das técnicas de caracterização deve ser feita levando-se em conta a resolução, o tipo de informação que cada uma pode fornecer e principalmente a complementariedade entre elas.

A análise morfológica por microscopia de força atômica (AFM) envolve o arraste de uma sonda de ponta extremamente fina ao longo da amostra, muito próximo à superfície, fazendo a varredura sobre uma área da amostra onde um mapa de superfície pode ser produzido (Klabunde ⁸⁷ 2001; Magonov e Whangbo ⁸⁸ 1996). Tal leitura é complementada por microscopia eletrônica por efeito de campo (FEG) pelo fato de ser muito sensível e delicada à aglomerados de nanopartículas, como foi o caso, nesse estudo, das nanopartículas de cobre, assim como comprovada pela análise através do Potencial Zeta. Uma análise é complementar à outra, visto que cada uma faz uma análise específica diferente, sendo AFM a análise de superfície, Potencial Zeta a determinação do diâmetro médio e o FEG micrografias de alta resolução.

Todas as análises morfológicas demonstraram um resultado satisfatório em relação ao tamanho das partículas, sendo que estas estão dentro dos padrões para serem nomeadas como nanopartículas. Porém, os tamanhos estão acima do que o fabricante informa nas especificações do produto. Essa variação pode ocorrer devido a aglomeração das nanopartículas nos diferentes testes utilizados ou no tempo de armazenamento até que ocorresse as leituras de caracterização. A aglomeração frequentemente ocorre quando há elevada força iônica, que protege a repulsão devido às cargas sobre as nanopartículas e é influenciada pela metodologia de obtenção das nanopartículas (Mora-Huertas et al. ⁸⁹ 2010).

Para análise composicional dois tipos de detectores que captam raios-X característicos podem ser utilizados: por dispersão de energia (EDS) ou por dispersão em comprimento de onda (WDS). A análise por EDS é uma ferramenta muito importante para a caracterização de materiais metálicos e semicondutores, pois

permite ao pesquisador identificar a composição de sua amostra, mesmo que qualitativamente, em pontos específicos da imagem (Cruz ⁹⁰ 2006). Porém, deve-se atentar para as condições da superfície da amostra. No presente estudo optou-se pelo uso do EDS pois a rugosidade superficial não é tão crítica quanto no caso da utilização do Espectrômetro de Comprimento de Onda Dispersivo (WDS - Wavelength Dispersive Spectroscopy), principalmente, quando se deseja descobrir a composição mais aproximada de precipitados em matriz metálica ou de impurezas em semicondutores. Em uma superfície rugosa (baixo polimento) pode-se aumentar consideravelmente o erro da quantificação do espectro obtido. O volume de interação do feixe eletrônico varia conforme a rugosidade superficial e a inclinação da superfície da amostra.

Além da caracterização, conhecer as propriedades dos materiais utilizados é de suma importância. Alguns fatores sobre as nanopartículas em sistemas adesivos precisam ser considerados para que haja relevância nos resultados. São eles: as nanopartículas devem ser suficientemente pequenas para penetrarem nos espaços interfibrilares, que apresentam cerca de 20nm de diâmetro (Perdigão et al. ⁹¹ 1996; Van Meerbeek et al. ⁹² 1998); as nanopartículas necessitam apresentar estabilidade físico/química para evitar sua agregação/aglomeração durante a armazenagem e/ou aplicação do sistema de união, caso contrário, haveria a possibilidade de formação de estruturas micrométricas denominadas *clusters*, cujas dimensões as impossibilitam de penetrar na dentina desmineralizada (Tay et al. ⁹³ 1999) e por último deve ainda ser considerada a presença de um hidrogel de substâncias residuais composto por proteoglicanas e proteínas não-colágenas, localizado nos espaços interfibrilares, que pode impedir fisicamente a infiltração de nanopartículas (Linde ⁹⁴ 1995).

A inclusão de nanopartículas em sistemas adesivos, diferentemente dos compósitos odontológicos, ainda não foi dominada. A estabilização de nanopartículas em sistemas adesivos é extremamente difícil de ser alcançada. Um exemplo é o caso do adesivo Prime & Bond NT (Dentsply, De Trey, Konstanz, Germany), que apresenta um equilíbrio químico crítico, com alteração das características de fluidez e pH em função da rápida volatilização do seu solvente a base de acetona. A instabilidade química é, provavelmente, responsável pela agregação das nanopartículas, cujo tratamento superficial recebido não consegue bloquear a atração eletrostática entre elas (Tay et al. ⁹³ 1999). Por outro lado, similar influência das nanopartículas não foi

constatada por Nunes et. al (Nunes et al. ⁹⁵ 2001). Estes autores chegaram a resultados estatisticamente iguais entre o adesivo Prime & Bond NT e uma versão experimental sem a presença de nanopartículas. Destacaram ainda, que a incorporação de partículas micrométricas para compor uma modificação do adesivo Adper Single Bond acarretou redução significativa da resistência de união em comparação ao produto original. Diante destes dados antagônicos, ficou evidente que a presença de partículas inorgânicas em adesivos pode exercer influência na resistência da união, mas em condições especiais. Além disso, o mecanismo que estabelece este poder é determinado, provavelmente, pelas características das partículas e forma de interação com o tecido dentinário.

Alguns estudos mais recentes mostraram que a incorporação de ZnONp (Garcia et al. ⁹⁶ 2016) ou CuNp (Gutierrez et al. ⁵⁷ 2017; Gutierrez et al. ⁵⁸ 2017) em alguns adesivos dentários comerciais, não influenciam negativamente as propriedades mecânicas do próprio adesivo, bem como observadas nos resultados de resistência máxima à tração do presente estudo. Na RMT, ambos os grupos obtiveram um aumento em seus valores de média com o passar do tempo. O grupo APS apresentou os melhores valores em 28 dias para todas as concentrações. Esses resultados demonstram uma vantagem da adição de nanopartículas aos sistemas adesivos devido à melhora na resistência do material, como um reforço de carga. A relevância também está na avaliação ao longo do tempo, pois o sucesso clínico não depende apenas do bom resultado alcançado logo após a aplicação do material restaurador, mas à manutenção de suas características ao longo do tempo (Van Meerbeek et al. ⁷ 2003)

Na SO e SB, AMB apresentou uma maior sorção de água e APS sempre apresentou melhores valores de solubilidade. A justificativa para os bons resultados apresentados para todos os grupos pode ser a presença do 10-MDP em ambos os sistemas adesivos assim como mostra a Tabela 2 e que, de acordo com os fabricantes, promove uma ligação química mais estável em relação aos outros adesivos. Estudos mostram que a ligação química promovida pelo 10-MDP não é apenas mais eficiente como também mais estável em meio aquoso, o que acarreta em menor sorção de água quando comparado à outros monômeros (Cardoso et al. ⁹⁷ 2011; Sano et al. ⁹⁸ 1995; Yoshida et al. ⁹⁹ 2004). Em outras palavras, isto significa

que a adição de nanopartículas de zinco e cobre não tornou os sistemas adesivos mais propensos à degradação precoce.

Na avaliação do grau de conversão não houve diferença estatística significativa para o grupo AMB ($p > 0,05$), porém quando comparado ao grupo APS ele apresentou valor inferior ao controle e superior às demais concentrações ($p < 0,05$). Para o grupo APS, houve diferença estatística significativa entre todas as concentrações, sendo o grupo controle (APS) o de maior valor de grau de conversão ($p < 0,05$). Como limitações deste estudo, podemos mencionar que, embora os resultados tenham mostrado redução significativa no grau de conversão para APS, não está claro se essa redução é relevante pelo fato de RMT, SO e SB mostrarem valores melhores e/ou iguais ao longo do tempo. Isso pode ser explicado pelas propriedades cinéticas das nanopartículas de liberação lenta ao longo do tempo, podendo ter melhorado as propriedades mecânicas e físico-químicas através de uma polimerização tardia. Esta hipótese é levantada pelo fato de não haver conhecimento sobre a composição de APS. Um novo teste de grau de conversão poderá ser feito após 28 dias para confirmar tal hipótese e uma possível análise composicional do sistema adesivo APS e suas reações eletroquímicas com as nanopartículas de zinco e cobre.

Outro fator que podemos levar em consideração diz respeito à aglomeração das nanopartículas. Existe uma tendência natural das nanopartículas se agregarem/aglomerarem formando *clusters*, como resultado da atuação de forças de van der Waals, predominantes em nanoescala. Neste universo de grandeza, as forças de atração eletrostáticas chegam a ser cerca de 10^{36} vezes mais intensas que a força gravitacional (Roco ¹⁰⁰ 1995; Roco et al. ¹⁰¹ 1999; Seeman ¹⁰² 2003). Para alcançar a estabilidade das partículas, conforme a teoria de Derjaguim-Landau-Vermeij-Overbeek (DLVO), são aplicados modificadores de superfície, o que resulta em forças eletrostáticas de repulsão entre elas, proporcionando equilíbrio químico. No entanto, a tendência das nanopartículas se agregarem/aglomerarem pode ser intensificada, em um segundo momento, como resultado do próprio tratamento de superfície. Isto ocorre devido a formação de grupamentos silanol na superfície das partículas modificadas, o que implica na formação de pontes de hidrogênio entre unidades adjacentes (Vauthier et al. ¹⁰³ 2008) e adicionalmente, soma-se a isso a desestabilização da carga eletrostática das nanopartículas, devido a alterações no pH e forças iônicas do adesivo, advindas com a volatilização de solvente (Tay et al. ⁹³

1999), podendo estes fatores terem sido também um motivo para o impedimento da correta transformação de monômeros em polímeros.

Outro fator em discussão é se há ligação entre nanopartículas de zinco e cobre com as moléculas de APS, impedindo assim que tais moléculas exerçam sua função de polimerização. Para isso torna-se necessário o conhecimento das moléculas que compõem o sistema APS. Mas, apesar de suas limitações, o presente estudo foi capaz de demonstrar que a adição de nanopartículas de zinco e cobre a dois sistemas adesivos simplificados poderia proporcionar uma melhora nas propriedades mecânicas ao longo do tempo, melhorando a adesão da interface adesivo-dentina.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a inclusão de nanopartículas de zinco e cobre em sistemas adesivos simplificados apresentou um melhor desempenho nos testes realizados. Tal inclusão não afetou a degradação do material ao longo do tempo por meio da sorção de água e que é viável sua utilização para o aumento da resistência do material ao longo do tempo. Todas as concentrações utilizadas são seguras e indicadas pois não houve degradação do material. A caracterização das nanopartículas auxilia sendo base para estudos futuros e confirma a pureza do material.

REFERÊNCIAS

1. Alvanforoush N, Palamara J, Wong RH, Burrow MF. Comparison between published clinical success of direct resin composite restorations in vital posterior teeth in 1995-2005 and 2006-2016 periods. *Aust Dent J.* 2017; Jun;62(2):132-45.
2. Koshiro K, Inoue S, Sano H, De Munck J, Van Meerbeek B. In vivo degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch and an etch-and-rinse adhesive. *Eur J Oral Sci.* 2005; Aug;113(4):341-8.
3. Jokstad A, Bayne S, Blunck U, Tyas M, Wilson N. Quality of dental restorations. FDI Commission Project 2-95. *Int Dent J.* 2001; Jun;51(3):117-58.
4. Deligeorgi V, Mjor IA, Wilson NH. An overview of reasons for the placement and replacement of restorations. *Prim Dent Care.* 2001; Jan;8(1):5-11.
5. Sakaguchi RL. Review of the current status and challenges for dental posterior restorative composites: clinical, chemistry, and physical behavior considerations. Summary of discussion from the Portland Composites Symposium (POCOS) June 17-19, 2004, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon. *Dent Mater.* 2005; Jan;21(1):3-6.
6. Swift EJ, Jr., Perdigao J, Heymann HO. Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art, 1995. *Quintessence Int.* 1995; Feb;26(2):95-110.
7. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent.* 2003; May-Jun;28(3):215-35.
8. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982; May;16(3):265-73.
9. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater.* 2008; Jan;24(1):90-101.
10. Frankenberger R, Kramer N, Petschelt A. Long-term effect of dentin primers on enamel bond strength and marginal adaptation. *Oper Dent.* 2000; Jan-Feb;25(1):11-9.
11. Haller B. Recent developments in dentin bonding. *Am J Dent.* 2000; Feb;13(1):44-50.
12. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res.* 2000; Jun;79(6):1385-91.
13. ten Cate R. *Histologia Bucal – desenvolvimento, estrutura e função* 2001.
14. Gwinnett AJ. Histologic changes in human enamel following treatment with acidic adhesive conditioning agents. *Arch Oral Biol.* 1971; Jul;16(7):731-8.
15. ten Cate TJ. [Small-scale theoretical clinical line education]. *Ned Tijdschr Geneesk.* 1994; Jun 11;138(24):1238-43.
16. Gwinnett AJ, Matsui A. A study of enamel adhesives. The physical relationship between enamel and adhesive. *Arch Oral Biol.* 1967; Dec;12(12):1615-20.
17. Perdigao J, Gomes G, Lopes MM. Influence of conditioning time on enamel adhesion. *Quintessence Int.* 2006; Jan;37(1):35-41.
18. Kanca J, 3rd. Resin bonding to wet substrate. II. Bonding to enamel. *Quintessence Int.* 1992; Sep;23(9):625-7.
19. Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent.* 1997; Sep;25(5):355-72.

20. Marshall GW, Jr., Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997; Nov;25(6):441-58.
21. Kanca J, 3rd. Effect of resin primer solvents and surface wetness on resin composite bond strength to dentin. *Am J Dent.* 1992; Aug;5(4):213-5.
22. Chersoni S, Suppa P, Breschi L, Ferrari M, Tay FR, Pashley DH, et al. Water movement in the hybrid layer after different dentin treatments. *Dent Mater.* 2004; Nov;20(9):796-803.
23. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res.* 2002; Jan;59(1):46-55.
24. Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials. *Dent Mater.* 2005; Sep;21(9):864-81.
25. Sano H. Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. *J Dent Res.* 2006; Jan;85(1):11-4.
26. Reis A, Carrilho M, Breschi L, Loguercio AD. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. *Oper Dent.* 2013; Jul-Aug;38(4):E1-E25.
27. Spencer P, Jonggu Park QY, Misra A, Bohaty BS, Singh V, Parthasarathy R, et al. Durable bonds at the adhesive/dentin interface: an impossible mission or simply a moving target? *Braz Dent Sci.* 2012; Jan;15(1):4-18.
28. Barcellos DC, Batista GR, Silva MA, Pleffken PR, Rangel PM, Fernandes VV, Jr., et al. Two-year clinical performance of self-etching adhesive systems in composite restorations of anterior teeth. *Oper Dent.* 2013; May-Jun;38(3):258-66.
29. Spencer P, Ye Q, Misra A, Goncalves SE, Laurence JS. Proteins, pathogens, and failure at the composite-tooth interface. *J Dent Res.* 2014; Dec;93(12):1243-9.
30. Van Meerbeek B, Perdigao J, Lambrechts P, Vanherle G. The clinical performance of adhesives. *J Dent.* 1998; Jan;26(1):1-20.
31. Eick JD, Gwinnett AJ, Pashley DH, Robinson SJ. Current concepts on adhesion to dentin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(3):306-35.
32. Wang Y, Spencer P. Effect of acid etching time and technique on interfacial characteristics of the adhesive-dentin bond using differential staining. *Eur J Oral Sci.* 2004; Jun;112(3):293-9.
33. Marshall GW, Jr. Dentin: microstructure and characterization. *Quintessence Int.* 1993; Sep;24(9):606-17.
34. Eick JD, Robinson SJ, Chappell RP, Cobb CM, Spencer P. The dentinal surface: its influence on dentinal adhesion. Part III. *Quintessence Int.* 1993; Aug;24(8):571-82.
35. Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int.* 1993; Sep;24(9):618-31.
36. Gwinnett AJ. Quantitative contribution of resin infiltration/hybridization to dentin bonding. *Am J Dent.* 1993; Feb;6(1):7-9.
37. Tam LE, Pilliar RM. Fracture surface characterization of dentin-bonded interfacial fracture toughness specimens. *J Dent Res.* 1994; Mar;73(3):607-19.
38. Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, et al. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res.* 1999; Apr;78(4):906-11.
39. Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Yiu C, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *Am J Dent.* 2005; Dec;18(6):315-9.

40. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*. 2003; Feb;82(2):136-40.
41. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjaderhane L, Mazzoni A, et al. 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. Perdigao J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J Esthet Restor Dent*. 2013; Aug;25(4):219-41.
43. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*. 1998; Aug;77(8):1622-9.
44. Boukpepsi T, Menashi S, Camoin L, Tencate JM, Goldberg M, Chaussain-Miller C. The effect of stromelysin-1 (MMP-3) on non-collagenous extracellular matrix proteins of demineralized dentin and the adhesive properties of restorative resins. *Biomaterials*. 2008; Nov;29(33):4367-73.
45. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res*. 2006; Jan;85(1):22-32.
46. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007; Feb;65(1):1-13.
47. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjaderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater*. 2010; Apr;26(4):320-5.
48. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials*. 2003; Sep;24(21):3795-803.
49. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res*. 2005; Aug;84(8):741-6.
50. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004; Mar;83(3):216-21.
51. De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res*. 2009; Dec;88(12):1101-6.
52. Liu Y, Mai S, Li N, Yiu CK, Mao J, Pashley DH, et al. Differences between top-down and bottom-up approaches in mineralizing thick, partially demineralized collagen scaffolds. *Acta Biomater*. 2011; Apr;7(4):1742-51.
53. Stanislawczuk R, Reis A, Malaquias P, Pereira F, Farago PV, Meier MM, et al. Mechanical properties and modeling of drug release from chlorhexidine-containing etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2014; Apr;30(4):392-9.
54. Malaquias P, Gutierrez MF, Hass V, Stanislawczuk R, Bandeca MC, Arrais C, et al. Two-year Effects of Chlorhexidine-containing Adhesives on the In Vitro Durability of Resin-dentin Interfaces and Modeling of Drug Release. *Oper Dent*. 2018; Mar/Apr;43(2):201-12.
55. Stanislawczuk R, Costa JA, Polli LG, Reis A, Loguercio AD. Effect of tetracycline on the bond performance of etch-and-rinse adhesives to dentin. *Braz Oral Res*. 2011; Sep-Oct;25(5):459-65.
56. Sabatini C, Kim JH, Ortiz Alias P. In vitro evaluation of benzalkonium chloride in the preservation of adhesive interfaces. *Oper Dent*. 2014; May-Jun;39(3):283-90.

57. Gutierrez MF, Malaquias P, Hass V, Matos TP, Lourenco L, Reis A, et al. 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.
58. Gutierrez MF, Malaquias P, Matos TP, Szesz A, Souza S, Bermudez J, et al. 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.
59. Zhang K, Melo MA, Cheng L, Weir MD, Bai Y, Xu HH. 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.
60. Melo MA, Cheng L, Zhang K, Weir MD, Rodrigues LK, Xu HH. Novel dental adhesives containing nanoparticles of silver and amorphous calcium phosphate. *Dent Mater*. 2013; Feb;29(2):199-210.
61. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Roman JS, Toledano M. Zinc-doped dentin adhesive for collagen protection at the hybrid layer. *Eur J Oral Sci*. 2011; Oct;119(5):401-10.
62. Toledano M, Sauro S, Cabello I, Watson T, Osorio R. A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dent Mater*. 2013; Aug;29(8):e142-52.
63. Toledano M, Yamauti M, Ruiz-Requena ME, Osorio R. A ZnO-doped adhesive reduced collagen degradation favouring dentine remineralization. *J Dent*. 2012; Sep;40(9):756-65.
64. Essa AM, Khallaf MK. Antimicrobial potential of consolidation polymers loaded with biological copper nanoparticles. *BMC Microbiol*. 2016; Jul 11;16(1):144.
65. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005; Oct;16(10):2346-53.
66. Ingle AP, Duran N, Rai M. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014; Feb;98(3):1001-9.
67. Schmidt MG, Attaway Iii HH, Fairey SE, Steed LL, Michels HT, Salgado CD. Copper continuously limits the concentration of bacteria resident on bed rails within the intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013; May;34(5):530-3.
68. Usman MS, El Zowalaty ME, Shameli K, Zainuddin N, Salama M, Ibrahim NA. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4467-79.
69. Usman MS, Ibrahim NA, Shameli K, Zainuddin N, Yunus WM. Copper nanoparticles mediated by chitosan: synthesis and characterization via chemical methods. *Molecules*. 2012; Dec 14;17(12):14928-36.
70. Wang Y, Zi XY, Su J, Zhang HX, Zhang XR, Zhu HY, et al. Cuprous oxide nanoparticles selectively induce apoptosis of tumor cells. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2641-52.
71. Marelli B, Le Nihouannen D, Hacking SA, Tran S, Li J, Murshed M, et al. Newly identified interfibrillar collagen crosslinking suppresses cell proliferation and remodelling. *Biomaterials*. 2015; Jun;54:126-35.
72. Rucker RB, Kosonen T, Clegg MS, Mitchell AE, Rucker BR, Uriu-Hare JY, et al. Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am J Clin Nutr*. 1998; May;67(5 Suppl):996S-1002S.

73. Sabatini C, Mennito AS, Wolf BJ, Pashley DH, Renne WG. Incorporation of bactericidal poly-acrylic acid modified copper iodide particles into adhesive resins. *J Dent*. 2015; May;43(5):546-55.
74. de Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater*. 2000; Mar;16(2):103-8.
75. Simeon A, Emonard H, Hornebeck W, Maquart FX. The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci*. 2000; Sep 22;67(18):2257-65.
76. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Tay FR, Pashley DH. The inhibitory effect of polyvinylphosphonic acid on functional matrix metalloproteinase activities in human demineralized dentin. *Acta Biomater*. 2010; Oct;6(10):4136-42.
77. Santos MC, Souza AP, Gerlach RF, Tabchoury CM, Line SR. 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.
78. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley DH, Tay FR, et al. Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants. *J Dent*. 2011; Feb;39(2):148-53.
79. Henn S, de Carvalho RV, Ogliari FA, de Souza AP, Line SR, da Silva AF, et al. Addition of zinc methacrylate in dental polymers: MMP-2 inhibition and ultimate tensile strength evaluation. *Clin Oral Investig*. 2012; Apr;16(2):531-6.
80. Takatsuka T, Tanaka K, Iijima Y. Inhibition of dentine demineralization by zinc oxide: in vitro and in situ studies. *Dent Mater*. 2005; Dec;21(12):1170-7.
81. Lynch RJ, Churchley D, Butler A, Kearns S, Thomas GV, Badrock TC, et al. Effects of zinc and fluoride on the remineralisation of artificial carious lesions under simulated plaque fluid conditions. *Caries Res*. 2011;45(3):313-22.
82. Gutierrez MF, Bermudez J, Davila-Sanchez A, Alegria-Acevedo LF, Mendez-Bauer L, Hernandez M, et al. Zinc oxide and copper nanoparticles addition in universal adhesive systems improve interface stability on caries-affected dentin. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2019; Dec;100:103366.
83. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials*. 2005; Nov;26(33):6449-59.
84. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater*. 2006; Oct;22(10):973-80.
85. Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Influence of water-storage time on the sorption and solubility behavior of current adhesives and primer/adhesive mixtures. *Oper Dent*. 2007; Jan-Feb;32(1):53-9.
86. Jortner JR, C. N. R. Nanostructured advanced materials. Perspectives and directions. *Pure and Applied Chemistry*. 2002; February;74(9):1491-506.
87. Klabunde KJ. *Nanoscale Materials in Chemistry*. 2001.
88. Magonov SN, Whangbo M-H. *Surface Analysis with STM and AFM.*: Wiley-VCH: 1996.
89. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*. 2010; Jan 29;385(1-2):113-42.
90. Cruz H, Gonzalez, C., Juárez A., Herrera, M., Juárez J. . Quantification of the microconstituents formed during solidification by the Newton thermal analysis method. *Journal of Materials Processing Technology*. 2006;178(1-3):128-34.

91. Perdigao J, Lambrechts P, van Meerbeek B, Tome AR, Vanherle G, Lopes AB. Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. *Dent Mater.* 1996; Jul;12(4):262-71.
92. Van Meerbeek B, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, Duke ES, Eick JD, et al. A TEM study of two water-based adhesive systems bonded to dry and wet dentin. *J Dent Res.* 1998; Jan;77(1):50-9.
93. Tay FR, Moulding KM, Pashley DH. Distribution of nanofillers from a simplified-step adhesive in acid-conditioned dentin. *J Adhes Dent.* 1999; Summer;1(2):103-17.
94. Linde A. Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res.* 1995;33(1-3):163-70.
95. Nunes MF, Swift EJ, Perdigao J. Effects of adhesive composition on microtensile bond strength to human dentin. *Am J Dent.* 2001; Dec;14(6):340-3.
96. Garcia IM, Leitune VC, Kist TL, Takimi A, Samuel SM, Collares FM. Quantum Dots as Nonagglomerated Nanofillers for Adhesive Resins. *J Dent Res.* 2016; Nov;95(12):1401-7.
97. Cardoso MV, de Almeida Neves A, Mine A, Coutinho E, Van Landuyt K, De Munck J, et al. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Aust Dent J.* 2011; Jun;56 Suppl 1:31-44.
98. Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Horner JA, Matthews WG, Pashley DH. Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. *Oper Dent.* 1995; Jan-Feb;20(1):18-25.
99. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res.* 2004; Jun;83(6):454-8.
100. Roco MC. Reviews of national research programs in nanoparticle and nanotechnology research in the U.S.A. *Journal of Aerosol Science* 1995;32:749-60.
101. Roco MC, Willians RS, Alivisatos P. Nanotechnology Research Directions: Vision for Nanotechnology Research and Development in the Next Decade.: NSTC/CT/IWGN; 1999 September.
102. Seeman NC. At the crossroads of chemistry, biology, and materials: structural DNA nanotechnology. *Chem Biol.* 2003; Dec;10(12):1151-9.
103. Vauthier C, Cabane B, Labarre D. How to concentrate nanoparticles and avoid aggregation? *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; Jun;69(2):466-75.