

DOUTORAMENTO

CIÊNCIAS MÉDICAS

Propriedades físico-químicas,
mecânicas e citotóxicas de um novo
adesivo dentário contendo um
dendrímero

Joana Vasconcelos e Cruz

D

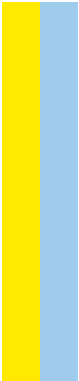
2020



Joana Vasconcelos e Cruz. Propriedades físico-químicas, mecânicas
e citotóxicas de um novo adesivo dentário contendo um dendrímero



Joana Vasconcelos e Cruz



JOANA VASCONCELOS E CRUZ

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, MECÂNICAS E CITOTÓXICAS DE UM
NOVO SISTEMA ADESIVO DENTÁRIO CONTENDO UM DENDRÍMERO

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em
Ciências Médicas
submetida ao Instituto de Ciências
Biomédicas Abel Salazar da Universidade do
Porto

Orientador – Professor Doutor Mário Polido
Afiliação – Instituto Universitário Egas Moniz
Co-orientador – Professor Doutor Artur
Águas
Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas
Abel Salazar
Co-orientador – Professora Doutora Luísa
Gonçalves
Afiliação – Instituto Universitário Egas Moniz

Para os meus queridos filhos...
Fonte de inspiração e alimento do espírito

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Doutor Mário Polido por ser a presença constante que me tem ajudado a crescer tanto neste percurso académico.

Ao meu co-orientador Prof. Doutor Artur Águas, por toda a disponibilidade e simpatia sempre demonstradas.

À minha co-orientadora Prof. Doutora Luísa Gonçalves, pelo seu trabalho, dedicação e apoio incondicional. Sem a sua colaboração esta tese não era possível.

Ao prof. Doutor José Brito pela sua colaboração essencial, cujo rigor e profissionalismo se espelham na análise estatística dos dados apresentados.

À prof. Doutora Madalena Oom, *“um anjo que caiu do Céu”* numa altura crucial para poder concluir esta etapa.

Ao Dr. José Manuel Furtado por me ter ensinado algo que nunca pensei conseguir vir a fazer, com uma qualidade técnica e destreza rara nos dias de hoje.

Ao Prof. Doutor José João Mendes por ter sempre apostado e confiado em mim mesmo quando ainda aluna de Mestrado.

Ao Prof. Doutor José Martins dos Santos, um sincero agradecimento carregado de uma eterna saudade.

A todos os funcionários do Instituto Universitário Egas Moniz, por toda a disponibilidade, ajuda e simpatia.

À Ana Pereira e ao Paulo Alves por todo o apoio logístico e incondicional ao longo destes anos.

À minha família, em especial ao meu querido Bá, aos meus irmãos, sogros e cunhados por toda a rede de suporte incansável que foram ao longo destes anos, criando a estrutura de que necessitei para concluir este sonho.

À minha Mãe, fonte de amor incondicional e energia inesgotável que nunca me deixa desistir e que acredita em mim acima de todas as coisas.

Por último, ao meu Marido, a minha bússola e o meu ponto de equilíbrio. Por toda a força e coragem nos momentos mais difíceis, por toda a calma e ponderação nas etapas mais críticas e por assumir cada conquista como se de um projeto comum se tratasse.

RESUMO

A adesão à dentina ocorre pela aplicação de um sistema adesivo que, após um condicionamento ácido prévio, penetra na dentina ficando retido micromecanicamente pela formação da camada híbrida e de *resin tags*. Contudo, a interface adesiva obtida é instável devido, por um lado, ao substrato dentinário que apresenta um elevado conteúdo de colagénio e água e, por outro, aos próprios sistemas adesivos aplicados.

Os sistemas adesivos Universais, recentemente introduzidos no mercado, embora sejam sistemas bastante versáteis e atraentes, apresentam ainda algumas limitações que contribuem para a degradação da interface entre o dente e a restauração, conduzindo ao aparecimento de cárie secundária. Além disso, tem sido demonstrado que a eficácia *in vitro* dos sistemas adesivos é dependente do tipo de adesivo utilizado, devido à complexidade da sua composição química. Neste sentido, várias estratégias têm sido referidas na literatura para melhorar as propriedades destes materiais e, consequentemente a sua eficácia adesiva, tais como, uma reduzida contração de polimerização, uma elevada taxa de conversão, uma boa penetração dos monómeros de resina e elevada hidrofobicidade. Assim, os dendrímeros, devido às suas características de polimerização, têm demonstrado ser candidatos promissores para serem utilizados em materiais dentários.

Pretendeu-se com este estudo formular um novo sistema adesivo dentário utilizando um dendrímero – o G-IEMA – em alternativa ao usual Bis-GMA que possui uma estrutura química linear. Com esta alteração, pretendeu-se desenvolver um adesivo com melhores propriedades físico-químicas e mecânicas e, simultaneamente, reduzir a sua potencial toxicidade pela remoção do Bis-GMA.

Neste trabalho foram formulados dois adesivos experimentais, os adesivos AE1 (com Bis-GMA) e AE2 (com G-IEMA). Os adesivos AE1, SBU (*Scotchbond Universal*®) e FUT (*Futurabond M+*®), todos com Bis-GMA, foram utilizados como controlo. Assim, na primeira etapa avaliaram-se 1) as propriedades físico-químicas, nomeadamente a taxa de conversão, o pH, a contração de polimerização, a solubilidade e a absorção de água; e 2) as

propriedades mecânicas através dos testes de microtração à dentina (μ TBS) após 24 horas de aplicação do adesivo, segundo os protocolos de aplicação *Etch & Rinse* (ER) e *Self-Etch* (SE), tendo sido a interface adesiva observada ao Microscópio Eletrónico de Varrimento (MEV).

O estudo das propriedades físico-químicas revelou uma taxa de conversão para AE2 significativamente superior à dos adesivos comerciais estudados (SBU, $p < 0,001$ e FUT, $p = 0,004$), não sendo observadas diferenças significativas nas outras propriedades estudadas (contração de polimerização, $p = 0,094$; absorção de água, $p = 0,213$ e solubilidade, $p = 0,175$).

Para a adesão à dentina, a análise estatística mostrou que o adesivo AE2 apresentava uma resistência adesiva equivalente à dos adesivos estudados ($p > 0,05$), enquanto que no adesivo AE1 a resistência adesiva era significativamente superior à do SBU ($p = 0,019$). Aquando da utilização do protocolo ER, as imagens obtidas por MEV revelaram uma interface adesiva equivalente entre os adesivos AE2, AE1 e SBU, com a presença de uma camada híbrida uniforme e vários *resin tags*. No entanto, com o protocolo SE o adesivo AE2 apresentou uma falha adesiva. Estes resultados indicaram a necessidade de otimizar a percentagem relativa dos componentes de AE2, com vista a melhorar o seu pH.

Com o adesivo AE2 re-formulado, doravante designado por EM2, foram novamente avaliadas as taxas de conversão, a adesão à dentina através da resistência à microtração (μ TBS), a morfologia da interface adesiva por MEV. Posteriormente foram realizados ensaios preliminares para avaliar a sua citotoxicidade.

Os resultados indicaram uma taxa de conversão para o adesivo EM2 de 84,1%, sendo significativamente superior à do SBU ($p = 0,008$).

De acordo com os resultados obtidos referentes à resistência adesiva, não se observaram diferenças significativas entre os adesivos ($p = 0,114$). No entanto, a morfologia da interface revelou diferenças na hibridização da dentina, onde o EM2 apresentou uma camada híbrida mais espessa e uniforme com a presença de inúmeros e longos *resin tags*, especialmente quando aplicado com o protocolo ER. Estes resultados permitiram o registo de uma patente nacional.

Os resultados obtidos com este trabalho sugerem o início de um novo

paradigma na área dos materiais restauradores, indicando que as estruturas dendríticas como o G-HEMA podem ser utilizadas com sucesso, constituindo uma boa alternativa aos tradicionais monómeros lineares, como o Bis-GMA.

ABSTRACT

Bonding to dentin occurs by applying an adhesive system, after an etching step, that penetrates the dentin and is retained micromechanically by the formation of the hybrid layer and resin tags. However, the bonding interface is instable, due to the high collagen and water content of the complex dentin substrate, and due to the adhesive systems applied.

Universal dental adhesives are a new versatile and very attractive adhesive family recently introduced in the market. However, they still present some limitations that lead to the degradation of the interface between the tooth and the restoration, causing a secondary caries. Moreover, the in vitro performance of these adhesive systems has been reported as material-dependent due to the complexity of their chemical composition. Many strategies have been reported in the literature to improve the properties of these materials and consequently the efficacy of dentin bonding, such as, low polymerization shrinkage, high double bond conversion, high resin monomers penetration and high hydrophobicity. Due to their polymerization characteristics, hyper-branched macromers are promising candidates to be used in dental materials.

The aim of this study was to formulate a new dental adhesive using a synthesized dendritic macromer - G-IEMA – instead of the usual linear Bis-GMA that contains a linear chemical structure. This innovation aims to create an adhesive with improved physical-chemical and mechanical properties and, simultaneously, to reduce its toxicity by removing Bis-GMA.

For the study, two experimental adhesives were formulated, AE1 (with Bis-GMA) and AE2 (with G-IEMA). AE1, SBU (Scotchbond Universal®) and FUT (Futurabond M + ®) adhesives were used as controls. Thus, in the first stage it were evaluated, 1) the physical-chemical properties, namely the conversion degree, polymerization shrinkage, solubility, water absorption and pH; 2) the mechanical properties through dentin microtensile bond strength tests (μ TBS) after 24 hours of application of the adhesive under the two application protocols: Etch & Rinse (ER) and Self-Etch (SE). The bonding interface was observed by Scanning Electron Microscopy (SEM).

The study of physical-chemical properties revealed that AE2 showed a

significantly higher conversion degree compared to the commercial adhesives studied (SBU, $p < 0.001$ and FUT, $p = 0.004$). No significant differences in other properties studied were observed (polymerization shrinkage, $p = 0.094$; water sorption, $p = 0.213$ and solubility, $p = 0.175$).

In the study of dentin bonding, the statistical analysis revealed that the adhesive AE2 showed a bond strength equivalent to the commercial adhesives, while AE1 showed a significantly higher μ TBS when compared to SBU ($p = 0.019$). When using the ER protocol, the SEM images showed a similar bonding interface between the AE2, AE1 and SBU adhesives, presenting a uniform hybrid layer and several resin tags. However, with SE protocol, the AE2 showed an adhesive failure. These results indicated the need to optimize the relative percentage of the AE2 components, in order to improve its pH.

With re-formulated AE2 adhesive, hereinafter referred to as EM2, the conversion degree, the dentin μ TBS and the morphology of the adhesive interface by SEM were again evaluated. Preliminary tests were also carried out to evaluate its cytotoxicity.

The results indicated a conversion degree of 84.1% for EM2, being significantly higher than that of SBU ($p = 0.008$).

Concerning dentin bond strength results, there is no significant differences observed among adhesives ($p = 0.114$). However, the bonding interface morphology revealed differences in dentin hybridization, where EM2 showed a thicker and more uniform hybrid layer and the presence of many and long resin tags, especially when ER protocol was applied. These results allowed the registration of a national patent.

The results obtained so far suggest the beginning of a new paradigm in the restorative materials field, indicating that dendrimers such as G-IEMA can be used successfully as an alternative to traditional linear monomers, like Bis-GMA.

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO	24
1. ADESÃO AO ESMALTE E À DENTINA	27
2. SISTEMAS ADESIVOS	28
2.1. Mecanismo de ação dos sistemas adesivos.....	28
2.2. Sistemas adesivos <i>Etch & Rinse</i>	30
2.3. Sistemas adesivos <i>Self-Etch</i>	34
3. SISTEMAS ADESIVOS UNIVERSAIS.....	38
3.1. Composição química dos sistemas adesivos Universais.....	40
3.2. Propriedades físico-químicas dos sistemas adesivos Universais .	48
3.3. Propriedades mecânicas dos sistemas adesivos Universais.....	54
3.4. Biocompatibilidade dos sistemas adesivos dentários	61
4. ESTABILIDADE DA INTERFACE ADESIVA	70
4.1. Degradação da camada híbrida.....	71
4.2. Estratégias utilizadas para estabilizar a camada híbrida	76
5. DENDRÍMEROS.....	82
OBJETIVOS	85
ARTIGO I - A NEW EXPERIMENTAL ADHESIVE SYSTEM CONTAINING G- IEMA – PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES	87
ARTIGO II -DENTIN BONDING AND SEM ANALYSIS OF A NEW EXPERIMENTAL UNIVERSAL ADHESIVE SYSTEM CONTAINING A DENDRIMER	110
PARTE III -OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO ADESIVO EXPERIMENTAL	134
6. NOTA INTRODUTÓRIA	135
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	137
7.1. Formulação dos novos adesivos experimentais	137
7.2. Taxa de conversão	138
7.3. Estudo da resistência adesiva à dentina por microtração (μ TBS) 139	
7.4. Avaliação da interface adesiva por MEV	140
7.5. Ensaio de citotoxicidade	141
7.5.1 Linhas celulares primárias estabelecidas a partir da polpa dentária e da gengiva	141

7.5.2. Ensaio preliminar de citotoxicidade	143
7.6. Análise estatística.....	146
8. RESULTADOS	147
8.1. Taxa de conversão (TC)	147
8.2. Resistência adesiva à dentina por microtracção (µTBS)	148
8.3. Análise de dados das fraturas	152
8.4. Análise da interface adesiva por MEV	153
8.5. Análise da viabilidade celular – resultados preliminares.....	157
9. DISCUSSÃO	159
PATENTE Nº 115064 - “FORMULAÇÃO PARA UM SISTEMA ADESIVO DENTÁRIO UNIVERSAL CONTENDO UM MONÓMERO DE RETICULAÇÃO DENDRÍTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO”	160
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL	160
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	160
TRABALHOS CIENTÍFICOS	160
ANEXOS	160

ÍNDICE FIGURAS E GRÁFICOS

Figuras 1: Representação esquemática da micro- e da nanoinfiltração. MI – microinfiltração; NI – nanoinfiltração; RC – resina composta; CH – camada híbrida; RT – <i>resin tags</i>	Página 26
Figura 2: Representação esquemática dos diferentes tipos de sistemas adesivos <i>Etch & Rinse</i> e <i>Self-Etch</i> disponíveis.	Página 37
Figura 3: Representação esquemática dos principais constituintes dos sistemas adesivos Universais (Imagem retirada e adaptada de Bedran-Russo et al., 2017).	Página 48
Figura 4: Representação esquemática do tipo de fraturas obtidas após os ensaios de microtracção (μ TBS) na Máquina de Teste Universal.	Página 56
Figura 5: Imagens de MEV da interface adesiva de dois sistemas adesivos Universais quando aplicados com os protocolos ER e SE, às 24h e após 6 meses de envelhecimento. AU – <i>All-bond Universal</i> ® (Bisco Inc.) SU – <i>Scotchbond Universal</i> ® (3M ESPE) (Imagem retirada e adaptada de Pashaev et al., 2017).	Página 60
Figura 6: Representação esquemática dos métodos de exposição das células com os adesivos dentários. A- Método de barreira dentinária, onde o material é colocado em discos de dentina e as substâncias tóxicas que são libertadas difundem através dos túbulos dentinários através da pressão pulpar simulada. B- Método de exposição indireta onde o material a testar é imerso no meio de cultura e incubado a 37°C por tempos definidos. As células são posteriormente expostas aos meios condicionados (Imagem retirada e adaptada de Caldas et al., 2019).	Página 67
Figura 7: Estrutura química do G-IEMA.	Página 84
Figura 8: A – Linha celular primária estabelecida a partir da polpa dentária. B – Linha celular primária estabelecida a partir de biópsia gengival. Ampliações de 100x em microscópio de contraste de fase.	Página 143
Figura 9: Esquema da placa de 96 poços no ensaio de viabilidade. Fotografia tirada após 24 horas de contato com os meios condicionados pelos adesivos.	Página 145

Figura 10: Imagens ao MEV da interface adesiva dos adesivos comerciais (SBU e FUT) quando aplicado o protocolo ER. Foram utilizadas ampliações de 500x (A, B) e 1000x (C, D). A e C - SBU com uma camada híbrida (CH) de 11,3 µm de espessura; B e D -FUT com uma camada híbrida (CH) de 7,6 µm de espessura, não sendo possível identificar a presença de *resin tags* (RT). RC - resina composta; D - dentina; CH - camada híbrida; RT – *resin tags*.

.....Página 154

Figura 11: Imagens ao MEV da interface adesiva dos adesivos experimentais (EM1 e EM2) quando aplicado o protocolo ER. Foram utilizadas ampliações de 500x (E, F) e 1000x (G, H). E e G - EM1 com uma camada híbrida (CH) de 8,9 µm de espesura; F e H - EM2 com uma camada híbrida (CH) de 9,6 µm de espessura, presença de *resin tags* (RT) com 154 µm de comprimento e inúmeros *resin tags* laterais (LRT). RC - resina composta; D - dentina; CH - camada híbrida; RT - *resin tags*; LRT - *resin tags* laterais. Página 155

Figura 12: Imagens ao MEV da interface adesiva dos adesivos comerciais (SBU and FUT) quando aplicado o protocolo SE. Foram utilizadas ampliações de 500x (A, B) e 1000x (C, D). A e C - SBU com uma camada híbrida (CH) de 2 µm de espessura e poucos *resin tags* (RT) estão presentes; B e D - FUT com uma camada híbrida (CH) pouco definida e muito poucos *resin tags* (RT). RC - resina composta; D - dentina; CH - camada híbrida; RT - *resin tags*. Página 156

Figura 13: Imagens ao MEV da interface adesiva dos adesivos experimentais (EM1 e EM2) quando aplicado o protocolo SE. Foram utilizadas ampliações de 500x (E, F) e 1000x (G, H). E e G - EM1 com uma camada híbrida (CH) de 3 µm de espessura e alguns *resin tags* (RT) presentes; F e H - AE2 com uma camada híbrida (CH) de 5,4 µm de espessura e vários *resin tags* (RT) presentes. RC - resina composta; D - dentina; CH - camada híbrida; RT - *resin tags*.

.....Página 157

Gráfico 1: Taxas de conversão por adesivo. Página 147

Gráfico 2: Dispersão dos valores de resistência adesiva em palitos de dentina.

.....Página 149

Gráfico 3: Adesão de diferentes adesivos sob protocolos ER e SE.

.....Página 152

ARTIGO I

Figure 1: Chemical structures of Bis-GMA (A) and G-IEMA (B).	Página 93
Figure 2: FTIR spectrum of G-IEMA.	Página 95
Figure 3: ¹ H-NMR Spectrum of G-IEMA.	Página 95
Figure 4: Schematic representation of the baseline method used for DBC's determinations and corresponding mathematical equation. Calculations for AE2 are given as an example.	Página 98
Figure 5: Double bond conversion of each adhesive after 60 sec of light-curing. The groups with different letters (a, b) present significant differences at the level of $p < 0.001$	Página 101

ARTIGO II

Figure 1: SEM micrographs of bonding interface of the commercial adhesives when ER was applied. Magnifications of 500× (A and B) and 2000× (C and D) were used. A and C —SBU with 11.3 µm of hybrid layer (HL) thickness; B and D - FUT with 7.6 µm of hybrid layer (HL) thickness. Any resin tags (RT) and lateral resin tags (LRT) were identified. RC - resin composite; D - dentin; HL - hybrid layer; RT - resin tags; LRT - lateral resin tags.	Página 125
Figure 2: SEM micrographs of the bonding interface of the experimental adhesives when ER was applied. Magnifications of 500× (E and F) and 2000× (G and H) were used. E and G - AE1 with 12.3 µm of HL thickness; F and H - AE2 with 11.2 µm of HL thickness and resin tags (RT) with 18.2 µm in length. RC - resin composite; D - dentin; HL - hybrid layer; RT - resin tags; LRT - lateral resin tags.	Página 125
Figure 3: SEM micrographs of the bonding interface of the commercial adhesives when SE was applied. Magnifications of 500× (A and B) and 2000× (C and D) were used. A and C - SBU; B and D - FUT. RC - resin composite; D - dentin; HL - hybrid layer; RT - resin tags.	Página 126
Figure 4: SEM micrographs of bonding interface of the experimental adhesives when SE was applied. Magnification of 500× (E and G) and 2000× (F) were used. E and F - AE1 with 10.4 µm of HL thickness; G - AE2. RC - resin composite; D - dentin; HL - hybrid layer; RT - resin tags; AF - adhesive failure.	Página 126

PATENTE

Figura 1: Representação das estruturas químicas do Bis-GMA (A) e do G-IEMA (B), sendo visível a estrutura linear e a estrutura dendrítica de cada composto, respectivamente.	Página 194
Figura 2: Representa as principais etapas da síntese do G-IEMA (a síntese foi efectuada a partir dos procedimentos já descritos na literatura por Yu B., et al, 2014).	Página 195
Figura 3: Representa o espectro FTIR (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier) do G-IEMA.	Página 196
Figura 4: Representa o espectro de ¹ H-RMN (Ressonância magnética nuclear de protão) do G-IEMA.	Página 196
Figura 5: representa a taxa de polimerização ou conversão (DBC) de cada adesivo após incidência de 60 seg. de luz. Sendo SBU e FUT adesivos disponíveis comercialmente e com a presença de Bis-GMA e AE1 e AE2 são os adesivos da presente invenção, sendo o AE1 o adesivo de controlo.	Página 197
Figura 5a e 5b: Representam as imagens obtidas por microscopia SEM da interface de ligação dos adesivos testados quando o ER foi aplicado. Foram utilizadas ampliações de 500X (A, C, E, G, I) e 2000x (B, D, F, H, J). A, B - SBU com 11,3µm de espessura de camada híbrida (HL); C, D - FUT; E, F - AE1 com 12,3 µm de espessura HL; G-J - AE2 com 11,2µm de espessura HL e <i>tags</i> de resina (RT) com 18,2µm de comprimento. RC - resina composta; D - dentina; HL - camada híbrida; RT - <i>tags</i> de resina; LRT - <i>tags</i> de resina lateral.	Página 198
Figura 6: Microscopias SEM da interface de ligação dos adesivos testados quando SE foi aplicado. Ampliação de 500X (A, C, E, G) e 2000x (B, D, F) foram utilizados. A, B - SBU; C, D - FUT; E, F - AE1; G - AE2. RC - resina composta; D - dentina; HL - camada híbrida; RT - <i>tags</i> de resina; LRT - <i>tags</i> de resina lateral.	Página 200

ÍNDICE TABELAS

Tabela 1: Composição e pH dos principais sistemas adesivos Universais disponíveis no mercado.	Página 41
Tabela 2: Resumo dos principais mecanismos envolvidos na degradação da camada híbrida e principais estratégias propostas para aumentar a estabilidade da interface adesiva.	Página 75
Tabela 3: Principais estratégias propostas para aumentar a estabilidade da interface adesiva.	Página 81
Tabela 4: pH dos adesivos comerciais e dos adesivos experimentais.	Página 138
Tabela 5: Protocolo de aplicação dos adesivos experimentais segundo a técnica ER e SE.	Página 140
Tabela 6: pH dos meios condicionados após 24h de incubação a 37°C.	Página 145
Tabela 7: Estatística descritiva dos dados referentes à resistência adesiva à dentina por microtracção (μ TBS) dos adesivos estudados, em função do protocolo ER e SE.	Página 150
Tabela 8: Informação sobre diversas estruturas de covariâncias.	Página 151
Tabela 9: Testes aos efeitos fixos de tipo III.	Página 152
Tabela 10: Total de fraturas A e C por adesivo.	Página 153
Tabela 11: –Viabilidade celular determinada pelo ensaio de MTT. Os valores representam a média e desvio padrão (n=5).	Página 158

ARTIGO I

Table 1: Concentration ranges for each component in commercial and experimental adhesives mixtures. Página 96

Table 2: Data obtained for the studied physicochemical parameters (Mean values $\pm$ Standard Deviation). Página 102

ARTIGO II

Table 1: Experimental groups and their respective main components. Página 117

Table 2: Mean values and standard deviations (S.D.) of the dentin micro-tensile bond strength (μ TBS, in MPa) for the tested groups. Página 122

Table 3: Information criteria for different covariance structures. Página 123

PATENTE

Tabela 1: Propriedades físico-químicas. Página 188

Tabela 2: Forças de adesão à dentina. Página 189

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Percentagem

µg/mL – micrograma por mililitro

µL – microlitros

µm – micrómetro

µTBS – Resistência adesiva à microtração

10-MDP – Dihidrogenofosfato de metacriloiloxidecilo

¹H-RMN- Ressonância Magnética Nuclear de próton

4-MET – Ácido 4-metacriloxietil-trimetílico

A – Adesiva

Abs – Absorvância

ADA – *American Dental Association*

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AE1 – Adesivo experimental com Bis-GMA

AE2 – Adesivo experimental com G-IEMA

AIC – *Akaike*

AICC – *Hurvich e Tsai*

AR1 – Regressiva de 1ª ordem

ARMA11 – Auto-regressiva com média móvel

AU – *All-bond Universal® Bisco Inc.*

Au/ Pd – Ouro-Paládio

BAPO- Óxido de fenilbis (2,4,6-trimetilbenzoil) -fosfina

BIC – *Bayes e Schwarz*

Bis-GMA – Glicidildimetacrilato de bisfenol A

BPA – Bisfenol A

C – Coesiva

CAIC – *Bozdogan*

CD – Coesiva dentina

CH – Camada híbrida

CHX – Clorexidina

cm⁻¹- Por centímetro

cm² – Centímetro quadrado

cm²/mL – Centímetro quadrado por mililitro
CO₂ – Dióxido de carbono
CQ – Canforoquinona
CR – Coesiva resina
D – Dentina
D.P. – Desvio padrão
DMEM - meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO – Dimetilsulfóxido
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática
EM1 – Adesivo experimental com Bis-GMA
EM2 – Adesivo experimental com G-IEMA
ER – *Etch & Rinse*
ETMA – Metacrilato de 2,3-epitiopropilo
Fenil-P - Hidrogenofosfato de 2-metacriloxietilo
Fig. – Figura
FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
FUT – *Futurabond® (VOCO, GmbH, Germany)*
G-IEMA – G(2)-Metacrilato de 2-isocianoetilo
GL – Graus de liberdade
GLM – Modelos lineares gerais
h – horas
HCl – Ácido clorídrico
HEMA – Metacrilato de 2-hidroxietilo
HI-FBS - soro fetal bovino inativado pelo calor
HL – Camada híbrida
HMDS - hexametildisilazano
HMTAF – Fluoreto de 2-hidroxi-3-metacrilamido-N,N,N-trimetilpropano-1-amina
ID - Identidade
IEMA – Metacrilato de 2-isocianoetilo
IGEPAL – octilfenoxipoliethoxietanol
kN – Kilonewton
LED - Diodo emissor de luz

LRT – *resin tags* laterais
 M - Mista
 m – Multipleteo (^1H -RMN)
 m/V – Massa/volume
 MEV – Microscopia eletrônica de varrimento
 MEV-EDS - Microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia de energia dispersiva
 MF8P – 6-metacriloxi-2,2,3,3,4,4,5,5-octafluorohexilo
 mg – Miligramas
 mg/mL – Miligramas por mililitro
 MI -Microinfiltração
 mL – Mililitros
 mm – Milímetros
 mM - Milimolar
 MM – Modelos mistos
 mm/min – Milímetro por minuto
 mm²- Milímetro quadrado
 MMPs – Metaloproteínas
 MPa – Megapascal
 MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
 mW/cm²- *Miliwatts* por centímetro quadrado
 n – Replicados
 ng/mL– Nanograma por mililitro
 NH - azoto-hidrogênio
 NI -Nanoinfiltração
 NIH/3T3 - Linha celular de fibroblastos
 nm – Nanômetros
 °C – Grau centígrado
 OMS – Organização Mundial de Saúde
 PAMAM – Dendrímero de poliamidoamina
 PBS - solução salina tamponada como fosfato
 Pen-Strep – Penicilina – estreptomicina
 PPD - Pirazolil-ftalazinadiona

RC – Resina composta
RT – *Resin tags*
s – Singuleto ($^1\text{H-RMN}$)
SBU – *Scotchbond Universal*[®] (3M ESPE, USA)
SC – Simetria composta
SCCORREL – Simetria composta de correlação
SE – *Self-Etch*
Seg. – segundos
SiC – Carboneto de sílcio
Sig. – Significância
SU - *Scotchbond Universal*[®] (3M ESPE, USA)
t -Tripleto ($^1\text{H-RMN}$)
TC – Taxa de conversão
TEGDMA – Dimetacrilato de trietilenoglicol
TMPEDMA – Dimetacrilato de 2-(aliloximetil)-2-etil-1,3-propanodiol
U/mL – Unidades por mililitro
UDMA – Dimetacrilato de uretano
UN – Matriz de covariância não estruturada
 γ – Modo de vibração de deformação (FTIR)
 δ – Modo de vibração de deformação (FTIR)
 ν - Modo de vibração de estiramento (FTIR)

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

% - Percentage

μg – Microgram

μL – Microliter

μm – Micrometer

μTBS – Micro-tensile bond strength

10-MDP –10-Methacryloyloxydecyl-dihydrogen phosphate

¹H-NMR – Proton nuclear magnetic resonance

AE1 – Experimental adhesive with Bis-GMA

AE2 – Experimental adhesive with G-IEMA

AF – Adhesive failure

AIC – Akaike

AICC – Hurvich and Tsai

AR (1) – First-order autoregressive (Heterogeneous)

ARMA (1) – First-order autoregressive moving average

ATR – Attenuated Total Reflectance

Au/ Pd –Gold-Palladium

BDA – Ethyl4-dimethylaminebenzoate

BIC – Bayes and Schwarz

Bis-GMA –Bisphenol-A-diglycidyl-dimethacrylate

BPA –Bisphenol A

CAIC – Bozdogan

CDCl₃- Deuterated Chloroform

CH₂Cl₂ - Dichloromethane

cm⁻¹- Per centimeter

CQ – Canphorquinone

CS – Compound Symmetry

d – Duplet (¹H-NMR)

D –Dentin

DBC – Double bond conversion

DEA – Diethanolamine

EM1 – New experimental adhesive with Bis-GMA

EM2 – New experimental adhesive with G-IEMA

ER – Etch & Rinse

Fig. –Figure

FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy

FUT – Futurabond® (VOCO, GmbH, Germany)

g – Gram

g.cm⁻³- Density

G-IEMA –G(2)- 2-isocyanatoethyl methacrylate

GLM – General linear models

g.mol⁻¹- Molar mass

h – hours

H₃PO₄- Orthophosphoric acid

HEMA – Hydroxyethyl-methacrylate

HL – Hybrid layer

HMDS - Hexamethyldisilazane

HPDPI – Diphenyliodoniumhexafluorophosphate

IEMA – 2-isocyanatoethyl methacrylate

kN – Kilonewton

LED - Light-emitting diode

LMM – Linear mixed models

LRT – Lateral resin tags

LT – Lateral tags

m – Multiplet (¹H-NMR)

mg – Miligram

min. – Minutes

mL – Mililiter

mm –Milimeters

mm/min –Milimeter/minute

mm²- Square millimeter

mm³- Cubic milimeter

mmol - Milimol

MPa – Megapascal

mW/cm²- Millwatt/square centimeter

N - Replicants
 nm - Nanometer
 NMR – Nuclear magnetic resonance
 °C – Centigrade degree
 PETA – Pentaerythritol tetraacrylate
 ppm – parts per million
 PS – Polymerization shrinkage
 RC – Resin composite
 RT – Resin tags
 s – seconds
 s – Singlet (^1H -NMR)
 S.D. – Standard deviation
 SBU – Scotchbond Universal[®] (3M ESPE, USA)
 SE – Self-Etch
 sec. -seconds
 SEM – Scanning electron microscopy
 SI – Scaled identity
 SL - Solubility
 t – Triplet (^1H -NMR)
 TEGDMA –Triethylene-glycol-dimethacrylate
 TMS – Teramethylsilane
 UA – Universal adhesive
 UAs – Universal adhesives
 UDMA – Urethane-dimethacrylate
 UN – Unstructured covariance
 V - Volume
 V/V – Volume/volume
 w/w – Weigth / weigth
 WHO – World health organization
 WS – Water sorption
 γ – Bending vibration mode (FTIR)
 δ – Bending vibration mode (FTIR)
 ν - Stretching vibration mode (FTIR)

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cárie dentária é um problema grave de saúde pública e apesar dos esforços desenvolvidos na promoção da saúde e na prevenção da doença, as restaurações dentárias ainda são necessárias (WHO, 2011).

Uma lesão de cárie não tratada provoca a destruição dos tecidos duros do dente (esmalte, dentina e cemento) sendo a principal razão para a perda de dentes (Fontana et al., 2009; Cramer et al., 2011). No tratamento, o tecido dentário cariado é removido e substituído por uma resina composta que é aderida ao esmalte e à dentina através da utilização de um sistema adesivo (Jandt & Sigusch, 2009).

Os primeiros sistemas adesivos dentários surgiram em meados da década de 50 do século vinte e consistiam em materiais à base de cianoacrilatos que se ligavam ao dente através da quelação com o cálcio (Buonocore, 1955). Desde o seu aparecimento, tanto a técnica adesiva como os diferentes sistemas adesivos têm sofrido diversas alterações com o objetivo de procurar encontrar a técnica mais rápida, aliada a uma adesão mais eficaz, tanto ao esmalte como à dentina (Elkaffas et al., 2018; Nagarkar et al., 2019).

No entanto, existem ainda algumas limitações nestes materiais cujas principais consequências são a microinfiltração e a nanoinfiltração.

A microinfiltração acontece do exterior para o interior do dente quando existe uma falha na interface entre o dente e a restauração, pela falta de selamento marginal. Nesta situação, a presença de bactérias e fluidos provenientes da cavidade oral vão destruindo e degradando a camada adesiva por processos de desmineralização da estrutura dentária e hidrólise dos componentes do adesivo (Fig. 1) (Marshall et al., 2010; Zhou et al., 2019).

A nanoinfiltração foi primeiramente descrita por Sano et al. (1994b) e é considerada por muitos autores o principal motivo de falha adesiva, gerada por um processo silencioso e contínuo de degradação da interface adesivo. Este fenómeno ocorre pela existência de pequenas zonas porosas na camada adesiva, mais ricas em água e pobres em resina que tornam a interface mais suscetível à hidrólise, refletindo-se mais tarde numa diminuição da resistência

adesiva às forças de tração (Fig. 1) (Sano et al., 1994b; Ding et al., 2009).

Ambos os fenômenos comprometem a duração dos tratamentos restauradores conduzindo ao aparecimento de cárie secundária, desinserção da restauração e/ou fratura. Estas consequências constituem atualmente o principal motivo de substituição das restaurações, pelo que, a procura de novas abordagens na adesão tem sido uma temática de grande interesse para a comunidade científica (Jandt & Sigusch 2009; Melo et al. 2013; Cuevas-Suárez et al., 2019), e o principal foco de estudo desta tese.

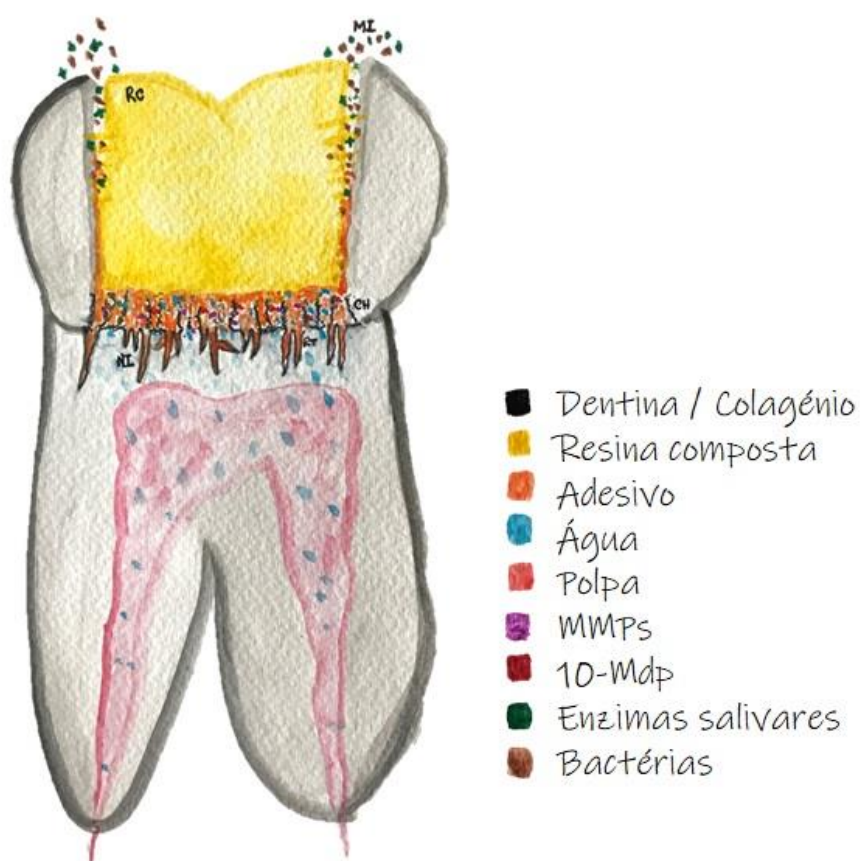


Fig. 1: Representação esquemática da micro- e da nanoinfiltração. MI – microinfiltração; NI – nanoinfiltração; RC – resina composta; CH – camada híbrida; RT – resin tags

1. ADESÃO AO ESMALTE E À DENTINA

De uma forma geral, o princípio fundamental da adesão à estrutura dentária tem por base um fenómeno de microretenção mecânica de monómeros de resina, que penetram no esmalte e na dentina, utilizando para isso diferentes mecanismos de ação consoante o tecido dentário em questão (Van Meerbeek et al., 2003).

Assim, para entender os sistemas adesivos e o mecanismo de adesão ao esmalte e à dentina, torna-se fundamental conhecer a morfologia e a composição destes tecidos dentários, especialmente da dentina onde a adesão é muito mais difícil e imprevisível (De Munck et al., 2005).

O esmalte dentário é a estrutura mais mineralizada do corpo humano. É constituído por 96% de matéria inorgânica, 1% de matéria orgânica e 3% de água. A matéria inorgânica é composta por uma estrutura cristalina ordenada de hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), disposta num padrão altamente organizado (Gwinnett, 1992; Miyazaki et al., 2014).

A dentina, por sua vez, é constituída por 47% do seu volume em matéria inorgânica, 33% de matéria orgânica e 20% de água. A matéria orgânica é formada essencialmente por fibras de colagénio tipo I envoltas por uma substância amorfa, lípidos e várias proteínas (fosfoproteínas, proteoglicanos, proteínas *Gla* e outras proteínas ácidas) (Berkovitz et al., 2009). Além disso, a sua estrutura heterogénea possui inúmeros túbulos, com diferentes orientações que vão desde a polpa até à dentina superficial, na junção amelodentinária e que contêm no seu interior prolongamentos dos odontoblastos e uma considerável quantidade de fluídos. Os fluídos presentes na dentina são semelhantes aos do plasma, sendo que 95% do seu conteúdo é água (Marshall et al., 1997; Perdigão, 2010).

Além disso, existe ainda uma grande variação na estrutura e composição físico-química entre a dentina superficial, média e a mais profunda (Van Meerbeek et al., 1992). Desta forma, como substrato vivo, dinâmico e em permanente mudança, a adesão à dentina é bastante mais difícil de obter do que em relação ao esmalte (De Munck et al., 2005; Bedran-Russo et al., 2017).

Um outro aspeto que importa referir, uma vez que constitui também um

desafio na adesão ao substrato dentário, é a existência de uma camada de detritos, o *smear layer*, que se forma tanto à superfície do esmalte como da dentina e que resulta de quando estes tecidos são tratados com instrumentos de corte manuais ou rotativos (Pashley et al., 1988; Spencer et al., 2010). Em função do tipo de instrumentos e refrigeração utilizados, bem como da proximidade com a polpa dentária, a espessura e morfologia do *smear layer* pode ser diferente (Tani & Finger, 2002; Miyazaki et al., 2014).

O *smear layer* é composto por uma mistura de fragmentos de hidroxiapatite e colagénio desnaturado, podendo ainda, em condições clínicas, apresentar uma contaminação de saliva e bactérias (Pashley, 1984; Marshall et al. 1997; Perdigão, 2010).

Desta forma, o *smear layer* constitui uma barreira para a adesão na medida em que os detritos se depositam sobre a superfície do esmalte e da dentina criando uma camada, que pode variar entre 0,5 a 5µm de espessura, dificultando a difusão dos sistemas adesivos. Além disso, as partículas do *smear layer* de menores dimensões conseguem penetrar nos orifícios dos túbulos dentinários, obstruindo-os. A esta obstrução que se traduz na diminuição da permeabilidade da dentina dá-se o nome de *smear plugs* (Pashley et al., 1988; Marshall et al., 1997; Perdigão, 2010).

2. SISTEMAS ADESIVOS

2.1. Mecanismo de ação dos sistemas adesivos

Para que exista uma adesão eficaz ao tecido dentário é necessário que a parte inorgânica do dente seja substituída por uma resina sintética. Este processo é estabelecido de forma distinta, consoante o substrato seja o esmalte ou a dentina (Van Meerbeek et al., 2003).

No esmalte, a primeira etapa consiste na remoção do fosfato de cálcio, criando microporosidades por onde o adesivo irá penetrar por capilaridade. Os monómeros do adesivo ficam retidos mecanicamente nas porosidades após polimerização formando assim os *resin tags* (Van Meerbeek et al., 2003; Lopes et al., 2007).

Na dentina, após o processo de desmineralização, o colagénio é exposto e os túbulos dentinários são desobstruídos. O adesivo ao ser aplicado vai penetrar entre as fibras de colagénio e nos túbulos dentinários, ficando retido após polimerização e dando origem à formação da camada híbrida e dos *resin tags*, respetivamente (Nakabayashi et al., 1982; Van Meerbeek et al., 2003; Breschi et al., 2008; De Munck et al., 2012).

Esta microretenção mecânica do adesivo no dente é fundamental para que exista uma boa adesão. No entanto, os sistemas adesivos mais recentes promovem ainda uma adesão química entre os monómeros funcionais do adesivo e o substrato dentário, reforçando este mecanismo e contribuindo para uma maior estabilidade das interfaces adesivas. Desta forma, o potencial da ligação mecânica aliada à ligação química tem sido um tema bastante abordado na literatura (Nunes et al., 2007; Yoshihara et al., 2014; Carrilho et al., 2019).

Os sistemas adesivos são compostos por três componentes fundamentais - o ácido, o *primer* e a resina adesiva, que se utilizam e combinam de maneira diferente consoante o tipo de adesivo e o substrato onde é aplicado (o esmalte ou a dentina). Desta forma, os sistemas adesivos podem apresentar duas classificações diferentes propostas por Van Meerbeek et al. (2003): - sistemas adesivos *Etch & Rinse* (ER) e sistemas adesivos *Self-Etch* (SE). Esta classificação tem por base a estratégia que cada sistema utiliza na interação com o *smear layer* e na forma como o ácido, o *primer* e a resina adesiva se aplicam (Van Meerbeek et al., 2003).

O que caracteriza os sistemas ER é a aplicação de ácido isoladamente num primeiro passo. Assim, estes sistemas podem ser formulados em 2 ou 3 passos, dependendo se o *primer* e a resina adesiva estão juntos no mesmo frasco ou em frascos diferentes (Pashley et al., 2011).

Nos sistemas SE, o ácido é sempre incorporado no *primer*, sendo que poderão apresentar-se em sistemas de 2 passos ou de 1 passo único, dependendo se a resina adesiva é disponibilizada num frasco separado ou combinada juntamente com os outros componentes num sistema chamado *all-in-one* ou *single-step* (Fig. 2) (Van Meerbeek et al., 2003; Miyazaki et al., 2014; Sofan et al., 2017).

Muito embora estes dois sistemas tenham vindo a revelar um bom

desempenho clínico e laboratorial, a sua eficácia continua a depender bastante da marca do produto utilizado e da técnica aplicada. Assim, para formular um adesivo dentário e otimizar os seus resultados, é fundamental conhecer o mecanismo de ação bem como os aspetos positivos e as limitações de cada um destes sistemas (Chee et al., 2012; Miyazaki et al., 2014).

2.2. Sistemas adesivos *Etch & Rinse*

Os sistemas adesivos *Etch & Rinse* (ER) constituem a geração mais antiga tendo sido introduzidos no início dos anos 90. Este tipo de adesivos caracteriza-se pela aplicação inicial de ácido isoladamente e pela remoção total do *smear layer* e dos *smear plugs* (Pashley et al., 2011).

A aplicação de ácido no esmalte foi introduzida em 1955 por Buonocore e é, ainda hoje, considerada uma das técnicas mais fiáveis na dentisteria restauradora (Buonocore, 1955; Erickson et al., 2009).

No esmalte, o ácido é aplicado de forma a remover o *smear layer* e dissolver seletivamente os cristais de hidroxiapatite, criando microporosidades e transformando a sua superfície lisa numa superfície muito irregular e com maior energia de superfície (Grégoire & Ahmed, 2007). O protocolo mais utilizado e eficaz consiste na aplicação de ácido ortofosfórico a 37% durante 15 segundos seguido de lavagem com água. Após a lavagem, o excesso de água é removido utilizando um *spray* de ar (Erickson et al., 2009; Pashley et al., 2011), permitindo que os monómeros da resina adesiva quando aplicados sejam atraídos e penetrem por capilaridade (Sofan et al., 2017). Os monómeros ficam retidos na superfície do esmalte condicionado através da polimerização e da formação dos *resin tags*, promovendo assim uma força adesiva extremamente eficaz (Perdigão & Ritter, 2001; Sofan et al., 2017).

Devido ao sucesso do condicionamento ácido ao esmalte, Fusayama et al. (1979) introduziram a aplicação do ácido também na dentina. No entanto, o elevado conteúdo orgânico e a quantidade de fluidos presentes nos túbulos da dentina fazem com que a adesão a este tipo de substrato seja bastante mais complexa. Por isso, o efeito da aplicação do ácido não ocorre de forma homogénea e está dependente de vários fatores como o tipo de dentina, a sua

profundidade, bem como a orientação e a quantidade dos túbulos dentinários (Martins et al., 2008).

Na dentina a aplicação do ácido além de remover o *smear layer*, promove a sua desmineralização, expondo as fibras de colagénio, remove os *smear plugs* abrindo desta forma os túbulos dentinários. O ácido é aplicado na dentina, nunca mais do que 15 segundos, para que não exista o risco de provocar modificações estruturais no colagénio, sendo depois removido com água. Após a lavagem do ácido, o excesso de água é retirado com um *spray* de ar (Miyazaki et al., 2014).

De seguida, é aplicado o *primer* que é composto por monómeros hidrofílicos que se encontram dissolvidos em solventes orgânicos como a água, o álcool e/ou a acetona. O solvente aquoso do *primer* tem como função hidratar as fibras de colagénio, mantendo-as mais separadas e permitindo a expansão da rede de colagénio. Por sua vez, os solventes orgânicos, como é o caso do álcool, ajudam a expelir e evaporar a água residual existente na superfície da dentina, criando as condições necessárias para a posterior aplicação da resina adesiva que é totalmente hidrofóbica (Munksgaard, 2002; Pashley et al., 2011). Contudo, antes disso, os solventes devem ser evaporados, sendo necessário removê-los com o ar após a aplicação do *primer* (Pashley et al., 2011; Luque-Martinez et al., 2014).

Por fim, o último passo consiste na aplicação da resina adesiva, composta por monómeros hidrofóbicos que irão penetrar tanto nos espaços criados entre as fibras de colagénio como nos túbulos dentinários, ficando retidos através da polimerização (Pashley et al., 2011).

Ao conjunto da camada composta pelas fibras de colagénio reforçadas pela matriz de monómeros de resina do adesivo, dá-se o nome de camada híbrida, descrita por Nakabayashi et al. (1982).

A camada híbrida representa uma zona de interdifusão das fibras de colagénio da dentina com a resina adesiva polimerizada, formando uma zona híbrida de transição entre o substrato dentinário mais profundo e o material de restauração dentário (Nakabayashi et al., 1991; Van Meerbeek et al., 1993). A formação desta camada depende tanto da permeabilidade do substrato dentinário criado pelo pré-tratamento do ácido e do *primer*, bem como pela capacidade de difusão dos monómeros de resina (Wang et al., 1991).

A qualidade da camada híbrida é assim um fator preponderante para uma boa adesão, isto é, quanto maior for a força e durabilidade da união entre os componentes desta camada, menor é a probabilidade de aparecimento de falhas devidas à sua degradação por processos enzimáticos e hidrolíticos (Van Meerbeek et al., 1993; Sauro et al., 2008; Pashley et al., 2011).

Por outro lado, além da formação da camada híbrida, a resina adesiva que penetra nos túbulos abertos da dentina, dá origem à formação de prolongamentos de resina chamados de *resin tags* (Kenshima et al., 2006; Miyazaki et al., 2014).

Nos sistemas adesivos ER de 2 passos, o *primer* e a resina adesiva estão misturados no mesmo frasco e atuam em simultâneo, dificultando a capacidade de o adesivo penetrar na dentina desmineralizada. A camada híbrida formada com este sistema funciona como uma membrana semi-permeável, permitindo uma constante movimentação dos fluídos provenientes da polpa (Tay et al., 2004). Isto acontece devido à presença de um maior conteúdo hidrofílico, agravado pela maior dificuldade em evaporar completamente os solventes necessários para que os componentes hidrofílicos e hidrofóbicos possam estar misturados no mesmo frasco. Desta forma, a eficácia dos sistemas adesivos ER de 2 passos é inferior ao dos de 3 passos, reduzindo a eficácia e o potencial terapêutico que cada componente poderá ter quando aplicado em separado (Pashley et al., 2011).

Apesar dos sistemas adesivos ER de 3 passos serem considerados ainda o *gold-standard* da adesão (Pashley et al., 2011; Sofan et al., 2017), o modo de aplicação é tecnicamente sensível e pode conduzir a inúmeros problemas que se traduzem numa diminuição da eficácia adesiva.

A primeira dificuldade prende-se com o passo de aplicação, lavagem e secagem do ácido ortofosfórico. Controlar o grau de humidade da dentina é algo bastante crítico, sendo que a água desempenha um papel bastante antagónico no mecanismo de adesão (Marshall et al., 1997; Sofan et al., 2017).

Se por um lado, a secagem do excesso de água pode fazer colapsar as fibras de colagénio previamente expostas, dificultando a posterior penetração dos monómeros do adesivo, por outro, se o excesso de água não for eliminado, poderá prejudicar as propriedades mecânicas e a estabilidade da camada

híbrida (Pashley et al., 2011; Miyazaki et al., 2014). Quando a água está em excesso, pode ocorrer uma separação entre os componentes hidrofílicos e hidrofóbicos do adesivo, uma polimerização incompleta dos monómeros e a hidrólise da camada híbrida, fenómeno chamado de *over-wet* (Miyazaki et al., 2014; Sofan et al., 2017).

Além disso, a aplicação de ácido isoladamente, para além de abrir os túbulos dentinários com a remoção dos *smear plugs*, torna a dentina mais permeável aumentando o fluxo de fluídos vindos da polpa pela pressão hidrostática existente. Este fenómeno vai dificultar o controlo da quantidade de água, tornando a técnica ainda mais sensível (Miyazaki et al., 2014).

Desta forma, torna-se fundamental a determinação do grau adequado de hidratação da dentina para a obtenção de um sistema adesivo eficaz. Este é, ainda nos dias de hoje, o fator mais difícil de controlar e padronizar, principalmente em condições clínicas (Martins et al., 2008; Choi et al., 2017).

Por último, a aplicação de ácido ortofosfórico à dentina tem a capacidade de provocar uma elevada desmineralização, removendo demasiado cálcio; tal facto, tem vindo a revelar-se importante para a formação de ligações químicas com monómeros específicos do adesivo (Perdigão & Swift, 2015).

Além do referido, a profundidade da desmineralização obtida na maioria dos adesivos é superior à capacidade que os monómeros têm de penetrar entre as fibras de colagénio, criando-se zonas profundas que, não estando impregnadas pelo adesivo, deixam o colagénio desprotegido. Por sua vez, o espaço entre as fibras de colagénio da dentina desmineralizada contém água e proteoglicanos carregados negativamente que irão contribuir para a degradação do colagénio desprotegido (Pashley et al., 2004).

Desta forma, a destruição da camada híbrida, ocorre por um lado, pela ação das metaloproteínases e, por outro, pela destruição dos componentes hidrofílicos dos monómeros dos adesivos devido à presença de água (Pashley et al., 2004).

Por este motivo, os investigadores têm vindo a reconsiderar o tipo de ácido usado e o seu poder de desmineralização, bem como a associação de outros componentes adicionados à composição dos adesivos (Breschi et al., 2018; Betancourt et al., 2019; Zhou et al., 2019). Este tema será novamente

abordado no capítulo dedicado às estratégias utilizadas para ultrapassar as limitações dos sistemas adesivos.

A evaporação dos solventes do *primer* é também um ponto sensível para se conseguir alcançar uma boa força de adesão, e do ponto de vista clínico, um procedimento bastante difícil de controlar. A permanência dos solventes, principalmente da água que é bastante mais difícil de evaporar do que o álcool ou a acetona, podem comprometer o grau de conversão dos monómeros, prejudicando as propriedades físicas e mecânicas da camada híbrida formada e consequentemente torná-la mais permeável (Ikeda et al., 2005; Luque-Martinez et al., 2014).

O tipo de solventes utilizados nos sistemas adesivos ER influencia bastante a sua aplicação clínica. Se não existir um cuidado especial na técnica de secagem, os adesivos com solventes à base de acetona podem secar em excesso a dentina enquanto que os adesivos à base de álcool ou água necessitam de um tempo de evaporação maior, para que a dentina não fique com excesso de água (Miyazaki et al., 2014).

Assim, apesar dos sistemas adesivos ER apresentarem uma longevidade clínica bastante satisfatória, apresentam algumas fragilidades na prevenção da nanoinfiltração, além de serem bastante sensíveis na técnica de aplicação. Por isso, o objetivo dos investigadores continua, ainda, a ser o desenvolvimento de materiais adesivos mais simples, com menor número de passos e com poder auto-condicionante (Breschi et al., 2008).

2.3. Sistemas adesivos *Self-Etch*

Os sistemas adesivos *Self-Etch* (SE) surgem com o objetivo de superar a dificuldade no controlo do grau de humidade adequado da dentina e ao mesmo tempo com a intenção de reduzir o tempo de aplicação e simplificar a técnica dos sistemas adesivos *Etch & Rinse* (Van Meerbeek et al., 2011).

Nestes sistemas, a aplicação em separado do ácido não é necessária, uma vez que são utilizados *primers* que contêm monómeros funcionais ácidos na sua composição, que simultaneamente condicionam e preparam o substrato (esmalte e dentina) para a adesão (Van Meerbeek et al., 2011).

Não existindo o passo de aplicação prévia de ácido, o problema relacionado com a lavagem e secagem não se coloca, tornando-o um sistema adequado à dentina, na medida em que previne a sua desidratação (Van Meerbeek et al., 2011).

No entanto, o condicionamento ácido ao ser efetuado pela ação do *primer* ácido, promove um grau de desmineralização inferior. O *smear layer* não é removido, dada a não existência do passo de lavagem, sendo modificado e posteriormente incorporado na camada híbrida. Por este motivo, os monómeros do adesivo têm uma maior dificuldade em infiltrar a dentina, gerando nestes adesivos uma camada híbrida tipicamente menos espessa e, *resin tags* mais curtos (Hashimoto et al., 2004).

Os sistemas adesivos SE estão disponíveis em sistemas de 2 passos, onde um frasco contém *primers* ácidos e o outro a resina adesiva, ou em sistemas de frasco único, chamados de *single-step* ou *all-in-one* onde os componentes se encontram todos misturados (Fig. 2) (Van Meerbeek et al., 2011; Sofan et al., 2017).

A composição básica destes sistemas adesivos consiste numa solução aquosa de monómeros funcionais acídicos, normalmente apresentando um pH ligeiramente superior ao do ácido ortofosfórico ($\text{pH} \approx 0,5$). De acordo com o pH da componente ácida e da sua capacidade de desmineralização, estes sistemas adesivos podem ser classificados em “*strong*” ($\text{pH} \leq 1$), “*intermediately strong*” ($1 < \text{pH} < 2$) and *mild* ($\text{pH} \approx 2$) (De Munck et al., 2005; Van Meerbeek et al., 2011).

Os sistemas *mild* têm a capacidade de desmineralizar a dentina, apenas superficialmente, deixando cristais de hidroxiapatite a envolver as fibras de colagénio que têm como função proteger o colagénio da hidrólise. Além disso, este valor de acidez também não é suficiente para remover completamente os *smear plugs* dentro dos túbulos dentinários, pelo que, os sistemas *self-etch mild* são considerados os adesivos que provocam menor sensibilidade pós-operatória. Esta vantagem deve-se ao facto de existir uma menor movimentação de fluídos dentinários, uma vez que os túbulos permanecem parcialmente obstruídos (Sofan et al., 2017).

Os sistemas de um passo combinam numa única solução a mistura de monómeros funcionais ácidos, monómeros hidrofílicos, monómeros

hidrofóbicos, partículas de carga, foto-iniciadores, inibidores, água e outros solventes (álcool ou acetona). A água é indispensável para a ionização dos monómeros funcionais e os restantes solventes para dissolução dos componentes hidrofílicos e hidrofóbicos. Porém, estes adesivos ao conterem água e monómeros ácidos podem comprometer a estabilidade da adesão, uma vez que ao serem maioritariamente hidrofílicos, conseguem atrair mais água do substrato dentinário, deixando a camada híbrida mais suscetível à hidrólise (Reis et al., 2007).

Mesmo após a polimerização, estes adesivos acabam igualmente por atuar como membranas semipermeáveis permitindo o movimento de água do substrato para a camada adesiva (Reis et al., 2007).

Resumindo, para a adesão à dentina, os sistemas adesivos SE parecem ser opções adequadas e promissoras, uma vez que respeitam a morfologia e a biologia deste tecido, deixando algum conteúdo de hidroxiapatite para a ligação química com os monómeros funcionais do adesivo e reforçar assim a adesão. No entanto, para o esmalte, estes sistemas apresentam um pior desempenho, na medida em que a sua acidez não é suficiente para provocar um grau de desmineralização adequado, dificultando a penetração do adesivo (Sofan et al., 2017).

Assim, apesar de atrativos, estes sistemas ainda apresentam algumas desvantagens devido à presença do *smear layer* que constitui uma barreira na penetração do adesivo e ainda ao elevado conteúdo de solventes e componentes hidrofílicos e hidrofóbicos que, quando combinados no mesmo frasco, fazem com que este tipo de adesivos apresentem uma menor longevidade (Wang & Spencer, 2005).

Subjacente às falhas adesivas está a polimerização insuficiente dos monómeros, devido à natureza ácida dos mesmos e o fenómeno de separação dos componentes hidrofílicos e hidrofóbicos que têm que coexistir no mesmo produto (Wang & Spencer, 2005).

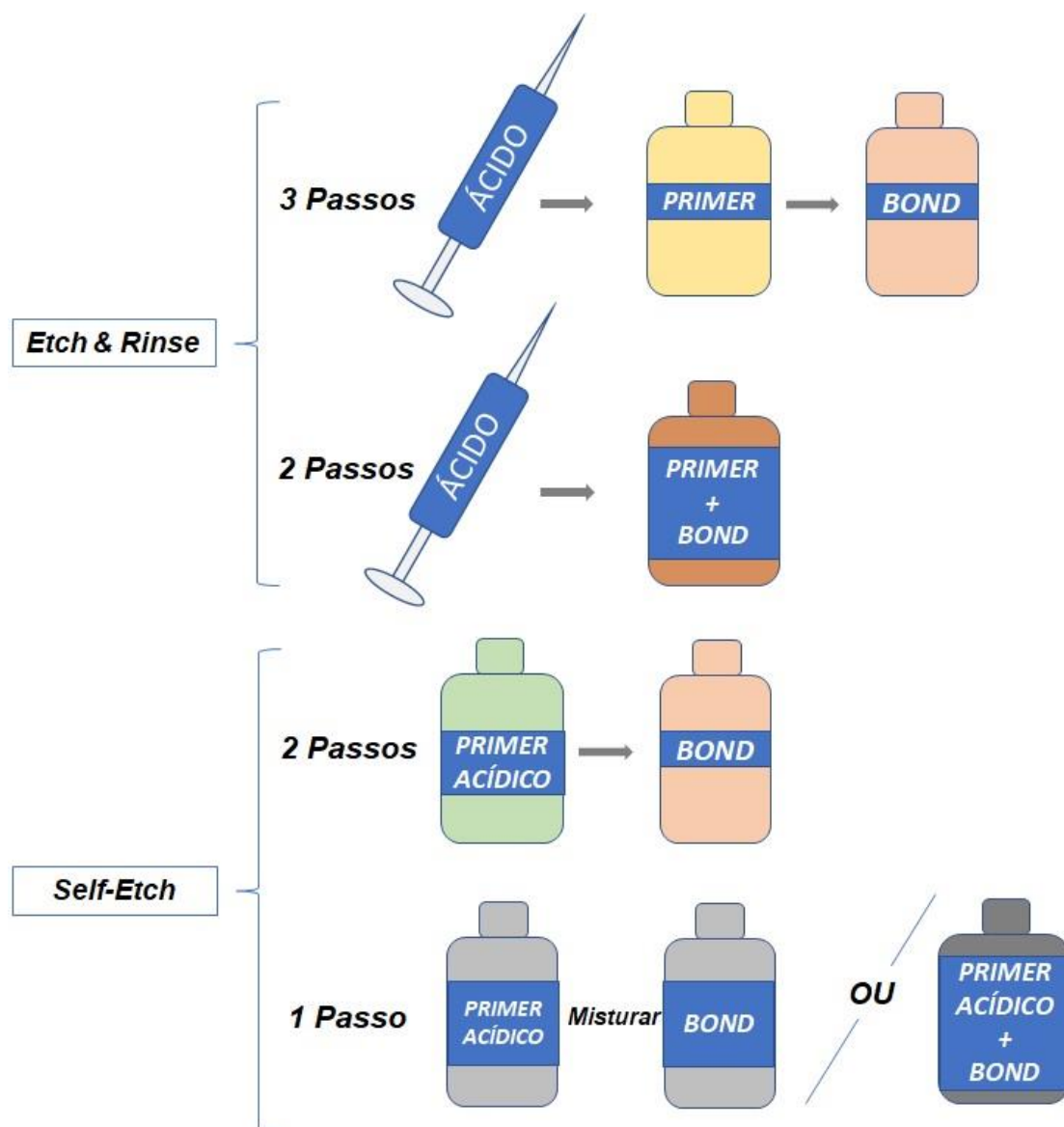


Fig. 2: Representação esquemática dos diferentes tipos de sistemas ER e SE disponíveis.

3. SISTEMAS ADESIVOS UNIVERSAIS

Os sistemas adesivos Universais são a novidade mais recente na dentisteria adesiva, estando disponíveis no mercado desde 2011. O *Scotchbond Universal*[®] (3M ESPE, St Paul, USA) foi o primeiro adesivo chamado de Universal a ser comercializado, seguido pelo adesivo *All Bond Universal*[®] (Bisco Inc, Schaumburg, USA).

No entanto, a definição de sistema adesivo Universal é dúbia e em muitos casos ambígua, não existindo na literatura nenhuma definição oficial que qualifique este tipo de material (Gary, 2015).

Estes materiais, para serem chamados de sistemas adesivos Universais, *multi-mode* ou *multi-purpose*, deverão ser apresentados idealmente num único frasco, sem necessidade de mistura prévia, podendo ser utilizados nos diferentes protocolos – *Etch & Rinse*, *Self-Etch* ou *Selective Enamel Etching* - dependendo da situação clínica ou da preferência do operador. (Gary, 2015; McLean et al., 2015; Sofan et al., 2017).

Esta versatilidade permite aliar as vantagens dos sistemas adesivos ER na adesão ao esmalte e dos sistemas adesivos SE na adesão à dentina. Desta forma, vários autores recomendam que a aplicação mais correta e eficaz deste sistema é a aplicação prévia de ácido ortofosfórico apenas no esmalte, seguindo-se da aplicação do adesivo nos dois substratos (*Selective Enamel Etching*) (Erickson et al., 2009; Van Meerbeek et al., 2011; Perdigão & Swift, 2015; Cuevas-Suárez et al., 2019).

Assim, a desmineralização provocada no esmalte é suficiente para se obter uma penetração eficaz do adesivo, sendo que na dentina, evita-se o risco relacionado com o passo de condicionamento ácido, lavagem e secagem, que existe quando os sistemas ER são aplicados (Perdigão & Swift, 2015; Sofan et al., 2017).

Por outro lado, ao preservar cristais de hidroxiapatite, permite que estes sistemas possam formar ligações químicas com a dentina. Por isso mesmo, os sistemas adesivos Universais devem apresentar sempre na sua composição monómeros funcionais com afinidade para esta ligação química com o cálcio (Perdigão & Swift, 2015; Sofan et al., 2017). Para que a ligação química possa

ocorrer, o requisito importante é que os verdadeiros Universais apresentem um valor de pH entre 2,2 e 3,5 (Gary, 2015).

Os sistemas adesivos Universais surgem também como materiais indicados para aderir restaurações diretas e indiretas, sendo compatíveis com os cimentos à base de resina autopolimerizáveis, fotopolimerizáveis ou com dupla polimerização (Gary, 2015; Tsujimoto et al., 2017; Cuevas-Suárez et al., 2019). Afirma-se ainda que estes sistemas adesivos têm o objetivo de poderem funcionar como *primers* adesivos em substratos como a zircônia, os metais nobres e não nobres, compósitos e diferentes materiais cerâmicos à base de sílica. Este procedimento implica a necessidade de aplicação em separado de iniciadores, tais como o silano (Gary, 2015; Tsujimoto et al., 2017; Cuevas-Suárez et al., 2019).

Observando a composição e características dos adesivos comercializados como sistemas adesivos Universais, é possível verificar muitas incongruências, deixando a dúvida se deverão ou não ser classificados como adesivos Universais. Por exemplo, adesivos comerciais como o *Optibond XTR*® (Kuraray) ou o *Futurabond Universal*® (VOCO) são comercializados como sistemas Universais, mas apresentam-se em dois frascos separados com a necessidade de serem misturados previamente. Outros exemplos são o caso do *Scotchbond Universal*® (3M ESPE) ou do *Clearfil Universal*® (Kuraray) que exigem que seja utilizado um ativador em separado quando se pretende aderir um cimento de resina (Gary, 2015).

Desta forma, atualmente ainda não existe nenhum adesivo universal que cumpra todos os requisitos que este tipo de material exige para poder desempenhar tantas funções em simultâneo (Gary, 2015; Matos et al., 2017; Nagarkar et al., 2019).

É inegável que a formulação de um adesivo Universal é um processo bastante desafiante, sendo que a componente química é um fator chave no desenvolvimento de um material tão versátil. Os estudos publicados até à data indicam que a estabilidade da adesão varia consoante o tipo de adesivo Universal utilizado, estando igualmente sujeita à degradação hidrolítica (Gary, 2015; Nagarkar et al., 2019). O pH do adesivo, a estratégia adesiva utilizada (ER ou SE) e o substrato onde se pretende aderir são fatores críticos no desempenho

deste tipo de adesivos (Rosa et al., 2015; Cuevas-Suárez et al., 2019).

3.1. Composição química dos sistemas adesivos Universais

A composição química dos adesivos Universais é semelhante à dos adesivos *Self-Etch*, diferindo principalmente no pH das formulações que, por norma, é sempre mais alcalino. À semelhança de alguns adesivos *Self-Etch*, os Universais caracterizam-se por terem incorporados na sua formulação monómeros funcionais responsáveis por estabelecer ligações químicas com o cálcio da hidroxiapatite e, em simultâneo continuarem a apresentar adesão micromecânica (Cuevas-Suárez et al., 2019; Papadogiannis et al., 2019).

Os sistemas adesivos Universais apresentam-se assim como um líquido viscoso que resulta da mistura de monómeros à base de resina, monómeros funcionais, solventes, iniciadores, inibidores e por vezes partículas de carga inorgânica (Papadogiannis et al., 2019).

Para formular um sistema adesivo Universal é necessário que exista um conjunto muito específico de monómeros funcionais e de reticulação que atuem de forma sinérgica e que tenham a capacidade de reagir perante diferentes tipos de substrato. Isto é, monómeros que apresentem a capacidade de copolimerizar com materiais à base de resina e ao mesmo tempo que se consigam ligar a tecidos como a dentina. Para isso, deverá existir um equilíbrio exigente entre as componentes hidrofílica e hidrofóbica, que terão de coexistir numa única solução (Gary, 2015; Papadogiannis et al., 2019).

O caráter hidrofílico é necessário para manter o grau de hidratação da dentina, permitindo a impregnação dos monómeros entre as fibras de colagénio (Hitmi et al., 2002; Van Landuyt et al., 2007).

No entanto, tal poderá acelerar a hidrólise do adesivo devido à maior absorção de água. Por este motivo, a existência de monómeros hidrofóbicos é extremamente importante para afastar a água e, ao mesmo tempo, melhorar a resistência mecânica (Feitosa et al., 2014).

O desafio centra-se, assim, em encontrar uma combinação perfeita de monómeros compatíveis, que exibam propriedades hidrofílicas iniciais e que, após serem polimerizados, formem camadas adesivas hidrofóbicas estáveis e

duradouras (Gary, 2015; Bedran-Russo et al., 2017).

Além destes componentes, fazem parte da composição destes materiais os iniciadores da reação de polimerização que desempenham um papel fundamental na consolidação da camada híbrida, na retenção micromecânica dos monómeros dentro da estrutura dentária e, posteriormente, na união à resina composta (Yoshida & Greener, 1994).

Na tabela 1 encontram-se descritos os principais constituintes dos sistemas adesivos Universais mais utilizados.

O conhecimento da composição detalhada dos sistemas adesivos e do papel de cada componente no mecanismo de adesão torna-se indispensável para a formulação deste tipo de material.

Tabela 1: Composição e pH dos principais sistemas adesivos Universais disponíveis no mercado				
Adesivo Universal	Principais Ingredientes*	Fabricante	pH	Classificação**
Scotchbond Universal®	Bis-GMA, HEMA, 10-MDP, metacrilato de etilo, ácido 2-propenoico, copolímero do ácido acrílico e itacônico, Dimetilaminobenzoato, etanol, água, silano canforoquinona,	3M ESPE St. Paul, MN, EUA	2,7	<i>Mild</i>
All Bond Universal®	10-MDP, Bis-GMA, HEMA, etanol, água, iniciadores	Bisco Inc. Schaumburg, IL, EUA	3,2	<i>Ultra-mild</i>
Adhese Universal®	10-MDP, Bis-GMA, HEMA, dimetacrilato de decanodiol, dimetacrilato, etanol, água, iniciadores, estabilizadores, dióxido de silício	Ivoclar Vivadent, Schaan, Lichtenstein	2,5	<i>Mild</i>
Clearfil Universal Bond®	Bis-GMA, HEMA, etanol, 10-MDP, dimetacrilato alifático hidrofílico, sílica coloidal, DL-canforoquinona, silano, aceleradores, iniciadores, água	Kuraray Noritake Dental Inc., Japão	2,3	<i>Mild</i>
Futurabond U®	HEMA, Bis-GMA, monômero adesivo ácido, UDMA, catalisadores, nanopartículas de Sílica, etanol	Voco GmbH, Alemanha	2,3	<i>Mild</i>
* De acordo com a indicação do fabricante descrita na ficha de dados de segurança (MSDS); ** Van Meerbeek B et al., 2010. Bis-GMA - Glicidildimetacrilato de bisfenol A; HEMA – Metacrilato de 2-hidroxietilo; UDMA - Dimetacrilato de uretano; 10-MDP - Dihidrogenofosfato de metacriloiloxidecilo				

3.1.1 Monómeros funcionais

A natureza hidrofílica do metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) faz com que este seja um dos monómeros mais utilizado nos sistemas adesivos, sendo considerado um excelente promotor da adesão (Fig. 3) (Nakabayashi & Takarada, 1992; Burrow et al., 1999; Hitmi et al., 2002; Van Landuyt et al., 2007).

O HEMA, enquanto assegura o grau de humidade necessário na dentina, atua também como um solvente natural que melhora a estabilidade das soluções com componentes hidrofóbicos e hidrofílicos, mantendo os restantes componentes em solução (Van Landuyt et al., 2005).

No entanto, quando presente em grandes quantidades, a sua capacidade de absorção de água e tendência para a hidrólise, conduz a uma grande diminuição da resistência mecânica dos adesivos. Por outro lado, Yoshida et al. (2012) defendem que a sua presença também poderá inibir a ação de outros monómeros funcionais utilizados, tais como o 10-MDP.

Ainda assim, o HEMA continua a ser um dos constituintes mais frequentes na composição dos sistemas adesivos Universais, em concentrações que variam de fabricante para fabricante. Otimizar a quantidade de HEMA, a fim de se utilizar a menor concentração necessária para aproveitar os seus benefícios e minimizar os seus efeitos negativos, tem sido o objeto de estudo para alguns autores (Van Landuyt et al., 2008; Zanchi et al., 2013; Münchow et al., 2014; Barbosa et al., 2015).

Van Landuyt et al. (2008) formularam um adesivo experimental *Self-Etch* de um passo, que continha apenas 10% de HEMA, apresentando uma eficácia adesiva superior. Outros autores, no entanto, têm vindo a estudar a hipótese da sua substituição (Zanchi et al., 2013; Barbosa et al., 2015). Münchow et al. (2014), concluíram que os adesivos que não contêm monómeros de HEMA apresentam melhor taxa de conversão e, por isso, melhores propriedades físicas e mecânicas.

Outros monómeros funcionais utilizados com frequência nos sistemas adesivos Universais caracterizam-se por conterem na sua composição ésteres de fosfato ($R-O-PO_3H_2$) permitindo que estes adesivos se consigam ligar a metais (Kadoma, 2002), à zircónia (Chen et al., 2012) e ao dente (Fukeygawa et al., 2006; Van Landuyt et al., 2008), pela formação de sais de cálcio.

No dente, a ligação química dos grupos carboxílicos e/ou fosfato ao cálcio presente nos cristais de hidroxiapatite vem reforçar a microretenção mecânica já existente, tornando a interface mais resistente à presença de água, aumentando assim, as forças de adesão (Proença et al., 2007; Hosaka et al., 2009) e a resistência do adesivo à degradação (Miyazaki et al., 2014).

Por outro lado, estes monómeros ao serem naturalmente ácidos, conseguem ao mesmo tempo contribuir para a desmineralização do dente, sendo um aspecto favorável quando o adesivo é aplicado sob o protocolo *Self-Etch* (Ogliari et al., 2008).

O 10-MDP (dihidrogenofosfato de metacriloiloxidecilo) foi sintetizado em 1980 pela *Kuraray Inc.* (Osaka, Japão) e, desde a queda da sua patente em 2003, vários fabricantes têm vindo a incorporar este monómero na composição dos sistemas adesivos.

Nos sistemas adesivos Universais este é o monómero funcional mais utilizado. Este composto apresenta uma estrutura química anfipática que o torna bastante versátil. Numa extremidade apresenta um grupo metacrilato que é hidrofóbico, indicado para formar ligações químicas com os materiais restauradores e os cimentos à base de resina. Na outra extremidade, encontra-se um grupo fosfato polar, que é hidrofílico permitindo a ligação química ao tecido dentário (Ogliari et al., 2008; Gary, 2015).

Para além do referido, a sua longa cadeia de carbonos faz com que seja um dos monómeros funcionais com características mais hidrofóbicas, conferindo ao adesivo uma menor tendência para absorver água e uma maior resistência à degradação hidrolítica da camada adesiva (Fig. 3) (Ogliari et al., 2008; Gary, 2015).

Desde a descoberta do 10-MDP, têm surgido na literatura referências a vários monómeros com o mesmo tipo de função. O ácido 4-metacriloxietil-trimetílico (4-MET) e o hidrogenofosfato de 2-metacriloxietilo (Fenil-P) são também exemplos disso, não apresentando, no entanto, resultados tão satisfatórios como o 10-MDP (Yoshida et al., 2004).

O 10-MDP tem sido referenciado como dos poucos monómeros que apresenta a capacidade de formar ligações iónicas com os cristais de hidroxiapatite, dando origem à formação de cristais de 10-MDP-cálcio bastante

estáveis. Estes cristais vão-se depositando de uma forma organizada em nanocamadas que variam de espessura e qualidade, conforme o sistema adesivo utilizado, tornando a interface adesivo bastante resistente à degradação (Fukeygawa et al., 2006; Nunes et al., 2007; Van Landuyt et al., 2008; Hosaka et al., 2009; Yoshida et al., 2012).

Muito embora o 10-MDP apresente inúmeras vantagens, segundo a literatura mais recente, este aparenta ser muito instável hidroliticamente, podendo degradar-se em dihidrogenofosfato de hidroxidecilo e metacrilato. Neste sentido, surgiu a necessidade de criar um polímero quimicamente mais estável, o dihidrogenofosfato de 6-metacriloxi-2,2,3,3,4,4,5,5-octafluorohexilo (MF8P), que ao conter flúor na sua composição, parece ser mais resistente à água, devido à forte adesão química existente entre o flúor e o carbono. Os resultados obtidos com a utilização deste monómero são promissores, uma vez que mantendo a eficácia na ligação ao cálcio semelhante à do 10-MDP, o MF8P revelou ser hidroliticamente mais estável (Yoshihara et al., 2014).

3.1.2 Monómeros “cross-link”

Os monómeros de “cross-link” estão presentes na composição dos adesivos para conferirem um carácter hidrofóbico e uma elevada taxa de conversão. Estes componentes são os principais responsáveis pela retenção mecânica do adesivo, que acontece pela formação da camada híbrida e dos *resin tags* e pela polimerização com os monómeros da resina composta (Van Landuyt et al., 2007).

O Bis-GMA (glicidildimetacrilato de bisfenol A), o TEGDMA (dimetacrilato de trietilenoglicol) e o UDMA (dimetacrilato de uretano) são os monómeros “cross-link” mais utilizados nos sistemas adesivos (Fig. 3), que, ao formarem polímeros com elevadas ligações cruzadas, promovem uma elevada resistência mecânica (Sideridou et al., 2002).

O Bis-GMA foi introduzido na década de 60 do século passado por Bowan e Rodriguez (1962). Tem sido o monómero mais utilizado ao longo do tempo como base dos adesivos, devido à sua capacidade de se difundir nos tecidos, bem como às boas propriedades físicas e mecânicas (Sideridou et al., 2002).

Porém, contrariamente ao que se pensava, em termos da sua

hidrofobicidade, alguns autores mostraram que este monómero absorve muita água (Gajewski et al., 2012). Além disso, a presença de grupos hidroxilo e de anéis aromáticos aumenta a sua viscosidade de tal forma que a sua taxa de conversão é negativamente afetada (Peutzfeldt, 1997).

Por essa razão, este monómero é associado ao monómero TEGDMA que atua como diluente, para conferir a viscosidade necessária aos sistemas adesivos. Contudo, o TEGDMA poderá prejudicar as propriedades mecânicas, tornando a matriz do adesivo mais permeável à água (Sideridou & Karabela, 2011).

No que diz respeito à biocompatibilidade, o Bis-GMA tem vindo a ser recentemente bastante questionado, devido ao facto de conter bisfenol A. A libertação de bisfenol A dos materiais restauradores é ainda um assunto polémico, na medida em que alguns autores defendem apresentar risco de citotoxicidade para o organismo. Encontram-se também algumas referências relacionadas com a atividade estrogénica destes monómeros, que serão abordadas no ponto 3.4 sobre a biocompatibilidade (Gupta et al., 2012; Malkiewicz et al., 2015; Chianese et al., 2018)

Desta forma, a elevada rigidez e viscosidade, a reduzida taxa de conversão, a absorção de água e a potencial libertação de bisfenol A leva a que um número crescente de fabricantes procurem retirar o Bis-GMA das formulações dos adesivos (Van Landuyt et al., 2007; Yu et al., 2014).

O monómero UDMA igualmente utilizado na composição dos materiais restauradores, tem sido considerado na literatura uma alternativa promissora para substituir os monómeros de Bis-GMA. Este monómero apresenta uma excelente taxa de conversão, formando um elevado número de ligações cruzadas, devido às reações em cadeia nas ligações azoto-hidrogénio (NH) dos grupos amida (Sideridou et al., 2002; Floyd & Dickens, 2006; Papakonstantinou et al., 2013).

Além disso, a sua menor rigidez e maior flexibilidade permitem obter um grau de viscosidade mais adequado que facilita a penetração destes monómeros na estrutura dentária (Van Landuyt et al., 2007; Reichl et al., 2012; Papakonstantinou et al., 2013).

3.1.3 Solventes

Os solventes desempenham um papel bastante importante no mecanismo de ação e eficácia dos adesivos. É devido à presença de solventes que os adesivos possuem uma reduzida viscosidade, que é crucial para que os monómeros se consigam difundir e infiltrar dentro da estrutura dentária. Nos sistemas adesivos Universais, os solventes são particularmente importantes pois facilitam a mistura dos monómeros dentro do mesmo frasco, evitando a separação entre os componentes hidrofílicos e hidrofóbicos durante o processo adesivo (Perdigão & Frankenberger, 2001; Reis et al., 2003; Toledano et al., 2012c).

A água, o álcool e a acetona são os solventes mais utilizados. A água é necessária para a dissociação dos monómeros funcionais, pelo que é um constituinte comum à maioria dos sistemas adesivos Universais. No entanto, a sua evaporação torna-se bastante difícil e, por isso, a associação com o álcool ou a acetona é necessária para facilitar este procedimento (Carvalho et al., 2012).

O álcool e a acetona, como têm uma pressão de vapor maior que a água, evaporam mais facilmente. Por outro lado, têm a capacidade de afastar a água da rede de colagénio e ao mesmo tempo assegurar a penetração dos monómeros nas microporosidades criadas entre as fibras de colagénio (Jacobsen & Söderholm, 1998; Bail et al., 2012).

Porém, alguns estudos têm demonstrado resultados menos favoráveis quando a acetona é utilizada como solvente, uma vez que ao ser muito volátil, não assegura uma adequada expansão da rede de colagénio nem uma difusão eficaz dos monómeros (Pashley et al., 2002).

Assim, a mistura de água e etanol, onde o etanol é utilizado em maior proporção, tem demonstrado uma maior eficácia no combate à nanoinfiltração (Moszner & Salz, 2005).

3.1.4 Iniciadores

Para que um adesivo seja fotopolimerizado é necessário adicionar à sua composição componentes foto-iniciadores que são combinados com co-iniciadores. Nos sistemas adesivos a canforoquinona (CQ) é o foto-iniciador mais utilizado que, juntamente com uma amina, e na presença de luz, reage desencadeando a libertação de radicais livres e a consequente polimerização dos monómeros (Van Landuyt et al., 2007).

A CQ é um excelente foto-iniciador que tem como principal vantagem o facto de apresentar um amplo espectro de absorção (entre 360–510 nm) com um pico de absorvância por volta dos 468 nm (luz azul) (Moss et al., 2002). À temperatura ambiente, a CQ apresenta-se como um pó cristalino, solúvel em água e de coloração amarela/acastanhada. Mesmo sendo utilizada em pequenas quantidades (<2,5 % (m/V)), tem a capacidade de influenciar de forma significativa a cor dos adesivos. Este aspeto acaba por ser uma desvantagem, pois, apesar da cor se desvanecer após a polimerização do adesivo, existe sempre o risco de pigmentar o dente, podendo prejudicar o resultado estético final da restauração. Porém, este aspeto é mais relevante nas resinas compostas do que nos sistemas adesivos (Van Landuyt et al., 2007). Para além disso, a CQ tem demonstrado também algumas propriedades citotóxicas (Atsumi et al., 2004).

As aminas terciárias são bastante utilizadas como co-iniciadores das CQ no mecanismo de polimerização. No entanto, a sua presença num adesivo com um pH mais ácido pode ser um problema, uma vez que algumas aminas poderão desencadear uma reação de oxidação-redução dos monómeros ácidos dos adesivos (Moszner & Salz, 2005; Van Landuyt et al., 2007).

Por este motivo, a ação da canforoquinona com diferentes co-iniciadores tem sido um tema bastante estudado (Wang et al., 2006).

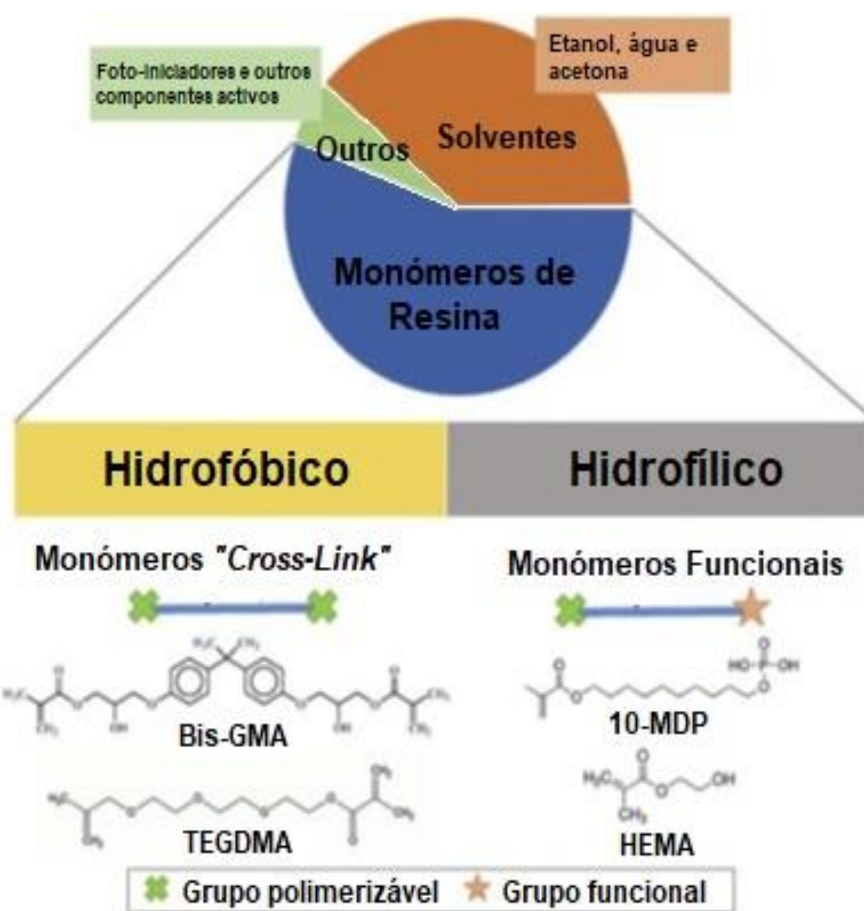


Fig. 3: Representação esquemática dos principais constituintes dos adesivos Universais (Imagem retirada e adaptada de Bedran-Russo et al., 2017)

3.2. Propriedades físico-químicas dos sistemas adesivos Universais

3.2.1 pH

De acordo com uma exaustiva revisão sistemática efetuada por Cuevas-Suárez et al. (2019), onde foram analisados 59 estudos publicados entre 2015 e 2019, envolvendo diferentes adesivos Universais, verificou-se que a estabilidade da adesão deste tipo de adesivos à dentina depende essencialmente do seu pH, e, como tal, a estratégia adesiva utilizada pelo profissional deve ter sempre em conta o grau de acidez do adesivo e o tipo de substrato onde ele vai ser aplicado.

Durante a formulação de um adesivo Universal não é imediata a obtenção

de um pH adequado para que se atinja o equilíbrio entre a quantidade de cálcio que deve ser removida *versus* a que deve ser mantida. Se por um lado, é necessário um certo grau de desmineralização para permitir a entrada do adesivo dentro da dentina, por outro, também é importante ser mantido o conteúdo de cálcio para permitir o estabelecimento da ligação química com o monómero funcional normalmente existente na composição destes sistemas adesivos (Gary, 2015; Cuevas-Suárez et al., 2019).

Desta forma, contrariamente ao que se verifica nos adesivos SE, os adesivos Universais apresentam, por norma, um pH menos ácido (acima de 2, comparativamente com os adesivos SE com pH <2), o que lhes confere a grande versatilidade de poderem ser utilizados com a estratégia ER ou com a estratégia SE (Gary, 2015; Cuevas-Suárez et al., 2019; Nagarkar et al., 2019).

Assim, o pH da maioria dos adesivos Universais varia entre 2,2 e 3,2 dependendo da marca comercial (Tabela 1). Consoante o valor de pH, os Universais podem ser considerados como “*intermediately strong*” (1<pH<2); “*mild*” (pH≈2) ou “*ultra-mild*” (pH>2,5) (Gary, 2015; Cuevas-Suárez et al., 2019; Nagarkar et al., 2019).

Na adesão ao esmalte, para aumentar a eficácia adesiva dos sistemas adesivos Universais, os mesmos devem ser sempre aplicados após o condicionamento ácido prévio (protocolo ER). Como já foi referido, o ácido ortofosfórico é fundamental para remover o *smear layer* e criar microporosidades resultantes da dissolução da hidroxiapatite, permitindo a infiltração dos monómeros no esmalte que ficam retidos após a polimerização, formando os *resin tags*. A esta técnica dá-se o nome de *Selective Enamel Etching* (Perdigão & Swift, 2015).

Já na adesão à dentina, os estudos revelam que a eficácia adesiva é afetada pelo protocolo e pelo pH do adesivo utilizado.

A eficácia adesiva à dentina dos adesivos *strong* é a que apresenta piores resultados, independentemente da estratégia utilizada (ER ou SE). Após o período de envelhecimento, os reduzidos valores de força adesiva encontrados são explicados pela presença de monómeros que ficaram por polimerizar e que continuam a desmineralizar a dentina devido ao seu alto nível de acidez, promovendo uma baixa estabilidade hidrolítica das interfaces adesivas e uma

baixa estabilidade das interações químicas com o colágeno. Por este motivo, a utilização de adesivos com pH *strong* é desaconselhada para a dentina (Van Meerbeek et al., 2011).

Relativamente à eficácia adesiva dos adesivos *intermediatly strong*, segundo a revisão sistemática de Cuevas-Suárez et al. (2019), os resultados existentes são inconsistentes pelo que será necessário continuar a estudar a sua *performance* na dentina de forma obter um maior nível de evidência da sua eficácia.

Quanto aos adesivos *ultra-mild*, muito embora o papel dos *resin tags* na eficácia adesiva continue a ser questionado (Lohbauer et al., 2008, Cuevas-Suárez et al., 2019), os estudos indicam que este tipo de adesivos quando aplicado com a técnica SE não permite a formação de *resin tags*, mas sim apenas quando aplicado com a técnica ER. Desta forma obtem-se uma maior retenção micromecânica do adesivo que poderá influenciar a eficácia adesiva imediatamente após a utilização dos adesivos Universais *ultra mild*. Contudo, a longo prazo, os resultados publicados na literatura revelam que a eficácia dos adesivos *ultra-mild* diminui com a técnica ER (Hashimoto et al., 2011). Na base deste fenómeno está a possível diminuição da ligação química dos monómeros funcionais pela remoção em excesso do cálcio aquando da aplicação do ácido fosfórico bem como o eventual colapso das fibras de colagénio pela secagem em excesso aquando do passo de lavagem do ácido. A degradação da camada híbrida pelo aumento da atividade das metaloproteinases (MMP) poderá ser outra das explicações encontradas na literatura (Tezvergil-Mutluay et al., 2013)

Por este motivo, os resultados publicados na literatura levam a crer que para a adesão à dentina os sistemas adesivos Universais com pH *mild* são os mais indicados. Com este pH consegue-se um equilíbrio entre o grau de desmineralização efetuado de forma a promover uma boa retenção micromecânica ao mesmo tempo que possibilita uma ligação química estável com o cálcio que fica disponível, independentemente da estratégia adesiva utilizada (ER ou SE) (Van Meerbeek et al., 2011; Cuevas-Suárez et al., 2019).

3.2.2 Solubilidade e absorção de água

Os sistemas adesivos dentários que são aplicados no dente com o objetivo de permanecerem durante longos períodos de tempo estão inerentemente sujeitos a processos de dissolução e degradação, quer pela libertação de componentes residuais, que permaneceram sem ligação química, quer pela absorção de fluídos para a sua estrutura (Breschi et al., 2018).

A água está constantemente a “banhar” a estrutura da dentina através dos túbulos dentinários e o seu equilíbrio durante a formação da camada híbrida é um processo dinâmico, representando ainda nos dias de hoje um dos grandes desafios na integridade da interface adesiva ao longo do tempo (McCabe & Rusby, 2004).

No que diz respeito aos sistemas adesivos Universais este equilíbrio torna-se ainda mais difícil uma vez que todos os componentes estão juntos no mesmo frasco e por norma a água está sempre presente na sua composição (Perdigão & Swift, 2015).

Desta forma, os sistemas adesivos atuais apresentam maior fragilidade à presença de água, mesmo após a polimerização, com consequente aumento da hidrólise da camada híbrida, comparativamente com os sistemas adesivos de vários componentes (Abedin et al., 2014).

Por outro lado, a absorção de água para a camada híbrida poderá ser benéfica na medida em que promove uma ligeira compensação da contração de polimerização, diminuindo o *stress* e as forças exercidas na interface adesiva após a polimerização do adesivo ao mesmo tempo que reduz a sensibilidade pelo selamento dos túbulos dentinários (McCabe & Rusby, 2004).

A percentagem relativa de monómeros hidrofílicos utilizados na composição dos adesivos, a quantidade de solventes residuais que permanecem após a evaporação e a taxa de conversão do polímero são fatores que influenciam a tendência para a absorção e solubilidade em água de um adesivo e a estabilidade da interface resina/dentina (Ito et al., 2005; Yiu et al., 2005; Malacarne et al., 2006; Malacarne et al., 2009).

Como já referido, os sistemas adesivos com solventes à base de água na sua composição, têm por norma maior tendência em acumular água na interface adesiva (Jacobsen et al., 1998; Chimeli et al., 2014). A dificuldade na evaporação dos solventes está dependente não só do tipo de solventes como do tempo de evaporação (normalmente definido pelos fabricantes) conduzindo à existência de solventes residuais que criam poros no adesivo e favorecem a absorção de água na matriz polimérica (Chimeli et al., 2014). Estes solventes também se acumulam mais quanto maior for a quantidade de monómeros hidrofílicos presentes no adesivo (Yiu et al., 2005).

Por outro lado, existem estudos que demonstram que a capacidade de absorção de água de um adesivo não está dependente do processo de evaporação dos solventes (Chimeli et al., 2014).

Outros critérios descritos na literatura que determinam também a capacidade de um adesivo absorver água são: a polaridade da estrutura molecular e a presença de grupos químicos capazes de formar pontes de hidrogénio com a água, o grau de ligações cruzadas obtidas após a polimerização e a presença de monómeros residuais (Nishitani et al., 2006).

Como já referido, a presença de HEMA na composição dos sistemas adesivos poderá ser um dos fatores que contribui para a absorção de água, pelas suas propriedades hidrofílicas (Garcia et al., 2010), pelo que a redução da quantidade deste composto e/ou a introdução de monómeros mais hidrofóbicos tem vindo a ser uma estratégia utilizada no desenvolvimento de novos adesivos (Zanchi et al., 2010; Münchow et al., 2014; Barbosa et al., 2015).

Contudo, podemos dizer que ainda existe pouca evidência sobre a relação entre a quantidade de água absorvida e o tipo de monómeros incorporados no adesivo. Da mesma forma, o mecanismo de difusão da água para o interior da camada híbrida não está também totalmente clarificado (Unemori et al., 2003; Perdigão et al., 2010; Kaczor et al., 2018).

Assim, uma das causas da nanoinfiltração pode ser explicada pela ligação química do hidrogénio da água às zonas hidrofílicas do adesivo, que é favorecida pela infiltração de água nos espaços livres que ficaram aquando da formação da camada híbrida (Unemori et al., 2003; Perdigão et al., 2010; Kaczor et al., 2018).

Sendo que os sistemas adesivos Universais apresentam um pH ácido, este processo de degradação hidrolítica dos polímeros e do colagénio é ainda mais potenciado (Perdigão & Swift, 2015).

Deste modo, a solubilidade e absorção de água de um sistema adesivo torna-se uma propriedade físico-química de extrema importância, na medida em que influencia fortemente a sua eficácia adesiva e estabilidade a longo prazo, sendo indispensável a sua avaliação sempre que se pretende formular um novo adesivo. A norma ISO 4049, (2000) descreve o procedimento utilizado para o cálculo da percentagem de solubilidade e absorção de água de um adesivo.

3.2.3 Taxa de conversão e contração de polimerização

No mecanismo de adesão, a formação de uma rede de polímeros com elevadas ligações cruzadas é crucial para a eficácia adesiva e longevidade das restaurações. Quanto maior for a taxa de conversão dos monómeros e menor a sua contração de polimerização, maior a resistência adesiva e o selamento marginal da interface e consequentemente a sua estabilidade na presença de água e de bactérias, bem como das forças da mastigação (Muñoz et al., 2014).

Segundo os resultados publicados na literatura, os sistemas adesivos Universais apresentam em média uma taxa de conversão de $76,8 \pm 3,9\%$ (Muñoz et al., 2013; Muñoz et al., 2014).

A presença de oxigénio, água e solventes residuais são alguns dos fatores que podem inibir a polimerização do adesivo (Nunes et al., 2005).

Quando a polimerização é baixa, ficam duplas ligações por reagir deixando pontas da rede do monómero/polímero por se ligar, produzindo um maior número de monómeros eluentes. Estes monómeros que se libertam, além de levantarem questões a nível da segurança e biocompatibilidade, criam zonas que facilmente se degradam quando em contacto com os fluídos orais (Sideridou et al., 2002).

Por outro lado, alguns monómeros apresentam uma maior tendência para contraírem após a reação de polimerização e sofrerem uma redução do volume do polímero obtido, criando assim uma tensão na interface adesiva (Van Landyut et al., 2007). Este aspeto é especialmente relevante uma vez que se o adesivo contrair demasiado, a tensão gerada após a polimerização poderá provocar um

descolamento do adesivo, criando uma fenda marginal, propícia à entrada de bactérias e consequente microinfiltração e formação de cárie secundária (Fig. 1).

O desenvolvimento de monómeros alternativos que apresentem uma redução da sua contração tem sido uma preocupação de alguns autores (Hasshoff et al., 2004).

O grau de conversão final depende assim da composição química dos adesivos (particularmente da natureza dos fotoiniciadores e dos monómeros) bem como das condições de polimerização, nomeadamente da temperatura, da intensidade e proximidade da luz e do tempo da fotopolimerização (Sideridou et al., 2002; Park et al., 2008; Seki et al., 2011; Loguercio et al., 2013).

A situação clínica também irá influenciar de certa forma a taxa de conversão onde a preparação cavitária, a posição do dente e a existência, ou não, de um dente adjacente são alguns dos fatores a ter em consideração (Mutluay et al., 2014).

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é a técnica espectroscópica mais indicada para avaliar a taxa de conversão. Esta técnica baseia-se no cálculo das áreas dos picos correspondentes às ligações duplas de carbono alifáticas e aromáticas, obtidas após leitura da absorvância nos picos 1640cm^{-1} e 1608cm^{-1} , respetivamente, antes e após a polimerização do adesivo (Rueggeberg, Hashinger & Fairhurst, 1990).

3.3. Propriedades mecânicas dos sistemas adesivos Universais

A resistência dos materiais à deformação ou fratura quando sujeitos a uma força são propriedades mecânicas muito relevantes dos materiais dentários (Anusavice et al., 2013).

No que diz respeito aos sistemas adesivos, estas propriedades são estudadas através de testes de resistência adesiva quando os adesivos são aplicados ao esmalte e à dentina. Estes testes são fundamentais para entender a eficácia e consequentemente o potencial de ação destes materiais (Anusavice et al., 2013).

Como complemento dos resultados da resistência adesiva, é utilizada a microscopia eletrônica de varrimento e/ou de transmissão com o objetivo de observar a interface entre o dente e a restauração, avaliando-se, assim, a quantidade e qualidade da penetração do adesivo bem como a sua estabilidade a longo prazo (Van Meerbeek et al., 2000).

3.3.1 Avaliação da resistência adesiva

Para a avaliação da resistência adesiva de um adesivo dentário quando aplicado ao dente podem ser utilizadas duas metodologias, dependendo da direção da força que é aplicada e da área de união que se pretende avaliar. Desta forma, existem macro ou micro testes que podem ser efetuados segundo forças de cisalhamento (*Shear bond strength test*) ou forças de tração (*Tensile bond strength test*). (Pashley et al., 1999; De Munck et al., 2005).

Ao longo do tempo, os macro testes foram sendo abandonados e substituídos pelos micro testes. A utilização de superfícies com áreas grandes de adesão onde a tensão não é distribuída de forma equitativa na superfície aderida, aumenta bastante a probabilidade de falhas coesivas e com isso, a avaliação da interface adesiva torna-se pouco precisa (Sano et al., 1994a; Andrade et al., 2010; Sano et al., 2020).

Por outro lado, a dificuldade no controlo da direção da força aplicada, no caso das forças de cisalhamento (*Shear bond strength test*), também fez com que os *Microtensile bond strength test* (μ TBS) prevalecessem, uma vez que estes, ao utilizarem áreas de adesão muito pequenas e uma força de tração com direção precisa, permitem que esta propriedade mecânica seja aferida de uma forma mais rigorosa (Sano et al., 1994a; Andrade et al., 2010; Sano et al., 2020).

Além disso, estes testes permitem obter muitas amostras a partir de um só dente, reduzindo o coeficiente de variação do método existente nos outros testes de avaliação (Sano et al., 1994a; Andrade et al., 2010; Sano et al., 2020).

Deste modo, o teste de microtração (μ TBS), proposto por Sano et al. (1994a) é amplamente utilizado, sendo considerado o teste mais válido e preciso para avaliar a força adesiva na interface entre o dente e a restauração, diminuindo de forma significativa o número de falhas coesivas (Sano et al.,

1994a; Pashley et al., 1995; Shono et al., 1999; Gallusi et al., 2009; Sano et al., 2020).

Para a realização deste ensaio, os dentes são previamente preparados através de protocolos bem estabelecidos, sendo posteriormente reduzidos a palitos de 1mm² de secção. Estes palitos são colocados numa Máquina de Teste Universal onde são sujeitos a uma força de tração a uma velocidade de 0,5mm/min até ocorrer a fratura (Sano et al., 1994a; Sano et al., 2020).

As fraturas obtidas são observadas numa lupa estereoscópica e classificadas em adesivas (quando ocorrem na interface entre o dente e a restauração), em coesivas (quando fraturam apenas no lado da dentina ou da resina) ou mistas (quando a fratura atinge as duas partes) (Fig. 4) (Shono et al., 1999).

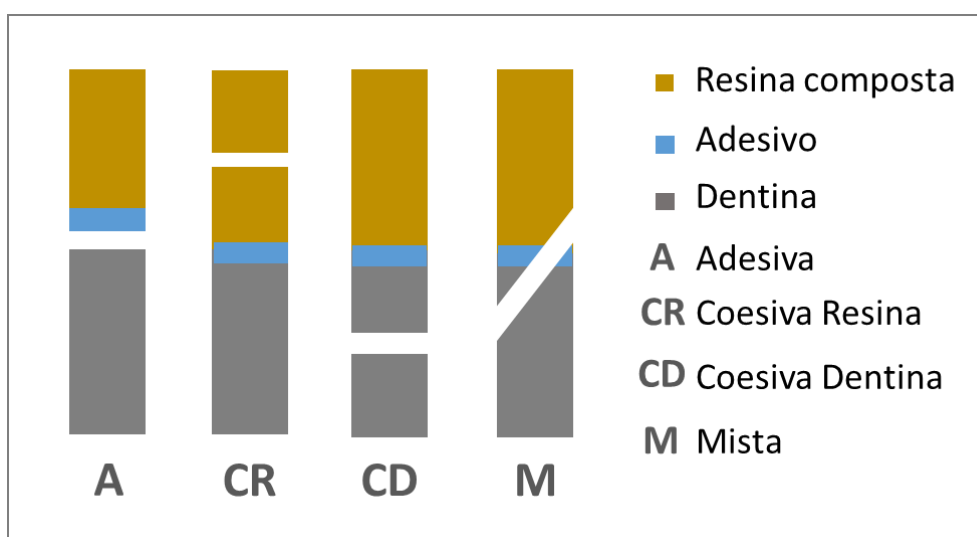


Fig. 4: Representação esquemática do tipo de fraturas obtidas após os ensaios de microtração (μ TBS) na Máquina de Teste Universal

O valor da resistência adesiva obtido em MegaPascal (MPa) é calculado para cada amostra através da força registada pelo equipamento em cada fratura adesiva a dividir pela área do respetivo palito (Sano et al., 1994a; Sano et al., 2020).

A eficácia adesiva dos sistemas adesivos Universais tem sido extensivamente estudada por vários autores desde a sua introdução no mercado (Chen et al., 2015; Rosa et al., 2015; Elkaffas et al., 2018; Siqueira et al., 2018; Cardoso et al., 2019; Cuevas-Suárez et al., 2019). Vários são os estudos que

comparam os valores de resistência adesiva dos diferentes adesivos comerciais quando aplicados segundo os protocolos ER ou SE. Considerando os resultados publicados relativamente aos sistemas adesivos Universais mais estudados e cujas características mais se aproximam dos adesivos experimentais formulados no âmbito desta dissertação, os valores médios de resistência adesiva à dentina registados após 24 horas de aplicação dos adesivos utilizando o protocolo ER variam entre 32,2 e 56,6 MPa (Siqueira et al., 2018).

Já com o protocolo SE o intervalo da média de valores de μ TBS é maior, variando entre 13,4 MPa (Muñoz et al., 2014) a 59,9 MPa (Chen et al., 2015).

De uma forma geral, os sistemas adesivos Universais parecem ser mais adequados para a adesão à dentina, quando aplicados segundo o protocolo SE. No entanto, a eficácia adesiva após 24 horas é idêntica independentemente do protocolo utilizado (ER ou SE).

De acordo com a meta-análise publicada por Elkaffas et al. (2018) a média dos valores de μ TBS à dentina é de 37 MPa para o protocolo ER e 35 MPa para o SE. Rosa et al. (2015) também não encontraram diferenças significativas nos valores de μ TBS entre os dois protocolos quando avaliados após 24 horas da sua aplicação. Estes resultados são ainda corroborados por Siqueira et al. (2018), Cardoso et al. (2019), Cuevas-Suárez et al. (2019).

No entanto, após 6 meses de envelhecimento, os estudos concluem que o protocolo SE resulta numa adesão à dentina mais estável e duradoura (Marchesi et al., 2014; Manfroi et al., 2016; Nagarkar et al., 2019). Este fenómeno tem sido atribuído às ligações químicas estáveis e resistentes à hidrólise que se formam pela presença do monómero de 10-MDP (Muñoz et al., 2015; Sezinando et al., 2017; Wang et al., 2017).

3.3.2 Avaliação da interface adesiva

A microscopia eletrónica de varrimento (MEV) foi das primeiras ferramentas a ser utilizada pela medicina dentária para estudar a estrutura do esmalte e da dentina. Após a descoberta dos sistemas adesivos ER esta técnica passou a ser indispensável para estudar os mecanismos de adesão ao esmalte e à dentina (Nakabayashi et al., 1982).

O princípio de funcionamento de um MEV consiste em utilizar um feixe de

electrões que é guiado por um sistema de bobinas de deflexão, de forma a varrer toda a superfície da amostra, ponto a ponto e por linhas sucessivas. O sinal do detetor é posteriormente transmitido a uma tela catódica sendo o varrimento sincronizado com o do feixe incidente. Esta técnica permite a produção de imagens tridimensionais e de alta resolução da superfície da amostra, fundamentais para avaliar alterações na topografia, composição e textura (Van Meerbeek et al., 2000).

Através da microscopia é possível confirmar a classificação do tipo de fratura obtida em cada palito bem como analisar a superfície de fratura dos dois lados da falha (Shono et al., 1999).

Perdigão et al. (1995) e Schneider et al. (2000) dedicaram-se a estudar o protocolo mais indicado para preparar as amostras através de processos de desidratação, desmineralização, desproteinização e metalização, de forma a ser possível a visualização da interface adesiva. Através desta técnica é possível observar e medir a espessura da camada híbrida formada em toda a sua extensão sendo bastante útil para entender a interação que ocorre entre a resina adesiva e o substrato dentário. Além disso, é possível ainda observar e medir os *resin tags* que se formam dentro dos túbulos dentinários e das microporosidades do esmalte, fundamentais para a microretenção mecânica dos monómeros do adesivo sinalizando a existência de uma adesão eficaz (Van Meerbeek et al., 2000).

A MEV também pode ser associada a um espectrómetro de raios X de energia dispersiva (EDS), permitindo efectuar uma análise elementar das amostras ou caracterizar as ligações químicas existentes. Esta técnica é extremamente útil para avaliar o comportamento dos adesivos após um período de envelhecimento. Assim, utilizando a MEV-EDS é possível através do tratamento das amostras com nitrato de prata observar a quantidade de água presente na interface adesiva, aferindo a nanoinfiltração que ocorre com diferentes adesivos ao longo do tempo (Sano et al., 1995; Pioch et al., 2001).

Analizando os estudos publicados que avaliaram a interface adesiva obtida após a utilização de diferentes sistemas adesivos Universais, é notório a disparidade de resultados. Alguns autores referem que a morfologia da camada híbrida e os *resin tags* formados são mais evidentes após 24 horas quando o

protocolo ER é aplicado, contrariamente ao que acontece após 6 meses de envelhecimento. Para estes autores a interface adesiva revela uma nanoinfiltração mais evidente com o protocolo ER enquanto que o protocolo SE parece contribuir para uma maior estabilidade da interface adesiva quando são utilizados sistemas adesivos Universais (Luque-Martinez et al., 2014; Marchesi et al., 2014; Muñoz et al., 2014).

Outros autores defendem que os resultados da interface adesiva obtida e a quantidade de nanoinfiltração variam consoante o tipo de adesivo utilizado e respectivo protocolo de aplicação (ER ou SE) (Pashaev et al., 2017; Kaczor et al., 2018).

Assim, o *Scotchbond Universal*® (3M ESPE) – SU surge como um dos adesivos que apresenta melhor morfologia da interface, apresentando uma camada híbrida espessa com longos e cónicos *resin tags* quando aplicado com o protocolo ER após 24h. Com o protocolo SE a camada híbrida resultante é muito fina e os *resin tags* muito curtos. Estes resultados seguem um padrão consistente quando avaliados após 6 meses de envelhecimento, continuando a ser o protocolo ER o que apresenta uma interface adesiva mais estável (Fig. 5). Já com o adesivo *All-bond Universal*® (Bisco Inc) - AU os autores verificam o oposto. A nanoinfiltração é menor quando este adesivo é aplicado com protocolo SE (Pashaev et al., 2017; Kaczor et al., 2018) (Fig. 5).

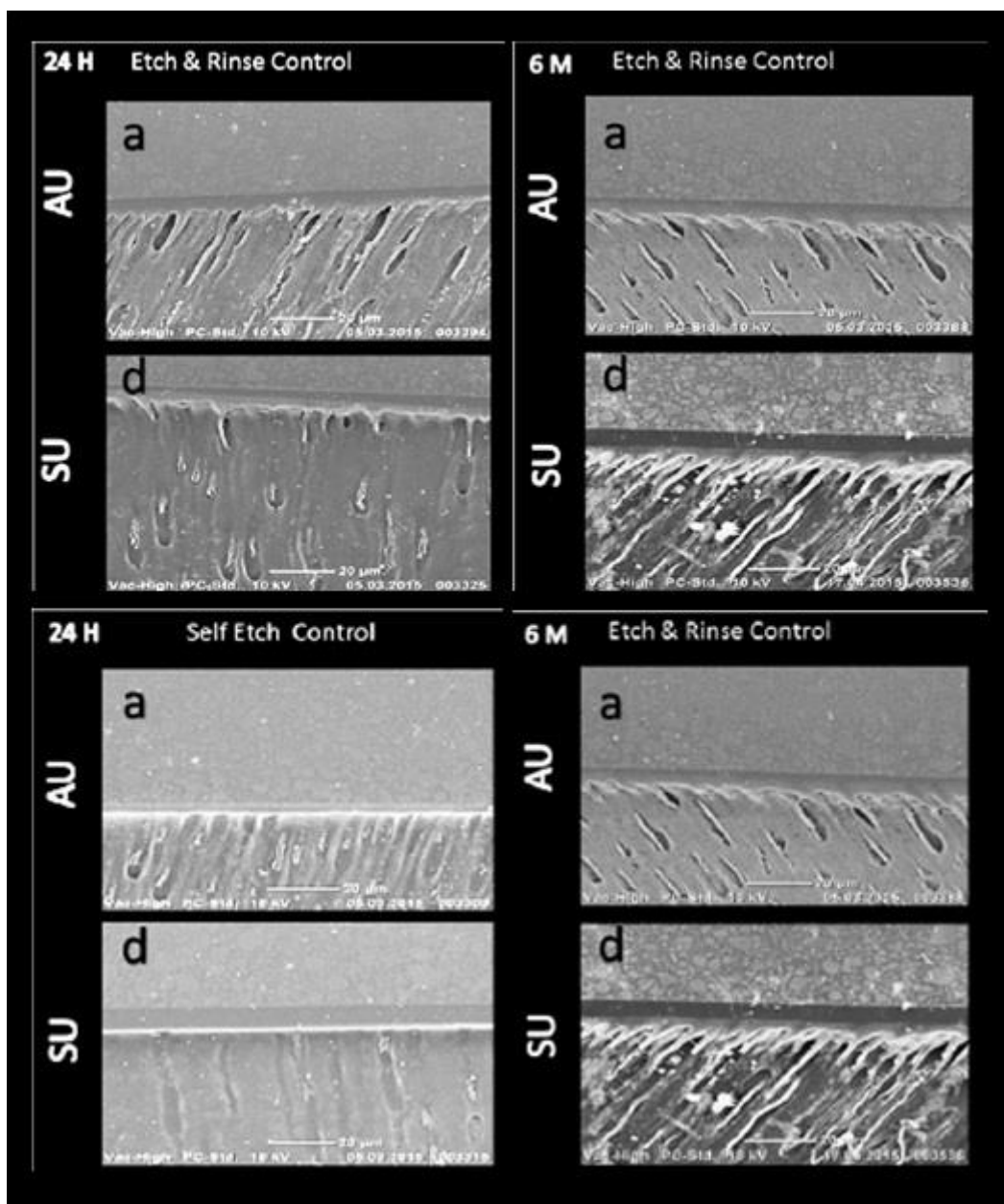


Fig. 5: Imagens de MEV da interface adesiva de dois sistemas adesivos Universais quando aplicados com os protocolos ER e SE, às 24h e após 6 meses de envelhecimento. AU – All-bond Universal® (Bisco Inc.) SU – Scotchbond Universal® (3M ESPE) (Imagem retirada e adaptada de Pashaev et al., 2017)

3.4. Biocompatibilidade dos sistemas adesivos dentários

A biocompatibilidade é definida como “a capacidade de um material responder de forma adequada à solicitação do hospedeiro”. Desta forma, um material biocompatível não deve ser completamente inerte, devendo provocar uma resposta dos tecidos, biológica e equilibrada (Wataha, 2001; Anusavice, 2013).

A toxicidade é a primeira resposta dos organismos e descreve a capacidade de um agente químico provocar uma lesão ou morte num sistema biológico. A toxicidade local provoca uma reação adversa na zona onde o material é aplicado. Quando utilizados materiais dentários, caso sejam tóxicos, estes podem provocar uma reação adversa que ocorre primariamente nas células e tecidos adjacentes como a polpa dentária, o periodonto, a gengiva e a mucosa oral. A inflamação surge como resposta biológica à lesão, seguida da resposta imunomediada. Por fim, poderá também haver uma resposta mutagénica que resulta em alterações ao nível do ADN das células (Anusavice, 2013).

Os sistemas adesivos dentários, quando aplicados, entram em contacto direto ou indireto com os tecidos como o esmalte, a dentina, a polpa ou até a mucosa. Por este motivo, a biocompatibilidade é um dos requisitos mais importantes nestes materiais. Tem sido demonstrado em vários estudos que alguns monómeros constituintes dos adesivos podem difundir-se através dos túbulos dentinários em concentrações que são tóxicas para a polpa (Cetingüç et al., 2006; Jiang et al., 2017; Leite et al., 2018; Schneider et al., 2019).

Pensa-se que esta toxicidade assume uma expressão ainda maior se a taxa de conversão do adesivo após a sua aplicação no dente for baixa. Uma taxa de polimerização baixa permitirá um aumento da libertação de monómeros que se difundem através dos túbulos dentinários podendo chegar à polpa em maiores concentrações. A grande questão ainda se prende com a concentração de monómeros necessária para induzir essa toxicidade (Schneider et al., 2019).

Assim, os principais efeitos adversos dos adesivos dentários estão relacionados, numa fase inicial, com a libertação de monómeros residuais para os tecidos devido à polimerização incompleta dos mesmos. Numa fase mais

tardia, a toxicidade ocorre pela degradação dos monómeros do adesivo devido a processos enzimáticos e hidrolíticos (Koulaouzidou et al., 2009; Gupta et al. 2012; Silva et al., 2014; Caldas et al., 2019).

Como já referido anteriormente, o contato dos adesivos dentários com os tecidos poderá causar uma resposta inflamatória, necrose da mucosa oral e ainda desencadear reações alérgicas. Estas reações poderão ser importantes quando o adesivo ou os monómeros dele libertados entram em contacto com o complexo pulpo-dentinário ou com os tecidos gengivais. Os efeitos adversos dependem da quantidade, do tipo e da toxicidade dos monómeros eluídos, da qualidade da polimerização dos monómeros, bem como do tempo de exposição e da resposta do tecido (da Silva et al., 2008; Sigusch et al., 2009; Elias et al., 2015).

Por este motivo, o desenvolvimento de novos materiais adesivos com menos componentes tóxicos e que utilizem alternativas mais biocompatíveis, tem sido um tema de grande interesse na comunidade científica. Contudo, os estudos que têm sido feitos passam, na sua maioria, pela alteração do modo de aplicação dos adesivos e não tanto pela alteração e/ou substituição do tipo de monómeros de metacrilato utilizados na composição base dos adesivos (Moharamzadeh et al., 2009).

Encontra-se bem documentado na literatura o efeito provocado pelos compostos eluídos dos adesivos comercialmente disponíveis, após polimerização, nas células da polpa e nos fibroblastos gengivais (Bouillaguet, 2004; Schweikl et al., 2006; Schmalz & Arenholt-Bindslev, 2009; Schneider et al., 2019).

No que diz respeito aos fibroblastos gengivais, as principais conclusões dos estudos revelam que a toxicidade dos adesivos está diretamente relacionada com a presença dos monómeros residuais no meio de cultura. Alguns dos efeitos descritos são a capacidade de reduzir a atividade mitocondrial, causar alterações morfológicas e rutura da membrana celular dos fibroblastos. Estes efeitos podem ocorrer caso os sistemas adesivos dentários, aquando da sua utilização clínica, entrem em contacto direto com os tecidos gengivais envolventes (Szep et al., 2002; Kierklo et al., 2012).

Quando em contacto com as células da polpa, os adesivos têm a capacidade de alterar o metabolismo celular, apresentando um grande potencial tóxico para as células, principalmente quando aplicados em zonas de dentina profunda. Na dentina mais próxima da polpa o número e o diâmetro de túbulos dentinários aumenta consideravelmente, tornando-a mais permeável. Por sua vez, os fluídos que sobem pelos túbulos devido à elevada pressão pulpar, chegam à zona da dentina onde o adesivo é aplicado podendo interferir na sua polimerização. Nesta situação, a toxicidade aumenta pela quantidade de monómeros que não polimerizam e que mais facilmente se difundem até à polpa (Leite et al., 2018).

A resposta da polpa depende assim de vários fatores, nomeadamente da composição dos adesivos, do procedimento clínico, da espessura de dentina remanescente e sua permeabilidade e ainda da aplicação ou não de materiais protetores pulpares. Muitos estudos têm demonstrado a importância do papel dos sistemas adesivos como protetores pulpares, tanto em cavidades profundas como diretamente em cima da polpa. Neste sentido, o conhecimento das possíveis reações dos tecidos pulpares quando em contacto com diferentes tipos de adesivos revela-se de extrema importância (Leite et al., 2018; Caldas et al., 2019; Schneider et al., 2019).

De acordo com vários estudos publicados, a citotoxicidade dos adesivos está associada à grande capacidade que os monómeros eluídos têm de produzir radicais livres de oxigénio, causando stress oxidativo (Stanislowski et al., 2003; Chang et al., 2005; Schweikl et al., 2006; Chang et al., 2010; Schneider et al., 2019).

Por outro lado, a degradação dos monómeros leva à formação de epóxidos (p. ex. ácido 2,3-epoximetacrílico). Estes compostos são considerados tóxicos uma vez que podem reagir diretamente com o ADN e originar mutações (Kleinsasser et al., 2004; Styllou et al., 2015). Estes fatores têm sido apontados como estando subjacentes ao mecanismo de apoptose das células da polpa e gengiva (Gupta et al., 2012; Schneider et al., 2019).

Relativamente aos compostos que estão presentes na grande maioria dos adesivos dentários, o Bis-GMA é referido por muitos autores como o composto

mais citotóxico, seguindo-se o UDMA, o TEGDMA e o HEMA, respetivamente (Geurtsen et al., 1999; Noda et al., 2002; Bakopoulou et al., 2009; Gupta et al., 2012; Zhou et al., 2019).

O HEMA, apesar de ser um monómero hidrofílico, de baixo peso molecular, que se difunde muito facilmente pelos túbulos dentinários, apresenta um menor grau de toxicidade quando comparado com o Bis-GMA ou o TEGDMA (Bakopoulou et al., 2009).

Alguns estudos revelaram que o Bis-GMA, apesar do seu elevado peso molecular e carácter hidrofóbico, apresenta uma maior toxicidade para as células, mesmo em concentrações muito baixas (Bakopoulou et al., 2009; Yano et al., 2011). Tendo em conta que o Bis-GMA é amplamente utilizado na composição dos materiais dentários e por norma em concentrações elevadas, esta questão pode ser preocupante. O bisfenol A (BPA) presente na composição daquele monómero, é dos compostos que mais se liberta, podendo ser uma das causas que justifica esta elevada toxicidade. No entanto, apesar dos riscos do BPA para a saúde e da sua elevada atividade estrogénica estarem já perfeitamente documentados (Schafer et al., 1999; Al Hiyasat et al., 2002; Kang et al., 2006; Welshons et al., 2006; Van Landuyt et al., 2011; Chianese et al., 2018), os efeitos citotóxicos deste composto nas células da polpa e da gengiva, após a aplicação de um sistema adesivo seguido da aplicação de uma resina composta no dente, ainda geram alguma controvérsia (Wada et al., 2004; Gupta et al., 2012; Abouelleil et al., 2015; Schneider et al., 2019;).

No que diz respeito à toxicidade sistémica do BPA, enquanto alguns autores demonstraram a sua presença na saliva após a colocação de uma restauração ou selante de fissura (Al Hiyasat et al., 2005; Sasaki et al., 2005; Joskow et al., 2006; Kloukos et al., 2013b; Malkiewicz et al., 2015), outros autores afirmaram que a quantidade libertada é desprezável e segura (Soderholm & Mariotti, 1999; Nomura et al., 2003; Fleisch et al., 2010).

Sasaki et al. (2005) identificaram através de testes de ELISA que o BPA pode estar presente na saliva até 100 ng/mL após a colocação de restaurações à base de resina. Outros autores revelaram que a quantidade de BPA libertado 24 horas após a colocação de uma restauração extensa de um molar pode variar entre 13µg a 30mg (Van Landuyt et al., 2011; Kloukos et al., 2013a).

Contudo, e apesar da disparidade de resultados, é certo que a quantidade de BPA libertada está dependente do número de dentes restaurados bem como da extensão da restauração. No entanto, este composto pode ser detectado na saliva até 3 horas após a colocação da resina (Fleisch et al., 2010; Van Landuyt et al., 2011; Kingman et al., 2012).

A nível local, muitos estudos continuam a revelar que o Bis-GMA é tóxico podendo induzir a apoptose das células da polpa (Yano et al., 2011), e que os efeitos do Bisfenol A podem ser prejudiciais mesmo em pequenas doses (Vom Saal & Hughes, 2005; Bakopoulou et al., 2009; Gupta et al., 2012; Malkiewicz et al., 2015).

Apesar dos fabricantes procurarem produzir novos materiais sem adição de BPA, de acordo com a *American Dental Association* (ADA) (2014), as resinas compostas e os adesivos constituem ainda fontes de exposição a este composto devido aos seguintes fatores:

- 1) libertação de BPA residual presente nos monómeros de Bis-GMA utilizados aquando a formulação destes materiais;
- 2) degradação enzimática dos materiais polimerizados pelas esterases salivares;
- 3) redução do grau de conversão dos monómeros como resultado da fotopolimerização incompleta.

3.4.1 Métodos de Avaliação

Para avaliar a biocompatibilidade dos materiais dentários podem ser aplicados três tipos de testes: *in vitro*, *in vivo* (efetuando-se experiências em animais), e ensaios clínicos (Anusavice et al., 2013).

Os estudos *in vitro*, onde se utilizam culturas celulares, são utilizados como primeira abordagem para a avaliação da segurança dos materiais antes da sua utilização clínica. A simplicidade em termos éticos, a rapidez, o controlo, a reprodutibilidade e a sensibilidade são algumas vantagens apresentadas por este tipo de ensaios. No entanto, na literatura estão descritas diferentes metodologias que poderão dificultar a escolha do tipo de teste mais indicado e até comparações entre resultados. A seleção do tipo de células, a forma como as mesmas são expostas ao adesivo e o método utilizado para avaliar a

viabilidade celular são bastante variáveis entre os autores. Caldas et al. (2019) publicaram muito recentemente um artigo de revisão sistemática onde verificaram que nos dez estudos selecionados apenas quatro utilizaram as normas ISO internacionais (Tuncer et al., 2012; Wegehaupt et al., 2016; Almaroof et al., 2017; Jiang et al., 2017).

O modo como as células são expostas aos adesivos dentários influencia bastante os resultados obtidos. Uma das abordagens foi descrita por Schmalz et al. (1999), onde a exposição das células é efetuada através dos testes de permeabilidade à dentina. Nestes testes, o adesivo é aplicado em discos de dentina e as células são cultivadas dentro de uma câmara que simula a polpa (Fig. 6A). Desta forma, os componentes libertados dos adesivos conseguem atingir as células da polpa através da passagem pelos túbulos dentinários. Apesar de este método parecer ser promissor, na medida em que mimetiza melhor o que acontece clinicamente, é necessário que os mesmos sejam padronizados, para que os resultados obtidos apresentem um maior rigor e exatidão. Este tipo de ensaios poderá levar a conclusões díspares, uma vez que existe um grande número de variáveis difíceis de controlar, tais como: o tipo, a localização, a área e o grau de permeabilidade da dentina utilizada, a variabilidade interindividual, bem como o tipo de protocolo utilizado (*Etch & Rinse* ou *Self-Etch*) (Jiang et al., 2017).

Assim, o método de exposição indireto é o mais comum. Neste método, são efetuados lixiviados do material a testar usando meio de cultura, a 37°C, durante um intervalo de tempo definido, normalmente 24h, durante o qual as substâncias eventualmente tóxicas são difundidas para o meio. As células são posteriormente colocadas em contacto com o meio previamente condicionado. Quando o material a testar é um adesivo dentário, este é o método preconizado na medida em que o que avalia é a viabilidade celular após o contacto com os possíveis monómeros residuais libertados dos adesivos após a polimerização (Fig. 6B) (Koulaouzidou et al., 2009; Cavalcanti et al., 2010; Bianchi et al., 2013b).

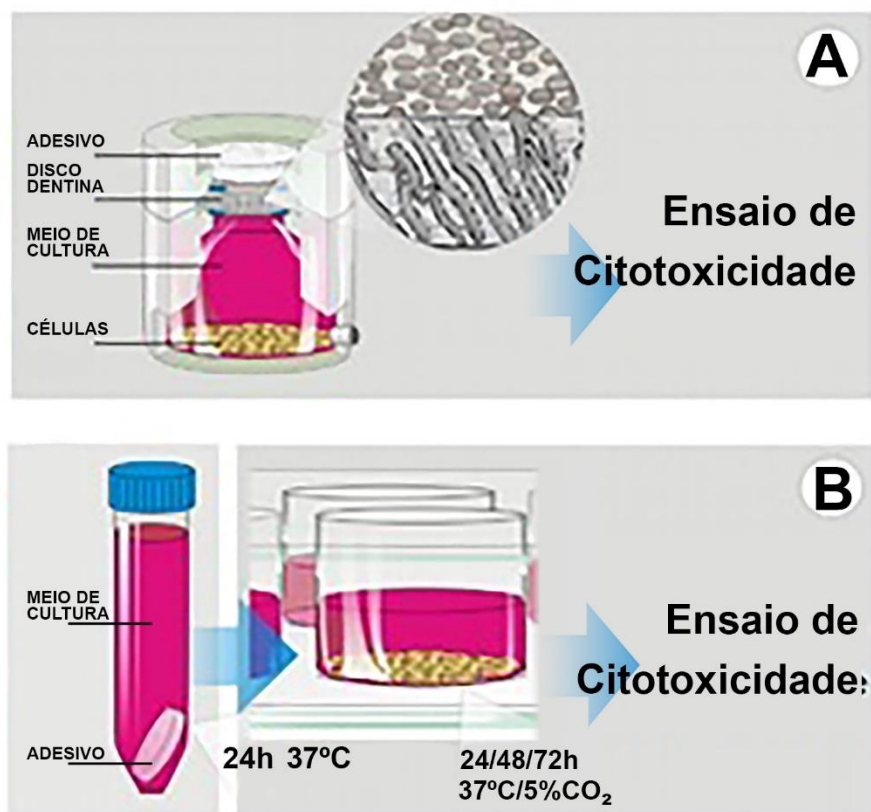


Fig. 6: Representação esquemática dos métodos de exposição das células com os adesivos dentários. **A-** Método de barreira dentinária, onde o material é colocado em discos de dentina e as substâncias tóxicas que são libertadas difundem através dos túbulos dentinários através da pressão pulpar simulada. **B-** Método de exposição indireta onde o material a testar é imerso no meio de cultura e incubado a 37°C por tempos definidos. As células são posteriormente expostas aos meios condicionados (Imagem retirada e adaptada de Caldas et al., 2019).

3.4.2 Tipos de células

Os odontoblastos e fibroblastos provenientes da polpa e da gengiva respetivamente, são considerados o tipo de células mais indicado para estudar os possíveis efeitos citotóxicos dos adesivos dentários. A avaliação da citotoxicidade nestes dois tipos de tecidos (polpa e gengiva) é importante, uma vez que a resposta desencadeada por cada um, bem como a forma como o adesivo poderá entrar em contacto com ambos poderá ser diferente. Isto é, no caso da polpa o contacto é feito por difusão através de um tecido duro (dentina) que é permeável, enquanto que nos casos em que o adesivo contacta com a gengiva, o contacto é direto (Wegehaupt et al., 2016; Caldas et al., 2019).

Outro aspeto bastante importante prende-se com o tipo e a origem das células utilizadas. A maioria dos estudos utiliza linhas celulares imortalizadas com elevado número de passagens, por serem mais simples de obter e comparáveis com um grande número de estudos publicados, em vez de utilizar células primárias. Por outro lado, utilizar células primárias da polpa humana poderá conduzir a informação biológica mais relevante uma vez que são mantidas as características do tecido original, embora estejam associadas a maior variabilidade dependente de características do dador. No entanto, importa garantir que, apesar das várias técnicas descritas, as culturas primárias utilizadas sejam provenientes de células vivas da polpa humana e que não apresentem nenhuma modificação genética (Caldas et al., 2019).

Da revisão sistemática feita por Caldas et al. (2019), 4 dos 10 estudos selecionados utilizaram células humanas (Almaroof et al., 2017; Koulaouzidou et al., 2009; Cavalcanti et al., 2010; Wegehaupt et al., 2016), dos quais, apenas 2 utilizaram células primárias em vez de células imortalizadas (Cavalcanti et al., 2010; Wegehaupt et al., 2016). Quanto ao método de exposição, 5 estudos utilizaram o método de barreira através da utilização de discos de dentina (Fig. 6A) (Lanza et al., 2009; Tuncer et al., 2012; Bianchi et al., 2013b; Wegehaupt et al., 2016; Jiang et al., 2017) enquanto que os outros 5 utilizaram o método indireto (Fig. 6B) (Koulaouzidou et al., 2009; Cavalcanti et al., 2010; Bianchi et al., 2013a; Lee et al., 2016; Almaroof et al., 2017).

Dos resultados obtidos, o estudo conclui que existe a necessidade de padronizar as metodologias utilizadas sendo bastante difícil comparar os resultados entre os vários artigos. Contudo, os autores referem que o método de exposição das células aos adesivos parece resultar em diferenças mais significativas (Caldas et al., 2019).

3.4.3 Ensaio de MTT

O ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) desenvolvido por Mosmann em 1983, tem como objetivo avaliar o número de células viáveis através da medição do metabolismo celular.

É comumente usado para determinar a viabilidade celular em qualquer tipo de ensaio celular. O MTT é um sal hidrossolúvel de tetrazólio, de coloração amarela, que possui um anel de tetrazólio que é reduzido por desidrogenases celulares. Desta forma, as células viáveis que apresentam um metabolismo ativo têm a capacidade de converter o MTT em cristais de formazan, um produto de cor azul-violeta, insolúvel em água e com um máximo de absorvância a 570 nm (Berridge & Tan 1993; Riss et al., 2004; Brescia & Banks, 2009). Estes cristais insolúveis vão sendo acumulados quer no interior das células quer à superfície e no meio de cultura, sendo posteriormente dissolvidos antes da leitura da absorvância. Tendo em conta que apenas as células viáveis irão catalisar esta reação, a quantidade de formazan formado e a intensidade da coloração obtida, é proporcional à quantidade de células viáveis. Assim, o valor de absorvância obtido será baixo quando existir uma diminuição da taxa de sobrevivência celular, sendo um composto considerado citotóxico quando a sobrevivência é inferior a 70% (Riss et al., 2004; ISO 10993-5, 2009).

O ensaio de MTT é assim o método mais comum para avaliar a citotoxicidade dos materiais dentários sendo também o ensaio mais descrito na literatura (Schuster et al., 2001; Bouillaguet et al., 2002; Huang & Chang, 2002; Schmalz et al., 2002; Chen et al., 2003; Moharamzadeh et al., 2009).

O ensaio de MTT é também o ensaio recomendado pela norma ISO 10993-5, (2009). No entanto, importa reforçar que este teste apenas avalia a viabilidade celular. Desta forma, os resultados destes ensaios são muitas vezes suportados com a observação das células ao microscópio eletrónico de varrimento (Lanza et al., 2009; Lee et al., 2016) e complementados com outros testes, como a citometria de fluxo, a fim de caracterizar o tipo de morte celular (necrose ou apoptose) (Tuncer et al., 2012; Lee et al., 2016) ou os efeitos dos materiais no ciclo celular (Bianchi et al., 2013a; Bianchi et al., 2013b; Lee et al., 2016).

4. ESTABILIDADE DA INTERFACE ADESIVA

Os sistemas adesivos têm vindo a alterar de forma significativa a prática clínica diária, dando um grande contributo para a melhoria dos tratamentos que são oferecidos aos doentes. Com a dentisteria adesiva os tratamentos passaram a ser menos invasivos, permitindo conservar bastante a estrutura dentária (Nagarkar et al., 2019).

Uma vez que a técnica adesiva requer a utilização de protocolos sensíveis e complexos, por vezes com a necessidade de aplicação de vários passos, o sucesso clínico depende muito dos materiais e técnicas utilizadas (Carvalho et al., 2012)

Contudo, os materiais disponíveis no mercado apresentam ainda algumas limitações, fazendo com que os investigadores continuem a procurar soluções que permitam uma adesão suficientemente forte ao esmalte e dentina, capaz de suportar a tensão gerada quer do exterior do dente para o interior (microinfiltração), quer no sentido da polpa para o exterior (nanoinfiltração) (Giachetti et al., 2007; Betancourt et al., 2019).

Apesar dos avanços significativos dos últimos anos, os desafios do futuro residem ainda em procurar refinar a interface dentina-resina de forma a melhorar a sua estabilidade a longo prazo, tornando-a mais resistente à hidrólise (Bedran-Russo et al., 2017).

O processo de degradação da camada híbrida inicia-se logo nas 24 horas após a colocação do material no dente, a partir do momento em que o colagénio fica desprotegido, contudo, Pashley et al., (2011) estimam que os efeitos mais notórios se manifestam a partir dos 6 meses.

Como já foi referido, a nanoinfiltração é um fenómeno devastador, uma vez que pode levar à completa falha do sistema adesivo, tendo como consequência o aparecimento de cárie secundária num dente já restaurado, por falta da existência de um selamento perfeito entre a restauração e o dente (Pioch et al., 2001; Bedran-Russo et al., 2017; Betancourt et al., 2019).

Na grande maioria das vezes este fenómeno vai ocorrendo de forma silenciosa e muitas vezes invisível podendo chegar a condicionar bastante o prognóstico do dente. São vários os fatores responsáveis por este efeito adverso,

pelo que, é fundamental o estudo de todas as variáveis que possam interferir com este processo. Continua, por isso, a ser necessário desenvolver estratégias que combatam a degradação da interface adesiva, prolongando a duração dos tratamentos dentários que envolvem a utilização de sistemas adesivos (restaurações diretas e indiretas, cimentação de coroas e facetas, aplicação de selantes de fissura, etc) (Bedran-Russo et al., 2017; Matos et al., 2017; Münchow & Bottino, 2017; Zhou et al., 2019).

4.1. Degradação da camada híbrida

A obtenção da camada híbrida é um fator chave para o sucesso da adesão à dentina. No entanto, a presença de um meio ácido provocado pela utilização dos sistemas adesivos e a existência de colagénio e de água, fazem com que esta camada se torne instável e suscetível à degradação por processos enzimáticos e hidrolíticos (Betancourt et al., 2019).

Assim, a degradação da camada híbrida é um mecanismo complexo que envolve vários intervenientes que em conjunto contribuem para a falha da restauração. As características do próprio adesivo juntamente com a natureza orgânica e húmida da dentina e o tipo de ambiente presente na cavidade oral justificam a ocorrência da microinfiltração e da nanoinfiltração (Kaczor et al., 2018; Zhou et al., 2019).

A Tabela 2 resume os principais mecanismos que estão na base da degradação da camada híbrida e que alternativas têm sido propostas para ultrapassar as dificuldades encontradas.

4.1.1 Adesivo

Durante a infiltração do adesivo, dependendo do grau de desmineralização provocado, da quantidade de colagénio exposto, da viscosidade do adesivo e do seu carácter hidrofílico, o adesivo pode ter maior ou menor capacidade de penetrar entre as fibras de colagénio. Os monómeros hidrofílicos apresentam uma maior capacidade em infiltrar o colagénio, enquanto que os monómeros hidrofóbicos permanecem mais na sua superfície. A dificuldade da infiltração dos monómeros do adesivo tem como resultado a

exposição da matriz orgânica da dentina deixando o colagénio desprotegido e mais susceptível à atividade das enzimas que o degradam (Pashley et al., 2004; Toledano & Osorio, 2015).

Por outro lado, a natureza ácida dos adesivos também tem a capacidade de ativar as enzimas endógenas do colagénio, desnaturando-o. Este fenómeno constitui mais um contributo para a degradação da interface (Pashley et al., 2004; Betancourt et al., 2019).

Por último, a polimerização incompleta dos monómeros do adesivo e o seu conteúdo em solventes aquosos constitui outro mecanismo de degradação da interface adesiva. A presença de água prejudica a polimerização. Os monómeros hidrofílicos que não polimerizam têm uma maior tendência em atrair e mobilizar a água que vem da polpa, favorecendo a formação de canais de água na camada híbrida, consequentemente, a degradação do adesivo é favorecida devido ao aumento da hidrólise dos grupos éster dos monómeros (Ito et al., 2005). A hidrólise da interface adesiva pode ser também agravada pela presença dos solventes aquosos que ficam retidos na camada híbrida devido à sua menor volatilidade (Yiu et al., 2005; Chimeli et al., 2014; Luque-Martinez et al., 2014).

Nos adesivos de um frasco único, este aspeto também pode conduzir à sua degradação pela separação dos conteúdos hidrofílicos e hidrofóbicos (Van Landuyt et al., 2005).

Para além do atrás referido, a polimerização incompleta e hidrólise dos monómeros tem ainda outra possível consequência: a libertação de compostos residuais que poderão ser citotóxicos para os tecidos (polpa, gengiva ou mucosas), como referido anteriormente no tópico sobre a biocompatibilidade dos sistemas adesivos (Caldas et al., 2019; Schneider et al., 2019) (Tabela 2).

4.1.2 Dentina

Além da presença de colagénio, água e cristais de hidroxiapatite, a dentina contém uma quantidade considerável de enzimas que podem prejudicar de uma forma importante a estabilidade da camada híbrida. As metaloproteinases (MMPs) são enzimas que, durante o processo de mineralização da dentina, ficam retidas no interior da matriz endógena do colagénio sob a forma inativa. Através de diferentes mecanismos físicos e

químicos estas enzimas podem ficar ativas desempenhando um papel importante na degradação dos componentes da matriz extracelular (Pashley et al., 2004; Betancourt et al., 2019).

A infiltração incompleta dos adesivos na matriz do colagénio deixa as fibras vulneráveis à degradação pelas metaloproteinases, que quando na presença de um meio ácido e aquoso, degradam o colagénio quebrando as suas ligações peptídeas, com consequente desnaturação da sua estrutura de tripla-hélice (Pashley et al., 2004; Pashley et al., 2011).

A ação das MMP-2 e MMP-9 foi já testada após a utilização de vários adesivos. No entanto, este aspeto torna-se mais evidente nos sistemas ER dado que existe uma maior diferença entre a infiltração do adesivo e a quantidade de desmineralização provocada, que faz com que a infiltração incompleta do adesivo deixe um maior número de fibras de colagénio desprotegidas e bastante suscetíveis à degradação pelas MMPs (Niu et al., 2011; Betancourt et al., 2019).

Além do processo enzimático, o substrato dentinário, pela sua proximidade à polpa, contribui ainda de uma forma importante para a hidrólise da camada híbrida. Os fluídos pulparez que contêm água estão sempre presentes e chegam à camada híbrida através dos túbulos dentinários, devido à elevada pressão intra-pulpar, acelerando assim o processo de nanoinfiltração (Pioch et al., 2001; Sauro et al., 2009; Perdigão et al., 2010) (Tabela 2).

4.1.3 Ambiente da cavidade oral

As restaurações favorecem bastante a acumulação de bactérias e a formação de uma comunidade bacteriana bastante diversa que atua como um biofilme. Apesar do biofilme oral desempenhar uma função fisiológica, as alterações no fenótipo e genótipo da microflora favorecem a formação de um ambiente ácido responsável pela desmineralização do esmalte e da dentina (Bedran-Russo et al., 2017).

A presença do biofilme oral e a acumulação de placa bacteriana favorecida pela falha da interface adesiva conduzem à microinfiltração e ao aparecimento de cárie secundária, sendo uma das causas que leva à necessidade de substituição das restaurações (Mjör et al., 2000; Imazato et al., 2003; Zhou et al., 2019).

O desenvolvimento de sistemas adesivos que apresentem uma ação antibacteriana é uma das linhas de investigação da atualidade que será abordada em maior detalhe no ponto 4.2.

Além disso, as bactérias cariogénicas presentes na cavidade oral têm a capacidade de induzir a biodegradação dos materiais à base de resina pela atividade das esterases. Estas enzimas provocam hidrólise dos monómeros com funcionalidades éster e uretano do adesivo e estão presentes na saliva e na polpa (Shokati et al., 2010).

Os sistemas Self-Etch que apresentam um maior conteúdo de componentes hidrofílicos na sua composição são mais susceptíveis à ação das esterases. Contudo, quando contém o monómero de 10-MDP poderão simultaneamente apresentar uma ação na inibição do crescimento de bactérias devido à componente ácida deste monómero. Assim, o componente hidrofílico dos sistemas adesivos e o pH podem influenciar o crescimento de bactérias (Bourbia et al., 2013; Brambilla et al., 2014).

Tabela 2: Resumo dos principais mecanismos envolvidos na degradação da camada híbrida e principais estratégias propostas para aumentar a estabilidade da interface adesiva.

Material / Substrato	Mecanismo / Característica	Resultado	Consequência	Estratégias propostas
Adesivo	Infiltração incompleta dos monómeros	A matriz orgânica da dentina permanece exposta e o colagénio desprotegido	Aumenta a atividade das enzimas que degradam o colagénio (Pashley et al., 2004; Toledano & Osorio, 2015)	Diminuição da viscosidade do adesivo pela introdução e/ou substituição de monómeros; agitação do <i>primer</i> quando aplicado e/ou adição de mais uma camada de resina adesiva hidrofóbica
	Acidez	Ativação de metaloproteinases	Degradação da camada híbrida pela destruição do colagénio, conduzindo à falha adesiva e perda de selamento (Pashley et al., 2004; Betancourt et al., 2019)	Desenvolvimento de inibidores das metaloproteinases para introduzir na formulação dos adesivos
	Polimerização incompleta	Monómeros que ficam por polimerizar e podem libertar-se	Aumentam a entrada de água para os espaços vazios conduzindo à hidrólise do adesivo (Ito et al., 2005) Os monómeros eluentes aumentam risco de toxicidade para os tecidos (Caldas et al., 2019; Schneider et al., 2019)	Desenvolvimento de novos monómeros e/ou introdução de agentes de co-polimerização para aumentar a taxa de conversão; aumento do tempo de polimerização
	Solventes à base de água e monómeros hidrofílicos	A evaporação dos solventes é mais difícil e há um aumento da quantidade de água que vem da polpa	Hidrólise dos componentes hidrofílicos do adesivo (nanoinfiltração) (Yiu et al., 2005; Chimeli et al., 2014; Luque-Martinez et al., 2014); risco de separação dos conteúdos hidrofílicos e hidrofóbicos (Van Landuyt et al., 2005)	Aumento do conteúdo de monómeros hidrofóbicos; aumento dos solventes voláteis como o etanol; aumento do tempo de evaporação dos solventes
Dentina	Presença de proteases endógenas (MMPs, cisteínas e catepsinas)	As enzimas ficam ativas na presença de um meio ácido	Degradação da matriz de dentina e fibras de colagénio conduzindo a porosidades na camada híbrida e falha da interface adesiva (Pashley et al., 2004; Pashley et al., 2011)	Desenvolvimento de inibidores que inativem a atividade destas enzimas; Biomodificação da dentina
	Humidade da dentina	Favorece a retenção de água na interface adesiva	Hidrólise com consequente perda de adesão e selamento (Pioch et al., 2001; Sauro et al., 2009; Perdigão et al., 2010)	<i>Etanol-wet bonding</i>
Ambiente da cavidade oral	Biofilme	Acumulação de placa bacteriana favorecida pela falha da interface adesiva	Microinfiltração e cárie secundária (Mjör et al., 2000; Imazato et al., 2003; Zhou et al., 2019)	Introdução de agentes antibacterianos e com propriedades de remineralização na formulação dos adesivos; Melhorar a polimerização e acabamento das resinas compostas
	Esterases bacterianas Esterases salivares	Atividade enzimática	Destruição da interface pela hidrólise dos monómeros esteres e uretanos do adesivo com consequente libertação de produtos tóxicos (Shokati et al., 2010)	Introdução de inibidores enzimáticos

4.2. Estratégias utilizadas para estabilizar a camada híbrida

Por forma a prolongar a estabilidade da camada híbrida e consequentemente a diminuição da necessidade de substituição das restaurações dentárias, vários investigadores têm vindo a propor, ao longo dos anos, diferentes abordagens (tabela 3).

Desta forma, acredita-se que a estabilidade da camada híbrida a longo prazo possa ser melhorada, por um lado, com a presença de alguns ingredientes que terão de estar presentes nas formulações dos adesivos e por outro com o desenvolvimento de novas formas de aplicação (Miyazaki et al., 2014; Bedran-Russo et al., 2017; Breschi et al., 2018; Betancourt et al., 2019; Zhou et al., 2019).

A tabela 3 resume as estratégias apontadas para solucionar cada fator que contribui para a instabilidade da interface adesiva.

4.2.1 Alterações no modo de aplicação dos adesivos

No que diz respeito ao modo de aplicação dos adesivos, vários são os autores que se dedicam ao estudo de variantes ao protocolo por forma a otimizar o comportamento dos adesivos. Neste sentido, têm sido propostas diversas abordagens:

1) Aplicar uma ou mais camadas de resina adesiva após a polimerização de forma a aumentar o conteúdo de componentes hidrofóbicos, criando uma camada híbrida mais resistente à nanoinfiltração (Muñoz et al., 2014; Perdigão et al., 2014; Perdigão et al., 2015; Sezinando et al., 2015; Ahmed et al., 2019; Zecin-Deren et al., 2019);

2) Esfregar o adesivo quando aplicado na dentina para aumentar a sua impregnação na rede de colagénio (Thanatvarakorn et al., 2016; Moritake et al., 2018);

3) Prolongar o tempo de polimerização do adesivo (Cadenaro et al., 2009).

4) Estender o tempo de evaporação dos solventes de forma a diminuir a quantidade de solventes residuais que ficam retidos na camada híbrida (Jacobsen et al., 2006; Luque-Martinez et al., 2014; Fu et al., 2017; Saikaew et al., 2019);

Jacobsen et al. (2006), referem que o tempo indicado pelos fabricantes para a evaporação dos solventes é demasiado curto sendo possível eliminar apenas metade do solvente.

Saikaew et al. (2019) verificaram que o aumento do tempo de secagem de 5 para 15 segundos, no caso do *Scotchbond Universal*[®] e de 5 para 30 segundos no caso do *Clearfil Universal Bond*[®], traduzia-se num aumento das forças adesivas a longo prazo. Este aspeto é particularmente importante nos sistemas adesivos que possuem solventes aquosos, como é o caso dos sistemas adesivos Universais.

Outra técnica proposta por Pashley et al. (2007), particularmente interessante nos sistemas adesivos com solventes aquosos, é o “*etanol wet-bonding*”. Esta é uma abordagem ainda conceptual que tem como princípio a substituição da água presente nos espaços entre as fibras de colagénio, por etanol. Desta forma, a matriz de colagénio fica suspensa pelo etanol, dando lugar à infiltração dos monómeros hidrofóbicos do adesivo (Sadek et al., 2010).

Além disso, ao substituir a água por etanol, o meio hidrolítico necessário para o funcionamento das metaloproteinases que degradam as ligações do colagénio é removido (Sadek et al., 2010; Tezvergil-Mutluay et al., 2011).

Porém, esta estratégia adesiva é bastante difícil de implementar, uma vez que obriga a múltiplos passos, maior tempo e é tecnicamente delicada. Por outro lado, os produtos ao serem à base de etanol teriam um tempo de vida bastante curto devido à sua rápida evaporação. Alguns autores reservam ainda algumas dúvidas relativamente a potenciais efeitos adversos na polpa dentária (Ayar et al., 2016).

4.2.2 Desenvolvimento de inibidores enzimáticos

A procura de inibidores das metaloproteinases (MMPs) para serem incorporados na formulação dos adesivos ou na técnica de aplicação dos mesmos, tem sido uma das abordagens mais estudadas nos últimos anos. O objetivo passa por desenvolver um inibidor que tenha a capacidade de inativar estas enzimas prolongando a estabilidade da interface adesiva (Osorio et al., 2014b; Toledano & Osorio, 2015).

Na literatura encontram-se vários estudos sobre diferentes inibidores, no entanto, a aplicação de clorexidina (CHX) é a proposta de inibidor mais estudada (Pashley et al., 2004; Carrilho et al., 2007; De Munck et al., 2009; Tay & Pashley, 2009; Breschi et al., 2010; Carrilho et al., 2010). Apesar disso, pouco se sabe ainda sobre o mecanismo de ação da CHX e a duração do seu efeito na prevenção da hidrólise (De Munck et al., 2009; Carrilho et al., 2010).

Toledano e Osorio (2015), têm publicado vários estudos acerca do efeito terapêutico e protetor que o zinco pode apresentar quando adicionado a sistemas adesivos específicos. Os resultados indicam que os iões de zinco poderão inibir a atividade das MMPs, diminuir a degradação do colagénio desprotegido na matriz de dentina desmineralizada (Osorio et al., 2011; Toledano et al., 2012b) e, ao mesmo tempo, estabilizar a camada híbrida pela precipitação de minerais na interface adesiva (Toledano et al., 2013; Osorio et al., 2014b).

Outros estudos revelaram uma melhoria na estabilidade da camada híbrida com a aplicação de inibidores como o cloreto de benzalcónio, o metacrilato de benzalcónio polimerizável e o EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) (Sabatini & Pashley, 2015; Tekçe et al., 2016). O EDTA quando aplicado como condicionamento prévio da dentina tem demonstrado uma boa capacidade em preservar o colagénio e formar novos minerais, tornando-o menos suscetível à atividade das MMPs (Thompson et al., 2011; Toledano et al., 2012a; Toledano & Osorio, 2015).

4.2.3 Tratamento da dentina

Estudos mais recentes referem que o combate à degradação do colagénio pelas MMPs poderá passar pela biomodificação da dentina, utilizando agentes que possam preparar este substrato para o adesivo, estabilizando o colagénio de forma a aumentar a sua resistência à atividade das enzimas (Seseogullari-Dirihan et al., 2016; Betancourt et al., 2019).

4.2.4 Alteração da composição dos adesivos

Por último, atuar a nível da composição química dos adesivos, pela adição ou substituição dos seus componentes de forma a conferir maior resistência à hidrólise e aumentar a estabilidade da camada híbrida, tem sido outra abordagem utilizada cujos estudos publicados têm demonstrado resultados promissores (Ogliari et al., 2006; Loguercio et al., 2013; Zanchi et al., 2013; Decha et al., 2019). Uma das estratégias propostas, e bastante atrativa, passa pela introdução de nanopartículas e/ou monómeros com o objetivo de conferir ao adesivo propriedades antibacterianas e de remineralização (Cocco et al., 2015; Toledano & Osorio, 2015). Desta forma, o adesivo poderia travar o aparecimento de cáries secundárias, evitando a destruição da interface pela ação das bactérias e, simultaneamente, pela capacidade de remineralização, conseguia voltar a envolver o colagénio desprotegido através da reposição do cálcio, inativando assim as MMPs (Zhang et al., 2015b).

Na literatura encontram-se referências a nanopartículas de amónia quaternária (Cheng et al., 2013; Zhou et al., 2014; Cheng et al., 2015); nanopartículas de prata (Melo et al., 2013; Zhang et al., 2014; Cheng et al., 2015); nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo (Melo et al., 2013; Cheng et al., 2015; Zhang et al., 2015b); nanopartículas de hidroxiapatite (Sadat-Shojai et al., 2010; Besinis et al., 2014) e nano-transportadores poliméricos carregados de zinco (Osorio et al., 2014a).

Quando o protocolo *Self-Etch* é aplicado, utilizar um adesivo que liberte flúor poderá ser uma medida eficaz uma vez que o *smear layer* (composto também por bactérias) é incorporado na camada híbrida. Assim, a incorporação de flúor nos adesivos confere propriedades anti-cariogénicas aumentando a duração da adesão à dentina (Nakajima et al., 2003; Martins et al., 2019).

Outra das propostas que tem vindo a ser estudada centra-se na procura de novos foto-iniciadores que possuam um espectro de absorção tão amplo quanto o da canforoquinona, mas que apresentem uma melhor capacidade de polimerização dos componentes hidrofílicos do adesivo, contribuindo para uma maior taxa de conversão e uma maior resistência da camada híbrida à hidrólise. A pirazolil-ftalazinadiona (PPD) e o óxido de fenilbis (2,4,6-trimetilbenzoil) - fosfina (BAPO) têm sido alguns dos foto-iniciadores estudados como alternativa

à CQ (Anido-Anido et al., 2012; Liu & Wang, 2013; Meereis et al., 2014).

Por último, alguns autores têm vindo a debruçar-se sobre soluções alternativas para a composição dos monómeros-base dos adesivos, com vista a melhorar a sua infiltração dentro da dentina, a qualidade da polimerização e a estabilidade da camada híbrida, obtida mesmo quando na presença de água e saliva (Ogliari et al., 2006; Park et al., 2008; Zanchi et al., 2010; Loguercio et al., 2013; Papakonstantinou et al., 2013; Zanchi et al., 2013; Barbosa et al., 2015; Decha et al., 2019).

A maior parte das propostas reside em adicionar outros monómeros de metacrilato, análogos ao Bis-GMA, que estruturalmente apresentem uma menor viscosidade. A utilização de metacrilato de 2,3-epitiopropilo (ETMA) (Ogliari et al., 2006) ou de dimetacrilato de trimetilolpropano mono alil éter (TMPEDMA) (Park et al., 2008) são exemplos desta abordagem. Este último monómero parece também demonstrar uma resistência superior à atividade das esterases salivares.

A introdução de novos componentes com maior estabilidade hidrolítica, como é o caso dos ácidos fosfónicos do éter acrílico ou as acrilamidas mono ou difuncionais poderão vir a resolver o problema da instabilidade dos monómeros de metacrilato (Moszner & Salz, 2005).

O fluoreto de N,N,N-trimetilamino-N-(2-hidroxipropil)-acrilamida (HMTAF), um monómero de metacrilamida, surge na literatura como um potencial monómero a ser incorporado na composição dos adesivos devido à sua elevada resistência à hidrólise (Decha et al., 2019).

Os problemas que têm sido identificados ainda não se encontram resolvidos, pelo que, a procura de novos compostos e técnicas que possam ser utilizadas clinicamente continuam a ser necessárias (Betancourt et al., 2019). Neste seguimento, a utilização de um dendrímero na formulação de um adesivo dentário poderá colmatar algumas destas lacunas apresentadas pelos sistemas adesivos.

Tabela 3: Principais estratégias propostas para aumentar a estabilidade da interface adesiva.

Modo de aplicação dos adesivos		
Aplicar uma ou mais camadas de resina adesiva hidrofóbica	Muñoz et al., 2014; Perdigão et al., 2014; Perdigão et al., 2015, Sezinando et al., 2015; Ahmed et al., 2019; Zecin-Deren et al., 2019	
Esfregar o adesivo	Thanatvarakorn et al., 2016, Moritake et al., 2018	
Aumentar o tempo de polimerização e qualidade das lâmpadas utilizadas	Cadenaro et al., 2009	
Estender o tempo de evaporação dos solventes	Jacobsen et al., 2006; Luque-Martinez et al., 2014; Fu et al., 2017; Saikaew et al., 2019	
Etanol-wet bonding	Pashley et al.,2007; Sadek et al., 2010; Tezvergil-Mutluay et al., 2011; Ayar et al., 2016	
Desenvolvimento de inibidores enzimáticos		
Inibidores das MMPs	Pashley et al., 2004; Carrilho et al., 2007; De Munck et al., 2009; Tay & Pashley, 2009; Breschi et al., 2010; Carrilho et al., 2010; Osorio et al., 2011; Thompson et al., 2011; Toledano et al., 2012a; Toledano et al., 2012b; Toledano et al., 2013; Osorio et al., 2014b; Sabatini et al., 2015 ; Toledano & Osorio, 2015; Tekçe et al., 2016	
Atividade contra as esterases salivares	Park et al., 2008	
Tratamento da dentina		
Biomodificação da dentina	Seseogullari-Dirihan et al., 2016; Betancourt et al., 2019	
Composição dos adesivos		
Introdução de nanopartículas, monómeros e/ou agentes com propriedades antibacterianas / anticariogénicas e de remineralização	Amónia quaternária	Cheng et al., 2013; Zhou et al., 2013; Cheng et al., 2015
	Prata	Melo et al., 2013; Zhang et al., 2014; Cheng et al., 2015
	Fosfato de cálcio	Melo et al.,2013; Cheng et al., 2015; Zhang et al., 2015b
	Hidroxiapatite	Sadat-Shojai et al., 2010; Besinis et al., 2014
	Flúor	Nakajima et al., 2003; Martins et al., 2019
	Zinco	Osorio et al., 2014a
	Outros	Wang et al., 2014; Cheng et al., 2015; Zhang et al., 2015a; Geraldini et al., 2017
Novos foto-iniciadores	Anido-Anido et al., 2012, Liu & Wang, 2013, Meereis et al., 2014	
alteração do tipo de monómeros-base com vista a melhorar a penetração e resistência à hidrólise	Ogliari et al., 2006; Zanchi et al., 2010; Loguercio et al., 2013; Papakonstantinou et al., 2013; Zanchi et al., 2013; Barbosa et al., 2015; Decha et al., 2019	

5. DENDRÍMEROS

Nas mais diversas áreas da saúde e das ciências biomédicas temos assistido a uma crescente utilização dos dendrímeros (Esfand & Tomalia, 2001; Svenson & Tomalia, 2005).

Os dendrímeros são macromoléculas globulares desenhadas à escala nanométrica que segundo Caminade et al. (2005), apresentam na sua estrutura três domínios principais:

a) um núcleo central constituído por um ou mais grupos atômicos com funções químicas específicas;

b) prolongamentos a partir do núcleo central constituídos por unidades repetidas e organizadas geometricamente que se vão dispendo em diferentes níveis chamados de gerações;

c) grupos funcionais localizados normalmente nas extremidades da macromolécula responsáveis pelas diversas propriedades atribuídas a este tipo de compostos, como por exemplo, a capacidade de polimerização.

Desta forma, os dendrímeros ao apresentarem uma configuração aproximadamente esférica, contrariamente aos tradicionais polímeros lineares, permitem a disposição de diferentes grupos funcionais na sua periferia de forma a exibirem múltiplas funções (Zhang et al., 2015a).

O dendrímero de poliamidoamina (PAMAM) foi a primeira família de dendrímeros sintetizada, e desde 1985 que tem sido extensamente estudada com vista a diferentes aplicações biomédicas (Esfand & Tomalia, 2001).

Das diversas aplicações dos dendrímeros, encontram-se na literatura várias referências à sua utilização como veiculadores de fármacos para diferentes fins, devido ao seu tamanho nanométrico e à sua capacidade para atravessar membranas celulares (Beezer et al., 2003; Svenson & Tomalia, 2005).

Alguns estudos têm também revelado resultados promissores como agentes de remineralização (Li et al., 2013; Zhang et al., 2015a; Zhu et al., 2018).

A introdução dos dendrímeros como substitutos dos principais monómeros usualmente utilizados nos adesivos, é uma mudança total de paradigma na área de dentisteria adesiva. Embora este tipo de macromoléculas

não tenha ainda sido associado à composição de adesivos, uma das etapas deste estudo incluía a síntese do G-IEMA e sua introdução na formulação de um novo sistema adesivo do tipo Universal.

O G-IEMA é um monómero de reticulação dendrítico de segunda geração, derivado do metacrilato de 2-isocianoetilo (IEMA), possuindo oito extremidades de metacrilato que lhe conferem uma organização tridimensional em forma de estrela (Fig. 7). Assim, a polimerização deste dendrímero pode ocorrer nas suas oito extremidades, pelo que é expectável que se alcancem elevadas taxas de conversão que se traduzirão possivelmente numa melhoria das propriedades mecânicas do adesivo. Adicionalmente, este tipo de estrutura em forma de estrela poderá proporcionar um maior preenchimento de espaços entre as fibras de colagénio e dentro dos túbulos dentinários, criando uma camada híbrida mais coesa e resistente à hidrólise, reforçada por *resin tags* com extensões mais longas e difusas.

Yu et al. (2014) observaram que a utilização de G-IEMA em resinas compostas originava uma diminuição da contração de polimerização e um aumento da taxa de conversão destes materiais. Como resultado, o polímero formado apresentava uma menor solubilidade. Este aspeto é clinicamente importante, uma vez que, quanto menor a solubilidade das resinas, menor é o número de monómeros libertados e consequentemente, menores serão os efeitos adversos observados (Costella et al., 2010).

Por outro lado, quanto menor a contração de polimerização, mais adaptada e estanque fica a restauração, diminuindo a entrada de bactérias e consequentemente a formação de cárie secundária (Magali et al., 2006).

Estas características estão na base da seleção deste composto como uma possível alternativa para a composição base do adesivo experimental. Além disso, a sua menor viscosidade, associada à reduzida contração de polimerização, elevada taxa de conversão e baixa solubilidade serviram de suporte à decisão de utilizar o G-IEMA em substituição do usual Bis-GMA.

Desta forma, colmatou-se outra necessidade identificada, que tem a ver com o facto de o Bis-GMA possuir bisfenol A na sua composição. Assim, pensa-se que o G-IEMA ao não possuir bisfenol A possa conferir ao adesivo menor risco de efeitos adversos (Yu et al., 2014).

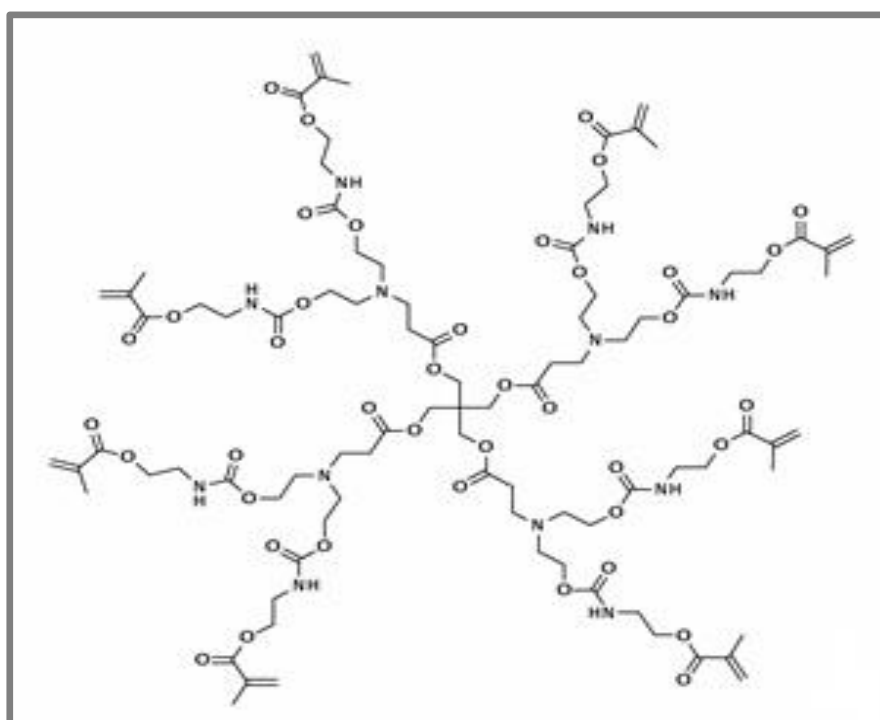


Fig. 7: Estrutura química do G-IEMA

OBJETIVOS

OBJETIVOS

A melhoria das propriedades físico-químicas dos sistemas adesivos e da sua eficácia na adesão à dentina tem sido um assunto de grande interesse para a comunidade científica, já que as limitações que estes materiais apresentam, dificultam o sucesso clínico e a longevidade das restaurações dentárias.

Pelo exposto, pretendeu-se com a realização deste trabalho formular um novo adesivo experimental do tipo Universal. Para isso, do ponto de vista experimental, foi sintetizado um macrómero com uma estrutura dendrítica – o G-HEMA – com vista a ser incorporado no adesivo como alternativa ao usual Bis-GMA. A escolha dos restantes componentes baseou-se nas formulações experimentais descritas na literatura e ainda no conhecimento dos principais constituintes dos adesivos comerciais utilizados como controlo, por substituição e/ou adição de novos monómeros e/ou respetiva concentração.

Com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas, mecânicas e citotóxicas, a formulação do adesivo experimental estudado teve em consideração os seguintes aspetos:

- Melhorar a viscosidade e a taxa de conversão pela introdução do G-HEMA, monómero que apresenta menor viscosidade que o Bis-GMA, e poderá polimerizar através de 8 extremidades. Com este procedimento pretendeu-se melhorar a penetração e fixação do adesivo dentro da dentina
- Aumentar o carácter hidrofóbico pelo aumento do UDMA e redução de HEMA, tornando o adesivo mais resistente à presença de água.
- Utilizar um maior conteúdo de solventes à base de álcool para facilitar a sua evaporação e com isso diminuir a quantidade de água residual que fica incorporada na camada híbrida.
- Melhorar a eficácia adesiva à dentina através das medidas referidas anteriormente concomitantemente com a utilização do monómero funcional 10-MDP para reforçar a adesão micromecânica, através da formação de ligações químicas estáveis à hidroxiapatite.
- Formular um adesivo potencialmente menos citotóxico com a eliminação do monómero Bis-GMA que contém bisfenol A.

ARTIGO I

A NEW EXPERIMENTAL ADHESIVE SYSTEM CONTAINING G-IEMA – PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES

Artigo publicado no Journal of Adhesion
Science and Technology,

(DOI: 10.1080/01694243.2018.1539154)
a 9 de Dezembro 2018

A NEW EXPERIMENTAL ADHESIVE SYSTEM CONTAINING G-IEMA – PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES

Joana Vasconcelos e Cruz^{1,2,3}, José Brito^{1,2}, Mário Polido^{1,2}, Luísa L.Gonçalves^{1,2*},

¹Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM), Campus Universitário, Quinta da Granja, Monte de Caparica, 2829-511 Caparica, Portugal;

²Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz (CiiEM), Campus Universitário, Quinta da Granja, Monte de Caparica, 2829-511 Caparica, Portugal;

³PhD student at Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313, Porto, Portugal;

*Corresponding author: Instituto Universitário Egas Moniz, Campus Universitário, Quinta da Granja, Monte de Caparica, 2829-511 Caparica, Portugal. Tel. (+351) 21 294 6793, Fax (+351) 21 294 6768

E-mail address: lmgoncalves@gmail.com or lgoncalves@egasmoniz.edu.pt

The authors declare that the preliminary results of this work were presented at the 2nd International Congress of CiiEM “Translational Research and Innovation in Human and Health Sciences” (11-13-Jun. 2017 at Egas Moniz - Cooperativa de Ensino Superior CRL, Portugal) as a poster and its abstract published in Annals of Medicine (2018) vol. 50, S1, pag.565 (<https://www.tandfonline.com/toc/iann20/50/sup1?nav=tocList>).

A NEW EXPERIMENTAL ADHESIVE SYSTEM CONTAINING G-IEMA – PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES

Purpose The ultimate goal of this study was the development of a new Bis-GMA-free dental adhesive system with improved adhesive properties. Instead of Bis-GMA, a dendritic macromer (G-IEMA), derived from 2-isocyanatoethyl methacrylate (IEMA), was used and its physicochemical properties were investigated.

Materials and Methods G-IEMA was synthesized and subsequently incorporated into an experimental adhesive (AE2) formulated without Bis-GMA. Double bond conversion (DBC), polymerization shrinkage (PS), water sorption (WS) and solubility (SL) were evaluated and results were compared with three other adhesives: - an experimental adhesive formulated with Bis-GMA (AE1); Scotchbond™ (SBU); and, Futurabond M+™ (FUT). Comparisons between adhesives for DBC, PS, WS and SL properties were performed using One-Way ANOVA and the Kruskal-Wallis test, at the 5% significance level.

Results Statistical analysis of DBC data, using one-way ANOVA, revealed significant differences between adhesives ($p < 0.001$). AE2 presented a significantly higher DBC than SBU ($p < 0.001$) and FUT ($p = 0.004$); no significant differences were observed between AE2 and AE1 ($p = 0.403$) with 60 s of light-curing. Kruskal-Wallis test revealed no significant differences between adhesives ($p = 0.094$) for PS. One-Way ANOVA showed no significant differences among adhesives for WS ($p = 0.213$) and SL ($p = 0.175$).

Conclusion G-IEMA-based adhesive AE2 presented comparable DBC, PS, WS and SL when compared to Bis-GMA-based adhesive AE1. The results obtained so far are promising, revealing that G-IEMA macromer might be a good substitute monomer to prepare Bis-GMA-free adhesive systems.

Keywords Dental adhesives, Bis-GMA-free dental adhesives, One-bottle dental adhesives, G-IEMA, Dendrimers, Physicochemical properties.

1. Introduction

Adhesive systems have been developed since the Mid-1950's, and new adhesives with different adhesion strategies have been introduced in order to increase the efficacy of enamel and dentin adhesion [1, 2]. Depending on the substrate (enamel or dentin) and the technique used, there are two main strategies for promoting dental adhesion: etch-and-rinse systems, with complex components and adhesive procedures; and self-etch adhesive systems, with simpler clinical processes [3, 4]. Recently, the universal adhesives systems were introduced in the market, which allows dentists to choose the adhesive technique [4, 5]. In spite of the advantages presented by universal adhesives [4, 5], they still present limitations that lead to degradation of the interface between the tooth and the restoration [6, 7]. In addition, the in vitro performance of universal adhesives has been reported as material-dependent due to the complexity of their chemical composition [5, 7].

The formation of a secondary caries is the principal reason for the replacement of dental restorations [8]. Many strategies for the development of adhesive materials and techniques have been reported in the literature aiming at reducing micro and nanoleakage phenomena [9, 10, 11]. Low polymerization shrinkage, high double bond conversion, high resin monomers penetration and high hydrophobicity are important characteristics to be considered for the improvement of dental adhesives' bonding efficacy [9].

Concerning chemical aspects, all adhesive systems have acrylic resin monomers that can be considered as their most important components [6, 9, 12]. The Bisphenol-A-diglycidyl-dimethacrylate (Bis-GMA, Fig 1) was introduced by Bowan [12] and has been widely used as the main monomer in dental adhesives due to its ability to diffuse into the tissues, as well as good physical and mechanical properties [12]. However, Bis-GMA has high viscosity and low double bond conversion [13, 14]. To solve these constraints, different monomers with lower viscosities (for example, triethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA) were added to dilute the highly viscous Bis-GMA monomer, in detriment of the polymerization shrinkage [14, 15]. Moreover, Bis-GMA contains Bisphenol-A (BPA) which it is claimed to have cytotoxic effects in and estrogenic activity in

humans [9], acting as an endocrine disruptor [16, 17, 18].

There is much controversy in the literature regarding this subject. Some authors refer that the use of restorative materials containing Bis-GMA might increase the human exposure to BPA [16]; some others defend that Bis-GMA does not hydrolyze into BPA since its chemical structure prevents hydrolysis at the ester linkage [16, 18]. Nevertheless, it is still believed that BPA has the potential to be released from Bis-GMA based dental materials [16]. As a result of this current and controversial issue, many manufacturers seek to remove Bis-GMA from the formulation of dental materials [9, 19].

The Urethane-dimethacrylate (UDMA) is another dimethacrylate monomer commonly used in dentistry that has been considered a potential candidate to prepare Bis-GMA-free dental materials. Compared to Bis-GMA, UDMA has lower viscosity and its structural, highly flexible, urethane linkage may improve the toughness of resin composites based on this monomer [20]. However, the higher volumetric shrinkage of UDMA resin bases might lead to an increased probability of recurrent caries [20].

It was reported that dendritic macromers, due to their chemical structure, could reduce the volumetric shrinkage of the dental materials [21]. As published by Yu et al. [19], G-IEMA (Fig.1) has claimed to be a potential substitute for Bis-GMA-based resins. According to those authors, when compared with Bis-GMA-based resin, resins containing G-IEMA could have higher double bond conversion, comparable or lower polymerization shrinkage and lower water solubility [19, 20, 22]. Such characteristics are of key importance for the improvement of dental adhesion efficacy, reducing the degradation of the adhesive interface and increasing the longevity of restorations [23]. However, as far as we know, G-IEMA has never been used in dental adhesives systems. In fact, to the best of the authors' knowledge, this is the first attempt to use such compound in the formulation of a Bis-GMA-free adhesive with such purposes.

The aim of this study was the formulation of an adhesive system containing G-IEMA instead of Bis-GMA. Physicochemical properties, such as double bond conversion, water sorption and solubility, and polymerization shrinkage were studied. An experimental adhesive containing Bis-GMA and two commercial Universal adhesives systems, Scotchbond Universal (3M ESPE, St. Paul, USA)

and Futurabond M+ (VOCO GmbH, Cuxhaven, Germany), were used to compare such properties among them.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

All reagents and solvents used for the synthesis of G-IEMA were of analytical grade and were purchased to Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), Merck KGaA. (Darmstadt, Germany) and Carlo Erba (Laborspirit Ltd., Loures, Portugal).

Bisphenol-A-diglycidyl-dimethacrylate (Bis-GMA), Urethane-dimethacrylate (UDMA), Triethylene-glycol-dimethacrylate (TEGDMA), 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA), Camphoroquinone (CQ), Diphenyliodoniumhexafluorophosphate (HPDPI), Ethyl4-dimethylaminebenzoate (BDA) were purchased to Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). 10-methacryloyloxy-decyl-dihydrogen phosphate (10-MDP) was obtained from Watson International Ltd. (Kunshan City, China).

2.2 Instrumentation

NMR spectra were recorded on a Bruker Bio Spin ARX 400 spectrometer (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany), operating at 400 MHz. Compounds were dissolved in chloroform (CDCl₃). Chemical shifts for each compound were referenced to the CDCl₃ chemical shift (7.26 ppm) or TMS (0 ppm). Peak assignments were based on comparison with literature data [19, 24]. The following specific abbreviations for nuclear magnetic resonance (NMR) data were used: s, singlet; d, duplet; m, multiplet. Infrared spectra were scanned using the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) spectrometer Spectrum 65 from Perkin-Elmer (Massachusetts, USA). This instrument was equipped with MIRacle™ Attenuated Total Reflectance (ATR) sampling station incorporating a diamond/ZnSe crystal plate (MIRacle, Madison, USA). FTIR spectra were recorded as transmittance values. Background air spectrum was automatically subtracted from sample spectra, prior to further analysis. The pH measurements

were performed using a high accuracy pH meter Crison Basic 20 (Crison Instruments, Barcelona, Spain).

2.3 Chemical Synthesis of G-IEMA

G-IEMA (Fig. 1) was synthesized according to the procedure described by Biao et al. [38]. Prior to chemical synthesis, pentaerythritol tetraacrylate (PETA) was purified by column chromatography (silica, ethyl acetate/petroleum ether 2:5, V/V). The product was isolated at 42% yield and presented the following selected FTIR bands: $\nu(\text{cm}^{-1})$, 1721 $\nu(\text{C}=\text{O}$, ester), 1634 $\nu(\text{C}=\text{C}$, alkene/aliphatic), 1407 δ (CH, alkene), 1165 ν (C–O, ester), 806 γ (CH, alkene). ^1H -NMR: 6.44 (m, 4H, trans CH=CH₂); 6.14 (m, 8H, CH₂=CH); 5.88 (m, 4H, cis CH=CH₂); 4.32 (s, 8H, CCH₂O).

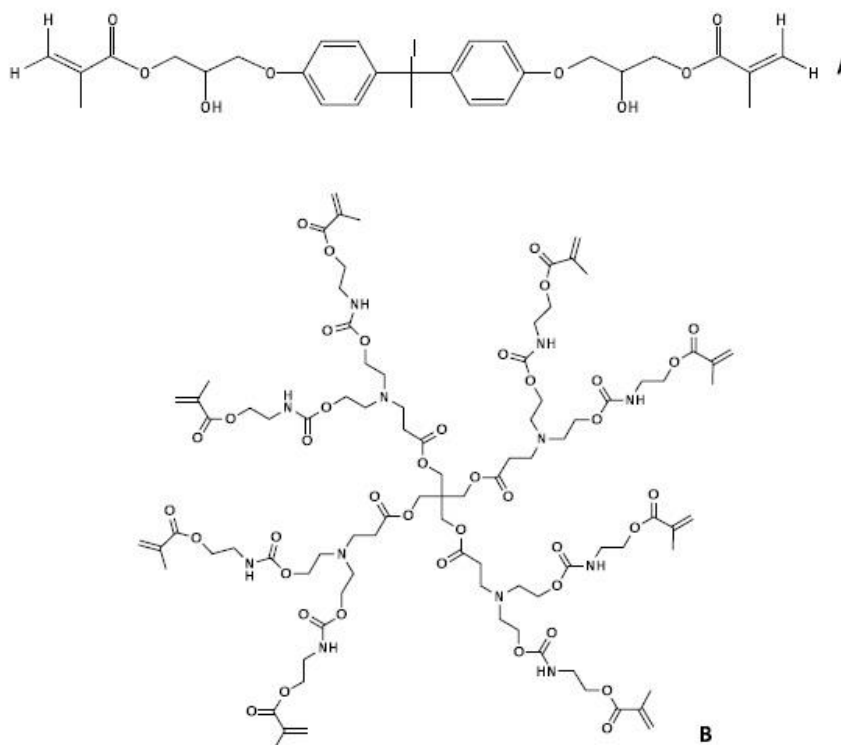


Fig.1: Chemical structures of Bis-GMA (A) and G-IEMA (B)

2.3.1 Synthesis of G-(OH):

The compound was obtained at a 40% yield following described procedures [38] and was used to prepare G-HEMA. Briefly, a mixture of diethanolamine (DEA) (7.5 g; 105.14 g mol⁻¹) and PETA (1.1407 g; 298.29 g mol⁻¹) were dissolved in methanol (70 mL) and stirred at 35 °C under nitrogen in a three-necked flask fitted with a condenser. After 36 h, the reaction was stopped and the solvent evaporated under reduced pressure. The crude product was obtained as a yellowish viscous oil which was then purified through column chromatography (basic aluminum oxide, and ethylacetate: petroleum ether 1:50, V/V). G-OH was obtained as a colorless oil. FTIR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3222 $\nu(\text{O-H, alcohol})$, 1711 $\nu(\text{C=O, ester})$, 1403 $\delta(\text{OH, alcohol})$, 1110 $\nu(\text{C-O, ester})$, 1066 $\nu(\text{C-O, alcohol})$. ¹H-NMR: 3.76 (d, 8H, CCH₂O-), 3.66 (t, 16H, CH₂CH₂OH), 2.84 (t, 8H, COCH₂CH₂N), 2.76 (t, 16H, NCH₂CH₂OH), 2.58 (t, 8H, COCH₂CH₂).

2.3.2 Synthesis of G-HEMA

G-HEMA was obtained at 40% yield according to literature protocols [38]. Typically, a mixture of G-(OH) (2.43 g; 3.14 mmol) and HEMA (3.90 g; 25.12 mmol) in dried CH₂Cl₂ (5 mL) was stirred under dark, at room temperature, for 24 h. The reaction product was precipitated with a large excess of n-hexane. G-HEMA was obtained as an oil which was then purified by column chromatography (silica, chloroform/ethyl acetate/methanol, 5:1:1, V/V/V). The isolated fraction corresponding to G-HEMA presented the following more relevant spectroscopic features (Fig.2): FTIR $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3355 $\nu(\text{N-H, amide})$, 2956 $\nu(\text{C-H, aliphatic})$, 1713 $\nu(\text{C=O, ester})$, 1636 $\nu(\text{C=C, aliphatic/alkene})$, 1544 $\delta(\text{N-H, amide})$, 1453 $\delta(\text{CH, alkene})$, 1158 $\nu(\text{C-O, ester})$, 942 $\delta(\text{CH, aliphatic - alkene})$. ¹H-NMR: 6.13 (s, 8H, trans, CH₂=CH(CH₃)CO), 5.53 (s, 8H, cis, CH₂=C(CH₃)CO), 4.16 (t, 16H, CH₂CH₂OCOC(CH₃)=CH₂), 4.07 (t, 16H, NCH₂CH₂OCONH), 3.67 (s, 8H, CCH₂O-), 3.50 (t, 16H, HNCH₂CH₂OOC), 3.29 (s, 8H, CCH₂OCO), 2.77 (8H, t, OCOCH₂CH₂N), 2.56 (16H, t, 8(NCH₂CH₂OOCNH)), 2.41 (t, 8H, 4(CH₂OOCCH₂CH₂N)), 1.88 (s, 24H, CH₂=C(CH₃)CO). NMR spectrum is presented in Fig. 3.

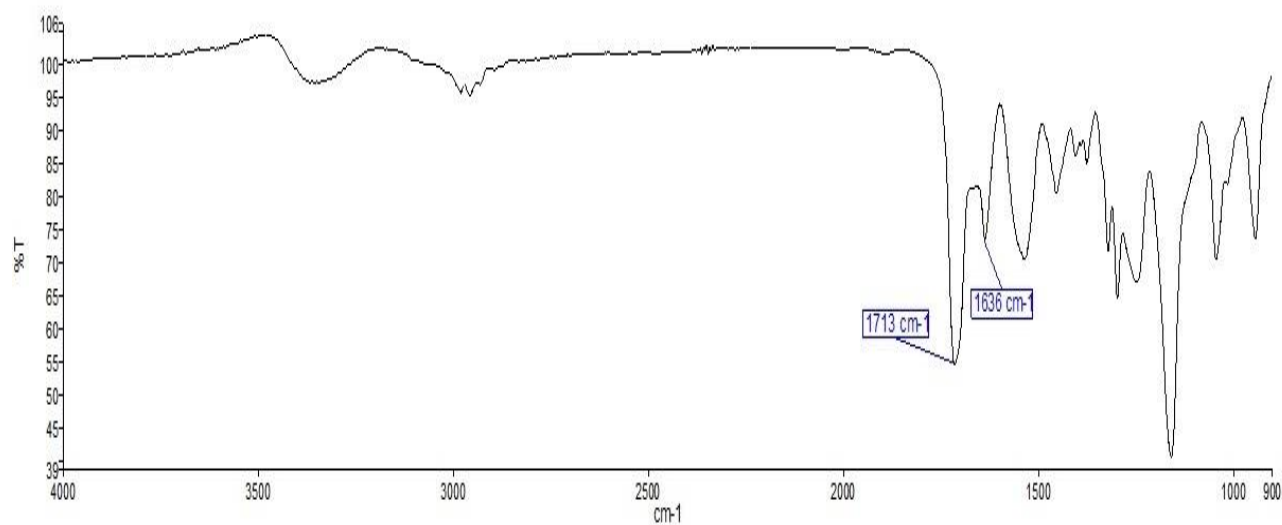


Fig. 2: FTIR spectrum of G-IEMA

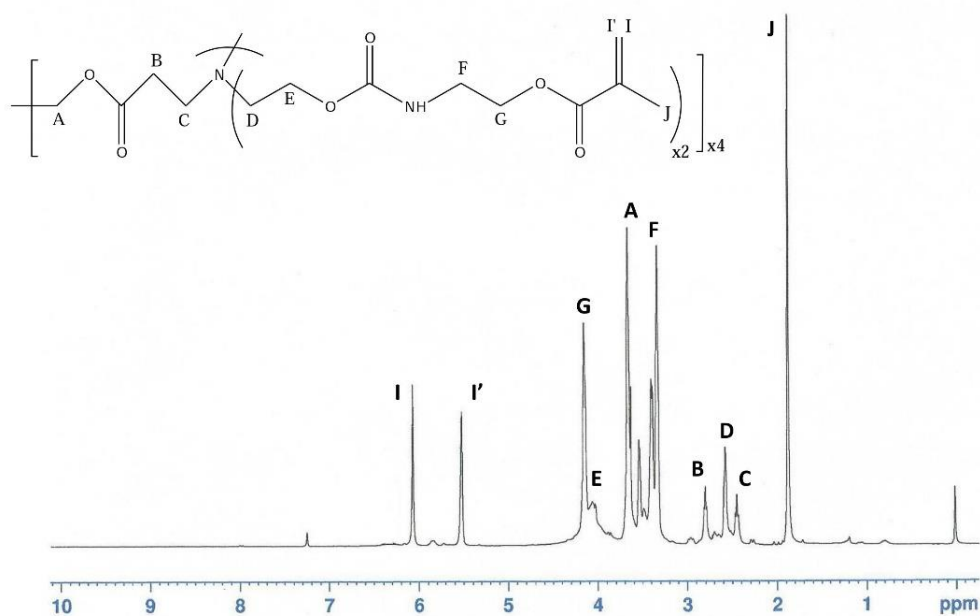


Fig. 3: ¹H-NMR Spectrum of G-IEMA

2.4 Formulation of experimental adhesives

AE1 and AE2 were formulated according to the chemical composition of two commercial adhesives, namely Scotchbond Universal, SBU (3M ESPE, St. Paul, USA) and Futurabond M+, FUT (VOCO GmbH, Cuxhaven, Germany), and also following the description of an experimental adhesive by Feitosa et al. [25]. AE1 was prepared by mixing Bis-GMA and all the components shown in table 1. In the formulation of AE2, instead of Bis-GMA, G-IEMA monomer was added and mixed with the same components as described for AE1 (Table 1). For each adhesive, the pH value was obtained in triplicate immediately after adhesive formulation, at room temperature and under the dark, using a high accuracy pH meter Crison Basic 20 and an electrode 5028 (Crison Instruments, Barcelona, Spain). All procedures were performed according to the manufacturer's instructions.

Table 1: Concentration ranges for each component in commercial and experimental adhesives

Adhesives	COMPONENTS (% w/w)										
	Bis-GMA	UDMA	HEMA	G-IEMA	TEGDMA	BDA	CQ	HPDPI	10-MDP	Ethanol	Water
COMMERCIAL ADHESIVES											
SBU	15-25	0	15-25	0	0	<2	<2	0	—*	10-15	10-15
FUT	10-25	2.5-5	10-25	0	0	0	<2.5	0	2.5-5	10-25	0
EXPERIMENTAL ADHESIVES											
AE1	10-15	5-10	10-25	0	5-10	<2	<2	1,5-2	2-5	10-25	10-15
AE2	0	5-10	10-25	10-15	5-10	<2	<2	1,5-2	2-5	10-25	10-15

SBU - Scotchbond Universal, 3M ESPE, St. Paul, USA; FUT - Futurabond M+, VOCO GmbH, Cuxhaven, Germany; Bis-GMA – Bisphenol A-glycidyl methacrylate; UDMA- urethane dimethacrylate; HEMA- 2-hydroxyethyl methacrylate; G-IEMA – G(2)-isocyanatoethyl methacrylate; TEGDMA – triethylene glycol dimethacrylate; BDA – ethyl4-dimethylaminebenzoate; CQ – camphoroquinone; HPDPI – diphenyliodoniumhexafluorophosphate; 10-MDP - 10-methacryloyloxy-decyl-dihydrogen phosphate;
 * - % 10-MDP not known ; (% w/w- percentage is expressed as weight/weight)

2.5 Measurement of double bond conversion (DBC)

For DBC data acquisition, samples were scanned at 4000-900 cm^{-1} (Fig. 3), according to the following FTIR conditions: 32 interferograms and resolution 4 cm^{-1} with strong apodization. All spectra were recorded as transmittance values, subtracted against background air spectrum and subsequently converted

into absorbance units. To determine the percentage of double bond conversion, the areas of C=C aliphatic bonds at 1636 cm⁻¹ and of carbonyl bonds (C=O) at 1713 cm⁻¹, considered as the internal standard, were measured, before and after photo-polymerization, and were then analyzed after spectra expansion at 1800-1300 cm⁻¹. In the absence of monomers containing aromatic groups, such as in dental materials without Bis-GMA and/or with different monomer blends, the use of carbonyl's stretching vibrations, as an internal standard for the DBC calculation, is already a usual practice [19, 22].

The DBC were calculated according to the equation:

$$\text{DBC (t)} = \frac{(A_{\text{C=C}}/A_{\text{C=O}})_0 - (A_{\text{C=C}}/A_{\text{C=O}})_t}{(A_{\text{C=C}}/A_{\text{C=O}})_0} \times 100\%$$

where $A_{\text{C=C}}$ and $A_{\text{C=O}}$ are the peak areas at 1636 cm⁻¹ and 1713 cm⁻¹, respectively before curing and after curing time (60 s). Peak areas were determined using the software Spectrum 10™, following the baseline method described in the literature [26]. Fig. 4 presents how typically DBC's calculations were performed, using AE2 as an example. Samples for DBC determination were prepared as follows: five disks of each adhesive were prepared, pipetting 140 µL and dispensed on a circular mold to form a 2 mm thick and 9 mm in diameter disk. The disks were light-cured for 60 s, using a LED curing light unit (Coxo Medical Instrument Co., Ltd, London, United Kingdom) with an output intensity of 1200 mW cm⁻². After irradiation, the disks were scanned in order to get the corresponding FTIR spectra.

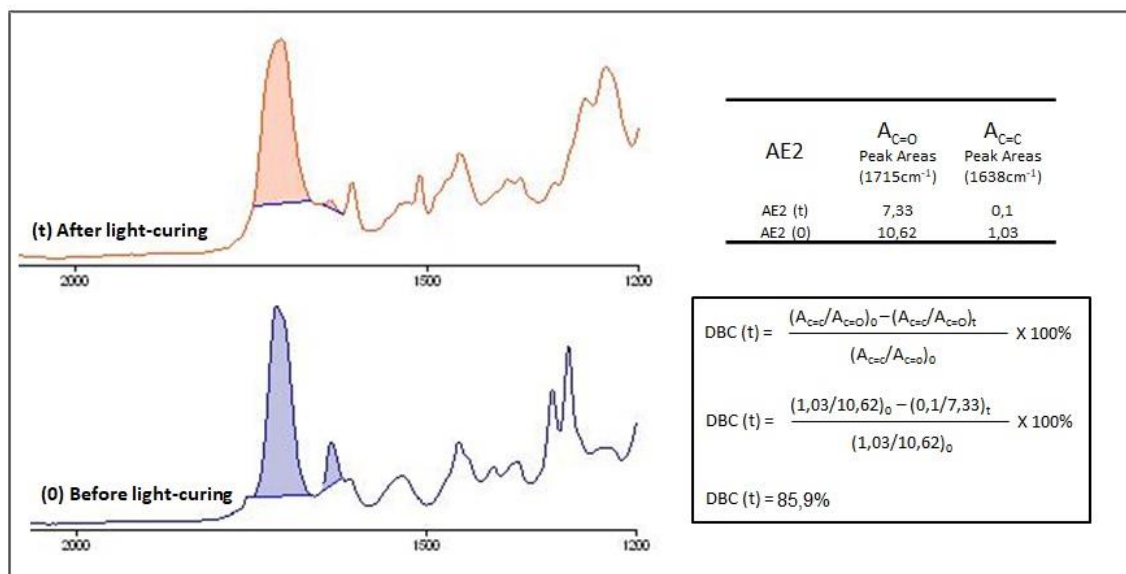


Fig. 4: Schematic representation of the baseline method used for DBC's determinations and corresponding mathematical equation. Calculations for AE2 are given as an example.

2.6 Measurement of polymerization shrinkage (PS)

Polymerization shrinkage was measured following the method reported by Garoushi et al. [27]. The sample densities (n=3 per group) were measured using Archimedes' principle with a commercial Density Determination Kit from Mettler Toledo X (Mettler Instrument Co., Highstone, NJ, USA). The specimens were weighed in air and in water, before and after 60 s of light curing with a LED light with an output intensity of 1200 mW cm⁻² (Coxo Medical Instrument Co., Ltd, London, United Kingdom). Due to the low adhesive's viscosity, an adaptation of the kit's special holder was made to allow sample measurements in water before photo-polymerization. The weight of the specimens was registered and the densities were calculated using the following equation:

$$d = \frac{M_a}{M_a - M_w} \times (d_w - d_a) + d_a$$

where M_a and M_w were the weight in air and water, respectively; d_w is the density of water at the measured temperature in °C, according to the density table

of distilled water and air density (0.0012 g cm⁻³).

The densities were used to calculate the volumetric shrinkage (PS), according to the equation:

$$PS = \frac{d_{\text{after}} - d_{\text{before}}}{d_{\text{after}}} \times 100\%$$

2.7 Measurement of water sorption (WS) and solubility (SL)

ISO 4049 instructions were followed [28] to obtain the degree of water sorption (WS) and solubility (SL). WS and SL were calculated using the following equations:

$$WS = \frac{M2 - M3}{V} \quad S = \frac{M1 - M3}{V}$$

where M1 is the dry mass of the specimen, M2 is the mass of the specimen after immersion in water for 7 days and M3 is the mass of the reconditioned specimen, all masses in µg. V is the volume of the specimen, in mm³.

To obtain the dry mass M1, the specimens were placed into a desiccator containing silica gel and weighed every 24 hours in a scale (Precisa 125 A, Switzerland) with an accuracy of 0.1 mg, until constant mass was achieved (14 days). The specimens were immersed in distilled water at 37 °C, after which they were again weighed to obtain M2. M3 was calculated after the specimens were re-dried following the same procedure used for M1 [28].

The volume (V) of each disk was calculated according to Archimedes' principle, using a 10 mL burette (A type), graduated at 0.5 mL.

2.8 Statistical Analysis

All statistical procedures were performed using IBM SPSS version 24.0 (IBM, New York, USA). One-Way ANOVA, Tukey Test and Kruskal-Wallis Test were applied for comparisons of DBC, PS, WS and SL data between adhesives. The Levene test of homoscedasticity and the Shapiro-Wilk test of normality were

used in assumption checking for ANOVA. All tests were applied at the 5% significance level.

3. Results

G-IEMA was successfully synthesized according to described methodology in a two-step synthetic pathway as can be seen from FTIR and ^1H NMR spectra (Fig. 2 and 3). Both spectra are in full agreement with the published spectroscopic features described by Yu et al. [19].

Mean values and Standard deviation obtained for pH, DBC, PS, WS and SL are presented in table 2. According to obtained pH results, AE2 and SBU are classified as ultra-mild adhesives (both with $\text{pH} > 2.5$) while AE1 and FUT are considered as mild adhesives ($\text{pH} \sim 2$).

The Shapiro-Wilk test has suggested that the residuals of the one-way ANOVA models used in comparisons between adhesives for DBC, WS and SL do not deviate from a normal distribution ($p > 0.05$, in all cases). Moreover, the Levene test of homogeneity has shown that variances are homogeneous between adhesives for DBC and WS ($p > 0.05$) but not for SL data ($p = 0.009$). It should be mentioned that, although such tests have acceptable power when applied to samples of residuals with the size observed in this work for DBC, WS and SL ($N = 20$), it is not guaranteed that the assumption of distribution normality is perfectly met. Nevertheless, these results do not exclude the use of ANOVA in group comparisons, particularly with the homoscedastic DBC and WS data. In the case of heteroscedastic SL data, and although the ANOVA test is robust against this violation when groups are of equal size ($n = 5$), the Kruskal-Wallis test was also applied.

Statistical analysis of DBC data using ANOVA revealed significant differences between the 4 groups of adhesives with respect to the double bond conversion ($p < 0.001$), with observed power in excess of 95% showing that group sizes were not a problem to detect marked differences between groups (Fig. 5). Additionally, it can be inferred from the Tukey test, used for multiple comparisons among groups, that AE2 presented a significantly higher DBC than SBU ($p <$

0.001) and FUT ($p = 0.004$); no significant differences were observed between AE2 and AE1 ($p = 0.403$).

One-way ANOVA showed no significant differences between the same groups of adhesives, for WS ($p = 0.213$) and SL ($p = 0.175$). In view of the small size of the groups and heteroscedasticity of the SL data, these comparisons were also performed using the non-parametric Kruskal-Wallis test, which confirmed the absence of differences between adhesives for water sorption ($p = 0.116$) and solubility ($p = 0.171$).

Due to reduced size ($n = 3$) of the groups considered for polymerization shrinkage (PS), the Kruskal-Wallis test was applied to the obtained data, revealing no significant differences between all adhesives tested ($p = 0.094$) for this physicochemical parameter.

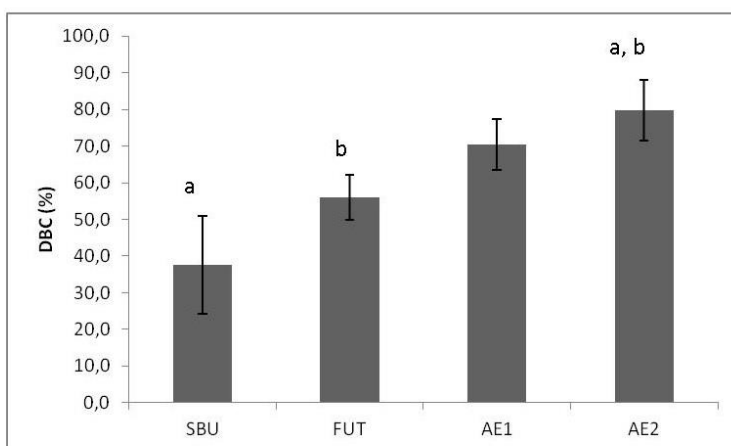


Fig. 5: Double bond conversion of each adhesive after 60 sec of light-curing. The groups with same letters (a,b) show significant differences ($p < 0.05$)

Table 2: Data obtained for the studied physicochemical parameters (Mean values ± Standard Deviation)						
Adhesives	pH	DBC (%)		PS (%)	WS	SL
		60 sec				
SBU	2.95	37.6	13.4 ^a	13.0±1.5	109.5±29.7	50.4±11.3
FUT	1.90	56.0	6.2 ^b	10.4±0.6	148.8±79.1	65.3±29.5
AE1	2.09	70.4±	6.9	10.2±1.0	147.8±64.8	63.6±28.3
AE2	3.50	79.7±8.2 ^{a,b}		10.7±0.4	187.0±25.1	81.8±2.4
DBC – double bond conversion; PS – polymerization shrinkage; WS – water sorption; SL – solubility For DBC, adhesives with same letters (a,b) present significant differences (p < 0.05)						

4. Discussion

Regardless of the advantages presented by universal adhesives [4, 5], they still present limitations that lead to the degradation of the interface between the tooth and the restoration [6, 7]. The formation of a secondary caries is the main reason for the replacement of dental restorations [8] and many strategies have been reported in the literature to develop adhesive materials and techniques aiming at reducing micro- and nanoleakage phenomena [9,10, 11]. Low polymerization shrinkage, high double bond conversion, high resin monomers penetration and high hydrophobicity are important characteristics to be considered for the improvement of dental adhesives' bonding efficacy [9].

Bis-GMA has been one of the most used monomers in dental adhesives, due to its good mechanical properties, low volumetric shrinkage, low volatility and ability to diffuse into tissues [12-15]. However, this methacrylate monomer has a low double bond conversion [13] and presents bisphenol A (BPA) in its composition [16]. BPA is a toxic component widely used in plastic materials [17]. Although the toxicity of BPA in dental materials is quite controversial, there are some references in the literature indicating that the release of Bisphenol A may depend on the source and synthetic methodology of the Bis-GMA used in the adhesive composition [16, 18]. The cytotoxic effects and the estrogenic activity of BPA have received increasing attention in recent years [16-18], and some Bis-GMA-free composite resins are now emerging in the market [9, 19, 22]. In an attempt to produce a less toxic material with improved micro-mechanical retention that undoubtedly contributes to a stronger and more stable adhesion, it was decided to use G-IEMA and to remove Bis-GMA from the formulated adhesive system described therein. Thus, a new adhesive system was prepared using a

synthesized dendrimer (G-IEMA) and its physicochemical properties were investigated. As shown in Table 1, the experimental adhesives AE1 and AE2 contain Bis-GMA and G-IEMA, respectively. The composition and the relative percentage (% w/w) of all of the remaining components are the same.

The choice of G-IEMA, as a substitute for Bis-GMA, was based on following assumptions: - since G-IEMA presents a dendritic structure, forming an 8-pointed star, in contrast to the linear Bis-GMA structure, it is expected that this monomer might contribute to a better interaction with dentin, improving bond strength. Also, due to its structure, this monomer could better fill in the spaces between the dentin collagen fibers while forming a network of resin tags with a superior number of lateral branches. In addition, due to G-IEMA polymerization characteristics, which may occur at 8 tips simultaneously, it is conceivable that DBC increases while PS may decrease. A similar behavior was already observed by Yu et al. [19] for methacrylate-based resins. These properties are important to improve adhesive light-curing inside the tooth with a lower risk of shrinkage failures comparing with a linear monomer, like Bis-GMA, which only cure at two tips.

Results obtained in this study, show that physicochemical properties, such as DBC, PS, WS, and SL, are not significantly different among experimental groups AE2 and AE1, suggesting that G-IEMA could be a good substitute for Bis-GMA-based adhesives.

The versatile new universal adhesives can be used either as a self-etch or an etch-and-rinse system [4, 7], depending on the substrate (enamel or dentin) [2]. However, dentin bonding still remains a challenge due to its organic component (collagen fibers) and water [29]. For that reason, dental adhesives still present some limitations, highlighting the importance of its chemical composition on the improvement of physicochemical properties and, consequently dental restorations longevity [23, 30].

The mechanism of monomers polymerization is an important feature of these materials. Ideally, adhesives should exhibit a high bond conversion, maintaining all adhesive monomers interlocked inside the tooth structure. On the other hand, adhesives should have reduced polymerization shrinkage to prevent the formation of micro-gaps among the adhesive interface during the

polymerization process. It is well known that polymerization shrinkage leads to the formation of a marginal gap and to secondary caries. Thus, high DBC and low PS are fundamental properties to improve bonding stability. However, this goal is often difficult to achieve since a low PS is usually associated to a low DBC [31]. According to some authors, G-IEMA hyperbranched macromer presents high DBC, and low PS and WS [19, 22]. These are important characteristics to be considered when designing a new adhesive. To improve curing degree, two co-polymerization agents (BDA and HPDPI) were used as described by Feitosa et al. [25].

The results of this study revealed that AE2 adhesives presented significant higher values of DBC than commercial adhesives (SBU and FUT), using 60 seconds of polymerization time. No significant differences were observed between AE2 and AE1 adhesives. Nevertheless, DBC mean values obtained for AE2 (79.7%) are within the range of magnitude of published results [19]. We shall emphasize that DBC were determined using 60 seconds of light-curing. This time point was chosen based on published results [19, 22]. However, no further tests were performed to determine the best polymerization time for the adhesives studied herein. In relation to PS, there were no significant differences among groups and PS mean values were within the same range of published data [32].

The relative percentage of hydrophilic and hydrophobic monomers is another important chemical aspect related to the adhesives composition [33, 34]. Water is a challenge for dentin bonding. In fact, water is needed to prevent the collagen fibers from collapsing, but the excess of water that comes from dental pulp invades the adhesive interface contributing to the hydrolysis of adhesive's components [2, 6]. Consequently, both a hydrophilic component and a hydrophobic coat are needed. The first component is needed for the infiltration of adhesive monomers in dentin substrate, preventing the collagen fibers from collapsing [6, 10], and the last component is important to protect the adhesive interface between dentin and resin composite, preventing nanoleakage. In fact, monomer's hydrolysis is one of the main reasons underneath bonding failures [11]. Therefore, dental adhesives should be more hydrophobic and present lower water sorption and solubility [33].

Regarding WS and SL, results obtained also reveal no significant

differences among groups of adhesives. In the literature, WS and SL values for adhesives are very heterogeneous. This heterogeneity is perhaps due to the methodologies used to evaluate these properties, which do not allow any comparison with data obtained in this study and the corresponding values published in the literature [34]. Although the impact of these results on dentin adhesion is still under investigation, for long-term adhesion interface stability it would be advantageous if AE2 had lower WS. However, data obtained are not surprising since G-HEMA presents many hydrophilic groups. Further studies will be developed to optimize the relative percentage of each hydrophilic component in order to improve the system behavior towards water.

Concerning pH, AE2 presented the highest pH value of all groups tested (pH = 3.5), followed by SBU (pH = 2.95) and AE1 (pH = 2.09). FUT were the more acidic adhesive (pH = 1.9). In universal adhesives the pH has a very important role for bonding efficacy, since it influences the ability of the adhesive to condition and promote an interaction depth in dentin and enamel [3, 6, 30, 35]. According to the literature, adhesives could be classified as strong (pH < 1), allowing an interaction of some micrometers depth; mild (pH ~ 2) allowing an interaction depth of 1 μ m; and, ultra-mild (pH >2.5) promoting a nanometric interaction depth. As the universal adhesives could be used either with previous acid application (etch-and-rinse technique) or without using acid (self-etch), the mild adhesives (pH ~ 2) have been considered the most suitable for dentin applications by many authors [3, 35].

Generally, the universal adhesives have acidic functional monomers, like 10-MDP that has the ability to form chemical bonds with calcium in hydroxyapatite, improving bonding efficacy [36-38]. If the adhesives present very low pH values, lower calcium bonding will occur due to the promotion of tooth demineralization, with the concomitant removal of calcium ions. On the other hand, the ultra-mild adhesives could not produce enough demineralization degree to avoid smear layer dissolution and monomers penetration inside the tooth structure. This would make bonding adhesion less effective [6, 36]. For that reason, although results described here did not include adhesion data, it is conceivable that the pH of AE2 should be optimized to a mild type (pH ~ 2).

One of the planned strategies aiming at the reduction of pH for AE2,

includes changes in the % of adhesives' components, such as HEMA and 10-MDP [39]. It is expected that such approach could possibly reduce the pH of AE2, improving simultaneously its physicochemical and mechanical properties.

5. Conclusion

Experimental adhesive AE2 formulated with G-IEMA presented no significant differences for DBC, PS, WS and SL when compare with Bis-GMA containing adhesive AE1. However, further studies are needed in order to improve AE2 acid-base properties. Additionally, the bonding behavior to enamel and dentin of this formulation is under *in vitro* investigation.

The results from this study represent a paradigm shift in the development of new adhesive systems which reinforces its originality. It was shown that the traditional linear crosslinking monomers can be replaced successfully by dendritic type of structures. G-IEMA not only significantly improved adhesive's bond conversion rates, but also reduced the polymerization shrinkage, which contribute to lower the risk of bond failures and subsequent bacteria infiltration that compromise the longevity of the tooth restoration.

Acknowledgments

The authors are grateful to VOCO GmbH (Cuxhaven, Germany) for providing Futurabond M⁺ used in the present study. Moreover, the NMR spectrometer used in this work are part of the national NMR Facility, supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (RECI/BBB-BQB/0230/2012).

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

1. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 1955; 34(6):849-53.
2. Van Meerbeek B, De Munk J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P and Vanherle G. Adhesion to enamel and dentin: Current status and future challenges. *Oper Dent* 2003; 28(3):215-35.
3. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J and Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater* 2011; 27(1):17-28.
4. Rosa WL, Piva E and Silva AF. Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *J Dent* 2005; 43(7):765-76.
5. Munöz MA, Luque I, Hass V, Reis A, Loguercio AD and Bombarda NH. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent* 2013; 41:404–11.
6. Ana Sezinando. Looking for the ideal adhesive – A review. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac* 2014; 55(4):194–206.
7. Sezinando A and Perdigao J. Interfacial characterization of a new universal dentin adhesive. *J Dent Res* 2012; 91. Spec Iss A: abstract number 469 (available from: <https://iadr.confex.com/iadr/ampa/webprogram/Paper158435.html>).
8. Jandt KD and Sigusch BW. Future perspectives of resin-based dental materials. *Dent Mater* 2009; 25(8):1001–6.
9. Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P and Van Meerbeek B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007; 28(26):3757-85.
10. Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH and Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent* 1997; 25(6):441-58.
11. Sano H, Shono T, Takatsu T and Hosoda H. Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. *Oper Dent* 1994; 19(2):59-64.
12. Bowan RL and Rodriguez MS. Tensile strength and modulus of elasticity of tooth structure and several restorative materials. *J Am Dent Assoc* 1962; 64:378-87.
13. Moszner, N. and Salz, U. New developments of polymeric dental composites. *Prog Polym Sci* 2001; 26, 535–576.
14. Sideridou I, Tserki V and Papanastasiou G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials* 2002; 23(8):1819-29.
15. Peutzfeldt, A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci* 1997; 105, 97–116.
16. Soderholm, KJ and Mariotti, A. BIS-GMA-based resins in dentistry: are they safe. *J Am Dent Assoc* 1999; 130, 201–209.
17. Chianese R, Troisi J, Richards S, Scafuro M, Fasano S, Guida M, Pierantoni R and Meccariello R. Bisphenol A in reproduction: epigenetic effects. *Curr Med Chem* 2018; 25(6):748-70.
18. Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL and Landrigan PJ. Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics* 2010; 126(4):760-8.
19. Yu B, Liu F and He J. Preparation of low shrinkage methacrylate-based resin system without Bisphenol A structure by using a synthesized dendritic macromere (G-IEMA). *J Mech Behav Biomed Mater* 2014; 35:1-8.

20. Papakonstantinou, A.E., Eliades, T., Cellesi, F., Watts, D.C. and Silikas, N. Evaluation of UDMA's potential as a substitute for Bis-GMA in orthodontic adhesives. *Dent Mater* 2013; 29, 898–905.
21. Viljanen EK, Skrifvars M and Vallittu PK. Dendritic copolymers and particulate filler composites for dental applications: degree of conversion and thermal properties. *Dent Mater* 2007; 223(11):1420-7.
22. Yu B, Fang LIU, Jingwei HE, Yingcong HE and Zhengmei. Preparation of Bis-GMA-Free Dental Restorative Composites with Dendritic Macromer (G-IEMA). *Advances in Polymer Technology* 2015; 34(4): 215-19.
23. Silva e Souza MH Jr, Carneiro KG, Lobato MF, Silva e Souza P De A and De Góes MF. Adhesive systems: important aspects related to their composition and clinical use. *J Appl Oral Sci* 2010; 18(3):207-14.
24. Gomez MV, Guerra X, Velders AH and Crooks RM. NMR Characterization of fourth-generation PAMAM dendrimers in the presence and absence of palladium dendrimer-encapsulated nanoparticles. *J Am Chem Soc* 2009; 131(1):351-350.
25. Feitosa VP, Sauro S, Ogliari FA, Ogliari AO, Yoshihara K, Zanchi CH, Correr-Sobrinho L, Sinhoreti MA, Correr AB, Watson TF et al. Impact of hydrophilicity and length of spacer chains on the bonding of functional monomers. *Dent Mater* 2014; 30(12): e317–23.
26. Rueggeberg FA, Hashinger DT and Fairhurst CW. Calibration of FTIR conversion analysis of contemporary dental resin composites. *Dent Mater* 1990; 6(4):241-9.
27. Garoushi, S., Lassila, L.V.J. and Vallittu, P.K. Influence of nanometer scale particulate fillers on some properties of microfilled composite resin. *J Mater Sci: Mater Med* 2011; 22, 1645–51.
28. ISO4049:2000, Dentistry - Polymer based filling, restorative and luting materials.
29. Miyazaki M, Tsujimoto A, Tsubota K, Takamizawa T, Kurokawa H and Platt JA. Important compositional characteristics in the clinical use of adhesive systems. *J Oral Sci* 2014; 56(1):1-9.
30. Perdigão J. Dentin bonding – Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater* 2010; 26(2):e24-37.
31. Patel, M.P., Braden, M. and Davy, K.W.M. Polymerization shrinkage of methacrylate esters. *Biomaterials* 1987; 8, 53–6.
32. Barcellos DC, Fonseca BM, Pucci CR, Cavalcanti Bd, Persici Ede S and Gonçalves SE. Zn-doped etch-and-rinse model dentin adhesives: Dentin bond integrity, biocompatibility, and properties. *Dent Mater* 2016; 32(7):940-50.
33. Moszner N, Salz U and Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater* 2005; 21(10):895-910.
34. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, Rueggeberg FA, Foulger S, Saito T, Nishitani Y, Yoshiyama M, Tay FR and Pashley DH. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials* 2005; 26(33):6449-59.
35. Tay FR and Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems I: depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater* 2001; 17:296–308.

36. Perdigão J and Swift EJ Jr. Universal Adhesives. *J Esthet Restor Dent* 2015; 27(6):331-4.
37. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, Inoue S, Tagawa Y, Suzuki K, De Munck J and Van Meerbeek B. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res* 2004; 83(6):454-8.
38. Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, Osaka A and Meerbeek BV. Self-assembled nano-layering at the adhesive interface. *J Dent Res* 2012; 91:376–81.
39. Yoshida Y, Yoshihara K, Hayakawa S, Nagaoka N, Okihara T, Matsumoto T, Minagi S, Osaka A, Van Landuyt K and Van Meerbeek B. HEMA inhibits interfacial nano-layering of the functional monomer MDP. *J Dent Res* 2012; 91(11):1060-5.

ARTIGO II

DENTIN BONDING AND SEM ANALYSIS OF A NEW EXPERIMENTAL UNIVERSAL ADHESIVE SYSTEM CONTAINING A DENDRIMER

Artigo publicado na revista *Polymers*,
(DOI:10.3390/polym12020461) a 17 de
Fevereiro 2020

DENTIN BONDING AND SEM ANALYSIS OF A NEW EXPERIMENTAL UNIVERSAL ADHESIVE SYSTEM CONTAINING A DENDRIMER

Joana Vasconcelos e Cruz ^{1,2}, Mário Polido ^{2,3}, José Brito ^{2,3} and Luisa L. Gonçalves ^{2,3,*}

¹ Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal; joanavcruz@gmail.com

² Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM), Campus Universitário, Quinta da Granja, Monte de Caparica, 2829-511 Caparica, Portugal; mpolido@egasmoniz.edu.pt (M.P.); britojaa@hotmail.com (J.B.)

³ Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz (CiiEM), Campus Universitário, Quinta da Granja, Monte de Caparica, 2829-511 Caparica, Portugal

* Correspondence: lgoncalves@egasmoniz.edu.pt

Abstract: Due to their polymerization characteristics, hyper-branched dendrimers have lately shown to be promising candidates for use in dental materials. In this study, a new dental adhesive system was prepared, using a dendrimer derived from 2-isocyanatoethyl methacrylate (G-IEMA), and its adhesive properties were investigated. The exposed dentin was treated with four universal adhesives (UAs): SBU (Scotchbond Universal™), FUT (Futurabond M+™), AE1 (experimental adhesive with Bis-GMA) and AE2 (experimental adhesive with G-IEMA), using Etch & Rinse (ER) or Self-Etch (SE) protocols. Composite build-ups were prepared and stored for 24 h at 37 °C in distilled water. Composite/dentin beams were prepared with cross-sectional areas of 1 ± 0.3 mm² and μ TBS (Micro-tensile bond strength) test was performed at 0.5 mm/min. Failures modes were evaluated by stereomicroscopy, and bonding interfaces were observed by scanning electron microscopy (SEM). Statistical analysis of μ TBS data was performed using General Linear (GLM) and Linear Mixed Models (LMM). The effect of adhesive type on μ TBS was significant ($p = 0.010$), with AE1 presenting significantly higher μ TBS than SBU ($p = 0.019$). No other differences between adhesives were observed. ER showed significantly better results than SE ($p = 0.019$), and no significant interactions between the adhesives and protocols were determined. Results obtained so far pinpoint the emergence of a new paradigm in the dental materials field, as G-IEMA can be used successfully

as an alternative to Bis-GMA.

Keywords: dendrimers; dental adhesives; G-IEMA; methacrylate; dentin bonding; SEM analysis

1. Introduction

Dentin bonding remains a challenge in clinical practice [1–3]. The high protein and water content of dentin makes it a very heterogeneous and dynamic substrate, increasing the difficulty of the bonding procedure [4]. Dentin bonding is obtained by mechanical retention of the adhesive monomers within the hybrid layer (HL) and the dentin tubules. The HL results from the infiltration and polymerization of the adhesive monomers between the collagen fibers exposed due to partial demineralization of dentin, sometimes enhanced by chemical adhesion [5,6]. The stability of the HL is critical for bonding efficacy; however, the main reason for failure has been attributed to the presence of water and acidic components that enhance enzymatic and hydrolytic degradation of newly formed HL [6].

Determining the dentin wetness for bonding stability is quite difficult. On one hand, water is required for the expansion of the collagen network and diffusion of the adhesive monomers into the dentin. On the other, the excess water causes hydrolysis of the hydrophilic components of the bonding interface, leading to adhesive failure [3,4,7].

There are two strategies for promoting dentin adhesion—the etch-and-rinse (ER) and the self-etch (SE) protocols, both presenting advantages and disadvantages [8]. The ER protocol creates a greater dentin demineralization depth than SE, allowing the adhesive infiltration to form a thick hybrid layer. However, this technique presents a higher risk of dentin dehydration and the collapse of collagen fibers [9]. With SE, demineralization degree is more superficial, and the hybrid layer is thinner. Nevertheless, this protocol allows for better dentin wetness control and maintains higher calcium content availability for chemical bonding with specific functional monomers, which are included in the chemical composition of the adhesives [7,10,11].

Universal adhesives (UAs), or multi-mode adhesives, are a versatile adhesive family designed under the “all-in-one” concept, allowing either ER or SE application depending on the clinical situation or dentists’ choices [12,13].

The composition of UAs comprises of a mixture of hydrophilic and hydrophobic monomers, polymerization initiators, solvents, stabilizers and filler

particles [8,12]. Additionally, most UAs also contain specific carboxylate and/or phosphate monomers, like 10-MDP (10-Methacryloyloxydecyl-dihydrogen phosphate), that bond ionically to calcium from hydroxyapatite [14]. This acidic and functional monomer contributes greatly to strengthen the micromechanical adhesive bonding to dentin when the SE protocol is applied, producing chemical bond adhesion [15]. Clinically, the stability of this type of 10-MDP-mediated chemical bonding has resulted in an excellent 13-year retention rate for the two-step 10-MDP-based Clearfil SE Bond (Kuraray Noritake Dental, Okayama, Japan) [14].

Despite the benefits of the simplified UAs, they still present limitations. In vitro and clinical performances seem to be dependent on their chemical composition [9], with the presence of water being one of the main problems. Water is required for the ionization of the acidic monomers, enabling them to interact with dentin and enamel. Residual water causes hydrolytic degradation to both monomers and collagen, which is enhanced by the acidic pH of the monomer [14].

Another composition related concern is the use of Bis-GMA. Its high viscosity makes it difficult to diffuse into dentin tissue. To reduce viscosity, Bis-GMA is always diluted with other monomers, such as the more hydrophilic triethylene-glycol-dimethacrylate (TEGDMA) and hydroxyethyl-methacrylate (HEMA), which increases the water content and polymerization shrinkage [10,16]. Additionally, Bis-GMA contains bisphenol A (BPA), whose release may have a negative impact on human health. BPA has been described as a cytotoxic agent and may be responsible for estrogenic activity [17], acting like an endocrine disruptor [18,19]. Some authors claim that the use of restorative materials with Bis-GMA might increase human exposure to BPA [19]. However, some others defend that Bis-GMA does not hydrolyze into BPA, due to its chemical structure which prevents hydrolysis at ester linkage [18]. Nevertheless, this current and controversial issue led many manufacturers to seek alternatives for the removal of Bis-GMA from dental material's formulations [17,20].

Considering the abovementioned problems affecting the use of adhesives, it seems that one of the major current challenges is the development of new dental adhesive systems and techniques that reduce the hydrolysis of hybrid

layers, improving bonding longevity and, from a biological point of view, without bisphenol A.

More hydrophobic adhesives with low polymerization shrinkage, high double bond conversion and high penetration ability were considered the main characteristics to take into account to improve bonding efficacy [21]. Consequently, dendritic macromers have recently been introduced in dental materials. Their polymerization characteristics were claimed to improve the double bond conversion [20]. Published studies showed that the use of such monomers, such as G-IEMA (dendrimer of generation (2) derived from 2-isocyanatoethyl methacrylate), in restorative materials could be promising, as it enables the preparation of more hydrophobic materials with better physical and mechanical properties. Due to their polymerization characteristics, hyper-branched macromers are potential candidates to be used in dental materials, as it has the advantage of not containing Bisphenol A in its composition [20].

To the best of the authors' knowledge, G-IEMA has never been used in dental adhesives systems. The first promising results of the incorporation of G-IEMA in a dental adhesive, published by the authors [22], revealed that the replacement of Bis-GMA by the aforementioned dendrimer presented good physicochemical properties, such as Double Bond Conversion (DBC), Polymerization Shrinkage (PS), Water Sorption (WS) and Solubility (SL), indicating that G-IEMA might be a good monomer for use in the preparation of Bis-GMA-free adhesive systems. Based on the results obtained so far, the replacement of Bis-GMA by G-IEMA might produce a Bis-GMA-free UA system that possesses the same dentin bond strength, regardless of the applied protocol. Thus, this study aimed to investigate the dentin adhesion efficacy, using two experimental UA systems: an experimental adhesive formulated with the traditional Bis-GMA, and another with an in-house synthesized dendrimer (G-IEMA).

2. Materials and Methods

2.1. Formulation of the Experimental Adhesives

Based on the disclosed composition of two commercial adhesives, Scotchbond Universal (3M ESPE, St. Paul, USA) and Futurabond M+ (VOCO GmbH, Cuxhaven, Germany), two universal adhesives were formulated (AE1 and AE2). AE1 was prepared by mixing urethane-dimethacrylate (UDMA; 2-[[3,5-trimethyl-6-[2-(2-methylprop-2-enoyloxy)ethoxycarbonylamino]hexyl] carbamoyloxy]ethyl-2-methylprop-2-enoate), bisphenol-A-diglycidyl-dimethacrylate (Bis-GMA; [2-hydroxy-3-[4-[2-[4-[2-hydroxy-3-(2-methylprop-2-enoyloxy)propoxy]phenyl]propan-2-yl]phenol-xy]propyl],2-methylprop-2-enoate), triethylene-glycol-dimethacrylate (TEGDMA; 2-[2-[2-(2-methylprop-2-enoyloxy)ethoxy]ethoxy]ethyl-2-methylprop-2-enoate), hydroxyethyl-methacrylate (HEMA; 2-hydroxyethyl-2-methylprop-2-enoate), deionized water, ethanol, camphoroquinone (CQ; 1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptane-2,3-dione) and 10-methacryloyloxy-decyl-dihydrogen phosphate (10-MDP). All reagents were purchased from Sigma Aldrich, Madrid, Spain, except 10-MDP, which was acquired from Watson International Ltd., Kunshan City, China.

For the formulation of AE2, G-IEMA was first synthesized following the protocol of Yu et al. (2014) [20] with minor changes, as described in detail in [22]. The isolated fraction, corresponding to G-IEMA, presented the following more relevant spectroscopic features: FTIR (Fourier Transform infrared spectroscopy), $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3355 $\nu(\text{N-H, amide})$, 2956 $\nu(\text{C-H, aliphatic})$, 1713 $\nu(\text{C=O, ester})$, 1636 $\nu(\text{C=C, aliphatic/alkene})$, 1544 $\delta(\text{N-H, amide})$, 1453 $\delta(\text{CH, alkene})$, 1158 $\nu(\text{C-O, ester})$, and 942 $\delta(\text{CH, aliphatic-alkene})$. $^1\text{H-NMR}$ (proton nuclear magnetic resonance): 6.13 (s, 8H, trans, $\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO}$); 5.53 (s, 8H, cis, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}$); 4.16 (t, 16H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$); 4.07 (t, 16H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCONH}$); 3.67 (s, 8H, $\text{CCH}_2\text{O-}$); 3.50 (t, 16H, $\text{HNCH}_2\text{CH}_2\text{OOC}$); 3.29 (s, 8H, CCH_2OCO); 2.77 (8H, t, $\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.56 (16H, t, $8(\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OOCNH})$); 2.41 (t, 8H, $4(\text{CH}_2\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{N})$); and 1.88 (s, 24H, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}$).

AE2 was prepared using the same components as described for AE1, but adding G-IEMA instead of Bis-GMA (Table 1). Concentration ranges for each component in commercial and experimental adhesives are presented elsewhere [22].

The pH of the adhesives was assessed using a high accuracy pH meter Crison Basic20 (Crison Instruments, Barcelona, Spain) (Table 1).

Table 1: Experimental groups and their respective main components.

Adhesive	Primary Ingredients	pH	Experimental Groups	n	Adhesive System Applied
Scotchbond Universal (3M ESPE, St. Paul, USA), Lot #587502	10-MDP; HEMA; Bis-GMA; ethanol; TEGDMA; silane treated silica; water; CQ	2.95	SBU-ER	5	Etch-and-rinse
			SBU-SE	5	Self-etch
Futurabond M+ (VOCO GmbH, Cuxhaven, Germany), Lot #1624201	HEMA; Bis-GMA; ethanol; Acidic adhesive Monomer; UDMA; pyrogenic silicic acids	1.9	FUT-ER	3	Etch-and-rinse
			FUT-SE	3	Self-etch
AE1 (experimental adhesive formulated with Bis-GMA)	10-MDP; Bis-GMA; HEMA; UDMA; TEGDMA; water; ethanol; CQ	2.09	AE1-ER	3	Etch-and-rinse
			AE1-SE	5	Self-etch
AE2 (experimental adhesive formulated with G-IEMA)	10-MDP; G-IEMA; HEMA; UDMA; TEGDMA; water; ethanol; CQ	3.5	AE2-ER	5	Etch-and-rinse
			AE2-SE	3	Self-etch

10-MDP: 10-methacryloxydecyl dihydrogen phosphate; HEMA: hydroxyethyl methacrylate; Bis-GMA: bisphenol a diglycidyl ether dimethacrylate; TEGDMA: 1,10-decamethylene glycol dimethacrylate; CQ: camphorquinone, G-IEMA: dendrimer of generation (2) derived from isocyanatoethyl methacrylate; SBU: Scotchbond Universal™; FUT: (Futurabond M+™); ER: Etch & Rinse; SE: Self Etch.

2.2. Specimen Preparation

The protocol followed in this study was approved by the Ethics Committee of the Instituto Universitário Egas Moniz, Monte da Caparica, Portugal.

Thirty-two caries-free extracted human molars, stored at 4 °C in 1.0% chloramine T for a maximum of 1 week following extraction, were selected. The

roots were cut, and the superficial dentin was exposed under water irrigation by cutting the enamel from the occlusal tooth surface using a hard tissue microtome (Accuton 50, Struers A/S, Ballerup, Denmark). Each dentin surface was ground with 600-grit silicon carbide abrasive paper to produce a standard smear layer. The teeth were then randomly assigned to eight different groups according to the adhesive used, as well as the protocol (SE or ER). The main characteristics of the groups tested are described in Table 1.

The commercial universal adhesives were then applied in each assigned group, with ER or SE techniques according manufacturer's instructions.

The universal adhesives were applied on dentin by mixing a brush tip for 20 s, and gently air blown for 5 s. Polymerization was promoted with a halogen light-curing unit Optilux 501 (Kerr, Middleton, USA) for 10 s. For the etch-and-rinse technique, the dentin surfaces were previous etched with 32% H₃PO₄ Scotchbond™ Universal Etchant (3M ESPE, St. Paul, USA) for 15 s, rinsed with water for 15 s and dried carefully with a soft blow of air to leave a moist surface. After each adhesive application, 6–8 mm high resin build-ups were formed in 2 mm increments with a universal light-cured hybrid composite resin—Grandio (VOCO, GmbH, Cuxhaven, Germany). Each layer of the composite was separately light-activated for 40 s according manufacturer's instructions. Light intensity output was monitored at 600 mW/cm² after every tenth use with a radiometer, Demetron 100 (Demetron Reserach Company, Danbury, USA).

The teeth were identified and stored in distilled water at 37 °C for 24 h in an incubation oven (Memmert INE 400, Memmert, Germany).

2.3. Micro-Tensile Bond Strength (μ TBS)

After a 24 h storage period, teeth were longitudinally sectioned using a hard tissue microtome (Accuton 50, Struers A/S, Ballerup, Denmark) to yield 1 mm thickness slabs. These slabs were further sectioned into beams with cross-sectional areas of $1 \pm 0.3 \text{ mm}^2$, following the method described by Shono et al. [23]. All beams were attached to a μ TBS (micro-Tensile Bond Strength) testing jig with a cyanoacrylate adhesive (Zapit, Dental Ventures of America Inc.,

Corona, CA, USA) and loaded to failure under tension, using a universal testing machine equipped with a 5 kN loading cell (Shimadzu AG-50kNI SD MS, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) at a crosshead speed of 0.5 mm/min. The fractured beams were carefully removed from the jig, and the cross-sectional area at the site of failure was measured to the nearest 0.01 mm with a digital caliber (Sylvae Ultra-Call/Fowler Inc., Newton, MA, USA). Fractured specimens were examined with a stereomicroscope (Olympus/DeTrey, Konstanz, Germany) at 40× magnification to determine the mode of failure (adhesive, cohesive or mixed). All the experimental procedures were performed by the same operator in order to reduce random errors.

2.4. SEM Analysis

For each group, two teeth were prepared to be analyzed by SEM (Scanning Electron Microscopy). The dentin surface was exposed, and the adhesives and resin build-ups were applied according to the same procedure described in 2.2. The teeth were then stored in distilled water at 37 °C for 24 h. After this period, samples were immersed in a glutaraldehyde and sodium cacodylate fixation solution according to Perdigão et al. [24]. The specimens were sectioned with a hard tissue microtome (Accuton 50, Struers A/S, Ballerup, Denmark) in a perpendicular plan to the adhesive interface, and the un-hybridized dentin was removed after demineralization and deproteinization procedures [25]. They were then dehydrated using increasing concentrations of ethanol (70%, 95% and 100%) and subsequently dried by immersion in methylidisilazane (HMDS) [24].

Finally, samples were subjected to a metallization process, where each one was placed on a self-adhesive double-sided carbon tape and then coated with a thin film of approximately 8 nm of Au/Pd on a Q150T ES Turbo-Pumped Sputter coater (Quorum Technologies, Q150T Turbomolecular-pumped coating system, UK). The hybrid layer was then observed at SEM (FEG-SEM JEOL, model JSM7001F, Tokyo, Japan) using 500× and 2000× magnifications.

2.5. Statistical Analysis

In the experimental design implemented in this investigation, the measurement of a variable (adhesive μ TBS, in MPa) in different specimens (beams) that originated from the same experimental unit (tooth) was performed. Taking into account that the measures were repeated in systematic way, the effects of possible correlations and heterogeneous variances, introduced by the results obtained in the different specimens, could not be ignored and had to be modeled in the data analysis.

To control these effects introduced by the repeated measures, the general linear model (GLM) was fitted to the collected data, in which the result of the measurement in the different specimens of the same experimental unit was represented by the mean values obtained in each one of these specimens. Thus, the GLM approach (part A) considered data collected in 32 teeth, considering that each one of these experimental units was represented by the mean of the μ TBS calculated in all beams obtained in this tooth. Since they were calculated in different experimental units, these averages were considered independent observations, as required in GLM analysis.

Another method used to control the effects of the correlations and heterogeneous variance possibly introduced by the repeated measures was a linear mixed model (LMM) fitted to the collected data, which combines the fixed effect of the factors (type of adhesive and protocol) and the random effects in the structure of covariance of the residuals (part B).

Contingency tables and the chi-square test were used to assess the differences in proportions of the observed failures modes, amongst the four adhesives (see Supplementary Information).

3. Results

3.1. Dentin μ TBS

3.1.1. Part A: GLM Analysis of μ TBS Data

A linear model was fitted to collected data, in which the dependent variable represented the mean value of the dentin sticks μ TBS of the 32 teeth, with independent factors defined by the type of adhesive (SBU, FUT, AE1, AE2) and protocol (ER, SE), as presented in Table 2.

Prior to the analysis, the assumptions of homogeneous variances and normal distribution were tested and validated, using the Levene test ($p > 0.05$) and the Shapiro–Wilk test ($p > 0.05$) respectively. Regarding the normality, the results should be considered with caution, due to the reduced statistical power of the test when applied to small samples.

Under these conditions, the GLM model concluded that:

There was no significant interaction between the independent factors (adhesives and protocols) ($p = 0.153$).

There were significant differences between the adhesives ($p = 0.023$), with an observed power of 74.9%.

Post-hoc tests concluded that AE1 presented a significantly higher μ TBS than SBU ($p = 0.012$), with no differences among the other adhesives.

The ER protocol showed significantly better results compared with SE protocol ($p = 0.015$), with an observed power of 71.0%.

Table 2: Mean values and standard deviations (S.D.) of the dentin micro-tensile bond strength (μ TBS, in MPa) for the tested groups.

GROUPS	PROTOCOL	μ TBS		N
		Mean	S.D.	
SBU-ER	ER	26.20	6.46	5
FUT-ER		33.96	3.22	3
AE1-ER		33.38	6.57	3
AE2-ER		36.50	4.25	5
SBU-SE	SE	23.69	3.15	5
FUT-SE		24.10	2.62	3
AE1-SE		34.66	8.41	5
AE2-SE		25.57	7.48	3

3.1.2. Part B: LMM Analysis of μ TBS Data

The use of LMM for the analysis of data collected, with measurements on dentin sticks obtained in the same tooth, requires that the covariance structure between the repeated observations in this experimental unit be known. In the selection of an appropriate and simple covariance structure, comparisons with the unstructured covariance (UN) matrix are usually performed since this represents the most complex covariance structure that can be fitted to the data. However, due to the high number of sticks obtained for each tooth in this study, the UN method did not converge to a solution that guarantees the accuracy of the covariance parameters of the model.

In these conditions, several matrices were considered, and the quality of the adjustment obtained with the different matrices was compared using the Akaike (AIC), Hurvich and Tsai (AICC), Bozdogan (CAIC) and Bayes and Schwarz (BIC) information criteria, which is the most recommended method in view of the wide range of covariance structures considered. Therefore, the selection of the appropriate structure considered matrices for homogeneous variances, namely the Scaled Identity (SI), first-order autoregressive moving average (ARMA(1)), Compound Symmetry (CS) and Toeplitz structures, and matrices for heterogeneous variances, such as the Diagonal, Huynh–Feldt and first-order autoregressive structures (AR(1): Heterogeneous).

According to the various information criteria, particularly the recommended AIC and BIC, and following the accepted interpretation that a smaller value is better, the best adjustment quality of the model was obtained with a covariance

structure of compound symmetry (CS) (Table 3). This matrix reflects the existence of homogeneous variances and homogeneous correlations.

Under these conditions, the model obtained allowed us to conclude that:

- No significant interaction was observed between the adhesive and protocol factors ($p = 0.125$).

- The effect of the adhesive type was significant ($p = 0.010$), as well as of the protocol ($p = 0.019$), with better results observed for the ER approach.

- Multiple comparisons showed significant differences only between the AE1 and SBU adhesives ($p = 0.019$).

In conclusion, the results obtained by GLM and LMM analysis were coincident, regarding the magnitude of the effects of the main factors and the lack of interactions.

Table 3: Information criteria for different covariance structures.*.

1. Inform ation Criteria	2. Covariance Structures							
	3. I	4. S	5. C	6. D	7. A	8. H	9. A	10. T
11. -2 Restricted Log Likelihood	11. 4 278.983	12. 4 261.939	13. 4 231.212	14. 4 278.313	15. 4 278.983	16. 4 264.345	17. 4 228.351	
18. Akaike 's Information Criterion (AIC)	19. 4 280.983	20. 4 265.939	21. 4 289.212	22. 4 282.313	23. 4 338.983	24. 4 270.345	25. 4 286.351	
26. Hurvic h and Tsai's Criterion (AICC)	27. 4 280.990	28. 4 265.962	29. 4 292.771	30. 4 282.337	31. 4 342.794	32. 4 270.392	33. 4 289.909	
34. Bozdo gan's Criterion (CAIC)	35. 4 286.235	36. 4 276.442	37. 4 441.517	38. 4 292.817	39. 4 496.540	40. 4 286.101	41. 4 438.656	
42. Schwar z's Bayesian Criterion (BIC)	43. 4 285.235	44. 4 274.442	45. 4 412.517	46. 4 290.817	47. 4 466.540	48. 4 283.101	49. 4 409.656	

* SI: Scaled Identity; ARMA (1): First-order autoregressive moving average; CS: Compound Symmetry; AR (1): First-order autoregressive (Heterogeneous).

3.2. Failure Modes and SEM Results

Quantitative analysis of the association between failure modes and type of adhesive was performed (Supplementary Information) and produced the following results:

The prevalence of adhesive fractures in SBU (77.5%) is significantly lower ($p < 0.001$) than in AE2 (91.9%), therefore the prevalence of cohesive fractures in SBU (22.5%) is significantly higher than in AE2 (8.1%).

Moreover, the prevalence of adhesive fractures in AE1 (76.9%) is significantly lower ($p = 0.001$) than in AE2 (91.9%), which means that the prevalence of cohesive fractures in AE1 (23.1%) is significantly higher than in AE2 (8.1%).

In conclusion, differences between adhesives that affect the prevalence of fractures could only be detected between adhesives AE2 and SBU and adhesives AE2 and AE1.

SEM examinations (magnifications 500× and 2000×) of the resin–dentin interfaces, created by the two commercial universal adhesives (SBU and FUT) and the two experimental universal adhesives (AE1 and AE2), showed different interfacial morphological features in both adhesive protocol, ER and SE (Figure 1–4).

Following ER protocol, a similar morphology of the adhesive interface was observed for SBU, AE1 and AE2. SBU could penetrate the dentin, forming a uniform hybrid layer with 11.3 μm thickness and well-defined resin tags (Figure 1A, C). AE1 and AE2 also showed a uniform hybrid layer with 12.3 μm and 11.2 μm thicknesses, respectively, and a great number of resin tags with different lateral branches (Figure 2E–H). FUT presented the lowest hybrid layer thickness (7.6 μm); in this case, it was not possible to visualize any resin tag or lateral tags (Figure 1B,D).

With the SE approach, SBU and FUT micrographs presented a diffused and undefined hybrid layer with few resin tags (Figure 3A–D). Among all adhesives tested, AE1 presented the best interface morphology. This experimental adhesive seems to penetrate the dentin, forming a hybrid layer with 10.4 μm thickness, with many long resin tags being observed (Figure 4E,F). AE2

micrograph showed an adhesive failure (Figure 4G).

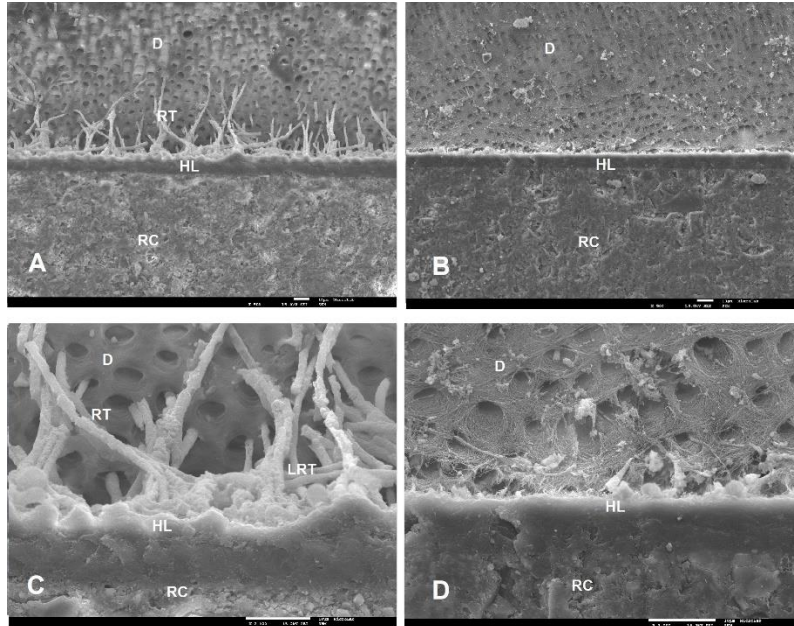


Figure 1: SEM micrographs of bonding interface of the commercial adhesives when ER was applied. Magnifications of 500× (**A** and **B**) and 2000× (**C** and **D**) were used. **A** and **C**—SBU with 11.3 μm of hybrid layer (HL) thickness; **B** and **D**—FUT with 7.6 μm of hybrid layer (HL) thickness. Any resin tags (RT) and lateral resin tags (LRT) were identified. RC—resin composite; D—dentin; HL—hybrid layer; RT—resin tags; LRT—lateral resin tags.

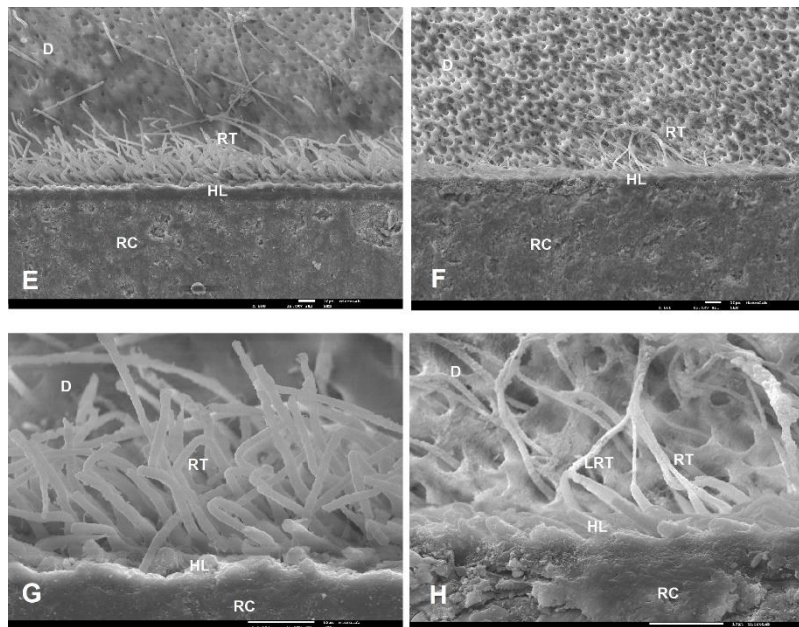


Figure 2: SEM micrographs of the bonding interface of the experimental adhesives when ER was applied. Magnifications of 500× (**E** and **F**) and 2000× (**G** and **H**) were used. **E** and **G**—AE1 with 12.3 μm of HL thickness; **F** and **H**—AE2 with 11.2 μm of HL thickness and resin tags (RT) with 18.2 μm in length. RC—resin composite; D—dentin; HL—hybrid layer; RT—resin tags; LRT—lateral resin tags.

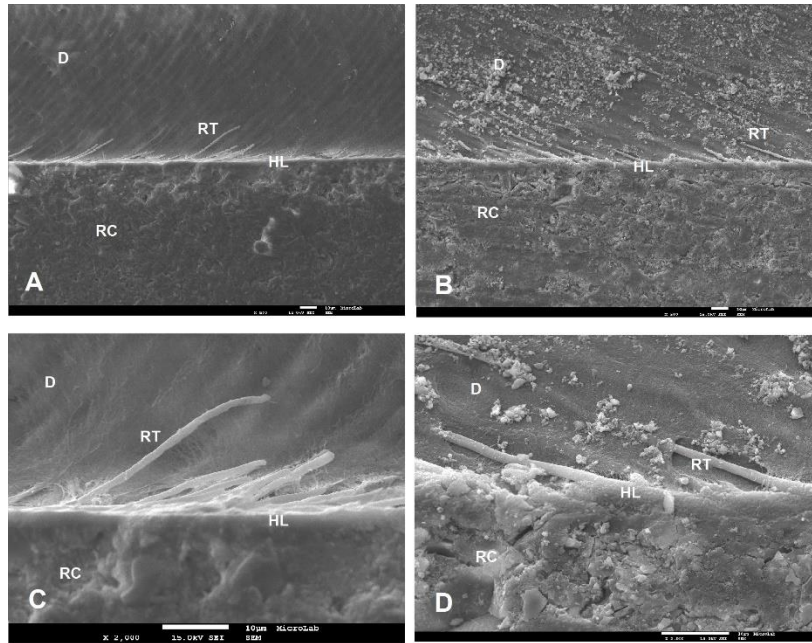


Figure 3: SEM micrographs of the bonding interface of the commercial adhesives when SE was applied. Magnifications of 500× (**A** and **B**) and 2000× (**C** and **D**) were used. **A** and **C**—SBU; **B** and **D**—FUT. RC—resin composite; D—dentine; HL—hybrid layer; RT—resin tags.

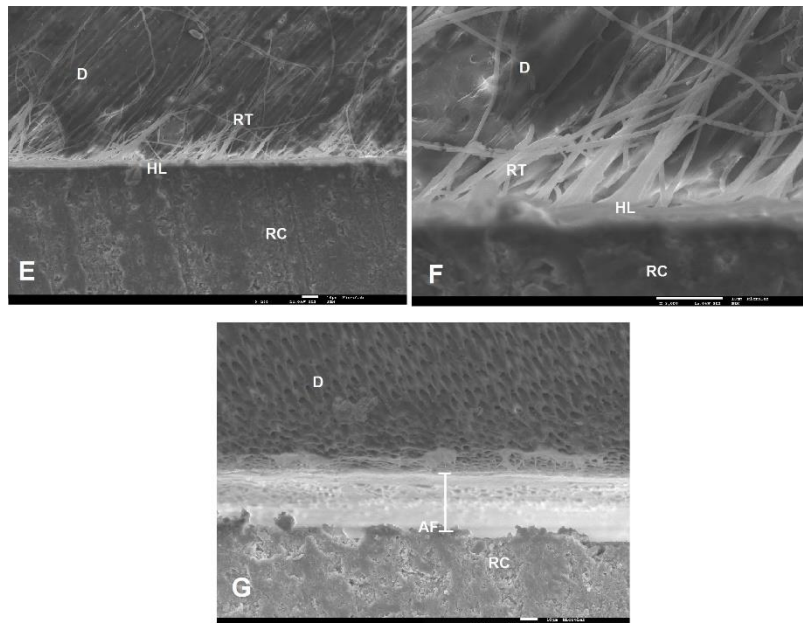


Figure 4: SEM micrographs of bonding interface of the experimental adhesives when SE was applied. Magnification of 500× (**E** and **G**) and 2000× (**F**) were used. **E** and **F**—AE1 with 10.4 μm of HL thickness; **G**—AE2. RC—resin composite; D—dentine; HL—hybrid layer; RT—resin tags; AF—adhesive failure.

4. Discussion

The Micro-tensile Bond Test (μ TBS) is considered the most valuable test for the evaluation of the adhesion bond strength [23,26]. This test allows a more uniform stress distribution than the shear bond strength test, due to axial tensile loading on a reduced interface, thus reducing the frequency of cohesive fractures in the dentin [27]. In any case, according to some authors, this test is highly influenced by the procedures and preparation of the samples for testing [26].

It is well known that the performance of the multi-mode adhesives evaluated by in vitro studies depends on the adhesive strategy, and tooth substrate and their efficacy has been reported as material-dependent due to the complexity of their chemical composition [28,29].

According to recently published work, it is consensual that for enamel adhesion, the bond strength of the Universal adhesive is improved when 32–40% phosphoric acid is applied prior to the next stages of dental restoration [7,30]. Regarding dentin adhesion, there is still some controversy among authors [3,30]; however, Sofan et al. [7], referred that adequate bonding can be achieved with either etch-and-rinse (ER) or self-etch protocols (SE).

Concerning the results obtained in this study using GLM and LMM, there was no interaction between the adhesive type and protocol ($p > 0.05$), which means that the observed differences between adhesives concerning their bond strengths are independent of the strategy used to promote dental adhesion.

Independently of the adhesives, samples treated under ER protocol showed significantly higher μ TBS than those treated using SE ($p < 0.05$). However, Perdigão et al. [14] defend that SE protocol is more appropriate for dentin when a universal system containing 10-MDP is used. According to these authors, the ER protocol might over-etch dentin structures, decreasing the dentin bond strength due to calcium removal; this consequently decreases the chemical bond strength, which has been referred to as being very important in creating a resistant hybrid layer with more hydrolytic stability, improving the dentin bonding durability [31].

The chemical composition of the adhesives could be the reason for the differences observed in this study, between the AE1 and SBU adhesives, independently of the protocol used. Although AE1 was formulated considering

the list of ingredients and their relative percentage range described by the SBU manufacturer, the exact percentage of each component was not disclosed. In addition, unlike AE1, SBU contains the polyalkenoic acid copolymer which, in combination with 10-MDP, has shown contradictory results: Perdigão et al. [32] reported a higher μ TBS to dentine for SBU when compared to Clearfil SE Bond, while Muñoz et al. [33] observed a lower μ TBS for SBU when compared to the same adhesive. It is noteworthy that Clearfil SE Bond only contains 10-MDP in its composition. It is then possible that the polyalkenoic acid copolymer may compete with the 10-MDP monomer for calcium-bonding in hydroxyapatite [31].

Considering the results obtained for AE1, the dentin μ TBS values are within the same range of values of the results published in literature for adhesives containing Bis-GMA. In fact, results similar to those obtained in our study, for both protocols (ER and SE), were reported by Luque-Martinez et al. [34] and Muñoz et al. [5,33], using the same methodology. Moreover, the SEM images of the interface morphology of the adhesives tested are in accordance with the dentin μ TBS results, where AE1 presented deeper penetration into dentin tissue with a thicker hybrid layer and long resin tags in both protocols (Figure 2E,G and Figure 4E,F).

Concerning dentin bonding behavior of AE2, it is not possible to establish any type of comparison since we have not found any reports on adhesives systems containing G-IEMA in literature. Furthermore, it is noteworthy that these adhesives are experimental, and further investigation is still needed in order to improve its physicochemical and mechanical properties. However, it should be emphasized that AE2 has shown no significant differences to the other adhesives studied (AE1, SBU and FUT).

A major finding of this work is the achievement of an adhesive Bis-GMA-free, with the same bonding strength properties as other universal adhesives. Both in the health and commercial perspective, this result may represent an important advance in dental materials formulation, since there are no available options in the market of dental adhesives without bisphenol A.

On the other hand, the use of a dendrimer, such as G-IEMA, as the base monomer of the adhesive composition may also bring some physicochemical advantages, as previously reported in our study. In that study, AE2 presented

significantly higher double bond conversion, compared to the commercial SBU [22]. A possible explanation was proposed by Yu et al. [20], where G-IEMA allowed the polymerization to occur in eight tips due to its dendritic structure, contributing to a higher double bond conversion rate and greater hydrophobicity. These properties have been considered quite important to the hydrolytic stability of the bonding interface [2,28].

Regarding the pH, this physicochemical property of the UA plays a very important role. On one hand, an acidic medium is needed to dissolve the smear layer and the smear plugs, and open the way for adhesive impregnation into the dentin; on the other hand, a very strong acidic medium might remove too much calcium, consequently decreasing its bonding ability to 10-MDP [35]. Perdigão et al. [14] referred that the ideal pH for UA containing 10-MDP is mild ($\text{pH} \approx 2$), which allows greater formation of stable calcium salts, improving dentin bonding.

AE2 presents an ultra-mild pH ($\text{pH} = 3.5$). This acidity level does not seem to be sufficient to demineralize the smear layer and to allow the adhesive penetration into the dentin. This fact may possibly explain the results obtained by SEM, where adhesive failures were observed (Figure 4G). It is possible then, that lowering its pH might result in the improvement of its bonding strength properties as a result of a better penetration of G-IEMA's branches, making it presumably a similar or even a better choice over AE1 (Figure 4F).

On the contrary, in the ER approach, SEM images of AE2 presented a better interface morphology with larger micromechanical retention inside the dentin. The prior application of phosphoric acid in this procedure, which promotes a depth demineralization and the effective penetration of the adhesive, might explain the results. Also important is the fact that G-IEMA has a branched structure and a higher polymerization degree, which may contribute to the entanglement of resin tags (RT) and the formation of many lateral tags (LT). The micromechanical retention effect obtained is stronger. The deeper impregnation of the adhesive, together with its increased polymerization, allowed the formation of a hybrid layer of $11.2 \mu\text{m}$ in depth, reinforced by the resin tags (Figure 2F,H).

In order to improve the bonding efficacy of AE2, strategies to optimize AE2 composition are currently being investigated.

5. Conclusions

Considering the results herein described, the development of a new universal adhesive is still a challenge to adhesive dentistry. The results of this study may represent a paradigm shift in the development of new adhesive systems, which reinforces its originality. It was shown that the traditional linear crosslinking monomers can be replaced successfully by a dendritic type of structures. G-IEMA not only significantly improved the adhesive's bond conversion rates, but also reduced the polymerization shrinkage and contributed to an increase in dentin bond strength, which lowers the risk of bond failures and subsequent bacteria infiltration that compromise the longevity of the tooth restoration. Nevertheless, further investigation is still being developed in order to improve the physicochemical and mechanical properties of the AE2.

6. Patents

The following patent was registered in Portugal as an outcome of this work: Vasconcelos e Cruz, J., Gonçalves, L. L., Polido, M. and Brito, J.A. FORMULAÇÃO PARA UM SISTEMA ADESIVO DENTÁRIO UNIVERSAL CONTENDO UM MONÓMERO DE RETICULAÇÃO DENDRÍTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO. "FORMULATION OF A UNIVERSAL DENTAL ADHESIVE SYSTEM CONTAINING A SECOND GENERATION DENDRITIC RETICULATION MONOMER." (2019) Titular: Instituto Universitário Egas Moniz. Portugal. N. 115064.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4360/12/2/461/s1>, Table S1: Cross tabulation with the prevalence of each type of fracture per adhesive.

Author Contributions: Conceptualization and methodology, J.V.C., L.L.G. and M.P.; Statistical analysis, J.B.; Experimental work, J.V.C. and L.L.G.; Original draft preparation, J.V.C.; Draft revision and editing L.L.G., M.P. and J.B.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors wish to acknowledge VOCO GmbH, Cuxhaven, Germany for supplying Futurabond M+ adhesive and Grandio hybrid composite resin. The authors have no potential conflicts of interest in any of the products used in this study. We also kindly thank Isabel Nogueira (from Instituto Superior Técnico de Lisboa, Portugal) for technical assistance with the SEM images. Moreover, the NMR spectrometer used in this work is part of the national NMR Facility, supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (REC/BBBBQB/0230/2012).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. De Munck, J.; Van Landuyt, K.; Peumans, M.; Poitevin, A.; Lambrechts, P.; Braem, M.; Van Meerbeek, B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: Methods and results. *J. Dent. Res.* 2005, *84*, 118–132, doi:10.1177%2F154405910508400204.
2. Liu, Y.; Tjäderhane, L.; Breschi, L.; Mazzoni, A.; Li, N.; Mao, J.; Pashley, D.H.; Tay, F.R. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J. Dent. Res.* 2011, *90*, 953–968. doi:10.1177%2F0022034510391799.
3. Choi, A.N.; Lee, J.H.; Son, S.A.; Jung, K.H.; Kwon, Y.H.; Park, J.K. Effect of Dentin Wetness on the Bond Strength of Universal Adhesives. *Materials* 2017, *10*, 1224, doi:10.3390%2Fma10111224.
4. Loguercio, A.D.; Barroso, L.P.; Grande, R.H.; Reis, A. Comparison of intra- and intertooth resin–dentin bond strength variability. *J. Adhes. Dent.* 2005, *7*, 151–158.
5. Muñoz, M.A.; Sezinando, A.; Luque-Martinez, I.; Szesz, A.L.; Reis, A.; Loguercio, A.D.; Bombarda, N.H.; Perdigão, J. Influence of a hydrophobic resin coating on the bonding efficacy of three universal adhesives. *J. Dent.* 2014, *42*, 595–602, doi:10.1016/j.jdent.2014.01.013.
6. Betancourt, D.E.; Baldion, P.A.; Castellanos, J.E. Resin-Dentin Bonding Interface: Mechanisms of Degradation and Strategies for Stabilization of the Hybrid Layer. *Int. J. Biomater.* 2019, *3*, 5268342, doi:10.1155/2019/5268342.
7. Sofan, E.; Sofan, A.; Palaia, G.; Tenore, G.; Romeo, U.; Migliau, G. Classification review of dental adhesive systems: From the IV generation to the universal type. *Ann. Stomatol* 2017, *8*, 1–17, doi:10.11138%2Fads%2F2017.8.1.001.
8. Van Meerbeek, B.; De Munk, J.; Yoshida, Y.; Inoue, S.; Vargas, M.; Vijay, P.; Van Landuyt, K.; Lambrechts, P.; Vanherle, G. Adhesion to enamel and dentin: Current status and future challenges. *Oper. Dent.* 2003, *28*, 215–235.
9. Pashley, D.H.; Tay, F.R.; Breschi, L.; Tjäderhane, L.; Carvalho, R.M.; Carrillo, M.; Tezvergil-Mutluay, A. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent. Mater.* 2011, *27*, 1–16, doi:10.1016/j.dental.2010.10.016.
10. Moszner, N.; Salz, U.; Zimmermann, J. Chemical aspects of self-etching enamel–dentin adhesives: A systematic review. *Dent. Mater.* 2005, *21*, 895–910, doi:10.1016/j.dental.2005.05.001.
11. Tay, F.R.; Pashley, D.H. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent. Mater.* 2001, *17*, 296–308.
12. Rosa, W.L.; Piva, E.; Silva, A.F. Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *J. Dent.* 2005, *43*, 765–776, doi:10.1016/j.jdent.2015.04.003.
13. Wagner, A.; Wendler, M.; Petschelt, A.; Belli, R.; Lohbauer, U. Bonding performance of universal adhesives in different etching modes. *J. Dent.* 2014, *42*, 800–807, doi:10.1016/j.jdent.2014.04.012.
14. Perdigão, J.; Swift, E.J., Jr. Universal Adhesives. *J. Esthet. Restor. Dent.* 2015, *27*, 331–334, doi:10.1111/jerd.12185.
15. Nunes, T.G.; Polido, M.; Amorim, A.; Nunes, S.G.; Toledano, M. Multinuclear magnetic resonance studies on the chemical interaction of a self-etching adhesive with radicular and coronal human dentin. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2007, *18*, 2093–2099.
16. Sideridou, I.; Tserki, V.; Papanastasiou, G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials* 2002, *23*, 1819–1829, doi:10.1016/s0142-9612(01)00308-8.
17. Landuyt, K.L.; Snauwaert, J.; De Munck, J.; Peumans, M.; Yoshida, Y.; Poitevin, A.; Coutinho, E.;

- Suzuki, K.; Lambrechts, P.; Van Meerbeek, B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007, 28, 3757–3785, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.044.
18. Fleisch, A.F.; Sheffield, P.E.; Chinn, C.; Edelstein, B.L.; Landrigan, P.J. Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics* 2010, 126, 760–768, doi:10.1542/peds.2009-2693.
 19. Soderholm, K.J.; Mariotti, A. BIS-GMA-based resins in dentistry: Are they safe. *J. Am. Dent. Assoc.* 1999, 130, 201–209, doi:10.14219/jada.archive.1999.0169.
 20. Yu, B.; Liu, F.; He, J. Preparation of low shrinkage methacrylate-based resin system without Bisphenol A structure by using a synthesized dendritic macromere (G-IEMA). *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2014, 35, 1–8, doi:10.1016/j.jmbbm.2014.03.012.
 21. Silva e Souza, M.H., Jr.; Carneiro, K.G.K.; Lobato, M.F.; e Souza, S.; de Almeida Rodrigues, P.; Góes, M.F.D. Adhesive systems: Important aspects related to their composition and clinical use. *J. Appl. Oral Sci.* 2010, 18, 207–214, doi:10.1590/s1678-77572010000300002.
 22. Vasconcelos e Cruz, J.; Brito, J.; Polido, M.; Gonçalves, L. A new experimental adhesive system containing G-IEMA—Physicochemical properties. *J. Adhes. Sci. Technol.* 2019, 33, 418–432, doi:10.1080/01694243.2018.1539154.
 23. Shono, Y.; Ogawa, T.; Terashita, M. Regional measurement of resin-dentin bonding as an array. *J. Dent. Res.* 1999, 78, 699–705, doi:10.1177/00220345990780021001.
 24. Perdigao, J.; Lambrechts, P.; Van Meerbeek, B.; Vanherle, G.; Lopes, A.L. Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995, 29, 1111–1120, doi:10.1002/jbm.820290911.
 25. Schneider, H.; Fröhlich, M.; Erler, G.; Engelke, C.; Merte, K. Interaction patterns between dentin and adhesive on prepared class V cavities in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 53, 86–92, doi:10.1002/(SICI)1097-4636(2000)53:1%3C86::AID-JBM12%3E3.0.CO;2-Z.
 26. Gallusi, G.; Galeano, P.; Libonati, A.; Giuca, M.R.; Campanella, V. Evaluation of bond strength of different adhesive systems: Shear and Microtensile Bond Strength Test. *Oral Implantol.* 2009, 2, 19–25.
 27. Pashley, D.H.; Sano, H.; Ciucchi, B.; Yoshiyama, M.; Carvalho, R.M. Adhesion testing of dentin bonding agents: A review. *Dent. Mater.* 1995, 11, 117–125, doi:10.1016/0109-5641(95)80046-8.
 28. Sezinando, A. Looking for the ideal adhesive—A review. *Rev. Port. Estomatol. Med. Dentária Cir. Maxilofac.* 2014, 55, 194–206.
 29. Hanabusa, M.; Mine, A.; Kuboki, T.; Momoi, Y.; Van Ende, A.; Van Meerbeek, B.; De Munck, J. Bonding effectiveness of a new ‘multi-mode’ adhesive to enamel and dentine. *J. Dent.* 2012, 40, 475–484, doi:10.1016/j.jdent.2012.02.012.
 30. Nicoloso, G.F.; Antoniazzi, B.F.; Lenzi, T.L.; Soares, F.Z.M.; Rocha, R.O. The Bonding Performance of a Universal Adhesive to Artificially-created Caries-affected Dentin. *J. Adhes. Dent.* 2017, 19, 317–321, doi:10.3290/j.jad.a38890.
 31. Yoshida, Y.; Yoshihara, K.; Nagaoka, N.; Hayakawa, S.; Torii, Y.; Ogawa, T.; Osaka, A.; Meerbeek, B.V. Self-assembled Nano-layering at the Adhesive interface. *J. Dent. Res.* 2012, 91, 376–381, doi:10.1177/0022034512437375.
 32. Perdigao, J.; Sezinando, A.; Monteiro, P.C. Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. *Am. J. Dent.* 2012, 25, 153–158.
 33. Munoz, M.A.; Luque, I.; Hass, V.; Reis, A.; Loguercio, A.D.; Bombarda, N.H. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J. Dent.* 2013, 41, 404–411,

doi:10.1016/j.jdent.2013.03.001.

34. Luque-Martinez, I.V.; Perdigão, J.; Muñoz, M.A.; Sezinando, A.; Reis, A.; Loguercio, A.D. Effects of solvent evaporation time on immediate adhesive properties of universal adhesives to dentin. *Dent. Mater.* 2014, 30, 1126–1135, doi:10.1016/j.dental.2014.07.002.
35. Van Meerbeek, B.; Yoshihara, K.; Yoshida, Y.; Mine, A.; De Munck, J.; Van Landuyt, K.L. State of the art of self-etch adhesives. *Dent. Mater.* 2011, 27, 17–28, doi:10.1016/j.dental.2010.10.023.

PARTE III

OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO ADESIVO EXPERIMENTAL

- **Avaliação da taxa de conversão;**
- **Avaliação da Resistência à dentina por microtração;**
- **Análise da interface adesiva por MEV;**
- **Ensaio preliminar da citotoxicidade**

PARTE III - OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO ADESIVO EXPERIMENTAL

6. NOTA INTRODUTÓRIA

Após a análise dos resultados relativos ao adesivo AE2, embora não tivessem sido observadas diferenças significativas na resistência adesiva à dentina ($p>0,05$), as imagens de MEV identificaram uma fratura da interface adesiva com o protocolo SE.

Após a análise das potenciais causas subjacentes aos resultados supracitados, constatou-se ser necessário alterar o pH da formulação inicial do AE2. O adesivo AE2 apresentava um pH superior ao da maioria dos sistemas adesivos Universais (pH= 3,5) e, que por isso, quando aplicado com o protocolo self-etch não produziria um nível de desmineralização suficiente para promover a entrada dos monómeros e consequente formação da camada híbrida e dos *resin-tags*.

Deste modo, a composição do adesivo AE2 foi ajustada com vista a reduzir os valores do seu pH e, com isso, melhorar a sua resistência adesiva, quando aplicado segundo o protocolo SE, sem prejuízo dos resultados já obtidos com o protocolo ER, surgindo assim o novo adesivo EM2.

Como estratégia de acidificação do adesivo, a quantidade de 10-MDP foi aumentada relativamente à utilizada nas formulações iniciais. O 10-MDP além de ser um monómero ácido, é também um monómero funcional, pelo que com esta abordagem procurou-se um “duplo efeito”: melhorar a adesão pelo aumento das ligações químicas do adesivo ao cálcio da hidroxiapatite e, simultaneamente reduzir o pH do adesivo e o seu poder de condicionamento da dentina. Convém salientar que a percentagem relativa dos diferentes componentes do adesivo AE1, doravante designado por EM1, foi também alterada de acordo com os valores utilizados para o adesivo EM2.

Assim, o pH e a taxa de conversão dos novos adesivos, EM1 e EM2, foram novamente avaliados. Efectuaram-se posteriormente os testes de resistência adesiva à dentina segundo os dois protocolos de avaliação, ER e SE. Estes testes foram complementados com a observação das interfaces adesivas

através do MEV.

Por último, e dado que um dos objetivos propostos era a avaliação da citotoxicidade do adesivo com G-IEMA (EM2), foram estabelecidas linhas de células primárias a partir da polpa dentária e da gengiva.

Apesar de efetuados ensaios preliminares de citotoxicidade, ainda não foi possível, até ao momento, retirar conclusões dado que os mesmos continuam a decorrer.

Os resultados obtidos para a taxa de conversão e para as propriedades mecânicas do adesivo EM2 ainda não estão publicados em artigo científico, no entanto, os mesmos já foram incluídos na Patente Nacional com o Nº 115064, intitulada “FORMULAÇÃO PARA UM SISTEMA ADESIVO DENTÁRIO UNIVERSAL CONTENDO UM MONÓMERO DE RETICULAÇÃO DENDRÍTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO”, publicada no Boletim da propriedade Industrial nº 070/2020 de 8 de Abril de 2020 (Anexo 5).

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1. Formulação dos novos adesivos experimentais

Todos os reagentes e solventes presentes na formulação dos adesivos foram selecionados com grau analítico e adquiridos na *Sigma-Aldrich* (Madrid, Espanha), *Merck KGaA.* (Darmstadt, Alemanha), *Carlo Erba* (Laborspirit Ltd., Loures, Portugal) e *Watson International Ltd.* (Kunshan, China).

A nova formulação dos adesivos experimentais (EM1 e EM2) foi definida com base na composição dos adesivos comerciais utilizados como controlo (*Scotchbond Universal®* (3M ESPE) e *Futurabond®* (VOCO GmbH)) e tendo em conta os resultados obtidos relativamente aos primeiros adesivos experimentais formulados, AE1 e AE2 (Vasconcelos e Cruz et al., 2020).

Para o adesivo EM2, também foi sintetizado o G-IEMA de acordo com o procedimento descrito em Vasconcelos e Cruz et al. (2019).

A quantidade relativa de cada componente foi re-definida com o objetivo de aumentar a acidez final do adesivo. Para isso, foram alteradas as percentagens relativas de alguns componentes, como o HEMA, o 10-MDP e o etanol.

Todos os componentes foram pesados de forma rigorosa numa balança analítica (Precisa 125 A, Switzerland) e foram adicionados pela mesma ordem num frasco opaco estéril. Os adesivos experimentais foram armazenados ao abrigo da luz no frigorífico a 4°C.

O pH de cada adesivo foi medido em triplicado utilizando um medidor de pH de elevada precisão (Crison Basic20, Crison Instruments, Barcelona, Espanha) (tabela 4).

Tabela 4: pH dos adesivos comerciais e dos adesivos experimentais

Adesivos	pH
SBU	2.65
FUT	1.70
EM1	1.50
EM2	1.84

7.2. Taxa de conversão

A taxa de conversão (TC) dos adesivos foi calculada utilizando a Espectroscopia de Infra-vermelhos por transformada de Fourier (FTIR) (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) de acordo com o procedimento descrito (Rueggeberg et al., 1990, Vasconcelos e Cruz et al., 2019).

Foram preparadas 5 amostras contendo 140µL de cada adesivo num molde de 2mm de espessura e 9mm de diâmetro. Cada amostra foi polimerizada durante 60 segundos com uma lâmpada de luz LED a uma intensidade de 1470 mW/cm² (Elipar Deep Cure-S, 3M ESPE, EUA). As amostras foram analisadas por FTIR, antes e após a polimerização, através do traçado dos respectivos espectros entre 4000-900 cm⁻¹.

Foram calculadas as áreas referentes aos picos das ligações alifáticas (C=C) a 1636cm⁻¹ e ligações carbonilo (C=O) a 1713cm⁻¹, antes (0) e após a polimerização (t) com a ajuda do *software Spectrum 10™* (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) e de acordo com o método descrito na literatura (Rueggeberg et al., 1990). A percentagem da TC foi determinada de acordo com a expressão:

$$TC(t) = \frac{(A_{C=C}/A_{C=O})_0 - (A_{C=C}/A_{C=O})_t}{(A_{C=C}/A_{C=O})_0} \times 100\%$$

7.3. Estudo da resistência adesiva à dentina por microtração (μ TBS)

A resistência adesiva à dentina por microtração dos novos adesivos EM1 e EM2 foi estudada utilizando a mesma metodologia descrita Vasconcelos e Cruz et al., 2020. Todos os procedimentos foram efetuados pelo mesmo operador de forma a garantir a igual aplicação de todo o protocolo.

Foram utilizados 20 molares hígidos, extraídos por motivos ortodônticos ou periodontais, que foram previamente desinfetados com cloramina T a 1% e armazenados em água destilada a 4°C, de acordo com a norma ISO 11405, (2015).

A superfície de dentina foi exposta com a utilização de um micrótomo de tecidos duros Accuton 50 (Struers A/S, Ballerup, Denmark) e a *smear layer* foi simulada com discos de papel abrasivos de 600 grit SiC. Os dentes foram aleatoriamente distribuídos por 4 grupos (EM1-ER, EM1-SE, EM2-ER, EM2-SE).

Os adesivos foram aplicados de acordo com o protocolo ER e SE descrito na tabela 5. De seguida, foram construídos blocos de resina com aproximadamente 6 mm de altura, sendo polimerizados a cada 2 mm de espessura durante 40 seg., com uma lâmpada fotopolimerizadora com uma intensidade de 1470 mW/cm² (Elipar Deep Cure-S, 3M ESPE, EUA). A intensidade da luz LED foi monitorizada a cada 10 utilizações com um radiômetro (Demetron Reserach Company, Danbury, EUA).

Após 24 horas de armazenamento em água destilada numa estufa a 37°C (Memmert INE 400, Memmert, Alemanha), os dentes foram cortados com o micrótomo Accuton 50 (Struers A/S, Ballerup, Denmark) em palitos de 1 mm² de acordo com o descrito por Sano et al. (1994a). O teste de microtração foi efetuado numa máquina de teste Universal equipada com uma célula de carga de 5kN (Shimadzu AG-50kNI SD MS, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) e os palitos foram tracionados a uma velocidade de 0.5 mm/min até ocorrer a fratura.

As falhas pré-teste foram descartadas e as restantes classificadas em adesivas (A), coesivas (C) e mistas (M) através da utilização de uma lupa esterioscópica (Olympus/DeTrey, Konstanz, Alemanha) com uma ampliação de 40x. Para o cálculo da resistência adesiva apenas foram utilizados os valores das falhas adesivas, sendo calculada a área da superfície da fratura através da

medição com uma craveira digital (Sylvae Ultra-Call/Fowler Inc., Newton, MA, EUA) da interface na zona da fratura, nas direções x e y.

Os resultados de adesão referentes aos novos adesivos EM1 e EM2 foram comparados com os resultados já obtidos para os adesivos comerciais SBU e FUT.

Tabela 5: Protocolo de aplicação dos adesivos experimentais segundo a técnica ER e SE

Adesivos Experimentais	Protocolo	Modo de aplicação
EM1 (com Bis-GMA)	ER	Aplicação de ácido ortofosfórico durante 15 seg. Lavar com água e secar com cuidado para não desidratar a dentina Aplicar o adesivo esfregando durante 20 seg. Secar para evaporar os solvents durante 5 seg. Fotopolimerizar durante 60 seg.
EM 2 (com G-IEMA)	SE	Aplicar o adesivo esfregando durante 20 seg. Secar para evaporar os solvents durante 5 seg. Fotopolimerizar durante 60 seg.

7.4. Avaliação da interface adesiva por MEV

Para cada grupo foram preparados dois dentes de acordo com o mesmo procedimento descrito no ponto 7.3. Após a aplicação dos adesivos e a construção dos blocos de resina composta, os dentes foram armazenados numa estufa de incubação a 37°C (Memmert INE 400, Memmert, Alemanha) durante 24h sendo posteriormente aplicado o protocolo de preparação dos dentes para a visualização da interface adesiva através do MEV, de acordo com o protocolo descrito por Perdigão et al. (1995).

Os dentes foram fixados com uma solução de gluteraldeído e cacodilato de sódio e a interface adesiva foi exposta através de cortes em fatias com a utilização do micrótomo de tecidos duros Accuton 50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca). Em seguida aplicou-se um protocolo rigoroso de desmineralização e desproteínização de forma a remover toda a dentina que não foi impregnada pelo adesivo. Posteriormente, foram utilizadas concentrações crescentes de etanol (70%, 95% e 100%) para desidratar as amostras e uma solução de HMDS (1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano) para a secagem (Perdigão et al., 1995).

Por fim, as amostras foram submetidas a um processo de metalização onde cada uma foi fixada a uma fita de carbono e coberta com uma película fina de Au/Pd num revestidor Q150T ES Turbo-Pumped Sputter coater (Quorum

Technologies, Q150T Turbomolecular-pumped coating system, UK).

A interface adesiva foi observada ao MEV (FEG-SEM JEOL, model JSM7001F, Tóquio, Japão) utilizando ampliações de 500× e 1000× para a visualização da camada híbrida e dos *resin tags*.

7.5. Ensaios de citotoxicidade

7.5.1 Linhas celulares primárias estabelecidas a partir da polpa dentária e da gengiva

As células da polpa dentária humana foram cultivadas com base numa adaptação da técnica de explantação de tecidos previamente descrita por vários autores (Chang et al., 1998; Chen et al., 2003).

O protocolo seguido neste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Universitário Egas Moniz, Monte da Caparica, Portugal. Após a assinatura do consentimento informado do doente (Anexos 1 e 2), foi extraído um incisivo central sem cárie devido a doença periodontal. O dente foi perfeitamente limpo e a câmara pulpar foi aberta com broca esterilizada de alta velocidade sob refrigeração a água. O tecido pulpar foi removido em condições assépticas com uma lima endodôntica *H-Files* (Mani, Japão) e colocado num meio de transporte apropriado contendo meio de cultura DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco com glutamina estável) suplementado com 10% de HI-FBS (soro fetal bovino inativado), Pen-Strep (penicilina/estreptomicina 10.000 U/mL) e anfotericina B (250µg/mL). Todos os reagentes foram adquiridos na Gibco®, (Nova Iorque, EUA).

No laboratório de cultura de tecidos, numa câmara de fluxo laminar (ScanLaf Mars 1200 safety classe 2, Labogene, Alemanha) a polpa foi lavada à temperatura ambiente com PBS (solução salina tamponada com fosfato, Gibco®, Nova Iorque, EUA) e com o auxílio de tesoura e bisturi foi triturada em pedaços.

Seguidamente, os pedaços mais pequenos foram colocados entre duas lamelas de vidro, em placas de 35 mm, com meio de cultura referido e incubadas em estufa de CO₂ a 5% e 95% de humidade relativa.

Após adesão das células da polpa, as lamelas foram separadas, deixando

aí confluir as culturas. A linha foi estabelecida, por expansão das células para caixas de cultura de 25 cm² e posteriormente para 75 cm².

As células foram congeladas com uma confluência de 90%, no máximo na 3ª passagem e num número $1 > 10^6$ (Fig. 8-A). A congelação foi efetuada inicialmente a uma temperatura de -80°C numa caixa de congelação (*Mr. Frosty™ Freezing Container*, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) de forma a respeitar a descida de 1°C por minuto sendo as células de seguida transladadas para o azoto líquido onde foram mantidas a -196°C até à sua utilização.

Para o estabelecimento da linha celular da gengiva foi utilizada uma biópsia de tecido gengival, recolhida por motivos periodontais, no âmbito da pós-graduação de periodontologia do IUEM e após a assinatura do consentimento informado (Anexo 3). A biópsia foi conservada e transportada para o laboratório de acordo com o procedimento anteriormente descrito para a polpa dentária e a linha celular foi estabelecida utilizando o mesmo protocolo (Fig. 8-B).

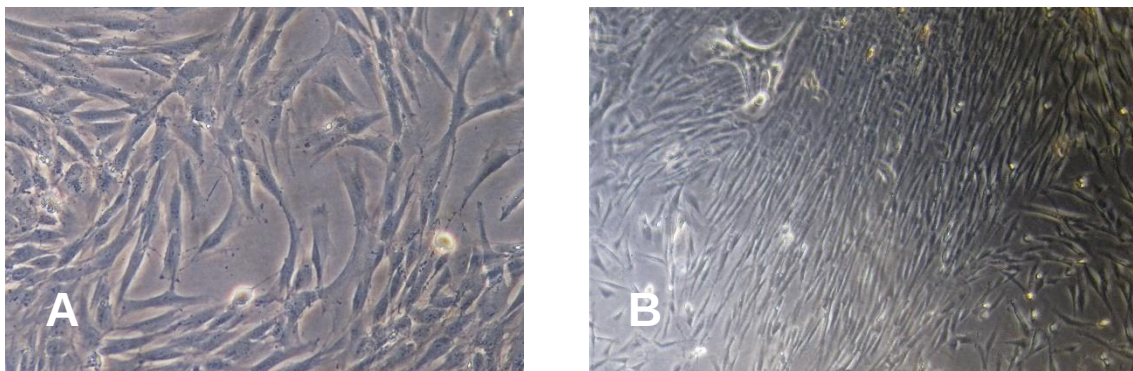


Fig. 8 – **A** – Linha celular primária estabelecida a partir da polpa dentária. **B** – Linha celular primária estabelecida a partir de biópsia gengival. Ampliações de 100x em microscópio de contraste de fase

7.5.2. Ensaio preliminar de citotoxicidade

Durante o estabelecimento das linhas celulares primárias, optou-se por fazer um ensaio preliminar para avaliar a citotoxicidade dos adesivos em células imortalizadas mais estáveis, previsíveis e bastante estudadas. Para isso, foi utilizada uma linha celular de fibroblastos NIH/3T3 (Swiss mouse embryo, fibroblastos, 93061524, Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha).

Este ensaio preliminar teve como objetivo estudar o protocolo mais adequado para avaliar a citotoxicidade dos nossos adesivos nas células da polpa e da gengiva previamente estabelecidas.

Para isso, as células 3T3 foram semeadas em 100 µL de meio DMEM, suplementado com 10% de *Calf Serum* e 1% de Penicillina-Estreptomicina em placas de 96 poços e cultivadas numa estufa a 37 °C com 5% de CO₂ em atmosfera húmida (Panasonic Biomedical - MCO-18AC, PHC Holdings Corporation, Japão), por 24 h, para obter uma monocamada confluenta (80 - 90% de confluência). Todos os reagentes para a cultura de células foram adquiridos na Gibco®, Nova Iorque, EUA.

Durante a etapa de distribuição das células na placa, a suspensão celular foi bem homogeneizada de forma a garantir que um mesmo número de células fosse plaqueado nos diferentes poços (1x10⁴ células / poço). As células foram

semeadas na placa, considerando cinco repetições para cada grupo, experimentais e controles.

Os adesivos foram previamente preparados e incubados em meio de cultura seguindo as concentrações recomendadas pela norma ISO 10993-12, (2007). Para isso, foram pipetados 460 µL de cada adesivo (EM1, EM2, SBU e FUT) e colocados num molde de silicone esterilizado. Os adesivos foram polimerizados durante 60 seg. com uma luz LED com uma intensidade de 1470 mW/cm² (Elipar Deep Cure-S, 3M ESPE, EUA). Cada peça de adesivo foi colocada num tubo de centrifuga contendo 2,53 mL de meio de cultura, para manter uma razão de 6cm²/mL, e incubado em estufa (Panasonic Biomedical - MCO-18AC, PHC Holdings Corporation, Japão) nas mesmas condições acima referidas durante 24 horas.

Após 24 h, foram efetuadas medições do pH do meio contendo os lixiviados dos adesivos utilizando um medidor de pH (LAQUAtwin pH-22 portable pH meter, Horiba, Quioto, Japão) (tabela 6) e foram preparadas diluições de 1:2, 1:4 e 1:10 dos lixiviados dos adesivos EM1 e EM2 no mesmo meio de cultura para os testes de toxicidade.

Após confirmação, por observação ao microscópio ótico invertido (Axiovert® 25, ZEISS Microscopy – Jena, Alemanha), de que as células estavam aderidas aos poços e tinham a sua morfologia característica, o meio de cultura foi removido e substituído por 100 µL de meio contendo os lixiviados (meio condicionado), ou das suas diluições. Foram também efetuados dois controlos: um controlo negativo onde foi adicionado às células apenas meio DMEM e um controlo positivo onde foi adicionado meio contendo 7,5% de DMSO (dimetilsulfóxido). As células foram incubadas por mais 24 h numa estufa a 37°C e 5% CO₂ em atmosfera húmida (Panasonic Biomedical - MCO-18AC, PHC Holdings Corporation, Japão). A figura 9 mostra o esquema de distribuição utilizado na placa de 96 poços.

Tabela 6. pH dos meios condicionados após 24h de incubação a 37°C.

Meios condicionados com os adesivos	pH
EM1/DMEM	6,3
EM2/DMEM	6,1
SBU/DMEM	7,3
FUT/DMEM	7,2

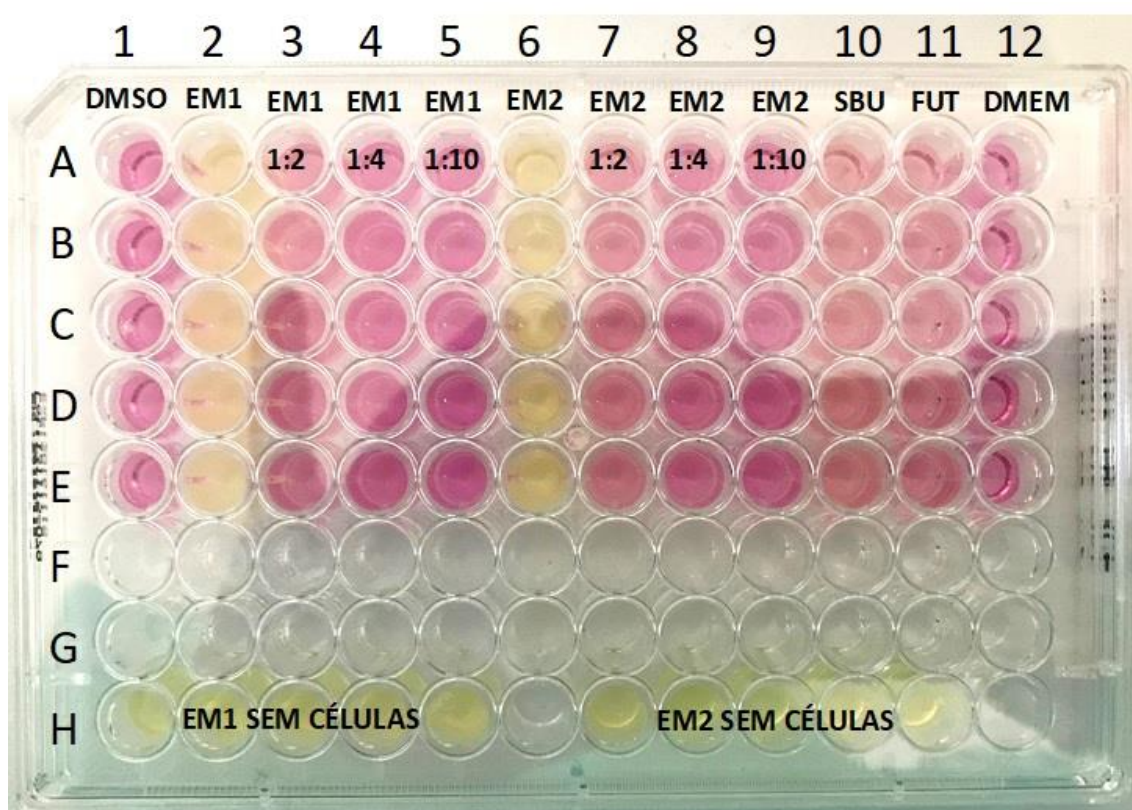


Fig. 9: Esquema da placa de 96 poços no ensaio de viabilidade. Fotografia tirada após 24 horas de contato com os meios condicionados pelos adesivos.

O ensaio MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) foi realizado posteriormente para determinar a viabilidade celular. Os meios foram aspirados e as células foram lavadas com uma solução de PBS (solução salina tamponada, Gibco®, Nova Iorque, EUA). Posteriormente, foram adicionados a cada poço 100 µL de solução de MTT (MTT dissolvido em DMEM sem soro a uma concentração de 0,5 mg / mL, preparado a partir de uma solução de 5 mg / mL de MTT (Sigma-

Aldrich, Madrid, Espanha) em PBS). Após um período de incubação de 3 h a 37°C e 5% de CO₂ em atmosfera húmida, foram adicionados a cada poço 150 µL de solvente de MTT (HCl 4 mM (*Sigma-Aldrich*, Madrid, Espanha), 0,1% IGEPAL (*Merck KGaA*, Darmstadt, Alemanha) em isopropanol (*Sigma-Aldrich*, Madrid, Espanha). A placa foi depois embrulhada em papel de alumínio para proteger da luz e agitada num agitador orbital (Hercuvan Lab Systems, UK) durante 1 hora. Durante este processo, foi realizada uma pipetagem de cima para baixo para dissolver completamente os cristais de MTT formados. A absorvância das amostras foi lida a 595 nm, utilizando um leitor de microplacas (Microplate reader AMP Platos R 496 AMEDA, AMP diagnostics, Graz, Austria). A quantificação relativa da viabilidade celular foi normalizada para o controlo negativo.

7.6. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada com um software SPSS (IBM SPSS version 24.0 (IBM, Nova Iorque, EUA).

Para as múltiplas comparações entre as taxas de conversão de cada adesivo foram utilizados os testes *Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney* e *Bonferroni*.

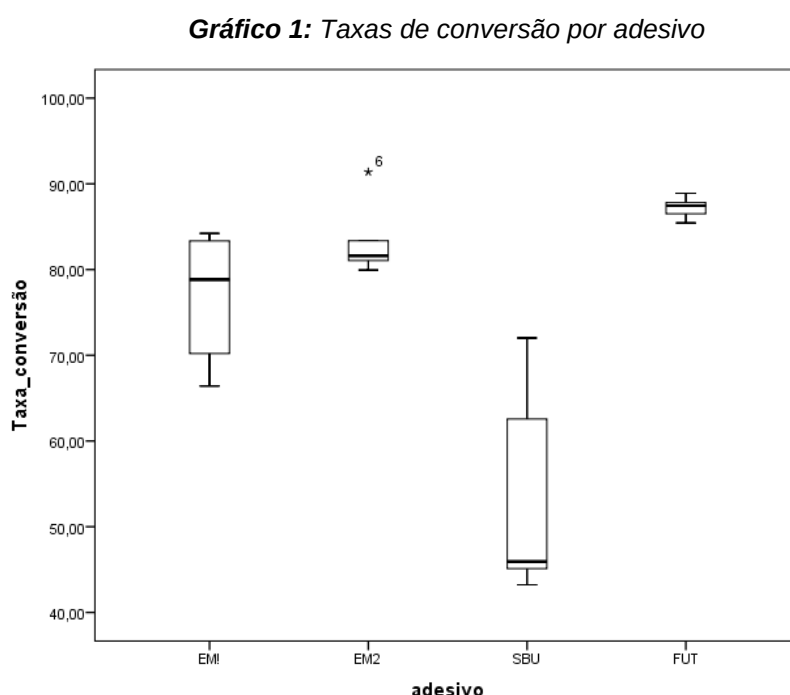
A análise dos dados referentes à resistência adesiva obtida através da microtração foi efetuada com base em Modelos Mistos e Modelos Lineares. Para a associação entre os adesivos e o tipo de fraturas obtidas utilizou-se o teste qui-quadrado.

Todos os testes foram aplicados com um nível de significância de 5%.

8. RESULTADOS

8.1. Taxa de conversão (TC)

O gráfico 1 representa os dados da TC por adesivo. Os 4 grupos de adesivos foram comparados entre si relativamente às taxas de conversão, mediante a aplicação do teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do teste de *Mann-Whitney* com correção de *Bonferroni* para comparações múltiplas.



De acordo com os resultados do teste de *Kruskal-Wallis*, a TC difere significativamente ($p = 0,003$) entre adesivos. De acordo com o teste de *Mann-Whitney*, verifica-se ainda que o adesivo experimental EM1 apresenta uma TC significativamente mais baixa do que o adesivo FUT ($p = 0,008$), que o adesivo experimental EM2 apresenta uma TC significativamente mais elevada do que o adesivo SBU ($p = 0,008$) e que a TC do SBU é significativamente mais baixa do que do FUT ($p = 0,008$). Não se detetam diferenças significativas entre quaisquer outros pares de adesivos, no que se refere à TC.

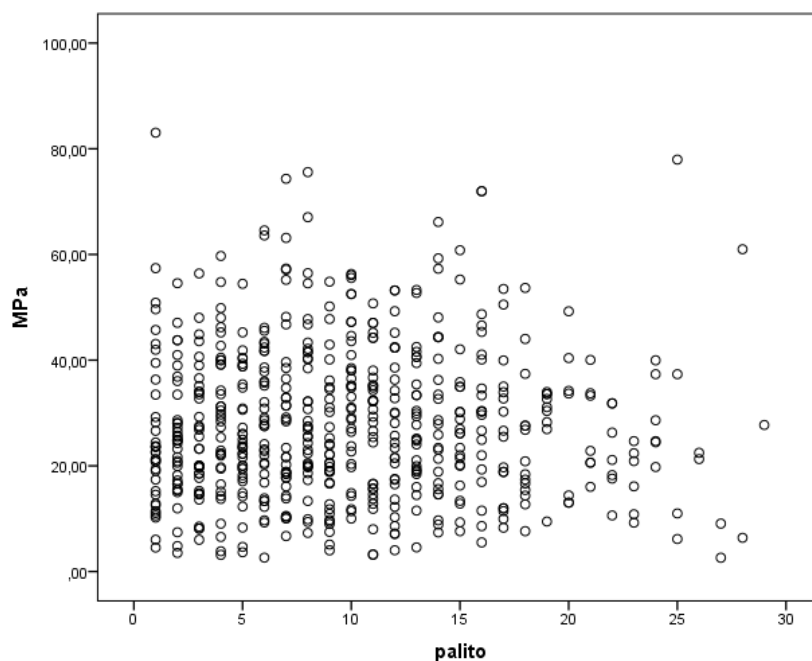
8.2. Resistência adesiva à dentina por microtracção (μ TBS)

Esta investigação envolve a medição de uma variável (adesão) em diferentes unidades de observação (palitos de dentina) provenientes da mesma unidade experimental (dente), o que pode resultar em correlações não nulas e variâncias heterogêneas que violam os pressupostos dos modelos lineares gerais (GLM), requerendo a modelação desses efeitos através da análise de dados usando modelos mistos (MM).

A utilização de MM nesta análise requer que a estrutura de covariância entre as observações repetidas em cada unidade experimental seja conhecida. A selecção da melhor e mais simples estrutura de covariância efectua-se por comparação com a matriz de covariância não estruturada (UN), a estrutura de covariância mais complexa passível de ajustamento aos dados. No entanto, face ao elevado número de palitos obtidos para cada dente, o método UN não convergiu para uma solução que garanta a precisão dos parâmetros de covariância do modelo.

Assim, previamente à selecção da melhor estrutura de covariância, procedeu-se à representação gráfica dos valores da adesão considerando todos os palitos obtidos por dente (gráfico 2), a qual sugere uma matriz de covariância homogênea (gráfico 2). Na selecção da melhor estrutura, foram então consideradas as seguintes matrizes para variâncias homogêneas: Auto-Regressiva de 1ª ordem (AR1), Auto-Regressiva com média móvel (ARMA11), Simetria Composta (SC), Simetria Composta de correlação (SCCORREL), Identidade (ID) e *Toeplitz*. A qualidade do ajustamento obtido com as diferentes matrizes foi avaliada usando os critérios de informação de *Akaike* (AIC), *Hurvich* e *Tsai* (AICC), *Bozdogan* (CAIC) e de *Bayes* e *Schwarz* (BIC).

Gráfico 2: Dispersão dos valores de resistência adesiva em palitos de dentina



A tabela 7 apresenta os valores mínimos, máximos, médio e desvio-padrão nos diferentes adesivos e protocolos, considerando o dente como unidade de observação, o que significa que, para cada dente foram considerados os valores médios obtidos sobre todos os palitos produzidos para essa unidade de observação.

Tabela 7: Estatística descritiva dos dados referentes à resistência adesiva à dentina por microtracção (μ TBS) dos adesivos estudados, em função do protocolo ER e SE

Adesivos	Protocolo	N	μ TBS (Mpa)			
			Min	Max	Média	D.P.
EM1	ER	5	26,26	42,62	32,4397	6,37588
	SE	5	18,75	34,35	26,8069	6,54590
EM2	ER	5	21,26	33,92	29,3480	5,31726
	SE	5	26,01	33,73	30,2249	3,39059
FUT	ER	3	30,24	35,86	33,9636	3,22091
	SE	3	21,15	26,16	24,1025	2,61854
SBU	ER	5	17,55	35,50	26,1960	6,46432
	SE	5	19,46	28,06	23,6867	3,14667

A tabela 8 apresenta os resultados do ajustamento do modelo usando vários critérios de informação e considerando as várias estruturas de covariâncias.

Tabela 8: Informação sobre diversas estruturas de covariâncias

	AR1	ARMA11	CS	CSCORREL	ID	TOEPLITZ
-2 Restricted Log Likelihood	4814,076	4801,715	4801,715	4801,715	4814,150	NC
Akaike's Information Criterion (AIC)	4818,076	4807,715	4805,715	4805,715	4816,150	NC
Hurvich and Tsai's Criterion (AICC)	4818,097	4807,756	4805,736	4805,736	4816,156	NC
Bozdogan's Criterion (CAIC)	4828,837	4823,856	4816,476	4816,476	4821,530	NC
Schwarz's Bayesian Criterion (BIC)	4826,837	4820,856	4814,476	4814,476	4820,530	NC

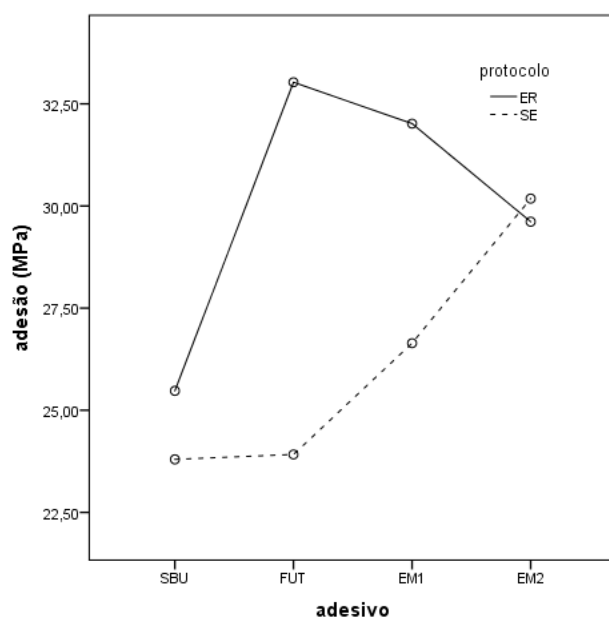
De acordo com os critérios de informação, verifica-se que a melhor qualidade de ajustamento do modelo, após penalização do valor de -2 Log (Verossimilhança Restrita) tendo em conta o número de parâmetros do modelo, é obtida com uma estrutura covariância de simetria composta, traduzindo a existência de variâncias homogêneas e correlações também homogêneas. É importante notar que a consideração de estruturas de covariâncias heterogêneas, como a matriz diagonal e simetria composta heterogênea, resultaram em ajustamentos de pior qualidade, comparativamente aos resultados que constam na tabela 8.

Face a estes resultados, o modelo que melhor traduz os efeitos do tipo de adesivo e protocolo, assim como da interação entre estes factores, nas propriedades de adesão de palitos de dentina é o que se representa na tabela 9, da qual se conclui que apenas o factor protocolo tem um efeito significativo sobre a adesão, sendo esta significativamente mais elevada para o protocolo ER ($p = 0,026$), independentemente do tipo de adesivo. Estes efeitos podem ser melhor visualizados no gráfico 3.

Tabela 9: Testes aos efeitos fixos de tipo III

Fator	GL num.	GL den.	F	Sig.
Constante	1	28,306	1049,626	<0,001
adesivo	3	28,046	2,172	0,114
protocolo	1	28,306	5,507	0,026
adesivo * protocolo	3	28,046	1,429	0,255

Gráfico 3: Adesão de diferentes adesivos sob protocolos ER e SE



Por fim, importa acrescentar que as conclusões anteriores com base nos resultados apresentados na tabela 9 não se alterariam caso o método GLM tivesse sido aplicado, e considerando os valores médios de adesão calculados com base nos vários palitos por dente.

8.3. Análise de dados das fraturas

De forma a avaliar se existe uma associação entre o tipo de adesivo e o tipo de fratura (adesiva (A) / coesiva (C)), foi aplicado o teste de qui-quadrado para independência considerando os dados que constam na tabela 10. Nesta tabela e para cada adesivo, o número de fraturas do tipo adesivo ou coesivo

apresentado refere-se ao total observado em protocolo ER e SE. De acordo com os resultados, não se verifica associação entre o tipo de adesivo e o tipo de fratura ($p = 0,189$), pelo que se pode afirmar que a prevalência de fraturas de um determinado tipo (A ou C) não difere entre adesivos.

Tabela 10: Total de fraturas A e C por adesivo

	SBU	FUT	EM1	EM2	Total
fraturas A	207	93	140	158	598
%	77,5%	86,1%	75,7%	79,0%	78,7%
C	60	15	45	42	162
%	22,5%	13,9%	24,3%	21,0%	21,3%
Total	267	108	185	200	760
%	100%	100%	100%	100%	100%

8.4. Análise da interface adesiva por MEV

As imagens ao MEV obtidas da interface adesiva dos sistemas adesivos comerciais (SBU e FUT) e dos experimentais (EM1 e EM2) são coincidentes com os resultados obtidos para a μ TBS, onde se verifica que o protocolo ER apresenta valores significativamente mais elevados do que o protocolo SE, independentemente do tipo de adesivo utilizado. Da mesma forma, para todos os adesivos, as imagens ao MEV revelam uma melhor hibridização da dentina, com a presença de uma camada híbrida mais espessa e a formação de *resin tags* mais longos com o protocolo ER (Figura 10-13).

Apesar de não terem sido verificadas diferenças significativas entre os vários adesivos, as imagens ao MEV revelam algumas diferenças na morfologia da interface adesiva.

Com o protocolo ER, o adesivo SBU apresentou a formação da camada híbrida mais espessa (11,3 μ m) com a formação de alguns *resin tags* (Fig. 10 – A e C). O FUT foi o adesivo com a hibridização na dentina menos profunda, apresentando uma camada híbrida com 7,6 μ m não sendo possível visualizar a formação de *resin tags* (Fig. 10 – B, D). Os adesivos experimentais, EM1 e EM2, apresentaram a formação de uma camada híbrida uniforme com 8,9 μ m e 9,6 μ m de espessura, respetivamente, revelando ainda uma boa penetração dentro

dos túbulos dentinários marcada pela presença de inúmeros *resin tags* (Fig. 11). Os *resin tags* mais longos (154 μm de comprimento) foram observados nas imagens onde o adesivo EM2 foi utilizado (Fig. 11 – F).

Quando aplicado o protocolo SE, os adesivos EM1 e EM2 apresentaram uma morfologia da interface adesiva semelhante, com a presença de uma camada híbrida uniforme, sendo possível observar a formação de vários *resin tags* (Fig. 13). Ainda assim, o adesivo EM2 permitiu a formação da camada híbrida mais espessa (5,4 μm) (Fig. 13 – F, H), comparativamente com a interface adesiva obtida com os outros adesivos estudados (Fig. 12 – A-D, Fig. 13 – E, G). Relativamente aos adesivos comerciais SBU e FUT, ambos apresentaram uma morfologia da interface adesiva com pouca hibridização, representada por uma camada híbrida fina e pouco definida e com a formação de poucos *resin tags* (Fig. 12).

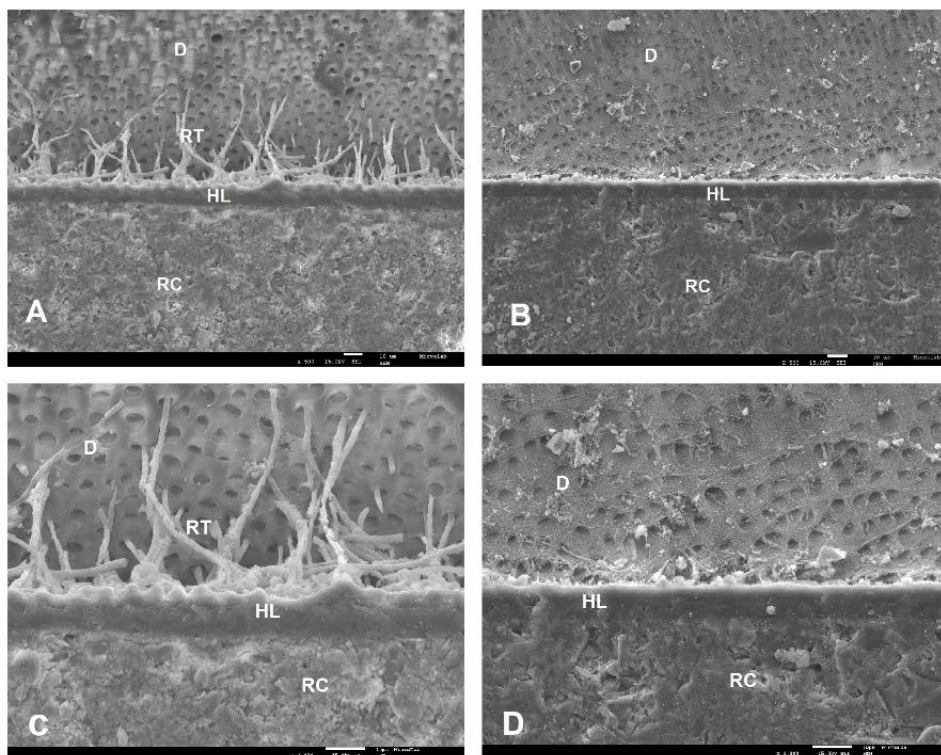


Fig. 10: Imagens ao MEV da interface adesiva dos adesivos comerciais (SBU e FUT) quando aplicado o protocolo ER. Foram utilizadas ampliações de 500x (A, B) e 1000x (C, D). A e C - SBU com uma camada híbrida (HL) de 11,3 μm de espessura; B e D -FUT com uma camada híbrida (HL) de 7,6 μm de espessura, não sendo possível identificar a presença de *resin tags* (RT). RC - resina composta; D - dentina; HL - camada híbrida; RT – *resin tags*.

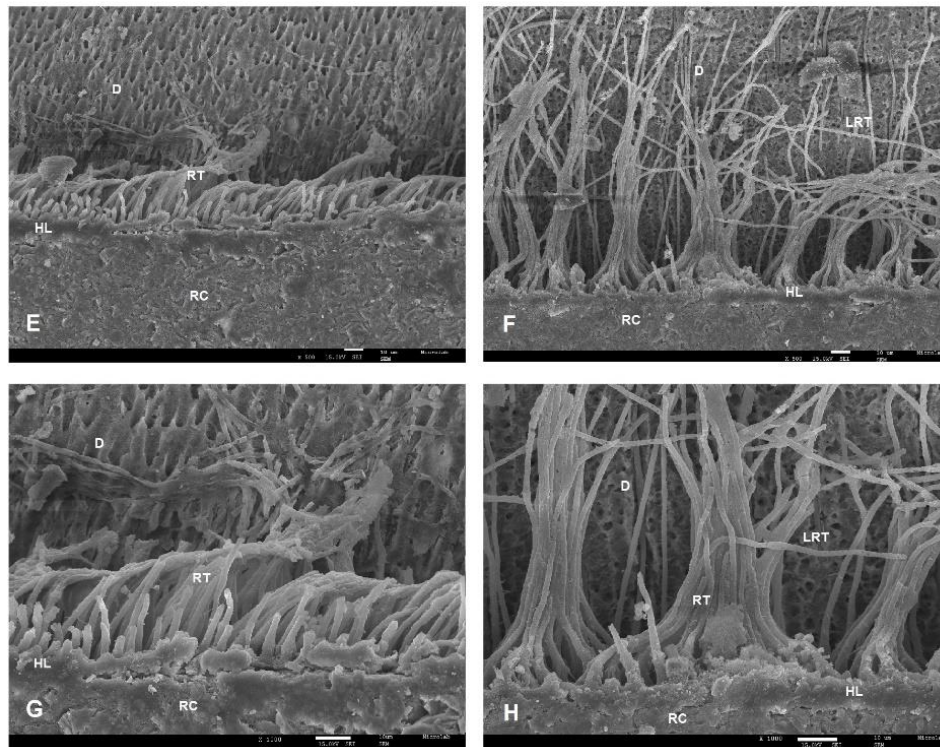


Fig. 11: . Imagens ao MEV da interface adesiva dos adesivos experimentais (EM1 e EM2) quando aplicado o protocolo ER. Foram utilizadas ampliações de 500x (**E, F**) e 1000x (**G, H**). **E** e **G** – EM1 com uma camada híbrida (HL) de 8,9 μm de espessura; **F** e **H**— EM2 com uma camada híbrida de 9,6 μm de espessura, presença de resin tags (RT) com 154 μm de comprimento e inúmeros resin tags laterais (LRT). RC—resina composta; D—dentina; HL—camada híbrida; RT—resin tags; LRT— resin tags laterais.

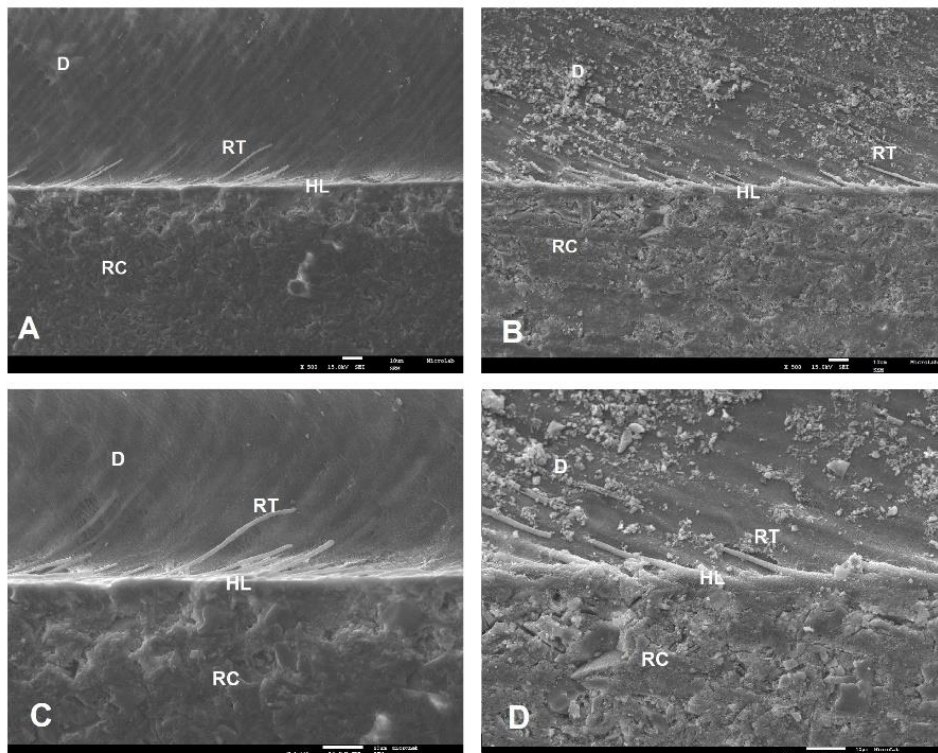


Fig. 12: Imagens ao MEV da interface adesiva dos adesivos comerciais (SBU and FUT) quando aplicado o protocolo SE. Foram utilizadas ampliações de 500x (**A, B**) e 1000x (**C, D**). **A e C** - SBU com uma camada híbrida (HL) de 2 μ m de espessura e poucos resin tags (RT) estão presentes; **B e D** - FUT com uma camada híbrida (HL) pouco definida e muito poucos resin tags (RT). RC—resina composta; D—dentina; HL—camada híbrida; RT—resin tags.

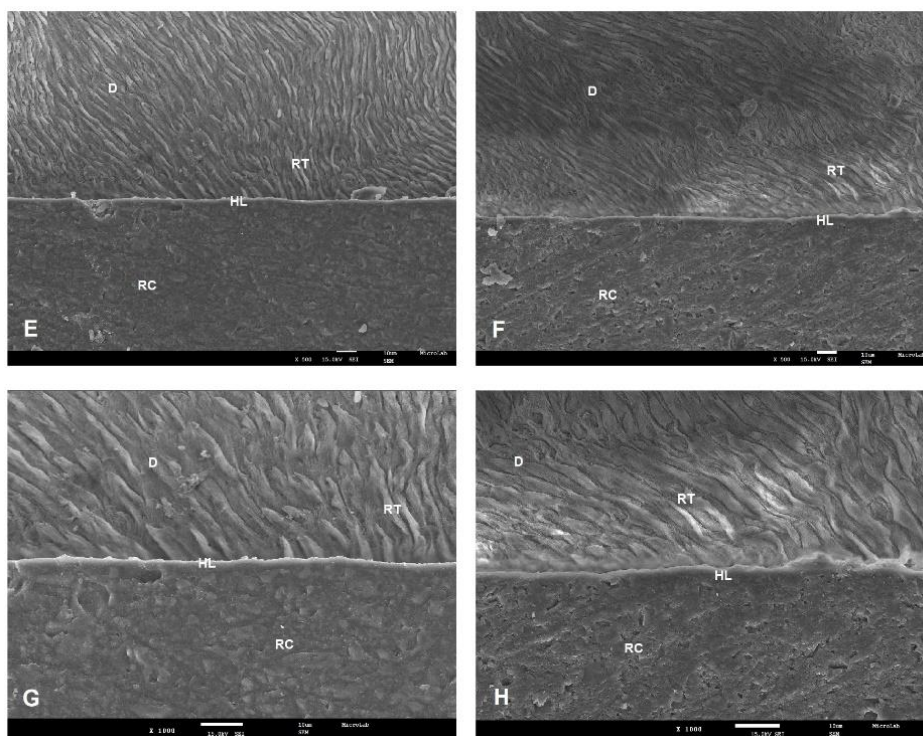


Fig. 13: Imagens ao MEV da interface adesiva dos adesivos experimentais (EM1 e EM2) quando aplicado o protocolo SE. Foram utilizadas ampliações de 500x (E, F) e 1000x (G, H). E e G - EM1 com uma camada híbrida (HL) de 3 μ m de espessura e alguns resin tags (RT) presentes; F e H - AE2 com uma camada híbrida (HL) de 5,4 μ m de espessura e vários resin tags (RT) presentes. RC -resina composta; D - dentina; HL - camada híbrida; RT - resin tags;

8.5. Análise da viabilidade celular – resultados preliminares

Após 24 horas de contato das células 3T3 com os meios de cultura previamente condicionados pelos adesivos em estudo, observou-se ao microscópio ótico invertido (Axiovert® 25, ZEISS Microscopy – Jena, Alemanha) que, para todos os sistemas adesivos e em todas as diluições, a maioria das células tinham alterações morfológicas evidentes, apresentando uma morfologia arredondada, típica de células não aderidas, e semelhante ao observado nas células incubadas com DMSO (controle positivo). Contrariamente, os poços onde as células foram incubadas apenas com DMEM (controle negativo) continuavam a apresentar células com uma morfologia alongada, fusiforme, típica de fibroblastos viáveis e devidamente aderidos à placa.

Foi ainda possível constatar que os poços que continham os meios condicionados pelos adesivos continham muitos detritos (sólidos) em suspensão, muito provavelmente resultado de uma polimerização incompleta dos adesivos e que se libertaram no meio, que dificultavam uma boa visualização das células.

A tabela 11 indica os resultados da viabilidade celular de cada amostra, calculados de acordo com a fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \text{Abs}_{595\text{nm}} (\text{A}) / \text{Abs}_{595\text{nm}} (\text{C-}) \times 100$$

onde $\text{Abs}_{595\text{nm}} (\text{A})$ é a média da absorvância da amostra, e $\text{Abs}_{595\text{nm}} (\text{C-})$ a média da absorvância controlo negativo (100 % viabilidade).

Tabela 11: Viabilidade celular determinada pelo ensaio de MTT. Os valores representam a média e desvio padrão (n=5).

VIABILIDADE CELULAR		
AMOSTRAS	Média* (%)	D.P. (%)
DMSO (controlo positivo)	-5	7
EM1	20	10
EM1 1:2	12	12
EM1 1:4	10	7
EM1 1:10	-2	6
EM2	-4	5
EM2 1:2	-2	7
EM2 1:4	-4	3
EM2 1:10	1	7
SBU	-5	8
FUT	-4	4
DMEM (controlo negativo)	100	12
*valores calculados após subtração da Abs do branco do ensaio de MTT		

9. DISCUSSÃO

Os sistemas adesivos Universais apresentam-se como a geração mais recente de adesivos e, graças à sua formulação, idealmente permitem aderir ao esmalte e dentina com igual eficácia com qualquer um dos protocolos, etch-and-rinse e self-etch, podendo o operador selecionar a melhor técnica para cada situação clínica. No entanto, quando se analisam os resultados publicados na literatura verifica-se que os sistemas adesivos Universais existentes no mercado não estão a cumprir esses requisitos (Rosa et al., 2015; Cuevas-suárez et al., 2019; Cardoso et al., 2019).

Existe uma grande disparidade nos resultados publicados da resistência adesiva à dentina após 24 horas de aplicação dos sistemas adesivos Universais comerciais. Alguns autores defendem que não existem diferenças significativas entre os protocolos ER e SE quando se utilizam sistemas adesivos universais (Hanabusa et al., 2012; Isolan et al., 2014) enquanto outros referem uma melhor performance quando aplicados com o protocolo ER (Leite et al., 2018). Acredita-se que estas diferenças poderão ser atribuídas às diferenças existentes na composição química dos adesivos estudados, sendo que é consensual que a performance dos adesivos universais é bastante dependente do material (Elkaffas et al., 2018).

De acordo com duas revisões sistemáticas feitas por Rosa et al., (2015) e Cuevas-Suárez et al., (2019), a *performance* dos sistemas adesivos universais está dependente do pH do adesivo, do substrato ao qual vão aderir (esmalte ou dentina) e da estratégia adesiva utilizada (SE ou ER). Cuevas-Suárez et al., (2019) salientam ainda que a estabilidade dos adesivos universais depende bastante do pH, sendo que para a adesão à dentina, os adesivos universais mild (pH~2) parecem ser os sistemas com melhor estabilidade adesiva independentemente da estratégia adesiva utilizada.

Neste trabalho, os resultados da resistência adesiva encontraram diferenças significativas apenas nos protocolos utilizados (ER e SE), não existindo uma interação entre adesivo e protocolo. Assim, não se pode estabelecer nenhum tipo de comparação entre adesivos e protocolos.

Entre os dois protocolos utilizados, o ER foi o que apresentou uma eficácia

significativamente superior ($p = 0,026$), independentemente do adesivo. Sendo que os adesivos estudados se enquadram na classificação *intermediatly strong* (FUT, EM1 e EM2) e *ultra-mild* (SBU) relativamente ao valor de pH, estes resultados estão de acordo com a literatura (Cuevas-Suárez et al., 2019).

Quando a estratégia ER é utilizada, o ácido dissolve o conteúdo mineral da dentina, incluindo a remoção do *smear layer* e dos *smear plugs* dentro dos túbulos dentinários. Como resultado os túbulos dentinários ficam abertos e a rede de colagénio exposta a uma profundidade ainda considerável (Pashley et al., 2011; Cuevas-Suárez et al., 2019). Após a aplicação do adesivo os monómeros são infiltrados entre as fibras de colagénio substituindo a água que lá se encontra (Perdigão et al., 1995; Cuevas-Suárez et al., 2019). Com a polimerização forma-se a camada híbrida que juntamente com a formação de *resin tags* dentro dos túbulos dentinários promovem a retenção micromecânica.

Dado que os sistemas adesivos Universais contêm na sua composição monómeros de 10-MDP que proporcionam a formação de ligações químicas estáveis ao cálcio, reforçando a adesão micromecânica existente, seria de esperar uma melhoria da resistência adesiva à microtração quando utilizados com o protocolo SE, pelo facto de neste protocolo não se efetuar o condicionamento prévio da dentina, evitando-se o passo de lavagem e secagem do ácido. Desta forma, além de ser possível controlar melhor o grau de humidade e evitar o colapso das fibras de colagénio pela secagem, o conteúdo de hidroxiapatite em redor das fibras de colagénio é mais preservado. Assim, utilizando esta estratégia adesiva, fica um maior conteúdo de cálcio disponível para a ligação com o 10-MDP.

O facto do protocolo SE não ter apresentado forças adesivas superiores poderá ter a sua explicação no valor de pH e na concentração de monómeros funcionais presente na composição de cada adesivo. Os adesivos experimentais (EM1 e EM2) por apresentarem um pH mais ácido poderão estar a não permitir que o 10-MDP cumpra a sua função. Por outro lado, o adesivo comercial SBU por possuir um pH mais alto diminui o condicionamento da dentina dificultando a penetração do adesivo.

Comparando os resultados de μ TBS obtidos não se verificam diferenças significativas entre os adesivos estudados, o que nos indica que os adesivos

experimentais (EM1 e EM2) apresentam igual resistência adesiva que os adesivos comerciais estudados (SBU e FUT). Contudo, as imagens ao MEV das interfaces adesivas revelam morfologias distintas.

Os adesivos experimentais EM1 e EM2 apresentam uma melhor hibridização do adesivo na estrutura dentinária, independentemente do protocolo utilizado (ER e SE). Esta penetração do adesivo é visível pela formação de uma camada híbrida espessa e uniforme e confirmada também pela presença de um maior número de *resin tags* (Fig. 10 e 12). Ainda assim, o adesivo EM2 parece apresentar a formação de *resin tags* mais longos, em maior quantidade e com um grande número de *resin tags* laterais. Atendendo ao facto dos adesivos EM1 e EM2 apresentarem exatamente a mesma composição, diferindo apenas no monómero de Bis-GMA e G-IEMA, e terem sido aplicados na dentina da mesma forma e pelo mesmo operador, as diferenças obtidas na morfologia da interface podem ser justificadas pelos monómeros. Pelo que se observa na Fig.11 (F e H) o adesivo EM2, quando aplicado com o protocolo ER, conseguiu penetrar mais profundamente na dentina, acompanhando o grau de desmineralização efetuado pelo condicionamento com ácido ortofosfórico prévio e pelo pH do próprio adesivo. Além disso, pensamos que ao possuir um dendrímero com uma estrutura circular, em forma de estrela em vez de linear (como é o caso do Bis-GMA), permita um tipo de retenção dentro dos túbulos dentinários mais eficaz devido à reticulação que ocorre nas 8 pontas do dendrímero, criando um emaranhado de *tags* de resina que promovem uma boa adesão micromecânica.

Outra justificação para a diferença encontrada nas imagens da MEV dos 4 adesivos (Fig. 10-13) poderá estar no tempo usado para a polimerização aquando da aplicação dos mesmos.

Nos adesivos experimentais EM1 e EM2 o tempo de irradiação foi de 60 segundos enquanto que com os adesivos comerciais foi respeitado o tempo indicado pelos fabricantes. O tempo de irradiação utilizado para os adesivos experimentais foi escolhido com base em resultados obtidos em ensaios preliminares realizados para os adesivos supracitados, onde se estudou a variação da TC em função do tempo de irradiação. Assim, concluiu-se que o adesivo que contém o dendrímero necessitava de um tempo de irradiação superior. Por esse motivo, e com base nos tempos estudados também por outros

autores, o tempo de irradiação selecionado foi de 60 segundos (Yu et al., 2014; Vasconcelos e Cruz et al., 2019).

Uma das explicações poderá estar na estrutura química dos dendrímeros, em que a polimerização ocorre em 8 pontas necessitando de mais tempo para reticular. Como resultado, a TC é superior traduzindo-se numa maior força de retenção, quer nos túbulos dentinários quer na camada híbrida. Desta forma, podemos sugerir que um dos mecanismos para aumentar a quantidade de *resin tags* formados, e conseqüentemente a retenção mecânica obtida, poderá residir no aumento do tempo de polimerização dos adesivos, em vez de utilizar apenas os 10 segundos indicados pela maioria dos fabricantes. Esta proposta é também estudada e sugerida por outros autores (Cadenaro et al., 2009).

Comparando as imagens de MEV com os resultados publicados por outros autores, cuja metodologia foi semelhante, verifica-se que existiu uma hibridização semelhante à dentina com os sistemas adesivos testados (Wagner et al., 2014; Chen et al., 2015). Embora sem diferenças significativas na eficácia adesiva por microtração entre os protocolos (ER e SE), Wagner et al., (2014) também mostraram uma melhor penetração da dentina com a abordagem ER do que a com a SE, onde a profundidade média da camada híbrida foi de 3-4 μm . A penetração nos túbulos dentinários dos sistemas adesivos Universais estudados por estes autores também foi comprovada pela formação de longos *resin tags*.

Relativamente aos resultados preliminares onde foi avaliada a citotoxicidade dos adesivos experimentais (EM1 e EM2) e dos comerciais (SBU e FUT), verificou-se que todas as amostras reduziram drasticamente a viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 nas condições testadas. Alguns factos podem ter contribuído para este resultado pouco expectável.

Uma das explicações poderá ser a quantidade de adesivo que foi utilizada na preparação dos lixiviados; a quantidade total de adesivo utilizado nesta experiência foi muito superior à utilizada na prática clínica, devido ao facto de se ter optado por realizar o teste de acordo com a norma ISO 10993-12, (2007) para a preparação dos extratos. Desta forma, seria possível a comparação dos resultados obtidos e os vários estudos publicados. Assim, utilizou-se um rácio área de superfície/volume de meio de extração de $6\text{cm}^2/\text{mL}$ tal como o indicado

na norma para materiais que se aplicam em espessuras muito finas (<0,5 mm).

No entanto, outra possível explicação poderá ser a incompleta polimerização dos adesivos nos moldes utilizados com a consequente maior libertação de monómeros para o meio de cultura.

Pelo facto dos moldes já testados nos testes da taxa de conversão dos adesivos serem em material plástico não autoclavável, optou-se por preparar novos moldes em silicone autoclaváveis. Estes moldes adaptados permitiram que todo o processo de pipetagem dos adesivos e fotopolimerização fosse efetuado na câmara de fluxo laminar mantendo a necessária esterilidade.

Contudo, este aspeto contribuiu possivelmente para uma polimerização incompleta das pastilhas de adesivo em toda a sua profundidade, permitindo a libertação de monómeros em excesso para o meio de cultura aquando da preparação dos lixiviados. Este facto também pode explicar o aspeto turvo, e a maior acidez do meio e consequentemente justifica a elevada toxicidade obtida em todos os adesivos estudados.

Sabe-se que a toxicidade destes materiais poliméricos está muito dependente da taxa de conversão dos mesmos. Uma polimerização incompleta do adesivo resultará numa maior libertação de monómeros que, devido ao seu reduzido tamanho e forte reactividade química, podem atravessar os túbulos dentinários e atingir a polpa em concentrações que poderão ser tóxicas (Chen et al. 2001; Schneider et al., 2019; Caldas et al., 2019). Neste sentido, e atendendo aos resultados obtidos para a taxa de conversão dos adesivos estudados, seria de esperar uma menor toxicidade nos adesivos com uma TC significativamente superior (EM2 e FUT), caso tivesse sido respeitado o mesmo procedimento de fotopolimerização. No entanto, tendo a polimerização e consequentemente a TC sido, muito possivelmente, afetadas pela utilização de moldes com formato irregular e mais profundos, a elevada citotoxicidade observada em todos os adesivos estudados poderá ter explicação.

Pupo et al. 2017, revelaram nos resultados da citotoxicidade avaliados com MTT, que adesivos com uma composição semelhante apresentavam um grau de toxicidade moderada, com uma média de morte celular entre 2,13% e 56,57%. Ao analisarmos o protocolo utilizado, verificamos que os autores optaram por não respeitar o rácio de preparação dos extratos aconselhado na

norma ISO 10993-12, (2007), utilizando um rácio de uma concentração muito menor do que a utilizada neste ensaio preliminar (cerca de 60x). Para isso, prepararam alíquotas contendo apenas 10µL de adesivo para a mesma quantidade de meio de cultura (3 mL). Além disso, após as 24 h de condicionamento do meio com os adesivos, os extratos foram filtrados com filtros de 0,22µm de forma a garantir que o meio de contacto com as células estava descontaminado e sem impurezas. Este procedimento é especificamente desaconselhado na norma ISO, por contribuir para a remoção de partículas em suspensão potencialmente tóxicas, justificando a menor citotoxicidade apresentada. Mais uma vez, a utilização de moldes previamente preparados e esterilizados para esta experiência foi uma preocupação para poder garantir a descontaminação sem ter a necessidade de filtrar os meios.

Assim, de forma a garantir a polimerização completa dos adesivos, enquanto se acautela a não contaminação dos meios de cultura que contêm os adesivos, serão utilizados futuramente, réplicas em silicone autoclavável dos moldes já utilizados nos testes da taxa de conversão.

Outro aspeto que se verificou neste ensaio preliminar foi que seria interessante avaliar a citotoxicidade dos monómeros de Bis-GMA e G-IEMA separadamente de forma a, clarificar se o G-IEMA não contribui para o aumento da citotoxicidade dos adesivos.

Por último, será importante referir duas observações relativamente a esta metodologia. A exposição das células aos meios de cultura condicionados pelos adesivos, por si só, não é a forma ideal de mimetizar a situação que acontece clinicamente. Acredita-se que a elevada citotoxicidade observada para os adesivos com esta metodologia também poderá estar relacionada com a quantidade superior de adesivo que contacta com as células, comparativamente àquele que chega à polpa se estivéssemos num sistema vivo. Contudo, sabe-se que este é o ensaio mais padronizado, com menor número de variáveis e cujos resultados podem ser facilmente comparáveis, caso se cumpram as normas ISO. Ainda assim, será muito interessante em ensaios futuros, além do método utilizado, aplicar também o adesivo em discos de dentina colocados numa câmara pulpar artificial de forma a avaliar se a quantidade de adesivo que consegue chegar às células da polpa é suficiente para induzir toxicidade (Jiang

et al., 2017; Leite et al., 2018; Caldas et al., 2019). Além disso, estender o tempo de avaliação para as 48 h e 72 h poderá também ser um aspecto importante na análise da citotoxicidade, uma vez que, de acordo com outros estudos publicados, o pico de toxicidade acontece nas primeiras 24h, sendo que as células têm a capacidade de recuperar nas horas seguintes (Szep et al., 2002; Chen et al., 2003).

Muito embora o estudo preliminar efetuado tenha sido útil para refletir sobre todas estas questões, importa salientar que os resultados obtidos quanto à citotoxicidade relativa dos adesivos experimentais foram inconclusivos. Assim sendo, os testes irão ser repetidos e serão utilizadas as linhas celulares da polpa e da gengiva por serem as células que mais contactam com este tipo de materiais.

Face aos resultados obtidos nesta última parte experimental, é possível manter a ideia que a utilização de dendrímeros na formulação de adesivos dentários é uma alternativa promissora aos tradicionais monómeros lineares parecendo possibilitar uma melhor hibridização na dentina com um selamento dos túbulos dentinários mais longo.

O adesivo experimental EM2 continuará a ser estudado e a sua formulação ajustada a fim de serem optimizadas as suas propriedades físico-químicas e mecânicas de forma a que se traduza num material cada vez mais eficaz

PATENTE Nº 115064

**“FORMULAÇÃO PARA UM SISTEMA
ADESIVO DENTÁRIO UNIVERSAL
CONTENDO UM MONÓMERO DE
RETICULAÇÃO DENDRÍTICO DE
SEGUNDA GERAÇÃO”**

publicado no Boletim da Propriedade
Industrial Nº 070/2020 de 8 de Abril de
2020 (Anexo 5)

RESUMO

“FORMULAÇÃO PARA UM SISTEMA ADESIVO DENTÁRIO UNIVERSAL CONTENDO UM MONÓMERO DE RETICULAÇÃO DENDRÍTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO”

A presente invenção enquadra-se na área dos sistemas adesivos dentários, e refere-se mais especificamente a uma formulação para um sistema adesivo dentário Universal. É objecto da presente invenção uma formulação para um sistema adesivo dentário que compreende um monómero de reticulação dendrítico de segunda geração com pelo menos oito extremidades. Adicionalmente, é também objecto da presente invenção um processo de obtenção da formulação que compreende o referido monómero de reticulação dendrítico de segunda geração.

DESCRIÇÃO

“FORMULAÇÃO PARA UM SISTEMA ADESIVO DENTÁRIO UNIVERSAL CONTENDO UM MONÓMERO DE RETICULAÇÃO DENDRÍTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção enquadra-se na área dos sistemas adesivos dentários, e refere-se mais especificamente a uma formulação para um sistema adesivo dentário Universal.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A presente invenção encontra antecedentes mais próximos nos sistemas adesivos dentários.

Segundo a OMS, a cárie dentária é um problema grave de saúde pública e apesar dos esforços desenvolvidos na promoção da saúde e na prevenção da doença, as restaurações dentárias ainda são necessárias (WHO, 2011).

Uma lesão de cárie dentária não tratada provoca a destruição dos tecidos duros do dente (esmalte e dentina) sendo a principal razão para a perda de dentes. No tratamento da lesão de cárie, o tecido dentário cariado é removido e substituído por uma resina composta que é aderida ao esmalte e à dentina através da utilização de um sistema adesivo.

Os primeiros sistemas adesivos dentários surgiram em meados da década de 50 e consistiam em materiais à base de cianoacrilatos que se ligavam ao dente através da quelação com o cálcio. Desde o seu aparecimento, tanto a

técnica adesiva como os diferentes sistemas adesivos, têm sofrido diversas alterações com o objectivo de procurar encontrar a técnica mais rápida, aliada a uma adesão mais eficaz tanto ao esmalte como à dentina.

No entanto, verificam-se ainda algumas limitações nestes materiais que têm como principais consequências a microinfiltração e a nanoinfiltração. A microinfiltração acontece devido à presença de bactérias e fluídos provenientes da cavidade oral, no interface existente entre o dente e a restauração, enquanto a nanoinfiltração ocorre em profundidade devido à presença de água na camada adesiva. Ambos os fenómenos comprometem a duração dos tratamentos restauradores conduzindo ao aparecimento de uma cárie secundária. Este processo constitui actualmente o principal motivo de substituição das restaurações, pelo que, a procura de novas abordagens na adesão tem sido uma temática de grande interesse para a comunidade científica.

Para combater estes fenómenos, têm sido apontados na literatura vários factores importantes que deveriam ser melhorados na formulação dos adesivos, tais como: aumento da taxa de polimerização; diminuição da contracção de polimerização; aumento da penetração do adesivo para o interior da estrutura dentária; e o aumento do carácter hidrofóbico para que se possa tornar mais resistente à hidrólise causada pela água que vem da polpa dentária.

Os sistemas adesivos são compostos por três componentes fundamentais - o ácido, o *primer* e a resina adesiva, que se utilizam de maneira diferente consoante o substrato seja o esmalte ou a dentina e consoante o tipo de sistema adesivo em questão. Deste modo, dependendo de como o ácido, o *primer* e a resina adesiva interagem com o tecido dentário, os sistemas adesivos podem apresentar duas classificações diferentes, propostas por Van Meerbeek *et al.* em 2003: sistemas adesivos *etch-and-rinse* (ER) e sistemas adesivos *self-etch* (SE).

Os sistemas *etch-and-rinse* (ER) podem ser aplicados em dois ou três passos enquanto que os *self-etch* (SE), na tentativa de simplificar a técnica adesiva, podem ser aplicados em dois passos ou num passo único através do conceito de *all-in-one*. No entanto, continuam a apresentar vantagens e

desvantagens, isto é, o sistema *etch-and-rinse (ER)* acaba por apresentar maior eficácia quando o substrato dentário é o esmalte, porém, para a dentina o sistema *self-etch (SE)* acaba por aliar um conjunto de propriedades que melhoram o seu desempenho na dentina.

Recentemente foi introduzida no mercado uma nova geração de adesivos que são chamados sistemas adesivos Universais. Estes sistemas têm a vantagem de, com o mesmo frasco, poderem ser utilizados tanto na estratégia de adesão *etch-and-rinse (ER)* como na estratégia *self-etch (SE)* aliando num só frasco o melhor dos dois sistemas, sendo uma opção muito versátil e atractiva para a maioria dos profissionais de saúde.

Toxicidade dos adesivos

A maioria das formulações dos sistemas dentários e das resinas compostas são polímeros constituídos por monómeros à base de metacrilatos. O glicidildimetacrilato de bisfenol A (doravante referido apenas como Bis-GMA) foi introduzido na década de 60 por Bowan e Rodriguez (1962) e tem sido, ao longo do tempo, o monómero mais utilizado como base dos adesivos e das resinas compostas, devido à sua capacidade de se difundir nos tecidos, bem como às boas propriedades físicas e mecânicas. No entanto, este monómero contém Bisfenol A; este composto tóxico, bastante utilizado nos plásticos, tem sido associado a inúmeros efeitos citotóxicos e actividade estrogénica.

Recentemente têm sido introduzidas no mercado novas resinas compostas sem Bis-GMA, denominadas de “BPA-Free”, utilizando na sua constituição monómeros alternativos de forma a oferecer opções potencialmente menos tóxicas aos doentes. No entanto, os sistemas adesivos não têm acompanhado esta crescente oferta, existindo uma lacuna no mercado de sistemas adesivos que não contenham Bis-GMA. Sem adesivos com estas características torna-se difícil oferecer aos pacientes restaurações dentárias que sejam completamente livres deste monómero.

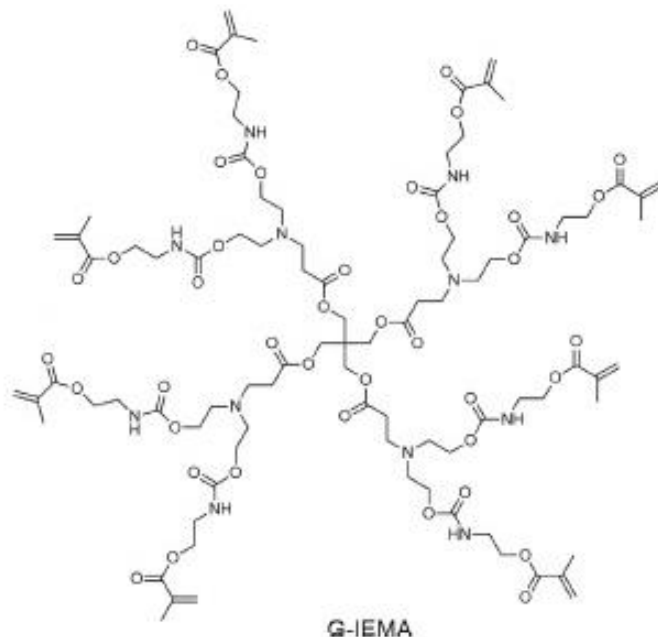
PROBLEMAS TÉCNICOS RESOLVIDOS

A crescente preocupação, com a segurança dos materiais e a procura de opções sempre mais biológicas é indiscutível, o que tem conduzido uma procura também crescente, por parte dos pacientes dessas abordagens nos tratamentos de medicina dentária.

Na presente invenção, pretendeu-se produzir uma formulação para um sistema adesivo que não incluísse na sua composição o Bis-GMA. A grande inovação da presente invenção prende-se com a utilização do G-IEMA–dendrímero de segunda geração derivado do metacrilato de 2-isocianoetilo (IEMA) (doravante apenas referido como G-IEMA) como monómero de reticulação alternativo ao Bis-GMA. Desta forma, com a incorporação do G-IEMA na formulação de um novo sistema adesivo, obteve-se um adesivo dentário do tipo Universal e livre de bisfenol A.

A escolha deste monómero dendrítico teve em consideração vários aspectos:

- a utilização crescente de dendrímeros na área da saúde;
- a sua estrutura em forma de estrela permite uma polimerização em oito extremidades, melhorando a taxa de conversão (polimerização) do adesivo e subsequente melhoria da adesão do sistema adesivo dentário;



- a polimerização ao ocorrer nas oito extremidades do monómero permite diminuir a contracção de polimerização comparativamente ao que acontece com os monómeros do tipo linear, como é o caso do Bis-GMA;
- a estrutura deste dendrímero estrelado poderá ajudar a preencher melhor os espaços entre as fibras de colagénio da dentina e dos túbulos dentinários, aumentando a penetração e posterior fixação do adesivo dentro da estrutura dentária.

Da análise dos resultados obtidos com a formulação do adesivo da presente invenção, conclui-se que:

- As elevadas taxas de polimerização obtidas, juntamente com os valores de contracção de polimerização semelhantes aos adesivos já encontrados comercialmente, possibilitam uma diminuição do fenómeno de microinfiltração e o aumento da longevidade das restaurações;
- A utilização de dendrímeros, devido à sua estrutura química em forma de estrela, parece contribuir para melhorar a penetração e retenção micromecânica do adesivo no dente, contribuindo

também para a diminuição da microinfiltração e para a obtenção de boas forças adesivas;

- A utilização do G-IEMA permitiu a obtenção de um sistema adesivo com propriedades físico-químicas e mecânicas melhoradas e/ou muito semelhantes aos sistemas adesivos comercialmente disponíveis e, simultaneamente, substituir o Bis-GMA, utilizado na maioria dos adesivos dentários. O sistema desenvolvido mostra potencial para ser, no futuro, comercializado e assim acompanhar a tendência do mercado em desenvolver materiais com menor toxicidade.

O pedido de patente com número de publicação WO2011/041677 A2, descreve formulações para um sistema adesivo dentário usadas para ligar materiais dentários a tecidos duros compreendendo uma mistura polimerizável de um ou mais compostos multifuncionais estáveis de baixa contração, cujos compostos são derivados do ácido metacrílico ou nomeadamente metacrilatos, de ligação do dente duro (esmalte ou dentina) a materiais restauradores dentários, e apresentam selamento marginal de alta qualidade entre o dente e o material, aderindo assim e melhorando a estabilidade da restauração. Esta formulação inclui o Bis-GMA como monómero polimerizável.

O pedido de patente com número de publicação EP 2873410 A1 divulga uma composição adesiva dentária que inclui: (A) um monómero polimerizável que contém um grupo acídico e (B) um polímero dendrítico com elevado peso molecular. Sendo a reacção entre estes dois compostos a responsável pela melhoria na adesão e durabilidade do adesivo. A formulação divulgada neste pedido de patente não dá qualquer indicação da presença do G-IEMA, pelo contrário, o polímero dendrítico utilizado é estruturalmente muito diferente do G-IEMA, e um dos compostos possíveis de estarem presentes na formulação é precisamente o Bis-GMA. Esta formulação poderá também conter Bis-GMA, monómero que se pretende eliminar neste tipo de formulações para sistemas dentários.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É assim objecto da presente invenção uma nova formulação para um sistema adesivo dentário do tipo Universal que não contem bisfenol A, mantendo e/ou melhorando as propriedades físico-químicas e mecânicas dos adesivos comercialmente disponíveis.

A presente invenção refere-se assim a uma nova formulação para um sistema adesivo dentário do tipo Universal; assim, os diferentes componentes da formulação são armazenados num frasco único, compreendendo um sistema adesivo dentário e um monómero de reticulação dendrítico de segunda geração.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 – representação das estruturas químicas do Bis-GMA (A) e do G-IEMA (B), sendo visível a estrutura linear e a estrutura dendrítica de cada composto, respectivamente.

Figura 2 - representa as principais etapas da síntese do G-IEMA (a síntese foi efectuada a partir dos procedimentos já descritos na literatura por Yu B., et al, 2014)

Figura 3 - representa o espectro FTIR (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier) do G-IEMA

Figura 4 - representa o espectro de ^1H -RMN (Ressonância magnética nuclear de protão) do G-IEMA

Figura 5 - representa a taxa de polimerização ou conversão (DBC) de cada adesivo após incidência de 60 seg de luz. Sendo SBU e FUT adesivos disponíveis comercialmente e com a presença de Bis-GMA e AE1 e AE2 são os adesivos da presente invenção, sendo o AE1 o adesivo de controlo.

Figura 5a e 5b - representam as imagens obtidas por microscopia SEM da interface de ligação dos adesivos testados quando o ER foi aplicado. Foram utilizadas ampliações de 500X (A, C, E, G, I) e 2000x (B, D, F, H, J). A, B - SBU com 11,3µm de espessura de camada híbrida (HL); C, D - FUT; E, F - AE1 com 12,3 µm de espessura HL; G-J - AE2 com 11,2µm de espessura HL e tags de

resina (RT) com 18,2µm de comprimento. RC - resina composta; D - dentina; HL - camada híbrida; RT - tags de resina; LRT - tags de resina lateral.

Figura 6 - Microscopias SEM da interface de ligação dos adesivos testados quando SE foi aplicado. Ampliação de 500X (A, C, E, G) e 2000x (B, D, F) foram utilizados. A, B - SBU; C, D - FUT; E, F - AE1; G - AE2. RC - resina composta; D - dentina; HL - camada híbrida; RT - tags de resina; LRT - tags de resina lateral.

No âmbito da presente invenção, “Tags” de resina são prolongamentos de resina adesiva que ficam polimerizados dentro do tecido dentário. Quanto em maior número e mais longos forem os prolongamentos maior a penetração do adesivo, permitindo uma melhor adesão micromecânica ao dente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma nova formulação para um sistema adesivo dentário do tipo Universal, isto é, um adesivo que se enquadra no tipo de adesivos mais recentes e mais versáteis que podem ser utilizados segundo dois protocolos de aplicação: *etch-and-rinse (ER)* e *self-etch (SE)*. O sistema adesivo da presente invenção será aplicado no dente (esmalte e/ou dentina) e servirá como adesivo de ligação entre o dente e uma resina composta, possibilitando realizar uma restauração dentária, tal como os demais sistemas adesivos existentes actualmente. O sistema adesivo dentário que contém a formulação da presente invenção poderá ainda ser aplicado em dois tipos de substrato dentário: esmalte e dentina. O sistema adesivo dentário da presente invenção não inclui na sua composição o Bis-GMA, sendo por isso um produto que é potencialmente inócuo, eliminado-se os efeitos tóxicos associados à exposição ao bisfenol A, nomeadamente o efeito estrogénico, por ex, apresentando deste modo uma toxicidade mais reduzida face aos adesivos dentários que contêm o Bis-GMA.

Para chegar à formulação do sistema adesivo dentário da presente invenção foi necessário efetuar a síntese química do G-IEMA, uma vez que o mesmo não está comercialmente disponível. A síntese deste monómero dendrítico encontra-se descrita abaixo, tendo tido a base da sua síntese na literatura existente. O G-IEMA foi posteriormente utilizado como monómero de reticulação da formulação da presente invenção.

A este monómero de reticulação dendrítico de segunda geração foram adicionados outros compostos, tendo por base o conhecimento da composição de outros adesivos comercialmente disponíveis, tais como restantes monómeros funcionais, agentes de copolimerização, iniciadores da reacção de polimerização, água e álcool, que foram adquiridos comercialmente.

Após terem-se encontrado as % ideais para cada componente da formulação, os diferentes componentes foram misturados num frasco de plástico completamente opaco, obtendo-se um líquido viscoso de coloração amarelada.

Síntese química do dendrímero G-IEMA (monómero de reticulação dendrítico que está compreendido na formulação do sistema adesivo da presente invenção)

A síntese deste monómero foi realizada pelos inventores da presente invenção e tendo como base a descrição da sua síntese a literatura existente e relacionada. Foram, no entanto, introduzidas pequenas alterações aos procedimentos experimentais já descritos por forma a otimizar e condições de trabalho e graus de pureza do composto final tendo em vista o objectivo proposto na presente invenção. A síntese foi efectuada a partir dos procedimentos já descritos na literatura por Yu B., et al, 2014. Primeiramente o monómero PETA (Figura 2 - tetraacrilato de pentaeritritol) foi purificado por cromatografia em coluna. O produto foi isolado com um rendimento de 42%, apresentando as seguintes bandas de FTIR (*Fourier Transform infrared spectroscopy*): $\nu(\text{cm}^{-1})$, 1721 $\nu(\text{C=O}$, éster), 1634 $\nu(\text{C=C}$, alceno/alifático), 1407 δ (CH, alceno), 1165 ν

(C–O, éster), 806 γ (CH, alceno). A análise do composto por ressonância magnética nuclear de próton revelou os seguintes picos: $^1\text{H-NMR}$ 6,44 (m, 4H, *trans* CH=CH₂); 6,14 (m, 8H, CH₂=CH); 5,88 (m, 4H, *cis* CH=CH₂); 4,32 (s, 8H, CCH₂O). Em seguida, foi sintetizado o composto G-(OH) com rendimento de 40%. Este composto foi obtido como um óleo incolor e com o seguinte espectro de FTIR: $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3222 $\nu(\text{O-H, álcool})$, 1711 $\nu(\text{C=O, éster})$, 1403 $\delta(\text{OH, álcool})$, 1110 $\nu(\text{C-O, éster})$, 1066 $\nu(\text{C-O, álcool})$, e apresentando o seguinte $^1\text{H-NMR}$: 3,76 (d, 8H, CCH₂O-); 3,66 (t, 16H, CH₂CH₂OH); 2,84 (t, 8H, COCH₂CH₂N); 2,76 (t, 16H, NCH₂CH₂OH); 2,58 (t, 8H, COCH₂CH₂).

Seguidamente, o G-IEMA foi sintetizado com um rendimento de 40% a partir do seu precursor G-(OH) (Fig. 2). O produto obtido apresentou-se como um óleo transparente que foi posteriormente purificado por cromatografia em coluna e cromatografia preparativa em camada fina de forma a isolar a fração correspondente ao G-IEMA com elevado grau de pureza. A caracterização do produto e o seu grau de pureza foram avaliados por FTIR e confirmados por $^1\text{H-RMN}$ (Ressonância Magnética Nuclear de próton). FTIR: $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3355 $\nu(\text{N-H, amide})$, 2956 $\nu(\text{C-H, alifático})$, 1713 $\nu(\text{C=O, éster})$, 1636 $\nu(\text{C=C, alifático/alceno})$, 1544 $\delta(\text{N-H, amide})$, 1453 $\delta(\text{CH, alceno})$, 1158, $\nu(\text{C-O, éster})$, 942 $\delta(\text{CH, alifático/alceno})$. $^1\text{H-NMR}$: 6,13 (s, 8H, *trans*, CH₂=CH(CH₃)CO); 5,53 (s, 8H, *cis*, CH₂=C(CH₃)CO); 4,16 (t, 16H, CH₂CH₂OCOC(CH₃)=CH₂); 4,07 (t, 16H, NCH₂CH₂OCONH); 3,67 (s, 8H, CCH₂O-); 3,50 (t, 16H, HNCH₂CH₂OOC); 3,29 (s, 8H, CCH₂OCO); 2,77 (8H, t, OCOCH₂CH₂N); 2,56 (16H, t, 8(NCH₂CH₂OOCNH)); 2,41 (t, 8H, 4(CH₂OOCCH₂CH₂N)); 1,88 (s, 24H, CH₂=C(CH₃)CO).

Após a síntese do monómero G-IEMA foram adicionados os restantes constituintes da formulação que será utilizada no sistema adesivo dentário.

Serão adicionados, especificamente por esta ordem ao G-IEMA, UDMA: uretano dimetacrilato; HPDPI: difeniliodoniumhexafluorofosfato; BDA: etil-4-dimetilaminobenzoato; HEMA: hidroxietil metacrilato; TEGDMA: 1,10-decametileno glicol dimetacrilato; 10-MDP: 10-metaacriloxidecil dihidrogeno fosfato; CQ: camforquinona, água e etanol.

Esta adição deverá ocorrer especificamente pela ordem referida, mais concretamente o iniciador, como a camforquinona, que deve ser o último a ser adicionado para não promover a iniciação de reações competitivas enquanto se procede à mistura dos componentes. De qualquer modo, a técnica experimental deverá ocorrer sempre da mesma forma para que não sejam introduzidas mais variáveis a serem controladas.

Para testar a eficácia da formulação da presente invenção foram incluídos vários testes físico-químicos e mecânicos de acordo com procedimentos experimentais descritos na literatura. Os resultados obtidos foram comparados com dois sistemas adesivos dentários e disponíveis comercialmente e com o sistema adesivo dentário experimental de controlo formulado pelos inventores. Este sistema adesivo experimental de controlo apresenta exatamente a mesma composição do adesivo inovador no entanto, em vez do dendrímero G-IEMA, contém Bis-GMA em igual percentagem.

A caracterização físico-química destes sistemas adesivos foi efetuada de acordo com procedimentos descritos na literatura, e consistiu em:

- determinar o pH de cada sistema adesivo em análise através de equipamentos de alta precisão e devidamente calibrados (Crison Basic 20 (Crison Instruments, Barcelona, Spain));
- medir as taxas de polimerização/conversão através dos espectros de FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, spectrometer Spectrum 65 from Perkin-Elmer (Massachusetts, USA));

- medir a contracção de polimerização através de um kit de determinação de densidades (Mettler Toledo X, Mettler Instrument Co., Highstone, NJ, USA).
- medir a taxa de absorção e solubilidade em água através dos procedimentos descritos na norma ISO4049.

Foram posteriormente efetuados testes de adesão para quantificar as forças adesivas à dentina, segundo os dois protocolos de aplicação, *etch-and-rinse* e *self-etch* (também descritos em baixo). Os testes de adesão foram efectuados através de ensaios de microtracção numa máquina de teste universal (Shimadzu AG-50kNI SD MS, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) e as forças adesivas foram obtidas em Mpa.

De forma a avaliar o grau de penetração do adesivo dentro do dente, a camada híbrida formada e os tags de resina (indispensáveis para existir uma boa adesão), o interface adesivo foi também avaliado através da microscopia electrónica (FEG-SEM JEOL, model JSM7001F, Tokyo, Japan), conforme as figuras 5 e 6 do presente pedido de patente.

OBJETOS DA INVENÇÃO

Constitui um primeiro objeto da invenção uma formulação para um sistema adesivo dentário que compreende um monómero de reticulação dendrítico de segunda geração com pelo menos oito extremidades.

A estrutura dendrítica deste tipo de monómeros permite que a polimerização seja mais eficaz, dado o número de pontos onde esta poderá ocorrer, ou seja, existem pelo menos oito extremidades onde é possível ocorrer polimerização. Deste modo a taxa de conversão (polimerização) do adesivo é melhorada, levando a uma durabilidade maior da restauração dentária.

Além disso, a polimerização ao ocorrer nas oito extremidades do monómero de reticulação permite diminuir a contracção de polimerização

comparativamente com o que acontece com os monómeros do tipo linear, como é o caso do Bis-GMA.

A estrutura deste dendrímero (o monómero de reticulação - G-IEMA) permite preencher mais eficientemente os espaços entre as fibras de colagénio da dentina e os túbulos dentinários, aumentando deste modo a penetração e posterior fixação do adesivo dentro da estrutura dentária.

Num modo de realização preferido a formulação da presente invenção contém o monómero de reticulação dendrítico de segunda geração com pelo menos oito extremidades - o G-IEMA- derivado do metacrilato de 2-isocianatoetilo.

Com a utilização deste monómero de reticulação dendrítico de segunda geração (o G-IEMA) é, eliminam-se os efeitos tóxicos associados à exposição ao Bisfenol A, isto é, o efeito estrogénico, por ex, assim este sistema apresentará toxicidade reduzida face aos sistemas que contêm Bis-GMA, sendo que a utilização do G-IEMA neste tipo de sistemas adesivos dentários apresenta esta mais valia, não comprometendo em simultâneo a eficácia do sistema adesivo e até melhorando certos parâmetros essenciais para a sua durabilidade, como a força adesiva à dentina, face aos sistemas adesivos dentários conhecidos.

Num modo de realização preferido a formulação da presente invenção compreende ainda UDMA uretano dimetacrilato como monómero de reticulação ou cross-linking; HPDPI: difeniliodoniumhexafluorofosfato como monómero de reticulação ou cross-linking; BDA: etil-4-dimetilaminobenzoato como co-iniciador químico da reação de polimerização; HEMA: hidroxietil metacrilato como monómero de reticulação ou cross-linking ; TEGDMA: 1,10-decametileno glicol dimetacrilato como monómero de reticulação ou cross-linking ; 10-MDP: 10-metaacriloxidecil dihidrogeno fosfato como monómero funcional; CQ: camforquinona como iniciador químico da reação de polimerização/fotoiniciador, água e etanol que serão os solventes.

Noutro modo de realização preferido a formulação da presente invenção apresenta as seguintes percentagens dos seus constituintes e em massa:

15-17% de G-IEMA;
5-10% de UDMA;
1,5-2% de HDPPI;
1-1,5% de BDA;
15-25% de HEMA;
5-7% de TEGDMA;
5-10% de 10-MDP;
10-12% de água;
23-28% de etanol; e
1-1,5% de CQ.

Constitui outro objecto da presente invenção um processo de obtenção da formulação descrita anteriormente e que compreende os seguintes passos:

- a) Síntese química do monómero de reticulação dendrítico de segunda geração, G-IEMA;
- b) Adição dos restantes compostos ao G-IEMA sintetizado no passo a), num frasco de plástico e completamente opaco;
- c) Agitação da mistura numa placa de agitação entre 5 a 10 s, até se obter uma mistura homogénea;
- d) Armazenamento da mistura, abrigo da luz, em frasco devidamente rolhado, à temperatura entre os 4º e os 8ºC.

Num modo de realização preferido o processo de obtenção da formulação da presente invenção os compostos são adicionados especificamente pela seguinte ordem: G-IEMA, UDMA, HPDPI, BDA, HEMA, TEGDMA, 10-MDP, água, etanol e CQ.

A ordem dos diversos componentes visa numa primeira abordagem a criação de uma metodologia para não haver diferenças nas várias formulações. Por outro lado, considera-se a consistência de cada componente e a sua função

na formulação. A camforquinona sendo um iniciador químico da reação de polimerização/fotoiniciador e reagindo à luz será a última a ser adicionada de forma a que o frasco opaco seja imediatamente rolhado evitando-se assim a polimerização do adesivo. Os solventes apresentam elevada volatilidade também serão adicionados no fim do processo, contribuindo para a dissolução dos restantes componentes mais viscosos.

É ainda objecto da presente um sistema adesivo dentário do tipo Universal, que compreende a formulação descrita.

Num modo de realização preferido o sistema adesivo dentário da presente invenção apresenta um pH entre 1,90 e 3,50.

Um pH entre 1,90 e 3,50 é ideal de forma a que exista uma boa adesão micro-mecânica e química. Isto é, por um lado o adesivo com este pH provoca uma desmineralização do tecido dentário suficiente para dissolver a camada de detritos que se forma quando instrumentamos o dente com brocas criando microporosidades no esmalte e abertura dos túbulos da dentina para permitir a penetração do adesivo para dentro do dente, ficando lá retido após a sua polimerização (adesão micromecânica). Por outro lado, este valor de pH permite ainda deixar algum conteúdo de cálcio imprescindível para formar um reforço na adesão micromecânica que ocorre pela ligação química do monómero de 10-mdp presente no adesivo e o cálcio do dente (adesão química).

Noutro modo de realização preferido o sistema adesivo dentário apresenta uma taxa de polimerização entre 70-85%.

Veja-se que os sistemas adesivos comercialmente disponíveis e que contêm Bis-GMA apresentam taxas de polimerização entre 37 e 56% (Tabela 1 - AE1 (adesivo experimental de controlo) VS SBU e FUT - adesivos comercialmente disponíveis).

Os testes foram realizados sob as mesmas condições e com os mesmos constituintes, pelo que poderemos concluir que a presença do G-IEMA e a sua estrutura dentrítica será a responsável por este aumento da taxa de polimerização.

Ainda num modo de realização preferido o sistema adesivo dentário da presente invenção apresenta uma taxa de contração de polimerização (alteração/diminuição do tamanho que o adesivo sofre após a sua polimerização dentro do tecido dentário) entre 9-12%. Se contrair demasiado pode levar a fractura adesiva e consequente falha da restauração. Poderemos inferir igualmente que a presença do G-IEMA é o responsável por esta taxa de contração baixa.

Noutro modo de realização preferido o sistema adesivo dentário de acordo com a presente invenção apresenta uma taxa de absorção de água entre 160-215%.

Ainda num modo de realização preferencial o sistema adesivo dentário apresenta uma solubilidade em água entre 75-85%.

Poderemos concluir face à tabela 1 que a presença deste monómero dentrítico de segunda geração, O G-IEMA, nestes sistemas adesivos dentários em substituição do usualmente utilizado Bis-GMA, não compromete os valores relevantes da absorção e solubilidade em água.

Ainda num modo preferencial da presente invenção o sistema adesivo dentário apresenta forças adesivas à dentina após 24 h de aplicação do sistema adesivo entre 29,6 e 37 Mpa quando a aplicação é do tipo *etch-and-rinse (ER)* e entre 25,6 e 30,2 Mpa quando a aplicação é do tipo *self-etch (SE)*.

Sendo estes valores de forças adesivas melhorados face aos testes realizados (conforme valores referidos na tabela 2).

O sistema adesivo dentário do tipo Universal da presente invenção

apresenta taxas de conversão superiores às dos sistemas adesivos dentários comercialmente disponíveis e boas propriedades mecânicas quando aplicado na dentina.

O sistema adesivo dentário é igualmente um sistema adesivo inovador uma vez que contém um monómero de reticulação dendrítico na sua formulação que além de conferir as propriedades explicadas anteriormente, não contém bisfenol A ao contrário do monómero usualmente utilizado nos adesivos comerciais (o Bis-GMA), possibilitando assim reduzir o potencial citotóxico que este tipo de materiais apresenta.

PARTE EXPERIMENTAL

Para cada exemplo abaixo descrito da formulação para um sistema adesivo dentário da presente invenção foi sempre formulado igualmente uma formulação para um sistema adesivo experimental de controlo (AE1) que apresenta exactamente a mesma composição que o sistema adesivo experimental (AE2) à excepção do G-IEMA que foi substituído em igual quantidade pelo Bis-GMA. Só desta forma é possível comparar os resultados e avaliar se o G-IEMA poderá ser utilizado em alternativa ao Bis-GMA.

EXEMPLO 1

Foram preparadas duas formulações para sistemas adesivos dentários:- a formulação designada como AE2 (que contém o G-IEMA) e a formulação AE1 (que contém Bis-GMA). Para cada uma delas foram efectuadas pesagens da quantidade relativa de cada componente (em massa) e misturados num frasco opaco pela ordem a baixo indicada:

Adesivos	AE2		AE1	
	Componentes	Quantidade (%)	Componentes	Quantidade (%)
1°	G-IEMA	15	Bis-GMA	15
2°	UDMA	10	UDMA	10
3°	HPDPI	1,5	HPDPI	1,5
4°	BDA	1,5	BDA	1,5
5°	HEMA	25	HEMA	25
6°	TEGDMA	7	TEGDMA	7
7°	10-MDP	5	10-MDP	5
8°	ÁGUA	10	ÁGUA	10
9°	ETANOL	23	ETANOL	23
10°	CQ	1,5	CQ	1,5

EXEMPLO 2

Para este exemplo foi realizada uma formulação na qual foram adicionados 15,5% de G-IEMA, 20% de HEMA, 5,5% de 10-MDP e 27% de etanol. Os restantes componentes foram mantidos nas mesmas quantidades face ao exemplo 1. A ordem de adição foi a indicada no exemplo 1.

EXEMPLO 3

A formulação do sistema adesivo deste exemplo foi formulada aumentando a % de G-IEMA para 16%, e aumentando o 10-MDP para 8%. A quantidade de HEMA foi a mesma utilizada no exemplo 2 e o etanol foi reduzido para 24%. Os restantes componentes não sofreram alteração face ao exemplo 1. A ordem de adição foi a indicada no exemplo 1.

EXEMPLO 4

A formulação para o sistema adesivo do exemplo agora descrito foi formulado adicionando 15% de G-IEMA e igual quantidade de HEMA. O 10-MDP foi introduzido no adesivo em quantidade correspondente a 10% e o etanol a 28%. Os restantes componentes não sofreram alteração face ao exemplo 1. A ordem de adição foi a indicada no exemplo 1.

EXEMPLO 5

Neste exemplo a formulação do sistema adesivo contém 15,5% de G-IEMA, 22,5% de HEMA, 7% de 10-MDP e 23% de etanol. Para os restantes componentes foram utilizadas as mesmas concentrações face ao exemplo 1. A ordem de adição foi a indicada no exemplo 1.

EXEMPLO 6

Adicionou-se 16% de G-IEMA e igual quantidade de HEMA. O 10-MDP foi adicionado em 8% e o etanol numa % correspondente a 28%. Para os restantes componentes foram utilizadas as mesmas concentrações face ao exemplo 1. A ordem de adição foi a indicada no exemplo 1.

EXEMPLO 7

Utilizando a mesma % de G-IEMA do Ex. 6, aumentou-se a % de HEMA para 19% e de 10-MDP para 10%. Foi ainda utilizado 23% de etanol. Para os restantes componentes foram utilizadas as mesmas concentrações face ao exemplo 1. A ordem de adição foi a indicada no exemplo 1.

EXEMPLO 8

A formulação do sistema adesivo do presente exemplo contém 17% de G-IEMA, 23% de HEMA, 5% de 10-MDP e 23% de etanol. Para os restantes componentes não sofreram alteração face ao exemplo 1. A ordem de adição foi a indicada no exemplo 1.

CONCLUSÕES

Com os vários exemplos de formulações para o sistema adesivo dentário da presente invenção foram efectuados testes de caracterização físico-química bem como testes de adesão à dentina, utilizando sempre os dois protocolos de aplicação do adesivo (ER e SE). As tabelas abaixo apresentam o intervalo de valores obtidos com os vários exemplos de formulações efectuados (AE2 Ex.1-8). Para comparação colocamos também os resultados obtidos com os adesivos comerciais utilizados como controlo (SBU e FUT).

e com os adesivos formulados por nós que também serviram de controlo (AE1 Ex.1-8).

TABELA 1: Propriedades Físico-químicas

SISTEMAS ADESIVOS DENTÁRIOS	pH	DBC (%)	PS (%)	WS	SL
		60 sec			
SBU (COMERCIALMENTE DISPONÍVEL E COM Bis-GMA)	2,65-2,95	37,6-53,8	11,5-14,5	79,8-139,2	39,1-61,7
FUT (COMERCIALMENTE DISPONÍVEL E COM Bis-GMA)	1,7-1,9	56,0-87,2	9,8-11	69,7-227,9	35,8-94,8
AE1 (Ex.1 a 8)	1,5-2,09	70,4-76,6	9,2-11,2	83-212,6	35,3-91,9
AE2 (Ex.1 a 8)	1,94-3,5	79,7-84,1	10,3-11,1	161,9-212,1	79,4-84,2
DBC – taxa de polimerização; PS – contração de polimerização; WS – absorção de água; SL – solubilidade					

TABELA 2

FORÇAS DE ADESÃO À DENTINA		
GROUPS	PROTOCOL	
		Mpa
SBU-ER	ER	15,5-25,5
FUT-ER		23-33,0
AE1-ER (Ex.1 a 8)		32-35,3
AE2-ER (Ex. 1 a 8)		29,6-37
SBU-SE	SE	13,7-23,7
FUT-SE		13,9-23,9
AE1-SE (Ex.1 a 8)		26,6 -36,9
AE2-SE (Ex.1 a 8)		25,6 – 30,2

Comparando os resultados obtidos das formulações testadas, é possível verificar que a formulação do AE2 compreendida nos exemplos descritos anteriormente contribuiu para aumentar as taxas de polimerização (DBC) de 79,7% para 84,1%.

Da análise das tabelas 1 e 2 conclui-se que existe uma descida do pH do adesivo de 3,5 para 1,94 o que permite melhorar os valores obtidos na resistência adesiva; veja-se que quando se utiliza o protocolo SE (as forças adesivas passam de 25,6 Mpa para 30,2 Mpa).

Da mesma análise e para o protocolo ER, a também se verifica que as forças de adesão são eficazes e com valores semelhantes e até superiores aos adesivos comercialmente disponíveis (37Mpa).

Como será evidente a um perito na especialidade, a presente invenção não deverá estar limitada aos modos de realização descritos no presente documento, sendo possíveis diversas alterações que se mantêm no âmbito da presente invenção.

Evidentemente, os modos preferenciais acima apresentados são combináveis, nas diferentes formas possíveis, evitando-se aqui a repetição de todas essas combinações.

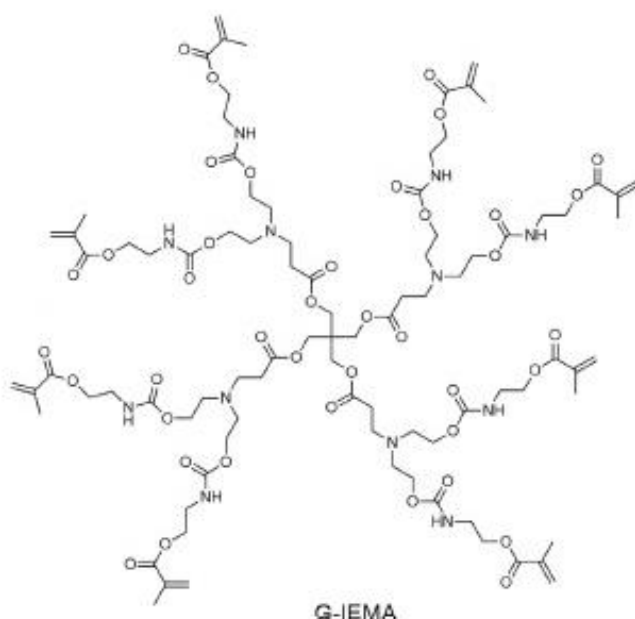
REFERÊNCIAS

- Yu B, Liu F and He J. Preparation of low shrinkage methacrylate-based resin system without Bisphenol A structure by using a synthesized dendritic macromere (G-HEMA). J Mech Behav Biomed Mater 2014; 35:1-8
- Yu B, Fang LIU, Jingwei HE, Yingcong HE and Zhengmei. Preparation of Bis-GMA-Free Dental Restorative Composites with Dendritic Macromer (G-HEMA). Advances in Polymer Technology 2015; 0:(0), 21519.

Lisboa, 8 de Outubro de 2018

- 1. Formulação para um sistema adesivo dentário caracterizada por compreender um monómero de reticulação dendrítico de segunda geração com pelo menos oito extremidades.
- 2. Formulação para um sistema adesivo dentário de acordo com a reivindicação anterior caracterizada por o monómero de reticulação dendrítico de segunda geração ser o G(2)-isocianatoetil metacrilato (G-IEMA), com formula:

REIVINDICAÇÕES



- 3. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizada por compreender ainda UDMA: uretano dimetacrilato como monómero de reticulação ou cross-linking; HPDPI: difeniliodoniumhexafluorofosfato como monómero de reticulação ou cross-linking; BDA: etil-4-dimetilaminobenzoato como co-iniciador químico da reação de polimerização; HEMA: hidroxietil metacrilato como monómero de reticulação ou cross-linking; TEGDMA: 1,10-

decametileno glicol dimetacrilato como monómero de reticulação ou cross-linking; 10-MDP: 10-metaacriloxidecil dihidrogeno fosfato como monómero funcional; CQ: camforquinona como iniciador químico da reação de polimerização/fotoiniciador, água e etanol que serão os solventes.

- 4. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizada por compreender as seguintes percentagens dos seus constituintes, em massa:

15-17% de G-IEMA;

5-10% de UDMA;

1,5-2% de HDPPI;

1-1,5% de BDA;

15-25% de HEMA;

5-7% de TEGDMA;

5-10% de 10-MDP;

10-12% de água;

23-28% de etanol; e

1-1,5% de CQ.

- 5. Processo de obtenção da formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4 anteriores caracterizado por compreender os seguintes passos:
 - a) Síntese química do monómero de reticulação dendrítico estrelado, G-IEMA;
 - b) Adição dos restantes compostos ao G-IEMA sintetizado no passo a) num frasco de plástico e completamente opaco;

- c) Agitação da mistura numa placa de agitação entre 5 a 10 s, até se obter uma mistura homogênea;
 - d) Armazenamento da mistura, abrigo da luz, em frasco devidamente rolhado, à temperatura entre os 4º e os 8ºC.
-
- 6. Processo de acordo com a reivindicação 5 caracterizado por a ordem de adição dos compostos ser a seguinte: G-IEMA, UDMA, HPDPI, BDA, HEMA, TEGDMA, 10-MDP, água, etanol e CQ.
 - 7. Sistema adesivo dentário do tipo Universal, caracterizado por compreender a formulação descrita em qualquer uma das reivindicações 1-4.
 - 8. Sistema adesivo dentário de acordo com a reivindicação 7 caracterizado por apresentar um pH entre 1,90 e 3,50.
 - 9. Sistema adesivo dentário de acordo com qualquer uma das reivindicações 7-8 caracterizado por apresentar uma taxa de polimerização entre 70-85%.
 - 10. Sistema adesivo dentário de acordo com qualquer uma das reivindicações 7-9 caracterizado por apresentar uma taxa de contração de polimerização entre 9-12%.
 - 11. Sistema adesivo dentário de acordo com qualquer uma das reivindicações 7-10 caracterizado por apresentar uma taxa de absorção de água entre 210-160%.
 - 12. Sistema adesivo dentário de acordo com qualquer uma das reivindicações 7-11 caracterizado por apresentar uma solubilidade em água entre 79-85%.

- 13. Sistema adesivo dentário de acordo com qualquer uma das reivindicações 7-12 caracterizado por apresentar forças à dentina entre 29,6 e 37 Mpa quando a aplicação é do tipo *etch-and-rinse (ER)* e entre 25,6 e 30,2 Mpa quando a aplicação é do tipo *self-etch (SE)*.

Lisboa, 8 de Outubro de 2018

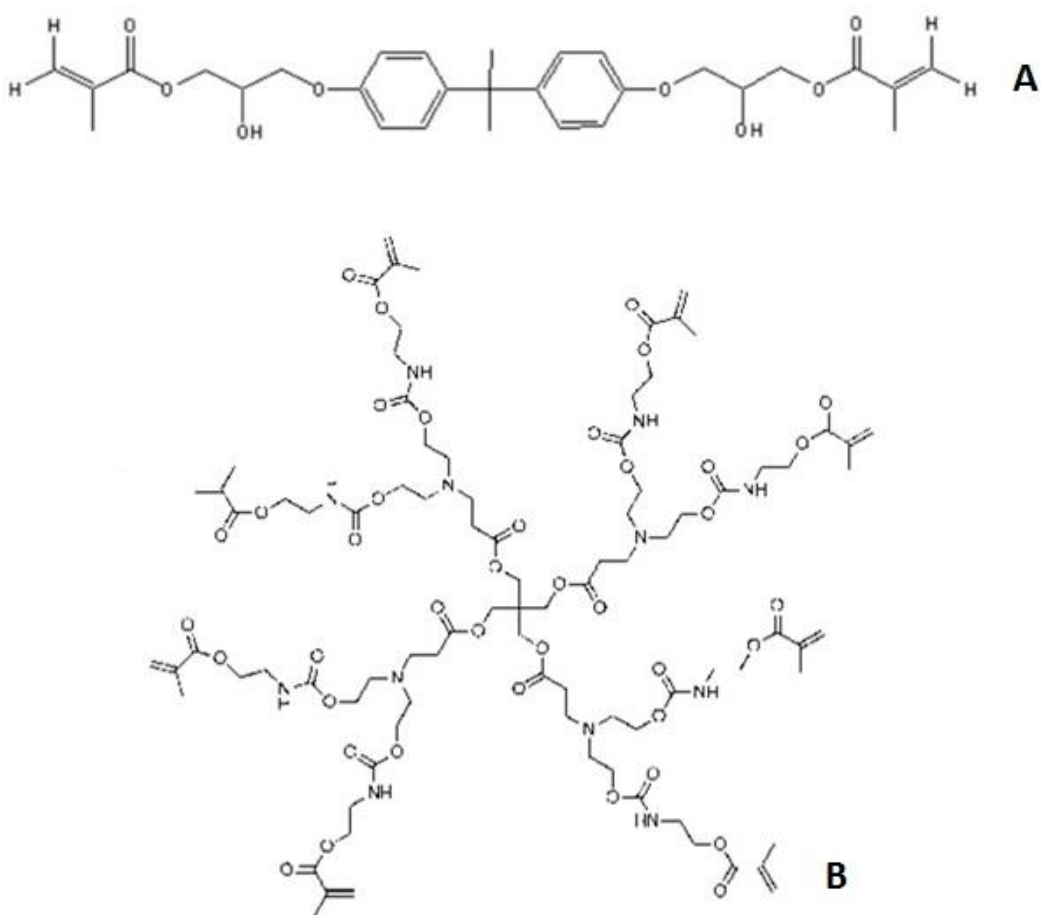


Figura 1

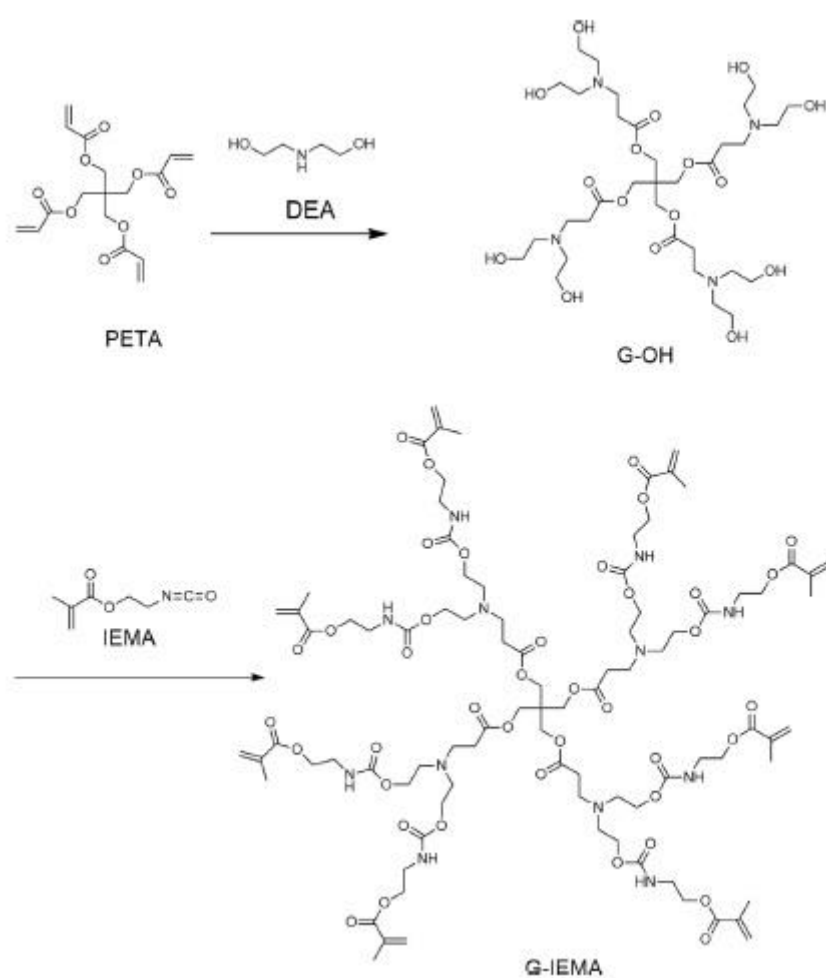


Figura 2

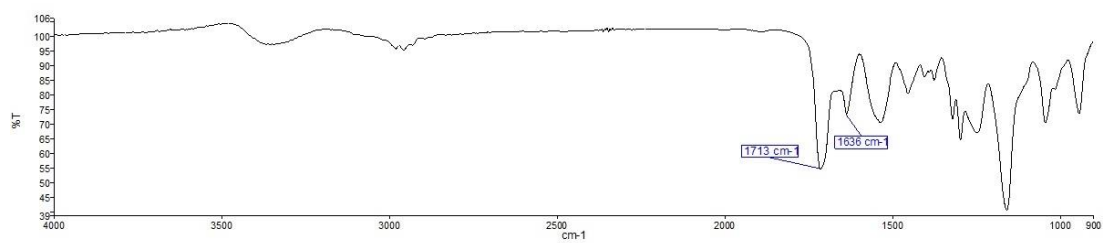


Figura 3

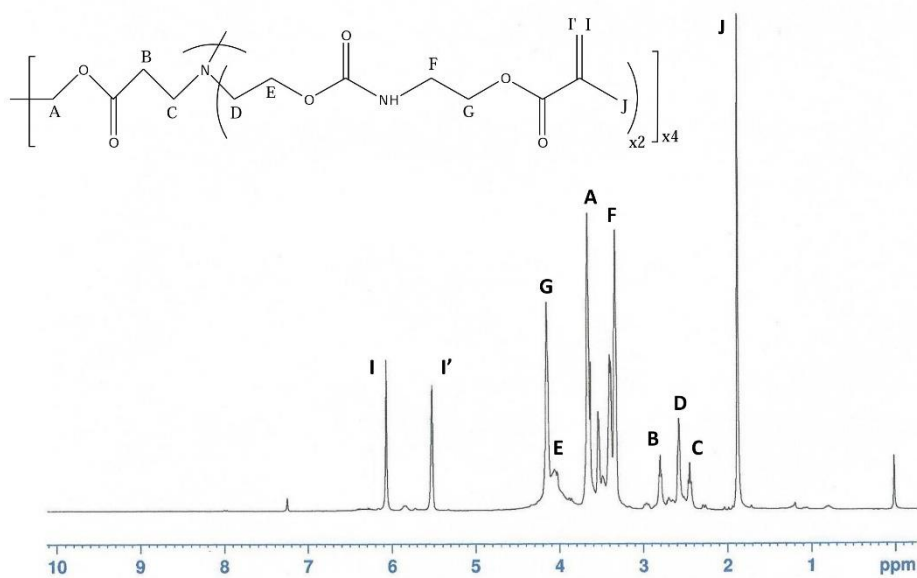


Figura 4

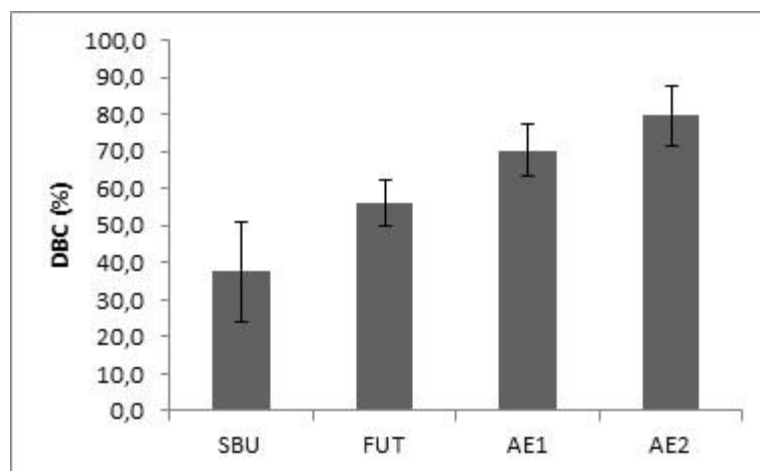


Figura 5

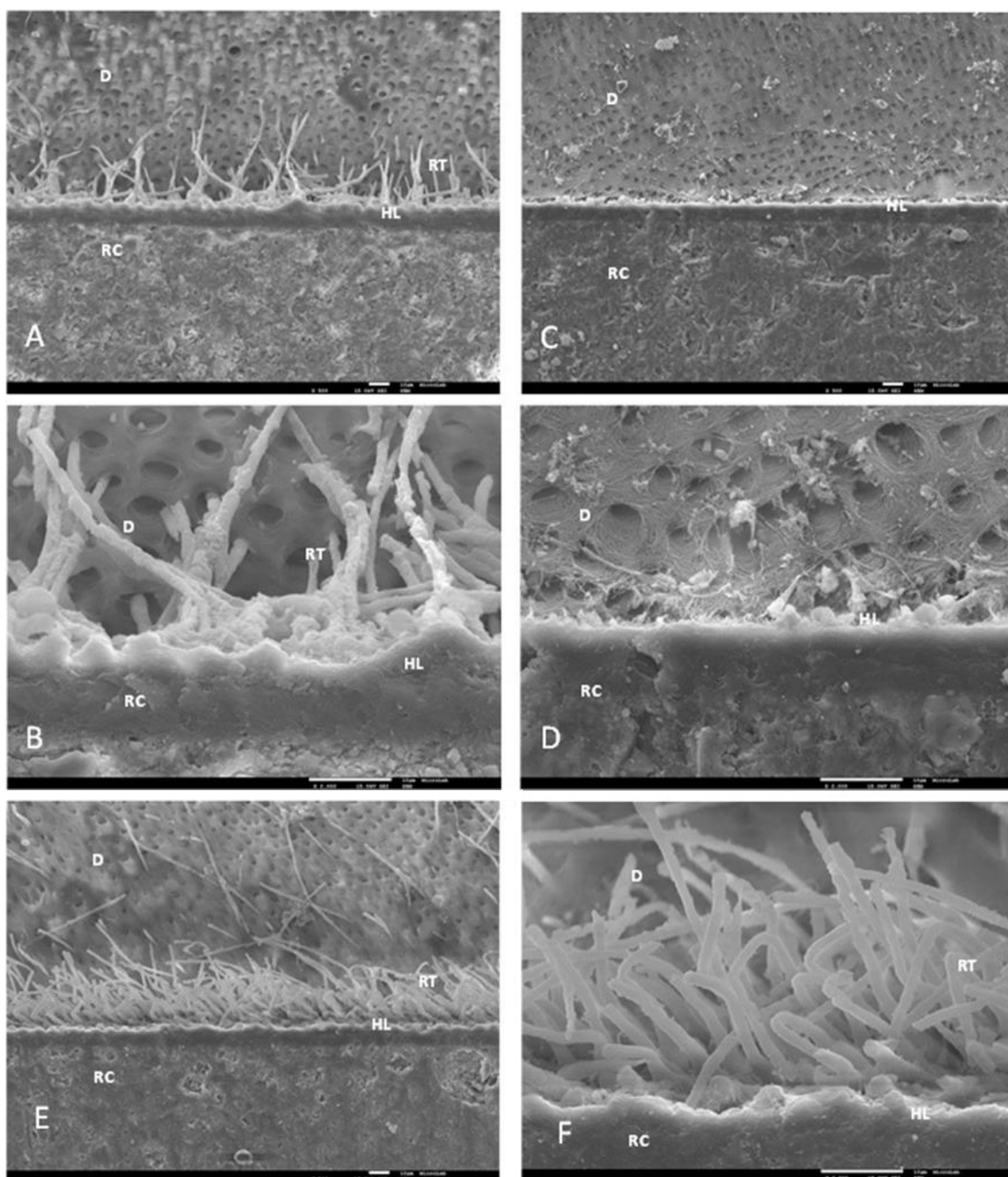


Figura 5a

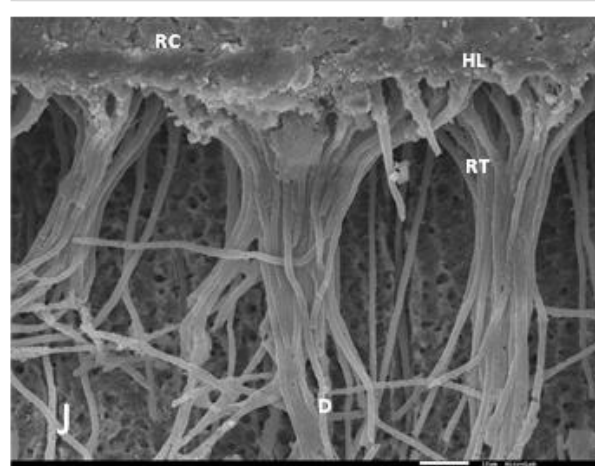
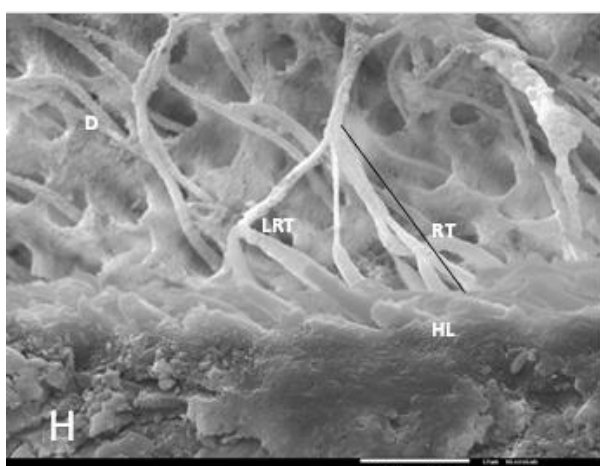
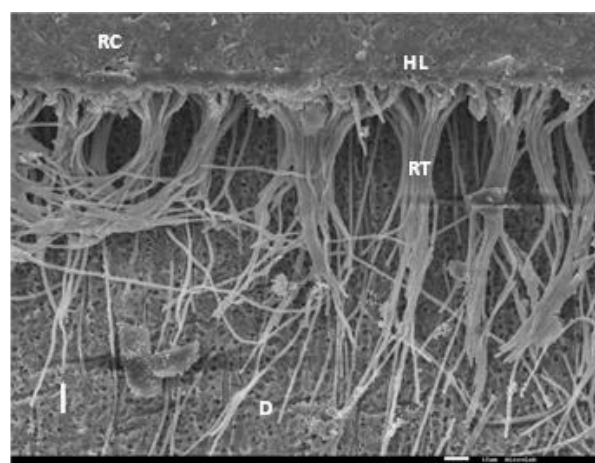
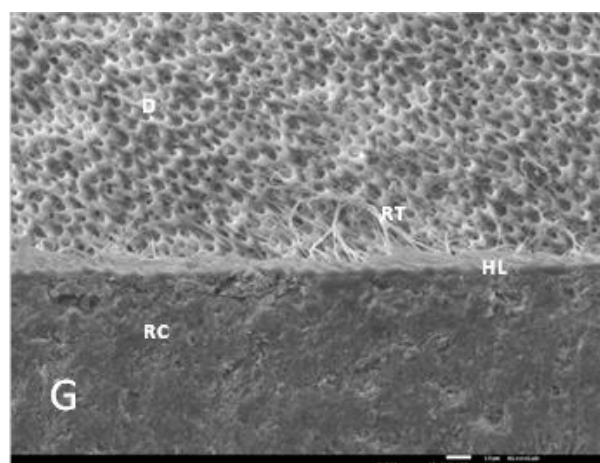


Figura 5b

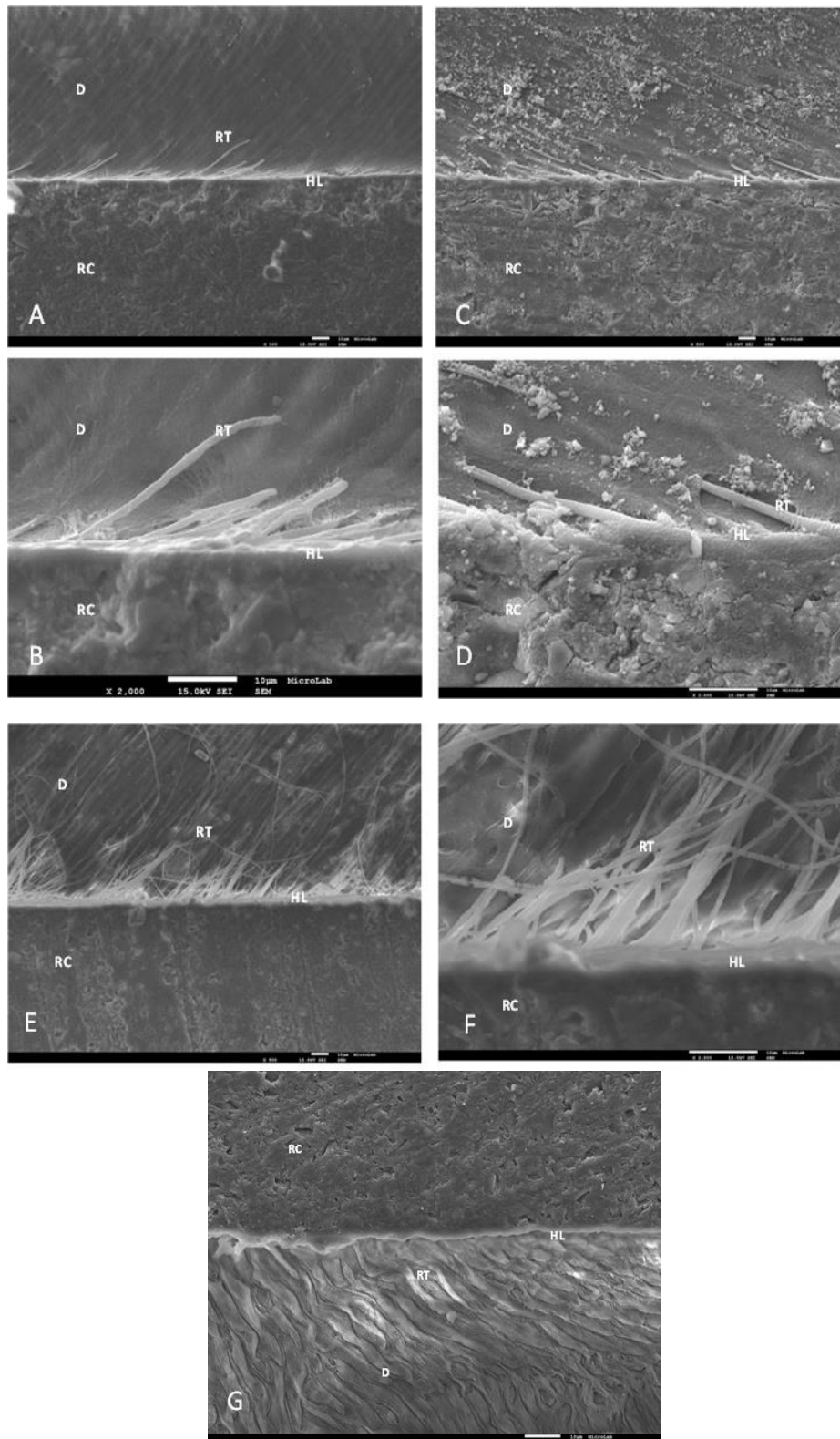


Figura 6

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO **GERAL**

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL

Com o desenvolvimento evidente dos sistemas adesivos dentários, é amplamente aceite que a adesão da interface dentina-resina é determinada por três aspetos fundamentais: a) a infiltração dos monómeros do adesivo na matriz da dentina desmineralizada, b) a formação da camada híbrida na dentina intertubular e dos *resin tags* dentro dos túbulos dentinários e c) a ligação química à superfície da dentina (Zhou et al., 2019).

O grande desafio no *design* e aprimoramento de novos materiais adesivos para que apresentem um alto desempenho na interface resina-dentina, centra-se em tornar a adesão mais forte e durável aos tecidos dentários, apesar das condições adversas da cavidade oral (Toledano & Osorio, 2015).

O complexo pulpo-dentinário é um substrato bastante dinâmico e a presença de água e conteúdo orgânico dificulta a estabilidade da adesão a longo prazo (Bedran-Russo et al., 2017). A interface adesiva é altamente suscetível à degradação hidrolítica e enzimática. A presença de bactérias e enzimas endógenas, associadas a um meio ácido promovido pela aplicação dos adesivos são fatores que contribuem altamente para a sua degradação sendo determinantes na longevidade das restaurações. Deste modo, procurar melhorar a estabilidade da camada híbrida ao longo dos anos é ainda hoje um dos grandes desafios na dentisteria adesiva (Betancourt et al., 2019; Nagarkar et al., 2019).

Ao longo dos últimos anos têm sido propostas múltiplas abordagens que visam melhorar a estabilidade da camada híbrida ao mesmo tempo que surgem novos materiais e técnicas de aplicação dos adesivos (Münchow & Biotino et al., 2017; Zhou et al., 2019). A duração da aplicação de ácido, a técnica de lavagem e o tempo de secagem da água, a qualidade da evaporação dos solventes, a forma como se aplica o adesivo e a eficácia da polimerização são alguns dos passos cruciais para se conseguir uma boa eficácia adesiva. O clínico deve assim estar ciente da variação das características particulares de cada tecido dentário e das estratégias que devem ser utilizadas para otimizar o comportamento e eficácia do sistema adesivo utilizado (Breschi et al., 2018; Moritake et al. 2018; Ahmed et al., 2019; Zecin-Deren et al. 2019).

No sentido de melhorar a longevidade das restaurações, muitos investigadores têm dedicado o seu trabalho à modificação e desenvolvimento de novos materiais adesivos, seguindo duas estratégias possíveis:

- a incorporação de agentes com funções específicas na inibição das MMPs, remineralização ou propriedades antibacterianas (Tezvergil-Mutluay et al., 2011; Tekçe et al., 2016; Cocco et al., 2015; Toledano & Osorio, 2015); ou,
- pela adição e/ou combinação de novos agentes na composição dos adesivos que desempenhem múltiplas funções com o objetivo de promover vários benefícios e aumentar a eficácia dos adesivos (Zhang et al., 2015b).

Neste trabalho, a formulação de um novo adesivo dentário teve como principal linha de investigação a alteração da composição base comum à maioria dos sistemas adesivos comerciais, pela remoção do Bis-GMA, o monómero vulgarmente utilizado na composição destes materiais. Para a substituição deste monómero foi utilizado um dendrímero de 2ª geração, o G-IEMA, introduzindo um carácter inovador na dentisteria adesiva. Ao introduzirmos um dendrímero com uma estrutura estrelada, foi quebrado o paradigma da utilização de monómeros lineares usualmente presentes na composição dos adesivos. Com esta substituição pretendeu-se, por um lado, melhorar a taxa de conversão, a capacidade de penetração e retenção dentro da estrutura dentária devido à sua forma estrelada e polimerização que pode ocorrer em oito pontas. Por outro lado, desenvolver um adesivo com uma composição menos citotóxica ao remover o Bis-GMA, conhecido como uma fonte de libertação de Bisfenol A.

A formulação final do adesivo experimental EM2 foi obtida através de alterações consecutivas dos seus constituintes principais e/ou da sua percentagem relativa, consoante as propriedades físico-químicas e mecânicas observadas.

Os resultados obtidos traduziram-se na publicação de 2 artigos científicos e permitiram ainda o registo de uma patente a nacional. Com este adesivo experimental os valores de resistência adesiva (μ TBS) após 24 horas de aplicação encontram-se dentro da gama de valores publicadas na literatura para os adesivos comerciais, para qualquer um dos protocolos (ER ou SE). Nas imagens obtidas através da MEV, o adesivo experimental com G-IEMA apresenta uma morfologia da interface adesiva satisfatória, onde é possível

observar uma camada híbrida bem definida com uma grande quantidade de *resin tags* formados. Os *resin tags* apresentam uma conformação cônica e longa sendo possível verificar a presença de vários *tags* laterais. Desta forma, as imagens ao microscópio evidenciam uma arquitetura 3D como resultado da utilização de polímeros hiper-ramificados que revela uma boa hibridização da dentina e que é compatível com os resultados de microtração obtidos. Contudo, os resultados de adesão após um período de envelhecimento estão ainda sob investigação de forma a avaliar a estabilidade da interface adesiva ao longo do tempo.

Quanto à citotoxicidade do adesivo experimental, os resultados preliminares foram inconclusivos, pelo que os novos ensaios nas células da polpa e da gengiva estão ainda a decorrer.

Assim, face aos resultados obtidos, é possível concluir que os principais objetivos deste trabalho foram alcançados. Foi demonstrado que os tradicionais monómeros de reticulação linear podem ser substituídos com sucesso por um tipo de estruturas dendríticas, sugerindo uma mudança do paradigma no desenvolvimento de novos sistemas adesivos. O G-IEMA contribuiu para a melhoria das taxas de conversão do adesivo não se observando alterações na contração de polimerização em relação aos restantes adesivos estudados. Adicionalmente, mostrou uma resistência adesiva à dentina semelhante aos adesivos comerciais estudados, confirmada pela boa penetração na dentina, representada pela espessa camada híbrida e pelo emaranhado de *resin tags* em toda a sua extensão.

Contudo, a formulação de um novo adesivo Universal ainda constitui um desafio para a dentisteria restauradora, pelo que o trabalho de investigação iniciado com esta tese continua em desenvolvimento de forma a melhorar as propriedades físico-químicas e mecânicas do adesivo EM2.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedin, F., Ye, Q., Good, H.J., Parthasarathy, R., & Spencer, P. (2014). Polymerization- and solvent-induced phase separation in hydrophilic-rich dentin adhesive mimic. *Acta Biomater*, 10, 3038-3047.
- Abouelleil, H., Attik, N., Jeannin, C., Colon, P., & Grosogeat, B. (2015). Potential toxicity of Bisphenol A and other related substances in dental restorative resins. *J. Oral Sci. Health*, 2, 1-15.
- Ahmed, M.H., De Munck, J., Van Landuyt, K., Peumans, M., Yoshihara, K., & Van Meerbeek, B. (2019). Do Universal Adhesives Benefit from an Extra Bonding Layer? *J Adhes Dent*, 21(2), 117-132. <http://doi:10.3290/j.jad.a42304>.
- Al Hiyasat, A.S., Darmani, H., & Elbetieha, A.M. (2002). Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *Eur J Oral Sci*, 110(2), 163–7.
- Al Hiyasat, A.S., Darmani, H. & Milhem, M.M. (2005). Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. *Clin Oral Invest*, 9(1), 21–5.
- Almaroof, A., Niazi, S.A., Rojo, L., Mannocci, F., & Deb, S. (2017). Evaluation of dental adhesive systems incorporating an antibacterial monomer eugenyl methacrylate (EgMA) for endodontic restorations. *Dent Mater*, 33, e239–54. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2017.01.016>.
- American Dental Association Council on Scientific Affairs. (2014). Determination of bisphenol a released from resin-based composite dental restoratives. *J Am Dent Assoc*, 145(7), 763–765. <http://doi:10.14219/jada.2014.42>.
- Andrade, A. M. D., Moura, S. K., Reis, A., Loguercio, A. D., Garcia, E. J., & Grande, R. H. M. (2010). Evaluating resin-enamel bonds by microshear and microtensile bond strength tests: effects of composite resin. *Journal of Applied Oral Science*, 18(6), 591-598.
- Anido-Anido, A., Souza-Junior, E., Brandt, W., Silva, E., Alonso, R. Zaia, A., Puppin-Rontani, R.M. & Sinhoreti, M. (2012). Dental adhesives containing alternative photoinitiators: Degree of conversion and cytotoxicity. *Dental Materials*, 28. e1. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2012.07.008>.
- Anusavice, K. J., Phillips, R. W., Shen, C., & Rawls, H. R. (2013). Part I: General Classes and Properties of Dental Materials. in Phillips' science of dental materials (ed), Standards for Dental Materials (12nd ed, pp 9-10); International Standards (12nd ed, pp 10-11); How Safe are Dental Materials (12nd ed, pp 12-15); Biocompatibility - Adverse Effects from Exposure to Dental Materials (12nd ed, pp. 115-117, 125-126, 136); Biocompatibility Tests (12nd ed, pp 138-140); Clinical Guidelines for Selecting Biocompatible Materials (12nd ed, pp 141-143). USA: Elsevier.

- Atsumi, T., Ishihara, M., Kadoma, Y., Tonosaki, K., & Fujisawa, S. (2004). Comparative radical production and cytotoxicity induced by camphorquinone and 9-fluorenone against human pulp fibroblasts. *J Oral Rehab*, 31(12),1155–64.
- Ayar, M.K. (2016). A review of ethanol wet-bonding: Principles and techniques. *Eur J Dent*, 10(1), 155–159. <http://doi.org/10.4103/1305-7456.175687>.
- Bail, M., Malacarne-Zanon, J., Silva, S.M., Anauate-Netto, A., Nascimento, F.D., Amore, R., Lewgoy, H., Pashley, D. H. & Carrilho, M.R. (2012). Effect of air-drying on the solvent evaporation, degree of conversion and water sorption/solubility of dental adhesive models. *J Mater Sci Mater Med*, 23(3), 629-38. <http://doi.org/10.1007/s10856-011-4541-y>.
- Bakopoulou, A., Papadopoulos, T., & Garefis, P. (2009). Molecular Toxicology of Substances Released from Resin–Based Dental Restorative Materials. *Int. J. Mol. Sci*, 10, 3861-3899.
- Barbosa, M.O., de Carvalho, R.V., Demarco, F.F., Ogliari, F.A., Zanchi, C.H., Piva, E., & da Silva, A.F. (2015). Experimental self-etching HEMA-free adhesive systems: cytotoxicity and degree of conversion. *J Mater Sci Mater Med*, 26(1), 5370.
- Bedran-Russo, A., Ariene, A., Leme-Kraus, Vidal, C.M.P., & Teixeira, E.C. (2017). An Overview of Dental Adhesive Systems and the Dynamic Tooth–Adhesive Interface. *Dent Clin N Am*, 61, 713–731. <http://doi.org/10.1016/j.cden.2017.06.001>.
- Beezer, A.E., King, A.S.H, Martin, I.K., Mitchel, J.C., Twyman, L.J., & Wain, C.F. (2003). Dendrimers as potential drug carriers: encapsulation of acidic hydrophobes within water soluble PAMAM derivatives. *Tetrahedron*, 59, 3873– 3880.
- Berkovitz, B.K.B, Holland, G.R., & Moxham, B.J. (2009). Dentine. In *Oral Anatomy, Histology and Embryology* (4 ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Berridge, M.V. & Tan, A.S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 303(2), 474–82.
- Besinis, A., van Noort, R., & Martin, N. (2014). Remineralization potential of fully demineralized dentin infiltrated with silica and hydroxyapatite nanoparticles. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 30(3), 249–262. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2013.11.014>.
- Betancourt, D.E., Baldion, P.A., & Castellanos, J.E. (2019). Resin-Dentin Bonding Interface: Mechanisms of Degradation and Strategies for

- Stabilization of the Hybrid Layer. *Int J of Biomater*, ID 5268342, 11. <http://doi.org/10.1155/2019/5268342>.
- Bianchi, L., Ribeiro, A.P.D., De Oliveira, Carrilho, M.R., Pashley, D.H., De Souza Costa, C.A., & Hebling, J. (2013a). Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 101, 1498–507. <http://doi.org/10.1002/jbm.b.32971>.
 - Bianchi, L., Ribeiro, A.P.D., De Oliveira, Carrilho, M.R., Pashley, D.H., De Souza Costa, C.A., & Hebling, J. (2013b). Transdental cytotoxicity of experimental adhesive systems of different hydrophilicity applied to ethanol-saturated dentin. *Dent Mater*, 29, 980–90. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2013.07.006>.
 - Bouillaguet, S.; Shaw, L.; Gonzalez, L.; Wataha, J.C. & Krejci, I. (2002). Long-term cytotoxicity of resinbased dental restorative materials. *J. Oral Rehabil*, 29, 7-13.
 - Bouillaguet, S. (2004). Biological risks of resin-based materials to the dentin pulp complex. *Crit. Rev. Oral Biol. Med*, 15, 47-60.
 - Bourbia, M., Ma, D., Cvitkovitch, D.G., Santerre, J.P., & Finer, Y. (2013). Cariogenic bacteria degrade dental resin composites and adhesives. *J Dent Res*, 92(11), 989–94.
 - Bowan, R.L. & Rodriguez, M.S. (1962). Tensile strength and modulus of elasticity of tooth structure and several restorative materials. *J Am Dent Assoc*, 64, 378-8.
 - Brambilla, E., Ionescu, A., Mazzoni, A., Cadenaro, M., Gagliani, M., Ferraroni, M., Tay, F., Pashley, D., & Breschi, L. (2014). Hydrophilicity of dentin bonding systems influences in vitro *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 30(8), 926–935. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.05.009>.
 - Breschi, L., Mazzoni, A., Ruggeri, A., Cadenaro, M., Di Lenarda, R., De Stefano, & Dorigo, E. (2008). Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dental Materials*, 24, 90-101.
 - Breschi, L., Mazzoni, A., Nato, F., Carrilho, M., Visintini, E., Tjäderhane, L., Ruggeri, A., Jr, Tay, F. R., Dorigo, E., & Pashley, D. H. (2010). Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 26(4), 320–325. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.153>.
 - Breschi, L., Maravic, T., Cunha, S. R., Comba, A., Cadenaro, M., Tjäderhane, L., Pashley, D. H., Tay, F. R., & Mazzoni, A. (2018). Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 34(1), 78–96. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.11.005>.

- Brescia, P. & Banks, P. (2009). Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. *BioTek Instruments, Inc.*
- Buonocore, MG. (1955). A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res*, 34(6), 849-53.
- Burrow, M.F., Inokoshi, S., & Tagami, J. (1999). Water sorption of several bonding resins. *Am J Dent*, 12(6), 295–8.
- Cadenaro, M., Breschi, L., Rueggeberg, F. A., Agee, K., Di Lenarda, R., Carrilho, M., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2009). Effect of adhesive hydrophilicity and curing time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol-saturated acid-etched dentin. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 25(1), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.05.004>.
- Caldas, I.P., Alves, G.G., Barbosa, I.B., Scelza, P., de Noronha, F., & Scelza, M.Z. (2019). In vitro cytotoxicity of dental adhesives: A systematic review. *Dent Mater*, 35(2), 195-205. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.11.028>.
- Caminade, A.M., Laurent, R., & Majoral, J.P. (2005). Characterization of dendrimers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(15), 2130-2146. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.09.011>.
- Cardoso, G. Nakanishi, L., Isolan, C., Jardim, P., & Moraes, R., (2019). Bond Stability of Universal Adhesives Applied To Dentin Using Etch-And-Rinse or Self-Etch Strategies. *Brazilian Dental Journal*, 30, 467-475. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902578>.
- Carrilho, E., Cardoso, M., Marques Ferreira, M., Marto, C.M., Paula, A., & Coelho, A.S. (2019). 10-MDP Based Dental Adhesives: Adhesive Interface Characterization and Adhesive Stability-A Systematic Review. *Materials (Basel)*, 7;12(5), pii: E790. <https://doi.org/10.3390/ma12050790>.
- Carrilho, M. R., Carvalho, R. M., de Goes, M. F., di Hipólito, V., Geraldeli, S., Tay, F. R., Pashley, D. H., & Tjäderhane, L. (2007). Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *Journal of dental research*, 86(1), 90–94. <https://doi.org/10.1177/154405910708600115>.
- Carrilho, M. R., Carvalho, R. M., Sousa, E. N., Nicolau, J., Breschi, L., Mazzoni, A., Tjäderhane, L., Tay, F. R., Agee, K., & Pashley, D. H. (2010). Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dental materials*, 26(8), 779–785. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.04.002>.
- Carvalho, R.M., Manso, A.P., Geraldeli, S., Tay, F.R., Pashley, D.H. (2012). Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. *Dent Mater*, 28(1), 72-86.
- Cavalcanti, B.N. (2010). Cytotoxicity of substances leached from a conventional and a self- etching adhesive system on human pulp fibroblasts. *Braz Dent Sci*, 13(2), 10–4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.00967.x>.

- Cetingüç, A., Olmez, S., & Vural, N. (2006). HEMA diffusion from dentin bonding agents through various dentin thicknesses in primary molars. *Am J Dent*, 19(4), 231–235.
- Chang, H.H., Guo, M.K., Kasten, F.H., Chang, M.C., Huang, G.F., & Wang, Y.L. (2005). Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials*, 26, 745–53.
- Chang, M. C., Lan, W. H., Chan, C. P., Lin, C. P., Hsieh, C. C., & Jeng, J. H. (1998). Serine protease activity is essential for thrombin-induced protein synthesis in cultured human dental pulp cells: modulation roles of prostaglandin E2. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 27(1), 23–29. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1998.tb02086.x>.
- Chang, M. C., Chen, L. I., Chan, C. P., Lee, J. J., Wang, T. M., Yang, T. T., Lin, P. S., Lin, H. J., Chang, H. H., & Jeng, J. H. (2010). The role of reactive oxygen species and hemeoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. *Biomaterials*, 31(32), 8164–8171. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.049>.
- Chee, B., Rickman, L.J., & Satterthwaite, J.D. (2012). Adhesives for the restoration of non-carious cervical lesions: a systematic review. *J Dent*, 40(6), 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.02.007>.
- Chen, R. S., Liuiw, C. C., Tseng, W. Y., Hong, C. Y., Hsieh, C. C., & Jeng, J. H. (2001). The effect of curing light intensity on the cytotoxicity of a dentin-bonding agent. *Operative dentistry*, 26(5), 505–510.
- Chen, R. S., Liu, C. C., Tseng, W. Y., Jeng, J. H., & Lin, C. P. (2003). Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *Journal of dentistry*, (3), 223–229. [https://doi.org/10.1016/s0300-5712\(02\)00088-x](https://doi.org/10.1016/s0300-5712(02)00088-x).
- Chen, L., Suh, B.I., Brown, D., & Chen, X. (2012). Bonding of primed zirconia ceramics: evidence of chemical bonding and improved bond strengths. *Am J Dent*, 25(2), 103–108.
- Chen, C., Niu, L. N., Xie, H., Zhang, Z. Y., Zhou, L. Q., Jiao, K., Chen, J. H., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2015). Bonding of universal adhesives to dentine--Old wine in new bottles? *Journal of dentistry*, 43(5), 525–536. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.03.004>.
- Cheng, L., Weir, M.D., Zhang, K., Arola, D.D., Zhou, X., & Xu, H.H. (2013). Dental primer and adhesive containing a new antibacterial quaternary ammonium monomer dimethylaminododecyl methacrylate. *J Dent*, 41(4), 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.01.004>.

- Cheng, L., Zhang, K., Weir, M.D., Melo, M.A., Zhou, X., & Xu, H.H. (2015). Nanotechnology strategies for antibacterial and remineralizing composites and adhesives to tackle dental caries. *Nanomedicine (Lond)*, 10(4), 627–641. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.191>.
- Chianese, R., Troisi, J., Richards, S., Scafuro, M., Fasano, S., Guida, M., Pierantoni, R., & Meccariello, R. (2018). Bisphenol A in Reproduction: Epigenetic Effects. *Current medicinal chemistry*, 25(6), 748–770. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171009121001>.
- Chimeli, T.B., D'Alpino, P.H., Pereira, P.N., Hilgert, L.A., Di Hipólito, V., & Garcia, F.C. (2014). Effects of solvent evaporation on water sorption/solubility and nanoleakage of adhesive systems. *J Appl Oral Sci*, 22(4), 294-301.
- Choi, A.N., Lee, J.H., Son, S.A., Jung, K.H., Kwon, Y.H., & Park, J.K. (2017). Effect of Dentin Wetness on the Bond Strength of Universal Adhesives. *Materials (Basel)*, 25;10(11), pii: E1224. <https://doi.org/10.3390/ma10111224>.
- Cocco, A. R., Rosa, W. L., Silva, A. F., Lund, R. G., & Piva, E. (2015). A systematic review about antibacterial monomers used in dental adhesive systems: Current status and further prospects. *Dental materials*, 31(11), 1345–1362. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.08.155>.
- Costella, A.M., Trochmann, J.L., & Oliverira, W.S. (2010). Water sorption and diffusion coeficiente through na experimental dental resin. *J.Mater.Sci.:Mater.Med*, 21,67–72.
- Cramer, N.B., Stansbury, J.W., & Bowman, C.N. (2011). Recent Advances and Developments in Composite. *J Dent Res*, 90(4),402-16.
- Cuevas-Suárez, C.E., da Rosa, W.L.O., Lund, R.G., da Silva, A.F., & Piva, E. (2019). Bonding Performance of Universal Adhesives: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *J Adhes Dent*, 21(1), 7-26. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a41975>.
- da Silva, E. M., Almeida, G. S., Poskus, L. T., & Guimarães, J. G. A. (2008). Relationship between the degree of conversion, solubility and salivary sorption of a hybrid and a nanofilled resin composite. *Journal of Applied Oral Science*,16(2), 161–6.
- De Munck, J., Van Landuyt, K., Peumans, M., Poitevin, A., Lambrechts, P., Braem, M., & Van Meerbeek, B. (2005). A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*, 84, 118-32.
- De Munck, J., Van den Steen, P.E., Mine, A., Van Landuyt, K.L., Poitevin, A., Opdenakker, G., & Van Meerbeek, B. (2009). Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res*, 88(12), 1101-6. <https://doi.org/10.1177/0022034509346952>.

- De Munck, J., Mine, A., Poitevin, A., Van Ende, A., Cardoso, M. V., Van Landuyt, K. L., Peumans, M., & Van Meerbeek, B. (2012). Meta-analytical review of parameters involved in dentin bonding. *Journal of dental research*, 91(4), 351–357. <https://doi.org/10.1177/0022034511431251>.
- Decha, N., Talungchit, S., Iawso, P., Pikulngam, A., Saiprasert, P., & Tansakul, C. (2019). Synthesis and characterization of new hydrolytic-resistant dental resin adhesive monomer HMTAF. *Des Monomers Polym*, 12;22(1), 106-113. <https://doi.org/10.1080/15685551.2019.1615789>.
- Ding, P.G., Wolff, D., Pioch, T., Staehle, H.J., & Dannewitz, B. (2009). Relationship between microtensile bond strength and nanoleakage at the composite-dentin interface. *Dent Mater*, 25, 135-141.
- Elias, S.T., dos Santos, A.F., Garcia, F.C.P., Pereira, P. N.R., Hilgert, L., Fonseca-Bazzo, A., Guerra, E. & Ribeiro, A.P.D. (2015). Cytotoxicity of Universal, Self-Etching and Etch-and-Rinse Adhesive Systems According to the Polymerization Time. *Brazilian Dental Journal*, 26(2), 160-168. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300294>.
- Elkaffas, A.A., Hamama, H.H.H., & Mahmoud, S.H. (2018). Do universal adhesives promote bonding to dentin? A systematic review and meta-analysis. *Restor Dent Endod*, 43, e29.
- Erickson, R.L., Barkmeier, W.W., & Kimmes, N.S. (2009). Bond strength of self-etch adhesives to pre-etched enamel. *Dent Mater*, 25, 1187–94.
- Esfand, R., Tomalia, D.A. (2001). Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today*, 1;6(8), 427-436.
- Feitosa, V. P., Sauro, S., Ogliari, F. A., Ogliari, A. O., Yoshihara, K., Zanchi, C. H., Correr-Sobrinho, L., Sinhoreti, M. A., Correr, A. B., Watson, T. F., & Van Meerbeek, B. (2014). Impact of hydrophilicity and length of spacer chains on the bonding of functional monomers. *Dental materials*, 30(12), e317–e323. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.06.006>.
- Fleisch A.F., Sheffield, P.E., Chinn, C., Edelstein, B.L., & Landrigan, P.J. (2010). Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics*, 126(4), 760–768.
- Floyd, C.J., & Dickens, S.H. (2006). Network structure of Bis-GMA and UDMA-based resin systems. *Dent Mater*, 22(12), 1143-9.
- Fontana, M., Young, D.A., & Wolff, M.S. (2009). Evidence-Based Caries, Risk Assessment, and Treatment. *Dent Clin North Am*, 53(1), 149-61.
- Fu, J., Saikaew, P., Kawano, S., Carvalho, R.M., Hannig, M., Sano, H., & Selimovic, D. (2017). Effect of air-blowing duration on the bond strength of current one-step adhesives to dentin. *Dent Mater*, 33(8), 895–903.
- Fukegawa, D., Hayakawa, S., Yoshida, Y., Suzuki, K., Osaka, A., & Van Meerbeek, B. (2006). Chemical interaction of phosphoric acid ester with hydroxyapatite. *J Dent Res*, 85(10), 941-944.

- Fusayama, T., Nakamura, M., Kurosaki, N., & Iwaku, M. (1979). Non pressure adhesion of a new adhesive restorative resin. *J Dent Res*, 58(4), 1364-70.
- Gajewski, V.E., Pfeifer, C.S., Fróes-Salgado, N.R., Boaro, L.C., & Braga, R.R. (2012). Monomers used in resin composites: degree of conversion, mechanical properties and water sorption/solubility. *Braz Dent J*, 23(5), 508-14.
- Gallusi, G., Galeano, P., Libonati, A., Giuca, Mr., & Campanella, V. (2009). Evaluation of bond strength of different adhesive systems: Shear and Microtensile Bond Strength Test. *Oral Implantol*, 2(4), 19–25.
- Garcia, F. C., Wang, L., Pereira, L. C., e Silva, S. M. D. A., Júnior, L. M., & de Oliveira Carrilho, M. R. (2010). Influences of surface and solvent on retention of HEMA/mixture components after evaporation. *Journal of dentistry*, 38(1), 44-49.
- Gary, A. (2015). Universal adhesives: the next evolution in adhesive dentistry? *Compend Contin Educ Dent*, 36(1), 15-26; quiz 28, 40.
- Geraldeli, S., Soares, E.F. Alvarez, A.J., Farivar, T., Shields, R. C., Sinhoreti, M. A. C., & Nascimento M.M. (2017). A new arginine-based dental adhesive system: formulation, mechanical and anti-caries properties. *J Dent*, 63, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.05.024>.
- Geurtsen, W.; Spahl, W.; Muller, K.; & Leyhausen, G. (1999). Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)*, 48, 772-777.
- Giachetti, L., Scaminaci Russo, D., Bertini, F., Pierleoni, F., & Nieri, M. (2007). Effect of operator skill in relation to microleakage of total-etch and self-etch bonding systems. *J Dent*, 35, 289-293.
- Grégoire, G., & Ahmed, Y. (2007). Evaluation of the enamel etching capacity of six contemporary self-etching adhesives. *J Dent*, 35(5), 388 – 97.
- Gupta, S.K., Saxena, P., Pant, V.A., & Pant, A.B. (2012). Release and toxicity of dental resin composite. *Toxicology International*. 19(3), 225-234. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.103652>.
- Gwinnett, A.J. (1992). Structure and composition of enamel. *Oper Dent*, 5, 10-17.
- Hanabusa, M.; Mine, A.; Kuboki, T.; Momoi, Y.; Van Ende, A.; Van Meerbeek, B.; De Munck, J. (2012). Bonding effectiveness of a new “multi-mode” adhesive to enamel and dentine. *J Dent*; 40:475-484.
- Hashimoto, M., Sano, H., Yoshida, E., Hori, M., Kaga, M., Oguchi, H., & Pashley, D.H. (2004). Effects of multiple adhesive coatings on dentin bonding. *Oper Dent*, 29(4), 416-23.
- Hashimoto, M., Nagano, F., Endo, K., & Ohno, H. (2011). A review: Biodegradation of resin–dentin bonds. *Japanese Dental Science Review*, 47 (1). <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2010.02.001>.

- Hasshoff, G., Schneider, H., & Merte, K. (2004). Tooth-composite interface from specific and nonspecific adhesive restorative systems. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 71(1), 38–45.
- Hitmi, L., Bouter, D., & Degrange, M. (2002). Influence of drying and HEMA treatment on dentin wettability. *Dent Mater*, 18(7):503-11.
- Hosaka, K., Nishitani, Y., Tagami, J., Yoshiyama, M., Brackett, W.W., Agee, K.A., Pashley, D.H. (2009). Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. *J Dent Res*, 88(2):146-51.
- Huang, F.M. & Chang, Y.C. (2002). Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod*, 94, 361-365.
- Ikeda, T., De Munck, J., Shirai, K., Hikita, K., Inoue, S., Sano, H., Lambrechts, P., & Van Meerbeek, B. (2005). Effect of evaporation of primer components on ultimate tensile strengths of primer-adhesive mixture. *Dental materials*, 21(11), 1051–1058. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.03.010>.
- Imazato, S. (2003). Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dental materials*, 19(6), 449–457. [https://doi.org/10.1016/s0109-5641\(02\)00102-1](https://doi.org/10.1016/s0109-5641(02)00102-1).
- ISO 4049. (2000). Dentistry – Polymer based filling, restorative and luting materials.
- ISO 10993-12. (2007). Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials.
- ISO 10993-5. (2009). Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.
- ISO 11405. (2015). Dentistry — Testing of adhesion to tooth structure.
- Isolani, C.P.; Valente, L.L.; Münchow, E.A.; Basso, G.R.; Pimentel, A.H.; Schwantz, J.K., Silva, A.V. & Moraes, R.R. (2014). Bond strength of a universal bonding agent and other contemporary dental adhesives applied on enamel, dentin, composite, and porcelain. *Appl Adhes Sci*, 2:25.
- Ito, S., Hashimoto, M., Wadgaonkar, B., Svizero, N., Carvalho, R. M., Yiu, C., Rueggeberg, F. A., Foulger, S., Saito, T., Nishitani, Y., Yoshiyama, M., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2005). Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials*, 26(33), 6449–6459. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.052>.
- Jacobsen, T. & Söderholm, K.J. (1998). Effects of primer solvent, primer agitation, and dentin dryness on shear bond strength to dentin. *Am J Dent*, 11, 225-28.
- Jacobsen, T., Finger, W. J., & Kanehira, M. (2006). Air-drying time of self-etching adhesives vs bonding efficacy. *Journal of Adhesive Dentistry*, 8(6).
- Jandt, K.D. & Sigusch, B.W. (2009). Future perspectives of resin-based dental materials. *Dent Mater*, 25(8), 1001–6.

- Jiang, R.D., Lin, H., Zheng, G., Zhang, X.M., Du, Q., & Yang, M. (2017). In vitro dentin barrier cytotoxicity testing of some dental restorative materials. *J Dent*, 58, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.01.003>.
- Joskow, R., Barr, D.B., Barr, J.R., Calafat, A.M., Needham, L.L., & Rubin, C. (2006). Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. *J Am Dent Assoc*, 137(3), 353–362. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0185>.
- Kaczor, K., Gerula-Szymańska, A., Smektała, T., Safranow, K., Lewusz, K., & Nowicka, A. (2018). Effects of different etching modes on the nanoleakage of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *J Esthet Restor Dent*, 30, 287–298. <https://doi.org/10.1111/jerd.12375>.
- Kadoma, Y. (2002). Surface treatment agent for dental metals using a thiirane monomer and a phosphoric acid monomer. *Dent Mater J*, 21(2), 156-159.
- Kang, J.H., Kondo, F., & Katayama, Y. (2006). Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, 21, 226.
- Kenshima, S., Francci, C., Reis, A., Loguercio, A.D., & Filho, L.E. (2006). Conditioning effect on dentin, resin tags and the hybrid layer of different acidity self-etch adhesives applied to thick and thin smear layer. *J Dent*, 34(10), 775-83.
- Kierklo, A., Pawinska, M., Tokajuk, G., Poplawska, B., & Bielawska, A. (2012). Cytotoxicity evaluation of three light-cured dentin adhesive materials on human gingival fibroblasts, ex vivo. *Adv Med Sci*, 57, 385–90. <https://doi.org/10.2478/v10039-012-0038-2>.
- Kingman, A., Hyman, J., Masten, S. A., Jayaram, B., Smith, C., Eichmiller, F., Arnold, M. C., Wong, P. A., Schaeffer, J. M., Solanki, S., & Dunn, W. J. (2012). Bisphenol A and other compounds in human saliva and urine associated with the placement of composite restorations. *Journal of the American Dental Association* (1939), 143(12), 1292–1302. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2012.0090>.
- Kleinsasser, N. H., Wallner, B. C., Harréus, U. A., Kleinjung, T., Folwaczny, M., Hickel, R., Kehe, K., & Reichl, F. X. (2004). Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *Journal of dentistry*, 32(3), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2003.11.002>.
- Kloukos, D., Pandis, N., & Eliades, T. (2013a). Bisphenol-A and residual monomer leaching from orthodontic adhesive resins and polycarbonate brackets: a systematic review. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*, 143(4), S104-S112.
- Kloukos, D., Pandis, N., & Eliades, T. (2013b). In vivo bisphenol-a release from dental pit and fissure sealants: a systematic review. *J Dent*, 41(8), 659–667. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.04.012>.

- Koulaouzidou, E.A., Helvatjoglu-Antoniades, M., Palaghias, G., Karanika-Kouma, A., & Antoniades, D. (2009). Cytotoxicity of dental adhesives in vitro. *Eur J Dent*, 3, 3–9.
- Lanza, C.R.M., De Souza Costa, C.A., Furlan, M., Alécio, A., & Hebling, J. (2009). Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol*, 25, 533–43, <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9110-x>.
- Lee, Y., An, S.Y., Park, Y.J., Yu, F.H., Park, J.C., & Seo, D.G. (2016). Cytotoxic effects of one-step self-etching adhesives on an odontoblast cell line. *Scanning*, 38, 36–42, <https://doi.org/10.1002/sca.21236>.
- Leite, M.L.A.E.S., Costa, C.A.S., Duarte, R.M., Andrade, A.K.M., & Soares, D.G. (2018). Bond Strength and Cytotoxicity of a Universal Adhesive According to the Hybridization Strategies to Dentin. *Braz Dent J*, 29(1), 68–75. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201801698>.
- Li, J., Yang, J., Li, J., Chen, L., Liang, K., Wu, W., Chen, X., & Li, J. (2013). Bioinspired intrafibrillar mineralization of human dentine by PAMAM dendrimer. *Biomaterials*, 34(28), 6738–6747. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.046>.
- Liu, Y., & Wang, Y. (2013). Effect of proanthocyanidins and photo-initiators on photo-polymerization of a dental adhesive. *Journal of dentistry*, 41(1), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.10.006>
- Loguercio, A.D., Stanislawczuk, R., Mittelstadt, F.G., Meier, M.M., & Reis, A. (2013). Effects of diphenyliodonium salt addition on the adhesive and mechanical properties of an experimental adhesive. *J Dent*, 41(7), 653-8.
- Lohbauer, U., Nikolaenko, S. A., Petschelt, A., & Frankenberger, R. (2008). Resin tags do not contribute to dentin adhesion in self-etching adhesives. *The journal of adhesive dentistry*, 10(2), 97–103.
- Lopes, G. C., Thys, D. G., Klaus, P., Oliveira, G. M., & Widmer, N. (2007). Enamel acid etching: a review. *Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, N.J.: 1995)*, 28(1), 18–42.
- Luque-Martinez, I.V., Perdigão, J., Muñoz, M.A., Sezinando, A., Reis, A., & Loguercio, A.D. (2014). Effects of solvent evaporation time on immediate adhesive properties of universal adhesives to dentin. *Dent Mater*, 30(10), 1126–35.
- Magali, D., Delphine, T.B., Jacques, D., & Gae tane, L. (2006). Volume contraction in photocured dental resins: the shrinkage– conversion relationship revisited. *Dent.Mater*, 22,359–365.
- Malacarne, J., Carvalho, R. M., de Goes, M. F., Svizero, N., Pashley, D. H., Tay, F. R., Yiu, C. K., & Carrilho, M. R. (2006). Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dental materials*, 22(10), 973–980. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.11.020>.

- Malacarne-Zanon, J., Pashley, D. H., Agee, K. A., Foulger, S., Alves, M. C., Breschi, L., Cadenaro, M., Garcia, F. P., & Carrilho, M. R. (2009). Effects of ethanol addition on the water sorption/solubility and percent conversion of comonomers in model dental adhesives. *Dental materials*, 25(10), 1275–1284. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.03.015>.
- Małkiewicz, K., Turło, J., Marciniuk-Kluska, A., Grzech-Leśniak, K., Gąsior, M., & Kluska, M. (2015). Release of bisphenol A and its derivatives from orthodontic adhesive systems available on the European market as a potential health risk factor. *Ann Agric Environ Med*, 22(1), 172–177.
- Manfro, F.B., Marcondes, M.L., Somacal, D.C., Borges, G.A., Júnior, L.H., & Spohr, A.M. (2016). Bond strength of a novel one bottle multi-mode adhesive to human dentin after six months of storage. *Open Dent J*, 10, 268–277.
- Marchesi, G., Frassetto, A., Mazzoni, A., Apolonio, F., Diolosa, M., Cadenaro, M., Breschi, L. (2014). Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-year in vitro study. *J Dent*, 42(5), 603–612.
- Marshall, G.W. Jr., Marshall, S.J., Kinney, J.H., & Balooch, M. (1997). The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent*, 25(6), 441-58.
- Marshall, S.J., Bayne, S.C., Baier, R., Tomsia, A.P., & Marshall, G.W. (2010). A review of adhesion science. *Dent Mater*, 26, 11-16.
- Martins, G.C., Franco, A.P.G.O., Godoy, E.P., Maluf, D.R., Gomes, J.C., & Gomes, O.M.M. (2008). Adesivos dentinários. *RGO*, 56(4), 429-36.
- Martins, F.V., Vasques, W.F., & Fonseca, E.M. (2019). Evaluation of the efficiency of fluoride-releasing adhesives for preventing secondary caries in-vitro: a systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Paediatr Dent*, 20(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s40368-018-0388-y>.
- Matos, A.B., Trevelin, L.T., Silva, B., Francisconi-Dos-Rios, L.F., Siriani, L.K., & Cardoso, M.V. (2017). Bonding efficiency and durability: Current possibilities. *Braz Oral Res*, 31(suppl 1), e57.
- McCabe, J.F., & Rusby, S. (2004). Water absorption, dimensional change and radial pressure in resin matrix dental restorative materials. *Biomaterials*, 25(18), 4001-7.
- McLean, Meyers, E., Guillory, V., & Vandewalle, K. (2015). Enamel Bond Strength of New Universal Adhesive Bonding Agents. *Oper Dent*, 40(2), 1-8.
- Meereis, C.T., Leal, F.B., Lima, G.S., de Carvalho, R.V., Piva, E., & Ogliari, F.A. (2014). BAPO as an alternative photoinitiator for the radical polymerization of dental resins. *Dent Mater*, 30(9), 945–953. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.05.020>.

- Melo, M.A., Cheng, L., Weir, M.D., Hsia, R.C., Rodrigues, L.K., & Xu, H.H. (2013). Novel dental adhesive containing antibacterial agents and calcium phosphate nanoparticles. *J Biomed Mater. Res B Appl Biomater*, 101(4), 620–9.
- Miyazaki, M., Tsujimoto, A., Tsubota, K., Takamizawa, T., Kurokawa, H., & Platt JA. (2014). Important compositional characteristics in the clinical use of adhesive systems. *J Oral Sci*, 56(1), 1-9.
- Mjör, I. A., Moorhead, J. E., & Dahl, J. E. (2000). Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice. *International dental journal*, 50(6), 361–366. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2000.tb00569.x>.
- Moharamzadeh, K., Brook, I.M., & Van Noort, R. (2009). Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials*, 2, 514-548.
- Moritake, N., Takamizawa, T., Ishii, R., Tsujimoto, A., Barkmeier, W.W., Latta, M.A., & Miyazaki, M. (2018). Effect of active application on bond durability of universal adhesives. *Oper Dent*, 14. <https://doi.org/10.2341/17-384-L>.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth*, 65, 55–6.
- Moss, L., Rueggeberg, F.A., & Stansbury, J.W. (2002). Effect of solvent type on absorption profile of camphoroquinone. *J Dent Res*, 81 [special issue A:A-255–A-255].
- Moszner, N. & Salz U. (2005). Chemical aspects of self-etching enamel–dentin adhesives: A systematic review. *Dent Mater*, 21(10), 895-910.
- Münchow, E.A., Zanchi, C.H., Ogliari, F.A., Silva, M.G., de Oliveira, I.R., & Piva, E. (2014). Replacing HEMA with alternative dimethacrylates in dental adhesive systems: evaluation of polymerization kinetics and physicochemical properties. *J Adhes Dent*, 16(3), 221-8.
- Münchow, E. A., & Bottino, M. C. (2017). Recent Advances in Adhesive Bonding - The Role of Biomolecules, Nanocompounds, and Bonding Strategies in Enhancing Resin Bonding to Dental Substrates. *Current oral health reports*, 4(3), 215–227. <https://doi.org/10.1007/s40496-017-0146-y>.
- Munksgaard, E.C. (2002). Wet or dry, normal or deproteinized dentin surfaces as substrate for dentin adhesives. *Acta Odontol Scand*, 60(1), 60-4.
- Muñoz, M.A., Luque, I., Hass, V., Reis, A., Loguercio, A.D., & Bombarda, N.H. (2013). Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent*, 41(5), 404–411. <https://doi:10.1016/j.jdent.2013.03.001>.

- Muñoz, M. A., Sezinando, A., Luque-Martinez, I., Szesz, A. L., Reis, A., Loguercio, A. D., Bombarda, N. H., & Perdigão, J. (2014). Influence of a hydrophobic resin coating on the bonding efficacy of three universal adhesives. *Journal of dentistry*, 42(5), 595–602. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.01.013>.
- Muñoz, M.A., Luque-Martinez, I., Malaquias, P., Hass, V., Reis, A., Campanha, N.H., & Loguercio, A.D. (2015). In vitro longevity of bonding properties of universal adhesives to dentin. *Oper Dent*, 40(3), 282–292.
- Mutluay, M.M., Rueggeberg, F.A., & Price, R.B. (2014). Effect of using proper light-curing techniques on energy delivered to a Class 1 restorations. *Quintessence Int*, 45, 549-556.
- Nagarkar, S., Theis-Mahon, N., & Perdigão, J. (2019). Universal dental adhesives: Current status, laboratory testing, and clinical performance. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 107(6), 2121–2131. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34305>.
- Nakabayashi, N., Kojima, K., & Masuhara, E. (1982). The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mat Res.*, 16(3), 265-73.
- Nakabayashi, N., Nakamura, M., & Yasuda, N. (1991). Hybrid Layer as a Dentin-Bonding Mechanism. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 3(4), 133–138.
- Nakabayashi, N. & Takarada K. (1992). Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dent Mater*, 8(2), 125–30.
- Nakajima, M., Okuda, M., Ogata, M., Pereira, P.N., Tagami, J., & Pashley, D.H. (2003). The durability of a fluoride-releasing resin adhesive system to dentin. *Oper Dent*, 28(2), 186-92.
- Nishitani, Y., Yoshiyama, M., Donnelly, A.M., Agee, K.A., Sword, J., Tay, F.R., & Pashley, D.H. (2006). Effects of resin hydrophilicity on dentin bond strength. *J Dent Res*, 85(11), 1016-21.
- Niu, L. N., Zhang, L., Jiao, K., Li, F., Ding, Y. X., Wang, D. Y., ...Chen, J. H. (2011). Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *Journal of dentistry*, 39(8), 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.05.004>.
- Noda, M., Wataha, J.C., Kaga, M., Lockwood, P.E., Volkmann, K.R., & Sano, H. (2002). Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J. Dent. Res*, 81, 265-269.
- Nomura, Y., Ishibashi, H., Miyahara, M., Shinohara, R., Shiraishi, F., & Arizono, K. (2003). Effects of dental resin metabolites on estrogenic activity in vitro. *J Mater Sci Mater Med*, 14(4), 307–10.

- Nunes, T. G., Ceballos, L., Osorio, R., & Toledano, M. (2005). Spatially resolved photopolymerization kinetics and oxygen inhibition in dental adhesives. *Biomaterials*, 26(14), 1809–1817. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.012>.
- Nunes, T.G., Polido, M., Amorim, A., Nunes, S.G., & Toledano, M. (2007). Multinuclear magnetic resonance studies on the chemical interaction of a self-etching adhesive with radicular and coronal human dentin. *J Mater Sci Mater Med*, 8(10), 2093-9.
- Ogliari, F.A., de Sordi, M.L., Ceschi, M.A., Petzhold, C.L., Demarco, F.F., & Piva, E. (2006). 2,3-Epithiopropyl methacrylate as functionalized monomer in a dental adhesive. *J Dent*, 34(7), 472-77.
- Ogliari, F. A., da Silva, E., Lima, G., Madruga, F. C., Henn, S., Bueno, M., Ceschi, M. A., Petzhold, C. L., & Piva, E. (2008). Synthesis of phosphate monomers and bonding to dentin: esterification methods and use of phosphorus pentoxide. *Journal of dentistry*, 36(3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.11.003>.
- Osorio, R., Yamauti, M., Osorio, E., Román, J.S. & Toledano, M. (2011). Zinc-doped dentine adhesive for collagen protection at the hybrid layer. *Eur J Oral Sci*, 119:401–410.
- Osorio, R., Osorio, E., Cabello, I., Toledano, M. (2014b). Zinc induces apatite and scholizite formation during dentin remineralization. *Caries Res*, 48: 276–290.
- Osorio, R., Osorio, E., Medina-Castillo, A. L., & Toledano, M. (2014a). Polymer nanocarriers for dentin adhesion. *Journal of dental research*, 93(12), 1258–1263. <https://doi.org/10.1177/0022034514551608>.
- Papadogiannis, D., Dimitriadi, M., Zafiropoulou, M., Gaintantzopoulou, M.D., & Eliades, G. (2019). Universal Adhesives: Setting Characteristics and Reactivity with Dentin. *Materials (Basel)*, 12(10), 1720. <https://doi:10.3390/ma12101720>.
- Papakonstantinou, A.E., Eliades, T., Cellesi, F., Watts, D.C., & Silikas, N. (2013). Evaluation of UDMA's potential as a substitute for Bis-GMA in orthodontic adhesives. *Dent Mater*, 29(8), 898-905.
- Park, J.G., Ye, Q., Topp, E.M., Kostoryz, E.L., Wang, Y., Kieweg, S.L., & Spencer, P. (2008). Preparation and Properties of Novel Dentin Adhesives with Esterase Resistance. *J Appl Polym Sci Symp*, 15;107(6), 3588-3597.
- Pashaev, D., Demirci, M., Tekçe, N., Tuncer, S., & Baydemir, C. (2017). The effect of double-coating and times on the immediate and 6-month dentin bonding of universal adhesives. *Biomed Mater Eng*, 28(2), 169–185. <https://doi.org/10.3233/BME-171665>.
- Pashley, D.H. (1984). Smear layer: physiological considerations. *Oper Dent Suppl*, 3, 13–29.

- Pashley, D.H., Tao, L., Boyd, L., King, G.E., & Horner, J.A. (1988). Scanning electron microscopy of the substructure of smear layers in human dentine. *Arch Oral Biol*, 33(4), 265–70.
- Pashley, D.H., Sano, H., Ciucchi, B., Yoshiyama, M., & Carvalho, R.M. (1995). Adhesion testing of dentin bonding agents. A review. *Dent Mater*, 11, 117–125.
- Pashley, D. H., Carvalho, R. M., Sano, H., Nakajima, M., Yoshiyama, M., Shono, Y., Fernandes, C. A., & Tay, F. (1999). The microtensile bond test: a review. *The journal of adhesive dentistry*, 1(4), 299–309.
- Pashley, D. H., Pashley, E. L., Carvalho, R. M., & Tay, F. R. (2002). The effects of dentin permeability on restorative dentistry. *Dental Clinics*, 46(2), 211-245.
- Pashley, D.H., Tay, F.R., Yiu, C., Hashimoto, M., Breschi, L., Carvalho, R.M., & Ito, S. (2004). Collagen Degradation by Host-derived Enzymes during Aging. *J Dent Res*, 83(3), 216-21.
- Pashley, D. H., Tay, F. R., Carvalho, R. M., Rueggeberg, F. A., Agee, K. A., Carrilho, M., Donnelly, A., & García-Godoy, F. (2007). From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *American journal of dentistry*, 20(1), 7–20.
- Pashley, D.H., Tay, F.R., Breschi, L., Tjäderhane, L., Carvalho, R.M., Carrillo, M., & Tezvergil-Mutluay, A. (2011). State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*, 27(1), 1-16.
- Perdigão, J., Lambrechts, P., Van Meerbeek, B., Braem, M., Yildiz, E., Perdigao, J., Lambrechts, P., Van Meerbeek, B., Vanherle, G., & Lopes, A.L. (1995). Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. *J Biomed Mater Res*, 29(9), 1111–1120. <https://doi.org/10.1002/jbm.820290911>.
- Perdigão J, & Frankenberger R. (2001). Effect of solvent and rewetting time on dentin adhesion. *Quintessence Int*, 32(5), 385-90.
- Perdigão, J. & Ritter, A.V. (2001). In Adesão aos tecidos dentários (1ª ed). São Paulo: Livraria Santos Editora.
- Perdigão, J. (2010). Dentin bonding – Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater*, 26(2), e24-37.
- Perdigão, J., Munoz, M., Sezinando, A., Luque-Martinez, I., Staichak, R., Reis, A., & Loguercio, A. D. (2014). Immediate adhesive properties to dentin and enamel of a universal adhesive associated with a hydrophobic resin coat. *Operative Dentistry*, 39, 489–99.
- Perdigão, J, & Swift, E.J. Jr. (2015). Universal Adhesives. *J Esthet Restor Dent*, 27(6), 331-4. <https://doi.org/10.1111/jerd.12185>.

- Peutzfeldt, A. (1997). Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Europ. J of Oral Sci*, 105(2), 97–116. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1997.tb00188.x>.
- Pioch, T., Staehle, H.J., Duschner, H., & García-Godoy, F. (2001). Nanoleakage at the composite-dentin interface: a review. *Am J Dent*. 2001;14(4), 252–258.
- Proença, J. P., Polido, M., Osorio, E., Erhardt, M. C., Aguilera, F. S., García-Godoy, F., Osorio, R., & Toledano, M. (2007). Dentin regional bond strength of self-etch and total-etch adhesive systems. *Dental materials*, 23(12), 1542–1548. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.02.001>.
- Pupo, Y. M., Bernardo, C., de Souza, F., Michél, M. D., Ribeiro, C., Germano, S., & Maluf, D. F. (2017). Cytotoxicity of Etch-and-Rinse, Self-Etch, and Universal Dental Adhesive Systems in Fibroblast Cell Line 3T3. *Scanning*, 2017, 9650420. <https://doi.org/10.1155/2017/9650420>.
- Reichl, F.X., Löhle, J., Seiss, M., Furche, S., Shehata, M.M., Hickel, R., Müller, M., Dränert M. & Durner, J. (2012). Elution of TEGDMA and HEMA from polymerized resin-based bonding systems. *Dent Mater*, 28(11), 1120-25.
- Reis, A.F., Oliveira, M.T., Giannini, M., De Goes, M.F., & Rueggeberg, F.A. (2003). The effect of organic solvents on one-bottle adhesives' bond strength to enamel and dentin. *Oper Dent*, 28(6), 700-6.
- Reis, A. F., Giannini, M., & Pereira, P. N. (2007). Long-term TEM analysis of the nanoleakage patterns in resin–dentin interfaces produced by different bonding strategies. *Dental Materials*, 23(9), 1164-1172.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In G. S. Sittampalam (Eds.) et. al., *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Rosa, W.L., Piva, E. & Silva, A.F. (2015). Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *J Dent*, 43(7), 765-76.
- Rueggeberg, F.A., Hashinger, D.T., & Fairhurst, C.W. (1990). Calibration of FTIR conversion analysis of contemporary dental resin composites. *Dent Mater*, 6(4), 241–249.
- Sabatini, C., & Pashley, D.H. (2015). Aging of adhesive interfaces treated with benzalkonium chloride and benzalkonium methacrylate. *Eur J Oral Sci*, 123(2), 102–107.
- Sadat-Shojaia, M., Ataia M., Nodehia, A., & Nasiri Khanlarb, L. (2010). Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: Synthesis and application. *Dent Mater*, 26, 471–482.
- Sadek, F.T., Castellan, C.S., Braga, R.R., Mai, S., Tjäderhane, L., Pashley, D.H., & Tay, F.R. (2010). One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dent Mater*, 26(4), 380-6. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.12.009>.

- Saikaew, P., Fu, J., Chowdhury, A.F.M.A., Carvalho, R.M., & Sano, H. (2019). Effect of air-blowing time and long-term storage on bond strength of universal adhesives to dentin. *Clin Oral Investig*, 23(6), 2629–2635. . <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2656-y>.
- Sano, H., Shono, T., Sonoda, H., Takatsu, T., Ciucchi, B., Carvalho, R., & Pashley, D.H. (1994a). Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength-evaluation of a microtensile bond test. *Dent Mater*, 10, 236-240.
- Sano, H., Shono, T., Takatsu, T., & Hosoda, H. (1994b). Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. *Oper Dent*, 19(2), 59-64.
- Sano, H., Takatsu, T., Ciucchi, B., Horner, J.A., Matthews, W.G., Pashley, D.H. (1995). Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. *Oper Dent*, 20(1), 18–25.
- Sano, H., Chowdhury, A.F.M.A., Saikaew, P., Matsumoto, M., Hoshika, S., & Yamauti, M. (2020). The microtensile bond strength test: Its historical background and application to bond testing. *Jpn Dent Sci Rev*, 56(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2019.10.001>.
- Sasaki, N., Okuda, K., Kato, T., Kakishima, H., Okuma, H., Abe, K., Tachino, H., Tuchida, K., & Kubono, K. (2005). Salivary bisphenol-A levels detected by ELISA after restoration with composite resin. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 16(4), 297–300. <https://doi.org/10.1007/s10856-005-0627-8>.
- Sauro, S., Pashley, D.H., Mannocci, F., Tay, F.R., Pilecki, P., Sherriff, M., & Watson, T.F. (2008). Micropermeability of current self-etching and etch-and-rinse adhesives bonded to deep dentine: a comparison study using a double-staining/confocal microscopy technique. *Eur J Oral Sci*, 116(2), 184–193.
- Sauro, S., Mannocci, F., Toledano, M., Osorio, R., Thompson, I., & Watson, T. F. (2009). Influence of the hydrostatic pulpal pressure on droplets formation in current etch-and-rinse and self-etch adhesives: a video rate/TSM microscopy and fluid filtration study. *Dental Materials*, 25(11), 1392-1402.
- Schafer, T.E., Lapp, C.A., Hanes, C.M., Lewis, J.B., Wataha. J.C., & Schuster, G.S. (1999). Estrogenicity of bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate in vitro. *J Biomed Mater Res*, 45(3), 192–7.
- Schmalz, G., Schuster, U., Nuetzel, K.; & Schweikl, H. (1999). An in vitro pulp chamber with threedimensional cell cultures. *J. Endod*, 25, 24-29.
- Schmalz, G., Schuster, U., Koch, A., & Schweikl, H. (2002). Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agentes in a dentin barrier test in vitro. *J. Endod*, 28, 188-192.
- Schmalz, G. & Arenholt-Bindslev, D. (2009). Biocompatibility of Dental Materials Springer-Verlag Berlin Heidelberg. XVI, 379. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77782-3>.

- Schneider, H., Fröhlich, M., Erler, G., Engelke, C., & Merte, K. (2000). Interaction patterns between dentin and adhesive on prepared class V cavities in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res*, 53(1), 86-92. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(2000\)53:1%3C86::AID-JBM12%3E3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(2000)53:1%3C86::AID-JBM12%3E3.0.CO;2-Z).
- Schneider, T.R., hakami-tafreshi, R., tomasino-perez, A., tayebi, L., & Lobner, D. (2019). Effects of dental composite resin monomers on dental pulp cells. *Dental Materials Journal*, 38(4), 579–583.
- Schuster, U., Schmalz, G., Thonemann, B., Mendel, N., & Metzl, C. (2001). Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *J. Endod*, 27, 259-265.
- Schweikl, H., Spagnuolo, G., & Schmalz, G. (2006). Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J. Dent. Res*, 85, 870-877.
- Seki, N., Nakajima, M., Kishikawa, R., Hosaka, K., Foxton, R.E., & Tagami, J. (2011). The influence of light intensities irradiated directly and indirectly through resin composite to self-etch adhesives on dentin bonding. *Dent Mater J*, 30, 315-322.
- Seseogullari-Dirihan, R., Apollonio, F., Mazzoni, A., Tjaderhane, L., Pashley, D., Breschi, L., & Tezvergil-Mutluay, A. (2016). Use of crosslinkers to inactivate dentin MMPs. *Dent Mater*, 32(3), 423–432, 2016.
- Sezinando, A., Luque-Martinez, I., Muñoz, M.A., Reis, A., Loguercio, A.D., & Perdigão, J. (2015). Influence of a hydrophobic resin coating on the immediate and 6-month dentin bonding of three universal adhesives. *Dent Mater*, 31(10), e236–e246. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.07.002>.
- Sezinando, A., Perdigão, J., & Ceballos, L. (2017). Long-term in vitro adhesion of polyalkenoate-based adhesives to dentin. *J Adhes Dent*, 19(4), 305–316.
- Shokati, B., Tam, L.E., Santerre, J.P., & Finer, Y. (2010). Effect of salivary esterase on the integrity and fracture toughness of the dentin-resin interface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 94(1), 230-7. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31645>.
- Shono, Y., Ogawa, T., & Terashita, M. (1999). Regional measurement of resin-dentin bonding as an array. *J Dent Res*, 78, 699-705.
- Sideridou, I., Tserki, V., & Papanastasiou, G. (2002). Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*, 23(8), 1819–29.
- Sideridou, I. D., & Karabela, M. M. (2011). Sorption of water, ethanol or ethanol/water solutions by light-cured dental dimethacrylate resins. *Dental Materials*, 27(10), 1003-1010.
- Sigusch, B.W., Pflaum, T., Volpel, A., Schinkel, M., & Jandt, K.D. (2009). The influence of various light curing units on the cytotoxicity of dental adhesives. *Dent Mater*, 25, 1446–52. [https://doi:10.1016/j.dental.2009.06.016](https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.06.016).

- Silva, J.M.F., Rodrigues, J.R., Camargo, C.H.R., Vilas Boas, V., Fernandes Jr., Hiller, K.A., & Schmalz, G. (2014). Effectiveness and biological compatibility of different generations of dentin adhesives. *Clinical Oral Investigations*, 18(2), 607–613.
- Siqueira, F., Cardenas, A. M., Ocampo, J. B., Hass, V., Bandeca, M. C., Gomes, J. C., Reis, A., & Loguercio, A. D. (2018). Bonding Performance of Universal Adhesives to Eroded Dentin. *The journal of adhesive dentistry*, 20(2), 121–132. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a40300>.
- Soderholm, K.J. & Mariotti, A. (1999). BIS-GMA—based resins in dentistry: are they safe? *J Am Dent Assoc*, 130(2), 201–9.
- Sofan, E., Sofan, A., Palaia, G., Tenore, G., Romeo, U., & Migliau, G. (2017). Classification review of dental adhesive systems: from the IV generation to the universal type. *Ann Stomatol (Roma)*, 3;8(1), 1-17. <https://doi.org/10.11138/ads/2017.8.1.001>.
- Spencer, P., Ye, Q., Park, J., Topp, E. M., Misra, A., Marangos, O., Wang, Y., Bohaty, B. S., Singh, V., Sene, F., Eslick, J., Camarda, K., & Katz, J. L. (2010). Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Annals of biomedical engineering*, 38(6), 1989–2003. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-9969-6>.
- Stanislawski, L., Lefeuvre, M., Bourd, K., Soheili-Majd, E., Goldberg, M., & Perianin, A. (2003). TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A*, 66, 476–82.
- Styllou, M., Reichl, F.X., Styllou, P., Urcan E., Rothmund, L., Hickel R., Högg, C., & Scherthan, H. (2015). Dental composite components induce DNA-damage and altered nuclear morphology in gingiva fibroblasts. *Dent Mater*, 31(11), 1335–1344. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.08.156>.
- Svenson, S. & Tomalia, D.A. (2005). Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Adv Drug Deliv Ver*, 14;57(15), 2106–29.
- Szep, S., Kunkel, A., Ronge, K., & Heidemann, D. (2002). Cytotoxicity of modern dentin adhesives--in vitro testing on gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res*, 63, 53–60. <https://doi.org/10.1002/jbm.10083>.
- Tani, C. & Finger, W.J. (2002). Effect of smear layer thickness on bond strength mediated by three all-in one self-etching priming adhesives. *J Adhes Dent*, 4(4), 283–9.
- Tay, F.R., Frankenberger, R., Krejci, I., Bouillaguet, S., Pashley, D.H., Carvalho, R.M., & Lai C.N.S. (2004). Single-bottle adhesives behave as permeable membranes after polymerization I. In vivo evidence. *J Dent*, 32, 611–21.

- Tay, F.R. & Pashley, D.H. (2009). Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. *J Dent Res*, 88(8), 719–724. <https://doi.org/10.1177/0022034509341826>.
- Tekçe, N., Tuncer, S., Demirci, M., & Balci, S. (2016). Do matrix metalloproteinase inhibitors improve the bond durability of universal dental adhesives? *Scanning*, 38(6), 535–544.
- Tezvergil-Mutluay, A., Agee, K. A., Hoshika, T., Uchiyama, T., Tjäderhane, L., Breschi, L., Mazzoni, A., Thompson, J. M., McCracken, C. E., Looney, S. W., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2011). Inhibition of MMPs by alcohols. *Dental materials*, 27(9), 926–933. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.05.004>.
- Tezvergil-Mutluay, A., Mutluay, M., Seseogullari-Dirihan, R., Agee, K. A., Key, W. O., Scheffel, D. L., Breschi, L., Mazzoni, A., Tjäderhane, L., Nishitani, Y., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2013). Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. *Journal of dental research*, 92(1), 87–91. <https://doi.org/10.1177/0022034512466264>.
- Thanatvarakorn, O., Prasansuttiorn, T., Takahashi, M., Thittaweerat, S., Foxton, R. M., Ichinose, S., Tagami, J., & Nakajima, M. (2016). Effect of Scrubbing Technique with Mild Self-etching Adhesives on Dentin Bond Strengths and Nanoleakage Expression. *The journal of adhesive dentistry*, 18(3), 197–204. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a36033>.
- Thompson, J. M., Agee, K., Sidow, S. J., McNally, K., Lindsey, K., Borke, J., Elsalanty, M., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2012). Inhibition of endogenous dentin matrix metalloproteinases by ethylenediaminetetraacetic acid. *Journal of endodontics*, 38(1), 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.09.005>.
- Toledano, M., Osorio, E., Aguilera, F.S., Cabrerizo, M. & Osorio, M. (2012a). Surface analysis of conditioned dentin and resin-dentin bond strength. *J Adhes Sci Tech*, 26, 27–40.
- Toledano, M., Yamauti, M., Ruiz-Requena, M. E., & Osorio, R. (2012b). A ZnO-doped adhesive reduced collagen degradation favouring dentine remineralization. *Journal of Dentistry*, 40(9), 756-765.
- Toledano, M., Cabello, I., Yamauti, M., Giannini, M., Aguilera, F. S., Osorio, E., & Osorio, R. (2012c). Resistance to degradation of resin-dentin bonds produced by one-step self-etch adhesives. *Microscopy and Microanalysis*, 18(6), 1480.
- Toledano, M., Sauro, S., Cabello, I., Watson, T., & Osorio, R. (2013). A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dental Materials*, 29(8), e142-e152.
- Toledano, M., & Osorio, R. (2015). New Advanced Materials for High Performance at the Resin-Dentine Interface. *Frontiers of oral biology*, 17, 39–48. <https://doi.org/10.1159/000381692>.

- Tsujimoto, A., Barkmeier, W. W., Takamizawa, T., Wilwerding, T. M., Latta, M. A., & Miyazaki, M. (2017). Interfacial characteristics and bond durability of universal adhesive to various substrates. *Operative dentistry*, 42(2), E59-E70.
- Tuncer, S., Demirci, M., Schweikl, H., Erguven, M., Bilir, A., & Kara Tuncer, A. (2012). Inhibition of cell survival, viability and proliferation by dentin adhesives after direct and indirect exposure in vitro. *Clin Oral Investig*, 16, 1635–46, <https://doi.org/10.1007/s00784-011-0669-x>.
- Unemori, M., Matsuya, Y., Matsuya, S., Akashi, A., & Akamine, A. (2003). Water absorption of poly(methyl methacrylate) containing 4 methacryloxyethyl trimellitic anhydride. *Biomater*, 24(8), 1381-7.
- Van Landuyt, K. L., De Munck, J., Snauwaert, J., Coutinho, E., Poitevin, A., Yoshida, Y., Inoue, S., Peumans, M., Suzuki, K., Lambrechts, P., & Van Meerbeek, B. (2005). Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. *Journal of dental research*, 84(2), 183–188. <https://doi.org/10.1177/154405910508400214>.
- Van Landuyt, K. L., Snauwaert, J., De Munck, J., Peumans, M., Yoshida, Y., Poitevin, A., Coutinho, E., Suzuki, K., Lambrechts, P., & Van Meerbeek, B. (2007). Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*, 28(26), 3757–3785. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.044>.
- Van Landuyt, K. L., Yoshida, Y., Hirata, I., Snauwaert, J., De Munck, J., Okazaki, M., Suzuki, K., Lambrechts, P., & Van Meerbeek, B. (2008). Influence of the chemical structure of functional monomers on their adhesive performance. *Journal of dental research*, 87(8), 757–761. <https://doi.org/10.1177/154405910808700804>.
- Van Landuyt, K. L., Nawrot, T., Geebelen, B., De Munck, J., Snauwaert, J., Yoshihara, K., Scheers, H., Godderis, L., Hoet, P., & Van Meerbeek, B. (2011). How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dental materials*, 27(8), 723–747. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.05.001>.
- Van Meerbeek, B., Inokoshi, S., Braem, M., Lambrechts, P., Vanherle, G. (1992). Morphological Aspects of the Resin-Dentin Interdiffusion Zone with Different Dentin Adhesive Systems. *Journal of Dental Research*, 71(8), 1530–1540. <https://doi.org/10.1177/00220345920710081301>.
- Van Meerbeek, B., Dhem, A., Goret-nicaise, M., Braem, M., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (1993). Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. *J Dent Res*, 72(2), 495-501.
- Van Meerbeek, B., Vargas, M., Inoue, S., Yoshida, Y., Perdigão, J., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (2000). Microscopy investigations. Techniques, results, limitations. *Am J Dent*, 13(Spec No), 3D-18D.

- Van Meerbeek, B., De Munck, J., Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Vijay, P., Van Landuyt, K., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (2003). Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Operative dentistry*, 28(3), 215–235.
- Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Yoshida, Y., Mine, A., De Munck, J., & Van Landuyt, K.L. (2011). State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*, 27(1), 17-28.
- Vasconcelos e Cruz J., Brito J., Polido M. & Gonçalves L. (2019). A new experimental adhesive system containing G-IEMA – physicochemical properties. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 1-15. <https://doi.org/10.1080/01694243.2018.1539154>.
- Vasconcelos e Cruz, J., Polido, M., Brito, J., & Gonçalves, L. L. (2020). Dentin Bonding and SEM Analysis of a New Experimental Universal Adhesive System Containing a Dendrimer. *Polymers*, 12(2), 461. <https://doi.org/10.3390/polym12020461>.
- Vom Saal, F.S. & Hughes, C. (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisfenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ. Health Perspect*, 113, 926-933.
- Wada, H.; Tarumi, H.; Imazato, S.; Narimatsu, M.; & Ebisu, S. (2004). *In vitro* estrogenicity of resin composites. *J. Dent. Res*, 83, 222-226.
- Wagner, A., Wendler, M., Petschelt, A., Belli, R., & Lohbauer, U. (2014). Bonding performance of universal adhesives in different etching modes. *Journal of dentistry*, 42(7), 800–807. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.04.012>.
- Wang, T., Nikaido, T., & Nakabayashi, N. (1991, Jan). Photocure bonding agent containing phosphoric methacrylate. *Dent Mater*, 7(1), 59-62.
- Wang, Y. & Spencer, P. (2005). Continuing etching of an all in- one adhesive in wet dentin tubules. *J Dent. Research*, 84(4), 350-354.
- Wang, Y., Spencer, P., Yao, X., & Ye, Q. (2006). Effect of coinitiator and water on the photoreactivity and photopolymerization of HEMA/camphoquinone-based reactant mixtures. *J Biomed Mater Res A*, 78(4), 721–8.
- Wang, S., Zhang, K., Zhou, X., Xu, N., Xu, H. H., Weir, M. D., Ge, Y., Wang, S., Li, M., Li, Y., Xu, X., & Cheng, L. (2014). Antibacterial effect of dental adhesive containing dimethylaminododecyl methacrylate on the development of *Streptococcus mutans* biofilm. *International journal of molecular sciences*, 15(7), 12791–12806. <https://doi.org/10.3390/ijms150712791>.
- Wang, R., Shi, Y., Li, T., Pan, Y., Cui, Y., & Xia, W. (2017). Adhesive interfacial characteristics and the related bonding performance of four selfetching adhesives with different functional monomers applied to dentin. *J Dent*, 62, 72–80.

- Wataha, J.C. Principles of biocompatibility for dental practitioners. (2001). *J. Prosthet. Dent*, 86, 203-209.

- Wegehaupt, F.J., Lunghi, N., Belibasakis, G.N., & Attin, T. (2016). Influence of light-curing distance on degree of conversion and cytotoxicity of etch-and-rinse and self-etch adhesives. *BMC Oral Health*, 17, 12. <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0239-3>.
- Welshons, W.V., Nagel, S.C., & Vom Saal, F.S. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, 147, S56-S69.
- World Health Organization (2011). The World Oral Health Report 2011: Future Use of Materials for Dental Restoration. Geneva.
- Yano, J., Kitamura, C., Nishihara, T., Tokuda, M., Washio, A., Chen, K.K. & Terashita, M. (2011). Apoptosis and survivability of human dental pulp cells under exposure to Bis-GMA. *J. Appl. Oral Sci*, 19(3), 218-222. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572011000300007>.
- Yiu, C. K., Pashley, E. L., Hiraishi, N., King, N. M., Goracci, C., Ferrari, M., Carvalho, R. M., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2005). Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. *Biomaterials*, 26(34), 6863–6872. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.011>.
- Yoshida, K. & Greener, E.H. (1994). Effect of photoinitiator on degree of conversion of unfilled light-cured resin. *J Dent*, 22(5), 296–9.
- Yoshida, Y., Nagakane, K., Fukuda, R., Nakayama, Y., Okazaki, M., Shintani, H., Inoue, S., Tagawa, Y., Suzuki, K., De Munck, J., & Van Meerbeek, B. (2004). Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *Journal of dental research*, 83(6), 454–458. <https://doi.org/10.1177/154405910408300604>.
- Yoshida, Y., Yoshihara, K., Hayakawa, S., Nagaoka, N., Okihara, T., Matsumoto, T., Minagi, S., Osaka, A., Van Landuyt, K., & Van Meerbeek, B. (2012). HEMA inhibits interfacial nano-layering of the functional monomer MDP. *Journal of dental research*, 91(11), 1060–1065. <https://doi.org/10.1177/0022034512460396>.
- Yoshihara, K., Yoshida, Y., Hayakawa, S., Nagaoka, N., Kamenoue, S., Okihara, T., Ogawa, T., Nakamura, M., Osaka, A., & Van Meerbeek, B. (2014). Novel fluoro-carbon functional monomer for dental bonding. *Journal of dental research*, 93(2), 189–194. <https://doi.org/10.1177/0022034513514447>.
- Yu, B., Liu, F., & He, J. (2014). Preparation of low shrinkage methacrylate-based resin system without Bisphenol A structure by using a synthesized dendritic macromere (G-IEMA). *J Mech Behav Biomed Mater*, 35, 1-8.
- Zanchi, C.H., Münchow, E.A., Ogliari, F.A., Chersoni, S., Prati, C., Demarco, F.F., & Piva, E. (2010). Development of experimental HEMA-free three-step adhesive system. *J Dent*, 38(6), 503-8. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.03.006>.

- Zanchi, C. H., Münchow, E. A., Ogliari, F. A., de Carvalho, R. V., Chersoni, S., Prati, C., Demarco, F. F., & Piva, E. (2013). Effects of long-term water storage on the microtensile bond strength of five experimental self-etching adhesives based on surfactants rather than HEMA. *Clinical oral investigations*, 17(3), 833–839. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0791-4>.
- Zecin-Deren, A., Sokolowski, J., Szczesio-Wlodarczyk, A., Piwonski, I., Lukomska-Szymanska, M., & Lapinska, B. (2019). Multi-Layer Application of Self-Etch and Universal Adhesives and the Effect on Dentin Bond Strength. *Molecules*, 24(2), 345.
- Zhang, K., Li, F., Imazato, S, Cheng, L., Liu, H., Arola, D. D., Bai, Y. & Xu, H. H. K. (2014). Dual antibacterial agents of nano-silver and 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide in dental adhesive to inhibit caries. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 101(6), 10.1002/jbm.b.32898. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32898>.
- Zhang, H., Ma, Y., & Xie, Y. A. (2015a). Controllable Aptamer-Based Self-Assembled DNA Dendrimer for High Affinity Targeting, Bioimaging and Drug Delivery. *Sci Rep*, 5,10099. <https://doi.org/10.1038/srep10099>.
- Zhang, L., Weir, M.D., Hack, G., Fouad, A.F., & Xu, H.K.K. (2015b). Rechargeable dental adhesive with calcium phosphate nanoparticles for long-term ion release. *J Dent*, 43(12), 1587–1595. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.06.009>.
- Zhou, H., Fang, L., Weir, M.D., & Xu, H.K.K. (2013). Dental plaque microcosm response to bonding agents containing quaternary ammonium methacrylates with different chain lengths and charge densities. *J Dent*, 41(4), 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.01.004>.
- Zhou, W., Liu, S., Zhou, X., Hannig, M., Rupf, S., Feng, J., Peng, X., & Cheng, L. (2019). Modifying Adhesive Materials to Improve the Longevity of Resinous Restorations. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 723. <https://doi.org/10.3390/ijms20030723>.
- Zhu, B., Li, X., Xu, X., Li, J., Ding, C., Zhao, C., & Li, J. (2018). One-step phosphorylated poly(amide-amine) dendrimer loaded with apigenin for simultaneous remineralization and antibacterial of dentine. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 1;172, 760-768. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.036>.

TRABALHOS CIENTÍFICOS

TRABALHOS CIENTÍFICOS

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS E OUTROS EVENTOS

- Apresentação de poster no 2º Congresso Internacional do CiiEM com o tema “Physicochemical and dentin adhesion studies of a new experimental universal dental adhesive without Bis-GMA”, onde foram apresentados os resultados preliminares obtidos com os primeiros adesivos experimentais formulados no âmbito desta tese. O *abstract* referente a este trabalho foi publicado na revista *Annals of Medicine: Physicochemical and dentin adhesion studies of a new experimental universal dental adhesive without Bis-GMA*. Conference Paper Second CiiEM Congress: Research and Innovation in Human and Health Sciences, Volume: *Annals of Medicine*, 50:sup1, S65, June 2018, Monte Caparica, Portugal. DOI: 10.1080/07853890.2018.1427445

- Comunicação oral no 3º Congresso Internacional do CiiEM, Research and Innovation in Human & Health Sciences, Monte Caparica, Portugal, com o tema “Physicochemical, mechanical and SEM characterization of a new experimental adhesive containing G-IEMA”: O abstract referente a esta comunicação foi publicado na revista *Annals of Medicine*: Joana Vasconcelos e Cruz, Luísa L. Gonçalves, José Brito & Mário Polido (2019) Physicochemical, mechanical and SEM characterization of a new experimental adhesive containing G-IEMA, *Annals of Medicine*, 51:sup1, 149, DOI: 10.1080/07853890.2018.1561992

Prémio: Melhor comunicação oral

PROJETOS DE ARTIGOS EM EXECUÇÃO

- Publicação do artigo sobre a última formulação do adesivo experimental e os seus resultados no que concerne à taxa de conversão, resistência adesiva à dentina (μ TBS), caracterização da interface adesiva através da Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV) e o seu efeito citotóxico nas células da polpa e gengiva.

PROJETOS EM CURSO

- Estudo da citotoxicidade do adesivo experimental nas linhas celulares da polpa e da gengiva já estabelecidas.
- Estudo da resistência adesiva do adesivo experimental quando aplicado ao esmalte.
- Estudo da nanoinfiltração do adesivo experimental quando aplicado à dentina, após 3 meses de armazenamento em estufa simulando as condições da cavidade oral.

PRESPECTIVA DE TRABALHOS FUTUROS

- Melhorar a composição do adesivo introduzindo nanopartículas com o objetivo de otimizar as suas propriedades físico-químicas e mecânicas e ao mesmo tempo conferir propriedades antibacterianas.
- Estudar as propriedades bacteriostáticas e bactericidas do adesivo quando em contacto com diversas estirpes, especialmente dos *estreptococos mutans*.
- Observar a interface adesiva do adesivo experimental, utilizando a MEV-EDS para visualizar a ligação ao cálcio.
- Estudar o efeito citotóxico do novo adesivo nas células da polpa dentária quando aplicado em discos de dentina numa câmara pulpar artificial.

ANEXOS

ANEXO 1

Documento comprovativo da aprovação do estudo pela Comissão de Ética do Instituto Universitário Egas Moniz, Monte da Caparica, Portugal



Ex.ma Senhora
Joana Vasconcelos e Cruz

Monte de Caparica, 03 de junho de 2015.

Ex.ma Senhora,

Venho comunicar-lhe que o Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado “Formulação de um novo Adesivo Dentário e estudo do respetivo Protocolo de Aplicação”, foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Prof.ª Doutora Maria Fernanda Mesquita

EGAS MONIZ — COOPERATIVA DE ENSINO SUPERIOR,
CRL

Campus Universitário — Quinta da Granja — Monte de
Caparica 2829-511 Caparica

ANEXO 2

Consentimento informado - Exodontia e
doação dos Órgãos em questão ao Banco
de Dentes Humanos do Instituto
Universitário Egas Moniz

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA EXODONTIA

Eu,

_____,

portador do C.C. nº _____, válido até

_____,

após ter recebido as informações que me foram transmitidas durante a elaboração do diagnóstico clínico e radiográfico e não tendo condição de receber tratamento conservador e consequente permanência na cavidade oral por

_____ (motivo da exodontia),

consinto na realização da(s) exodontia(s) do(s) dente(s)

_____, bem como na respetiva **Doação dos Órgãos**

em questão ao Banco de Dentes Humanos do Instituto Universitário Egas

Moniz, a fim de posterior utilização, sem fins lucrativos, em pesquisa científica e ensino, preservando a minha identidade.

_____, ____ de _____ de _____

Assinatura _____ do _____ doente

Assinatura _____ do _____ responsável _____ pela _____ recolha

ANEXO 3

Consentimento informado – Cirurgia
Periodontal

Pós-Graduação em Periodontologia do ISCSEM

Consentimento informado – Cirurgia Periodontal

Na Pós-Graduação em Periodontologia o Sr(a) irá ser tratado por Médicos Dentistas, (Licenciados ou Mestres) que se encontram a efectuar uma formação especializada nesta área, sempre sobre acompanhamento directo por parte dos docentes do curso.

Como paciente, o Sr(a) tem o direito de ser informado acerca dos benefícios e riscos que derivam da intervenção a que vai ser submetido(a). Leia atentamente o presente consentimento e tire as suas dúvidas antes de assinar.

Diagnóstico – Foi-lhe previamente diagnosticada periodontite. Em muitos casos após o tratamento inicial (destartarização e alisamento radicular) verifica-se a persistência de algumas bolsas periodontais, o que se pode traduzir num risco acrescido de progressão da doença, com perda do suporte ósseo e eventual perda dentária. O procedimento cirúrgico tem como objectivo, através de um acesso directo à superfície das raízes, efectuar uma melhor descontaminação das mesmas e, eventualmente, corrigir factores locais agravantes ou sequelas da doença, de forma a controlar a progressão da mesma.

Principais riscos e complicações – As complicações mais frequentes deste procedimento são: hipersensibilidade dentária, dor, edema (inchaço), hemorragia, hematomas. Em casos mais raros podem ocorrer: infecções, alterações de sensibilidade (dormência), alergias ao anestésico local administrado ou à medicação prescrita, alterações da vitalidade dentária e outras complicações não descritas. Devido às diferenças individuais de cada paciente, a natureza e duração exacta de algumas destas complicações não podem ser determinadas, sendo que, algumas delas, podem ser permanentes ou exigir a realização de tratamentos adicionais para a sua resolução.

Alternativas ao tratamento – 1) Não tratamento – nesse caso poderá ocorrer progressão da periodontite, com eventual perda de dentes.

Consultas de seguimento, cuidados pós-operatórios e higiene oral – Antes da intervenção deverá informar se possui algum problema de saúde, se está a tomar alguma medicação (mesmo que não tenha sido prescrita pelo médico) ou se possui alergia a algum medicamento ou a algum anestésico ou seus constituintes.

Normalmente a remoção dos pontos é efectuada uma semana após a intervenção. Adicionalmente, de forma a garantir o sucesso do tratamento além do cumprimento estrito dos cuidados de higiene oral que lhe foram ensinados, é fundamental um controlo regular

por parte do profissional, definido individualmente para cada paciente de acordo com o seu perfil de risco. O paciente deve comprometer-se a comparecer nestas consultas de reavaliação, de forma a garantir uma evolução favorável do tratamento. Deverá igualmente cumprir todas as instruções pós-operatórias que lhe foram fornecidas e tomar a medicação que lhe foi prescrita.

Custos – Todos os tratamentos prestados no âmbito da Pós-Graduação em Periodontologia não acarretam qualquer custo para o utente, no entanto, os restantes actos efectuados fora do âmbito do curso de Pós-Graduação, são cobrados de acordo com a tabela em vigor na Clínica Universitária Egas Moniz, mesmo que na decorrência de tratamentos iniciados previamente ao nível da Pós- Graduação. A remoção de pontos não terá qualquer custo.

Registos e Fotografias - Autorizo a utilização de fotografias, radiografias ou outros dados para fins médicos, educativos ou científicos, sempre com a salvaguarda de que a minha identidade não será revelada.

Declaro concordar com o plano de tratamento que me foi proposto, sendo que o mesmo não constitui nenhuma garantia de sucesso. Fui informado que o plano de tratamento pode eventualmente ser alterado no decurso da cirurgia, de acordo com a existência de condições previamente não diagnosticadas. Nomeadamente, se durante a cirurgia for constatada a presença de dentes com um mau prognóstico poderá ser indicada a sua remoção. No entanto, caso existia alguma alteração ao plano de tratamento inicial serei prontamente informado desse facto.

Declaro que me encontro suficientemente esclarecido e tive oportunidade de clarificar as minhas dúvidas acerca da natureza do meu problema, sobre o tratamento indicado e as suas alternativas, e tenho consciência da importância da minha colaboração ao longo de todo o processo.

Paciente

Processo nº _____

Médico

Monte da Caparica, ____ de _____ de 20____

ANEXO 4

Artigo II - Informação Suplementar

DENTIN BONDING AND SEM ANALYSIS OF A NEW EXPERIMENTAL UNIVERSAL ADHESIVE SYSTEM CONTAINING A DENDRIMER

Supplementary Information

In order to assess whether there is an association between the type of fracture (adhesive (A) or cohesive (C)) and the type of adhesive (SBU, FUT, AE1 and AE2), 2 X 4 contingency tables and the

chi-square test were used. Table 4 shows the prevalence of each type of fracture per adhesive. In view of such data, the chi-square test produced a significant result ($p = 0.001$) which shows that there is an association between type of fracture and adhesive. Consequently, 2 X 2 contingency tables and chi-square test with Bonferroni corrections were used to compare the prevalence of adhesive fractures between any two adhesives, with the following results:

-The prevalence of adhesive fractures in SBU (77.5%) is significantly lower ($p < 0.001$) than in 296 AE2 (91.9%), therefore the prevalence of cohesive fractures in SBU (22.5%) is significantly higher 297 than in AE2 (8.1%). 298

- Moreover, the prevalence of adhesive fractures in AE1 (76.9%) is significantly lower ($p = 0.001$) 299 than in AE2 (91.9%), which means that the prevalence of cohesive fractures in AE1 (23.1%) is 300 significantly higher than in AE2 (8.1%).

Table 4. Cross tabulation with the prevalence of each type of fracture per adhesive.

			Adhesives				
			SBU	FUT	AE1	AE2	Total
Fractures	A						
	(adhesive)	% within adhesive	77.5%	86.1%	76.9%	91.9%	81.8%
	C	% within adhesive	22.5%	13.9%	23.1%	8.1%	18.2%
	(cohesive)						
	Total	% within adhesive	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

ANEXO 5

Patente

BOLETIM DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Nº 2020/04/08 (070/2020)

8 de abril de 2020

Sumário

Aviso	2
Códigos	2
PATENTES DE INVENÇÃO	6
Pedidos - BB/CA1A.....	6
Patentes europeias vigentes em Portugal - FG4A	7
Caducidades por limite de vigência - Patente europeia - MM3A	9
Averbamentos - Patente europeia - PD1A, PD3A, PC1A, PC3A	10
Outros Atos - Patente europeia - HK4A	11
CERTIFICADOS COMPLEMENTARES DE PROTECÇÃO	12
Caducidades por limite de vigência.....	12
MODELOS DE UTILIDADE	13
Outros Atos - HK4K	13
DESENHOS OU MODELOS.....	14
Pedidos - BB/CA1Y.....	14
REGISTO NACIONAL DE MARCAS.....	16
Pedidos	16
Concessões	46
Recusas	47
Renovações	48
Averbamentos	49
Outros Atos.....	50
REGISTO INTERNACIONAL DE MARCAS.....	51
Concessões	51
REGISTO DE LOGÓTIPOS	52
Pedidos	52
Renovações	53
AGENTES OFICIAIS DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL.....	54
PROCURADORES AUTORIZADOS	74

PATENTES DE INVENÇÃO

Pedidos - BBKA/1A

A publicação dos pedidos de patentes de invenção a seguir indicados é efetuada nos termos do disposto no artigo 69.º do Código da Propriedade Industrial; da data de publicação do presente aviso começa a contar-se o prazo de dois meses para a apresentação de reclamações de quem se julgar prejudicado pela eventual concessão dos mesmos, nos termos do artigo 17.º do mesmo Código.

(11) **115064** (13) A

(22) 2018.10.08

(30)

(71) PT EGAS MONIZ - COOPERATIVA DE
ENSINO SUPERIOR CRL

(72) JOANA VASCONCELOS E CRUZ
LUÍSA MARIA LIMA GONÇALVES
MÁRIO HUMBERTO DOS SANTOS CRUZ
POLIDO

(51) Int. Cl.

A61K 6/00 (2020.01)

(54) **FORMULAÇÃO PARA UM SISTEMA ADESIVO
DENTÁRIO UNIVERSAL CONTENDO UM
MONÓMERO DE RETICULAÇÃO
DENDRÍTICO DE
SEGUNDA GERAÇÃO.**

(57) A PRESENTE INVENÇÃO ENQUADRA-SE NA ÁREA DOS SISTEMAS ADESIVOS DENTÁRIOS, E REFERE-SE MAIS ESPECIFICAMENTE A UMA FORMULAÇÃO PARA UM SISTEMA ADESIVO DENTÁRIO UNIVERSAL. É OBJECTO DA PRESENTE INVENÇÃO UMA FORMULAÇÃO PARA UM SISTEMA ADESIVO DENTÁRIO QUE COMPREENDE UM MONÓMERO DE RETICULAÇÃO DENDRÍTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO COM PELO MENOS OITO EXTREMIDADES. ADICIONALMENTE, É TAMBÉM OBJECTO DA PRESENTE INVENÇÃO UM PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO QUE COMPREENDE O REFERIDO MONÓMERO DE RETICULAÇÃO DENDRÍTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO.

[Ver Fascículo Completo](#)