



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

Francisco Adelson Alves de Macedo

**AVALIAÇÃO DO CONDICIONAMENTO DENTINÁRIO COM ÁCIDOS NATURAIS
BIOMODIFICADORES NA INTERFACE DENTINA-RESINA.**

FORTALEZA – CE

2018

Francisco Adeilson Alves de Macedo

**AVALIAÇÃO DO CONDICIONAMENTO DENTINÁRIO COM ÁCIDOS NATURAIS
BIOMODIFICADORES NA INTERFACE DENTINA-RESINA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago

Co-orientador: Prof. Dr. Victor Pinheiro Feitosa

FORTALEZA – CE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M1a MACEDO, FRANCISCO ADEILSON ALVES DE.
AVALIAÇÃO DO CONDICIONAMENTO DENTINÁRIO COM ÁCIDOS NATURAIS
BIOMODIFICADORES NA INTERFACE DENTINA-RESINA. / FRANCISCO ADEILSON
ALVES DE MACEDO. – 2018.
51 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago.
Coorientação: Prof. Dr. Victor Pinheiro Feitosa.

1. Ataque Ácido Dentário. 2. Dentina. 3. Colágeno. I. Título.

CDD 617.6

Francisco Adelson Alves de Macedo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago
Universidade Federal do Ceará (UFC)
Orientador

Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonça
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Giovanna Rabelo Neri

Universidade de Fortaleza (Unifor)
AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar e iluminar, mostrando, assim sua vontade e levando em paz e segurança pelos caminhos. Obrigado também, pela saúde e força de vontade para buscar meus objetivos. Tudo o que tenho e sou agradeço a Vós.

Aos meus pais, Ademir Alves de Macedo e José Ilson de Macedo, pelo amor, dedicação e empenho investidos em tantos anos de luta e por sempre acreditarem no meu potencial e que sempre posso fazer o meu melhor. Devo muito do que sou e essa vitória é nossa.

Aos meus avós, José Bento de Macedo (*in memorian*), Úrsula Gonçalves de Macedo (*in memorian*), Maria de Lourdes Oliveira, João Alves de Oliveira (*in memorian*) pelo trabalho de uma vida inteira. Tudo o que tenho hoje e tudo aquilo de que pude desfrutar são conseqüências diretas de suas incansáveis lutas por uma vida melhor.

À minha madrinha, Valdelice Alves de Oliveira e Julieta Alves de Oliveira (*in memorian*), por sempre acreditarem que alcançaria meus sonhos e pelo apoio incondicional em todos os momentos. Somente tenho a agradecer por terem passado por minha vida e terem participado ativamente da minha formação pessoal. A todos os meus parentes, agradeço pelos momentos, pelo companheirismo que torna a nossa vida mais feliz, e por participarem ativamente de todo o meu processo de crescimento.

Ao meu orientador, Sérgio Lima Santiago, professor dedicado e profissional ímpar, por todo o apoio, estímulo e por ter acreditado e me dado a oportunidade de participar e de tornar possível a realização deste trabalho. Agradeço pela paciência, todo ensinamento em tão curto tempo e por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional. Que além de orientador se tornou um estimado amigo. Meu muito obrigado.

À Universidade Federal do Ceará, em especial aos funcionários e docentes, por todo apoio e incentivo.

À CAPES, pelo apoio financeiro e incentivo com a manutenção da bolsa de auxílio durante o mestrado.

Aos professores participantes da banca examinadora Juliano Sartori Mendonça e Jiovanne Neri pelo tempo e pelas valiosas sugestões.

Aos meus amigos de Mestrado e os que me ajudaram nessa caminhada, Adalia Samara, Ana Laura Mota, Bernado Aguiar, Breno Martins, César Filho, Daniel Barbosa, David Queiroz, Diana Cunha, Diego Martins, Elisa Martins, Gabriela Lourenço, Gabriela Soledad, Hellen Súzany, Julianne Coelho, Luciana Arcanjo, Madiana Magalhães, Marcelo Sidou, Nara Sena, Nara Rodrigues, Nayara Oliveira, Samuel, Talita Arrais e tantos outros pelos momentos de alegria, pelo companheirismo e pelas boas lembranças que guardarei para sempre comigo.

**“O único homem que está isento de erros
é aquele que não arrisca acertar.”**

Albert Einstein

Resumo

Na tentativa de reduzir as falhas nos procedimentos restauradores, têm sido propostas alternativas, como o uso de agentes biomodificadores da dentina, a fim de promover melhorias nas propriedades físico-mecânicas e proteger as fibrilas de colágeno da degradação. O presente estudo teve como objetivo avaliar o uso de ácido fítico (IP6), ácido tânico (TA) e glutaraldeído como agentes biomodificadores durante o condicionamento dentinário, tanto na técnica úmida quanto seca, e como o condicionamento afetou a resistência de união à dentina, selamento e nanoinfiltração na interface. Setenta e dois dentes foram preparados expondo a superfície de dentina para a realização dos testes de microtração ($n = 6$), nanoinfiltração ($n = 1$) e micropermeabilidade ($n = 2$), sendo divididos em 8 grupos de acordo com o condicionamento ácido e técnica utilizada nos procedimentos restauradores. As superfícies de dentina foram condicionadas com 37% de ácido fosfórico (controle), 37% de ácido fosfórico + 5% de glutaraldeído, 1% de ácido fítico (IP6) (pH 1,2) e 20% de ácido tânico (TA) (pH 2,8), em seguida foram enxaguados e secos com jato de ar, sendo a técnica seca. Na técnica úmida, após a secagem, a dentina foi re-hidratada por 60 s. O sistema adesivo Adper Single Bond 2 foi aplicado e restaurado com incrementos até a altura de 5 mm. Os dentes restaurados foram seccionados para obter palitos com uma área de seção transversal de $1,0 \text{ mm}^2$. Metade dos espécimes foram testados imediatamente, enquanto os demais foram armazenados em água destilada por um período de seis meses, com exceção do teste de micropermeabilidade que somente foram testados imediatamente. Para a análise estatística, utilizou-se os testes Anova e Tukey. Após 24 h e 6 meses, respectivamente, as médias da resistência de união do grupo do TA foram significativamente inferiores às encontradas nos outros grupos, em ambas as técnicas ($p < 0,05$). Na nanoinfiltração, em técnica seca, o grupo IP6 apresentou selamento adequado e menor infiltração, e o grupo TA apresentou maior concentração de nitrato de prata na interface. Na dentina úmida, o grupo IP6 apresentou maior infiltração e menor selamento, e o grupo TA preservou a interface após 6 meses. Na micropermeabilidade, nas técnicas secas e úmidas, os grupos IP6 e TA mostraram um melhor selamento e menor infiltração de fluoresceína. O condicionamento com IP6 e TA, em técnica seca e úmida respectivamente, preservaram a interface adesiva, após 6 meses, semelhante ao grupo controle.

Descritores: Ataque Ácido Dentário, Dentina e Colágeno.

Abstract

In the attempt to reduce the failures in restorative procedures, alternatives have been proposed, such as the use of dentin biomodifying agents, in order to promote improvements in the physical and mechanical properties and to protect the collagen fibrils from the degradation. The present study aims to evaluate the use of phytic acid (IP6), tannic acid (TA) and glutaraldehyde as biomedical agents during dentin conditioning, both in wet and dry techniques, and as conditioning affected the bond strength, sealing and nanoleakage in interface. Seventy-two teeth were prepared exposing the dentin surface to perform the tests microtensile bonding strength (n=6), nanoleakage evaluation (n=1) and the micropermeability (n=2). Therefore divided into 8 groups according to the etched acid and technique used in restorative procedures. The dentin surfaces were conditioned with 37% phosphoric acid (control), 37% phosphoric acid + 5% glutaraldehyde, 1% phytic acid (IP6) (pH 1.2) and 20% tannic acid (TA) (pH 2.8), then rinsed and air dried. In the wet technique, after drying, dentin was rehydrated for 60s. The adhesive Adper Single Bond 2 was applied and restored in increments of 1mm up to the height of 5mm. The restored teeth were sectioned to obtain toothpicks with a cross-sectional area of 1.0 mm². Half of the specimens were immediately tested, while the others were after six months, with the exception of the micropermeability test, which were only tested immediately. In statistical analysis, the Anova and Tukey tests were used. After 24 h and 6 months, respectively, the only means of bond strengths of the tannic acid group were significantly lower than those found in the other groups in both techniques (p <0.05). In the nanoleakage evaluation, in the dry technique, the IP6 group presented better sealing and less infiltration, and the TA group presented higher concentration of nitrate at the interface. In the wet dentin, the IP6 group presented higher infiltration and lower sealing, and the TA group preserved the interface after 6 months. In the micropermeability, in the dry and wet techniques, the groups IP6 and TA showed a better sealing and less infiltration of fluorescein. The etched with IP6 and TA, in dry and wet technique respectively, preserved the adhesive interface, after 6 months, as well as the control group.

Keywords: Acid Etching , Dentin and Collagen.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
22	PROPOSIÇÃO	14
<i>2.1</i>	<i>Objetivo Geral</i>	<i>15</i>
<i>2.2</i>	<i>Objetivos Específicos</i>	<i>15</i>
3	CAPÍTULO	16
4	CONCLUSÃO GERAL	41
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ...	49

Introdução Geral

1.INTRODUÇÃO GERAL

A união entre os materiais restauradores estéticos e a estrutura dentária ocorre predominantemente através dos sistemas adesivos, que atuam na dentina por meio de retenção micromecânica, ao promover a penetração de monômeros entre as fibrilas colágenas expostas, na dentina parcialmente ou completamente desmineralizada (Niu et al., 2014). Nos sistemas adesivos convencionais, a etapa do condicionamento ácido é necessária para remover o componente inorgânico da dentina e promover a exposição da rede de colágeno, permitindo a infiltração dos monômeros resinosos e, conseqüentemente, formando na interface adesiva, uma região com características mistas chamada de zona de interdifusão (Van Meerbeek et al., 1993) ou camada híbrida (Nakabayashi; Nakamura; Yasuda; 1991).

A dificuldade em controlar a umidade na dentina quando se utiliza esse tipo de sistema adesivo, é um problema significativo, uma vez que é difícil obter a quantidade de água adequada na interface adesiva (Yiu et al., 2005). A secagem excessiva, promove o colapamento das fibrilas de colágeno, dificultando a penetração adequada dos monômeros adesivos e, conseqüentemente, facilitando o aparecimento de falhas que irão influenciar negativamente na longevidade das restaurações (Ritter et al, 2000). A presença de água em excesso promove a formação de nanoinfiltrações na interface (Liu et al., 2011). As falhas na durabilidade das restaurações, por meio das nanoinfiltrações, se dão parcialmente pela hidrólise, a qual é induzida pela sorção de água dos componentes resinosos hidrofílicos (Ito et al., 2005) e, parcialmente por degeneração das fibras de colágeno, através das metaloproteinases de matriz endógenas (MMPs) derivada da dentina desmineralizada e não completamente infiltradas pelos monômeros (Pashley et al., 2004).

Diante do exposto, a utilização de agentes que se liguem com as fibrilas colágenas e mantenham sua conformação adequada para a infiltração dos monômeros são de grande importância. Na tentativa de diminuir as falhas nos procedimentos restauradores tem sido propostas várias alternativas, como exemplo o uso de inibidores de MMPs, remineralização biomimética, agentes de ligações cruzadas e entre outros (Tay et al., 2009).

Um dos agentes de ligações cruzadas mais utilizados é o glutaraldeído, porém devido a sua citotoxicidade tem-se buscado substâncias naturais que realizem sua função sem trazer nenhum dano e sejam potenciais substitutos. O ácido fítico, conhecido como hexafosfato de inositol (IP6), é um dos ácidos orgânicos encontrados em alimentos do dia a dia, como exemplo cereais, leguminosas, oleaginosas e nozes (Schlemmer et al., 2009). Suas interações, nos campos biológico e fisiológico foram amplamente estudados e revistos. (Schlemmer et al., 2009, Bye et al., 2013, Grases et al., 2005; Bakewell, 2006; Kapral Et al., 2012; Selle et al., 2012). Porém, o conhecimento sobre o seu uso em Odontologia adesiva são ainda limitados. Na literatura, foi relatado que o IP6 apresenta potencial para ser um agente condicionador eficaz, que demonstrou boa ligação dentinária e baixa citotoxicidade a células pulpares, quando comparado com o ácido fosfórico (Nassar et al., 2013).

Contudo, o mecanismo envolvendo o ácido fítico na resistência de união da resina à dentina ainda não foi claramente compreendido. Especula-se que o IP6 pode atuar como um agente de ligação cruzada natural às fibrilas de colágeno, podendo fortalecê-las mecanicamente, evitando o seu colapso (Nassar et al., 2013). Também foi observado que o IP6 apresenta características cariostáticas através da redução da solubilidade do esmalte (Cutivet et al., 2009) ou através da sua elevada afinidade com a hidroxiapatita, reduzindo assim a adsorção de bactérias a superfície dentária (efeito antiplaca) (Magne et al, 2001). Na Endodontia, estudos envolvendo o ácido fítico como condicionamento ácido prévio a utilização de cimentos endodônticos, tem mostrado que o IP6 promove a quelação de íons cálcio, formando complexos com sais minerais, ligações cruzadas com colágeno, removendo camadas mineralizadas, aumentando a força de ligação de sistemas adesivos convencionais à dentina e apresentando mínimos efeitos sobre as células pulpares (Brackett et al, 2011).

Outro potencial substituto para o glutaraldeído é o ácido tânico. O ácido tânico, forma comercial do tanino condensado, é encontrado em frutas como uvas, açaí, maçã e dentre outros. É um polifenol com fraca acidez que tem a capacidade de modificar quimicamente o colágeno, promovendo ligações cruzadas (Jastrzebska et al., 2006). As alterações no colágeno, principalmente modificações no número de ligações cruzadas, fornecem à matriz de colágeno melhores propriedades mecânicas e menores taxas de degradação enzimática. Estas duas

propriedades são desejáveis para o sucesso das restaurações dentárias (Bedran-Russo et al., 2009). Estudos utilizando o ácido tânico como agente dessensibilizante e como agente de remoção da smear layer foram previamente relatados na literatura (Bitter, 1989; Prati et al., 1992; Natsir et al., 1999; Okamoto et al., 1991; Tomiyama et al., 2004), mas há poucas informações do seu efeito sobre as propriedades mecânicas da dentina e na interface adesiva.

Tendo em vista o exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a utilização do ácido fítico, do ácido tânico e do glutaraldeído como agentes biomodificadores durante o condicionamento ácido da dentina, nas técnicas úmida e seca, e verificar sua influência na resistência de união, selamento e nanoinfiltração, tendo como técnica padrão a utilização do ácido fosfórico previamente ao sistema adesivo. As hipóteses do estudo são: (1) não haverá diferenças entre os agentes de biomodificação naturais testados em termos de eficácia de união (resistência de união e nanoinfiltração) e (2) o selamento marginal será semelhante entre os diferentes agentes de biomodificação.

Proposição

2.Proposição

2.1. Objetivo Geral

2.1.1. Avaliar o efeito do condicionamento dentinário utilizando-se ácidos naturais biomodificadores em dentina hígida.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Analisar a influência do condicionamento ácido, utilizando TA e IP6 como agentes de ligação cruzada de colágeno sobre a resistência de união em dentina hígida, por meio do teste de microtração.

2.2.2. Avaliar o selamento dentinário promovido pelo sistema adesivo após aplicação de agentes condicionantes com potencial biomodificador de dentina.

2.2.3. Observar a influência das diferentes substâncias condicionantes sobre nanoinfiltração com nitrato de prata amoniacal na interface de união formada pelo sistema adesivo e a dentina hígida.

Capítulo

3 CAPÍTULO

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado, e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato. Por se tratar de estudos envolvendo seres humanos, ou parte deles, o projeto de pesquisa foi submetido a apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado com o protocolo de número #2.439.067 em 30/11/2017 (Anexo A). Assim sendo, esta dissertação é composta de um artigo científico que será submetido ao periódico The Journal of Adhesive Dentistry, conforme descrito abaixo:

EVALUATION OF DENTINAL CONDITIONING WITH NATURAL ACIDS IN DENTIN-RESIN INTERFACE.

MACEDO FAA, LEMOS MVS, MENDES TAD, FEITOSA VP, SANTIAGO SL.

Abstract

Purpose: To evaluate the use of phytic acid (IP6), tannic acid (TA) and glutaraldehyde as biomodifier agents during dentin conditioning, using dry and wet techniques, and to evaluate bond strength, sealing and nanoleakage in interface.

Materials and Methods: Seventy-two third molars were prepared to expose the dentin surface, microtensile bonding strength (n=6), nanoleakage evaluation (n=1) and the micropermeability (n=2), and divided into 8 groups according to the etched acid and technique, dry or wet, used in restorative procedures. Dentin surfaces were etched 37% phosphoric acid (control) for 15s, 37% phosphoric acid + 5% glutaraldehyde for 15s, 1% phytic acid (IP6) (pH 1,2) for 30 s e 20% tannic acid (TA) (pH 2,8) for 30s, rinsed, air dried 10 s, dry technique. Wet technique, after air dried, the dentin was rewetted for 60 s. The adhesive was applied and a subsequent 5-mm-thick resin crown was built up. Bonded teeth were longitudinally sectioned to obtain sticks with a cross-sectional area of 1.0 mm². Half of the specimens were immediately tested, while the remaining specimens were tested after six months for the microtensile bonding strength and nanoleakage evaluation. For the micropermeability were only immediately tested. For the statistical analysis, the Anova and Tukey tests were used.

Results: After 24 h and 6 months, mean bond strengths of tannic group was significantly lower than those found for the other groups, in both technique (p < 0.05). In the nanoleakage evaluation, in dry technique, the glutaraldehyde and the TA groups presented a higher concentration of the ammonium silver nitrate in the interface. The IP6 group showed superior sealing and less infiltration. In the wet dentin, the IP6 group showed higher silver infiltration and less sealing of the adhesive interface. The TA group maintained interface sealing after 6 months. The micropermeability test images, in the dry and wet techniques, showed a best sealing and less infiltration of fluorescein in the IP6 and TA groups.

Conclusion: The etched with IP6, in dry technique, preserved the interface dentin-resin after six months of storage equally well as control group. In wet technique, the TA group, although lower values of μ TBS, preserved the adhesive interface similar to control group.

Keywords: Acid Etching , Dentin and Collagen.

INTRODUCTION.

In conventional adhesive systems, the etch step is necessary to remove the inorganic component of the dentin and promote exposure of the collagen network²⁸. The challenge in controlling the moisture in the dentin is a problem, since it is difficult to obtain the adequate amount of water in the adhesive interface²⁹. Excessive drying promotes the collapsing of collagen fibers, making it difficult to properly penetrate adhesive monomers and, consequently, facilitating the appearance of defects that will negatively influence the longevity of restorations²⁵. The presence of excess water promotes the formation of nanoinfiltrations at the interface¹⁶. The failures in the durability of the restorations, through nanoinfiltrations, are partially due to the hydrolysis, which is induced by the water sorption of the hydrophilic resinous components¹⁰ and in part by degeneration of the collagen fibers through metalloproteinases (MMPs) derived from demineralised dentin and not completely infiltrated by monomers²³.

The use of agents which link to the collagen fibrils and their proper conformation for the infiltration of the monomers are of great importance. In an attempt to reduce failures in restorative procedures several alternatives have been proposed, such as inhibitors of MMPs, biomimetic remineralization, crosslinking agents and others³⁰.

One of the most commonly used cross-linking agents is glutaraldehyde, but due to its cytotoxicity, natural substances have been sought as potential substitutes. Phytic acid, known as inositol hexaphosphate (IP6), is one of the organic acids found in cereals, oilseeds and nuts²⁹. The interactions and the biological and physiological fields of IP6 were extensively studied and reviewed in the health area^{1,5,9,12,28,29}. Knowledge about their use in adhesive dentistry is still

limited. It has been reported that IP6 has the potential to be an effective conditioning agent, since presented bond-strength values were significantly higher than that of the control. Additionally, IP6 had a minimal effect on pulpal cells, presenting low cytotoxicity when compared to phosphoric acid¹⁹.

It is speculated that IP6 can act as a natural cross-linking agent to collagen fibrils, which can strengthen them mechanically, avoiding their collapse¹⁹. It has also been observed that IP6 presents anti-cariostatic characteristics by reducing the enamel solubility⁶ or by its high affinity with hydroxyapatite, thus reducing the adsorption of bacteria to the dental surface¹⁷. In endodontics, studies involving phytic acid as acid conditioning prior to the use of endodontic cements have shown that IP6 promotes calcium ion chelation, forming complexes with mineral salts, crosslinking with collagen, removing mineralized layers, increasing binding strength of conventional adhesive systems to dentin and exhibiting minimal effect on pulp cells⁴.

Another potential substitute for glutaraldehyde is tannic acid. Tannic acid (TA), the commercial form of condensed tannin, is found in fruits such as grapes, açai, apple and among others. It is a polyphenol with low acidity that has the ability to chemically modify the collagen, promoting crosslinks¹¹. Changes in collagen, mainly modifications in the number of crosslinks, provide the collagen matrix with better mechanical properties and lower rates of enzymatic degradation². Studies on the use of TA in dentistry as a desensitizing agent and as a smear layer removal agent have been previously reported^{3,20,22,24,31}, but there is no information on its effect on the mechanical properties of dentin and the adhesive interface.

The present study aimed to evaluate the use of phytic acid, tannic acid and glutaraldehyde as biomodifying agents during etched of dentin and affected bond strength, sealing and

nanoleakage , in the wet and dry techniques. The null hypotheses of the study were: (1) no statistically difference between the natural agents in the bond strength and (2) The interface sealing promoted of the etched will be similar between the different agents.

MATERIALS & METHODS

Experimental Design

The factors investigated in the study were: (1) dentin acid conditioning (four levels): 37% phosphoric acid (control); 37% phosphoric acid + 5% glutaraldehyde; 1% phytic acid (pH 1.2); 20% tannic acid (pH 2.8); (2) dentin moisture (two levels): wet and dry technique, and (3) the time of storage (two levels): 24 hours and 6 months. The experiments undertaken were microtensile bond strength (μ TBS) test, dentin micropermeability and interfacial nanoleakage, the latter two qualitatively evaluated by confocal-laser microscopy and scanning electron microscopy respectively. Six bonded teeth were used (n = 6) for μ TBS, one teeth (n=1) for the nanoleakage assessment whereas further two teeth (n=2) were prepared for micropermeability evaluation.

Acid Preparation

The acid gels were prepared with commercial products: 37% phosphoric acid (Condac, FGM, Joinville, Brazil), 25% glutaraldehyde (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), tannic acid (powder, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) and phytic acid (50% in water, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). The 25% glutaraldehyde was diluted in deionized water to 5% concentration, where it was associated with 1:1 phosphoric acid as used by Kong et al. 2015¹⁴. Tannic acid was dissolved in deionized water to obtain a concentration of 20% and, the pH stabilized at 2.8 with sodium hydroxide, according to Bedran-Russo et al. 2009². Phytic acid was diluted with deionized water to a concentration of 1% and the pH stabilized in 1,2 with sodium hydroxide, following the protocol of Nassar et al. 2013¹⁹.

Tooth Preparation

Seventy two unerupted, caries-free third molars were collected after the patients' informed consent had been obtained under a protocol reviewed and approved by the local Ethics Committee (#2.439.067). Selected teeth were stored in 0.1% thymol solution and used within two months after extraction.

A flat dentin surface was prepared perpendicular to the longitudinal axis of each tooth by means of a slow-speed Isomet diamond saw (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) under water-cooling. The bonding surface was further polished with a 600-grit silicon carbide paper under constant water irrigation during 30s to create a standardized smear-layer. Then, all dentin surfaces were evaluated in the 40x magnification (Stereo Zoom® Leica S8 APO, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) to ensure removal of all occlusal enamel.

Bonding Procedures

The teeth were divided randomly into 8 groups according to the technique used and acid etched. The groups containing phosphoric acid was etched for 15 s and the other ones for 30 s using the two different procedures, the dry technique: after the etched, rinsed for 30 s, with distilled water, and drying with oil-/water-free air for 10 s at a distance of 10 cm; and the wet technique: after the same procedures of dry technique, the dentin surface was rehydrated with 20 µl of distilled water for 60 s, and excess removed with absorbent paper, leaving the dentin surface visibly moist.

All specimens were bonded using the two-step etch-and-rinse adhesive Adper Single bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, USA). The bonding agent was actively applied for 30 s, gently air-dried and light-cured for 40 s using the LED light-curing unit DB-685 (1100 mW/cm²; Dabi Atlante, Ribeirão Preto, Brazil). Five increments of 1 mm-thick of the composite TPH Spectrum (Dentsply Caulk, Milford, USA) were build-up on the bonded surface. The bonded teeth were stored in distilled water at 37 °C for 24 h.

For the micropermeability test, the protocol published by Feitosa et al. 2014⁸ was followed, in which the restored specimens were taken to the cutting machine and subsequently cut into slices of 1 mm thickness, slightly polished with 2000 granulation sieves and sonicated for 2 min.

Microtensile Bond Testing

Subsequently, all bonded teeth were sectioned across the bonded interface in both x and y directions using a double-sided diamond disc mounting in a cutting machine (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) at low speed under refrigeration, to obtain bonded sticks with cross-sectional area of $1.00 \pm 0.04 \text{ mm}^2$. The sticks originating from each tooth were divided into proportional quantities the immediate period (24 h) and after 6 months in the destilated water at 37°C.

For microtensile testing, the sticks were glued with cyanoacrylate-based adhesive and tested to failure under tension in a universal testing machine (EMIC DL 2000, São José dos Pinhais, Brazil) subjected to a tensile force at 0.5 mm/min and 500N load cell. Before the test, the area of the adhesive interface of the sticks was measured with a digital caliper (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Tokyo, Japan) and computed in the program of the universal test machine. The rupture force was measured in Newtons (N) and divided by the cross-sectional area of union (mm^2), expressed in Megapascals (MPa).

Nanoleakage evaluation

Two resin-dentin bonded sticks from each group were analyzed for nanoleakage, as previously described by Tay et al. 2009³⁰, using 50 wt% ammoniacal silver nitrate solution [$\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{NO}_3$]. Specimens were immersed in the tracer solution for 24h and then immersed in photo-developing solution for 8h under fluorescent light to reduce silver ions into metallic silver grains. Afterwards, the specimens were rinsed with distilled water, embedded in epoxy resin stubs and polished using successive 600-, 1200- and 2000-grit wet SiC papers, and 1 μm diamond paste (Buehler); they were cleaned for 5 min by means of ultrasonic bath after each abrasive/polishing step. The specimens were dehydrated in silica gel for 24h, coated with gold

and examined using field-emission SEM (Quanta FEG 450, FEI, Amsterdam, Netherlands) in backscattered electron mode with 1000X and 3000X standardized magnifications.

Micropermeability Test

For the micropermeability test, two teeth per group ($n = 2$) were restored, using a 0.1% by weight rhodamine-B (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) adhesive, moments before use, and evaluated by confocal laser scanning microscopy (CLSM), according to the protocol published by Feitosa et al 2014⁸. The micropermeability of the resin-dentin interfaces was evaluated using a solution of 0.3% by weight aqueous fluorescein (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). This dye was perfused for 3 h under 15 cm of H₂O simulating the pulp pressure, in order to test the permeability of the adhesive after different conditions. At the time following removal of the specimens from the solution, they were subsequently cut lengthwise into slices of 1 mm thickness, slightly polished with 2000 granulation sieves and placed in ultrasonic vessel for 2 min.

Subsequently, samples were evaluated using confocal microscopy (LSM 710, Carl Zeiss, Munchen, Germany), equipped with a 63x / 1.4 NA oil immersion lens, and using 488 nm and 568 nm laser illumination. The CLSM fluorescence images were obtained on specimens with 1 μm optical section and up to 20 μm below the surface. The images, randomly captured along the interface, were compiled in individual projections and each resin-dentin interface was completely characterized, representing the micropermeability characteristic of each group.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by a statistical software package (Sigma Stat Version 15.0, SPSS, Chicago, IL, USA). The μTBS data were analyzed by two-way ANOVA using the etching agents and dentine-surface conditions (wet and dry). In case of significant, further statistical analysis was performed by Tukey post-hoc for multiple comparisons at 95% level of confidence.

Results

Means and standard deviations for microtensile bond strength (μ TBS) of the groups are presented in Table 1. No statistically significant difference was observed in the analysis among the groups in both conditions, excepted for TA group that presented lower values ($p < 0.05$), in the 24 hours and after 6 months. After 6 months, all the groups maintained the bond strength values ($p > 0.05$)

Analyzing the images of the nanoleakage evaluation (Figure 1), there observed that in the dry dentin, in the period of 24h, the phosphoric acid with gluteraldehyde group and the TA presented a higher concentration of the ammonium silver nitrate, indicating a higher infiltration and worse sealing. In the control and IP6 groups, silver nitrate was not present, indicating a better sealing of the resin-dentine interface. After 6 months, the control, gluteraldehyde and TA groups presented higher infiltration of silver nitrate. Additionally, there was presence of gaps in the control and TA groups. The IP6 group showed superior sealing and less infiltration of ammoniacal silver nitrate in 6 months (Figure 2). In the wet dentin, after 24 hour, the IP6 group showed higher silver infiltration and less sealing of the adhesive interface. Control, gluteraldehyde and TA groups showed better sealing with little or none silver nitrate infiltration. After 6 months, there was presence of gaps with silver infiltration in the gluteraldehyde and IP6 groups. The control and TA groups maintained interface sealing after 6 months.

The micropermeability test images, in the dry and wet techniques, showed a higher perfusion of fluorescein in the control and gluteraldehyde groups, indicating a high concentration of water in the interface. The best sealing and less infiltration of fluorescein were observed in the IP6 and TA groups (Figure 3).

Discussion

In the μ TBS test, the TA group showed statistical differences of the other groups, thus, the first hypotheses was to be rejected. In the micropermeability test, the control and glutaraldehyde groups had a higher presence of water at the interface when compared to the IP6 and TA groups. The second hypotheses should, then, be rejected.

Although dental materials have developed in the last decades, the amount of water in the interface represent a problem for the failure of direct dental restorations. This issue is mainly due to processes of hydrolytic degradation of the resin matrix and degradation of the hybrid layer through the proteolytic degradation of the organic matrix, which occur simultaneously²⁷.

The etched dentin with the phosphoric acid, in the concentration of 32-37%, denatures and exposes the collagen fibrils. Furthermore, the acid can activate endogenous proteases of the dentin matrix, such as MMPs and cysteine cathepsins^{19,27}. Therefore, new biocompatible materials have been constantly researched, for example the tannic and phytic acids. This acids are biocompatible agents capable of influencing dentin properties and show cross-linkers action^{2,20}.

Cross-linkers have been studied in Dentistry to improve the mechanical properties of demineralized dentin. Currently, alternatives to glutaraldehyde are researched, which despite cross-linking collagen, are cytotoxic¹⁶. Inositol has been studied because its activity as a Ca^{2+} chelating agent, collagen cross-linker, which can prevent collagen degradation and mechanically increasing its resistance¹⁹. Tannic acid is a weak acid which can interact to collagen through hydrogen bonds, increasing the stability of collagen fibrils and improving their resistance against the action of MMPs⁷.

Kong et al., 2015¹⁴, realized in vitro study evaluating the bond strength when dentin was conditioned with phosphoric acid or 1% IP6 (pH 1.2) in dry and wet techniques after 24h. It was observed that dentin conditioned with phosphoric acid in the dry technique presented significantly lower bond strength values when compared to the other groups, which differs from the present study, where there was no statistical difference between the groups etched with phosphoric acid and IP6 in the dry and wet techniques (Table 1).

Nassar et al., 2013¹⁹, tested dentin conditioning with IP6 1% (pH 1.2) at three different times: 15 seconds, 30 seconds and 60 seconds compared to the control group (dentin etching with 37% phosphoric acid for 15 seconds). The Inositol groups had better bonding strength values when compared to the control group, but there was no statistical difference in the different conditioning times. This confirming the findings of the present study, where there was also no statistical difference between the IP6 and Control group (Table 1).

Tannic acid has been used in Dentistry for several decades, as a desensitizer and adstringent agent, among other properties such as increased hardness of collagen, although information about this properties in the dentin-resin interface is still restricted in the literature. Okamoto et al., 1991²², already suggested that Tannic Acid was as resistant to enzymes as phosphoric acid, further to preserving collagen. Bedran-Russo et al. 2009², studied the effects of different TA concentrations (1%, 10% and 20%) on the elasticity and enzymatic degradation of the dentin matrix. The results demonstrated that TA, especially at concentrations of 10% and 20%, increased the hardness of the dentin submitted to demineralization and improved the bonding strength of the adhesive systems. This finding differs of ours result, once the TA group presented lower μ TBS values when compared other groups, indicated less bonding strength. The lower values of tannic acid group may be related with the etched time of dentin or acid concentration.

Bedran-Russo et al., 2009², tested the etched with 20% tannic acid, with pH 2.8 and pH 7.2, and control group using two different adhesive systems. The specimens were immersed in the solutions for one hour, then washed, applied the adhesive and restorative procedures. It was observed that the groups with TA had better bonding strength values when compared to the control group, but without statistical difference between the TA groups. The best results were obtained when the ethanol based adhesive system was used. These results differ from the present study, where the TA group showed the lowest bonding strength values when compared to the other groups. However, Bedran-Russo et al². used a longer dentin etched time than that used in the current study and which cannot be applied clinically.

Koide & Daito, 1997¹³, compared a control group to the 0.5% tannic acid and 1% glutaraldehyde groups at three different etched times: 5 minutes, 1 hour, 1 day. The bonding

strength of the tannic acid and glutaraldehyde groups were higher than the control when the etched was performed for 1 hour. Considering the conditioning time of 5 min, which was near to the time used in the our research, there was no statistical difference between the groups in relation to bonding strength, as in the present study.

Through the perfusion of the 50% ammoniacal silver nitrate marker on the bonded surfaces, the nanoleakage could be qualitatively evaluated (Figures 1 and 2). The marker acts by penetrating and precipitating the dentin-resin interface and is therefore detected in the scanning electron microscope. The amount of silver precipitated indicates that there was presence of water in the interface²⁶. In the 24 hours dry dentin images, the groups with glutaraldehyde and TA showed presence of silver ammoniacal nitrate, indicating a higher infiltration and lower sealing. The opposite was observed in the phytic acid group, which the default of the marker proposes a better sealing for this protocol. This may be explain because the nanoleakage was effect between the IP6 and the collagen fibrils.

The presence of gaps after 6 months was directly related to a higher infiltration of silver nitrate, which was higher in the control and tannic acid groups, showed lower results when compared to the images of phytic acid, that presented better sealing and less infiltration of ammoniacal silver nitrate after 6 months. The images demonstrated that the nanoleakage varied with the dentin etched system used and with the different technique.

The images of the wet protocol showed that in 24 hours there was higher infiltration and consequently less sealing in the IP6 group. After 6 months, the presence of gap infiltrated with silver nitrate in the glutaraldehyde and IP6 groups indicated a lower stability when compared to the control and TA groups.

The micropermeability images, showed a higher infiltration of fluorescein in the control and glutaraldehyde groups, both in dry and wet technique, indicating a higher presence of water in the interface. The better sealing and less infiltration of fluorescein were observed phytic and tannic acid groups. Indicating lower presence of water and degradation in the adhesive interface, contributing to a better stability of the restoration.

According to the findings and within the limitations of the present investigation, the phytic acid presented better results among the natural acids, influencing the dentin conditioning and

values similar to the control group, in the μ TBS, nanoleakage and micropermeability tests. Tannic acid presented lower values than the other groups, but remained stability after 6 months. Thus, further studies should be conducted to confirm what the better time etched in the dentin and maintenance of bond strength over time.

Conclusion

The etched with IP6, in dry technique, preserved the interface dentin-resin after six months of storage equally well as control group. In wet technique, the TA group, although lower values of μ TBS, preserved the adhesive interface jointly the control group.

REFERENCES

1. BAKEWELL, S. Phytic acid: a phytochemical with complementary and alternative benefits. **Cancer Biol Ther**, v. 5, n. 9, p. 1134–5, set. 2006.
2. BEDRAN-RUSSO, A. K. B; YOO, K. J.; EMA, K. C.; PASHLEY, D. H. Mechanical Properties of Tannic-acid-treated Dentin Matrix. **J Dent Res**, v. 88, n. 9, p. 807-11, set. 2009.
3. BITTER, N. C. Tannic acid for smear layer removal: pilot study with scanning electron microscope. **J Prosthet Dent**, 61, p. 503-7, 1989.
4. BRACKETT, M. G.; LI, N.; BRACKETT, W. W.; SWORD, R. J.; OI, Y. P.; NIU, L. N.; et al. The critical barrier to progress in dentine bonding with the etch-and-rinse technique. **J Dent**, v. 39, n. 3, p.238-48, mar. 2011.
5. BYE, J. W.; COWIESON, N. P.; COWIESON, A. J.; SELLE, P. H., FALCONER, R. J. Dual effect of sodium phytate on the structural stability and Solubility of proteins. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 2, p. 290–5, jan. 2013.
6. CUTIVET, A.; SCHEMBRI, C.; KOVENSKY, J.; HAUPT, K. Molecularly imprinted microgels as enzyme inhibitors. **J Am Chem Soc**, v. 131, n. 41, p. 14699–702, out. 2009.
7. EBRAHIMI, M.; SHIRAZI, A. S.; ABDOLHOSEINPOUR, F.; ABDOLLAHI, M. Effect of Tannic Acid on Bond Strength of Etch and Rinse and Self-etch Adhesive Systems in Dentin of Primary Teeth. **J Contemp Dent Pract**, v. 18, n. 1, p. 34-8, jan. 2017.
8. FEITOSA, V.P; SAURO, S.; OGLIARI, F. A.; OGLIARI, A. O.; YOSHIHARA, K.; ZANCHI, C. H.; et al. Impact of hydrophilicity and length of spacer chains on the bonding of functional monomers. **Dent Mater**, v. 30, n. 12, p. e317-23, dez. 2014.

9. GRASES, F.; COSTA-BAUZA, A.; PRIETO, R. M. Intracellular and extracellular myo-inositol hexa phosphate (InsP₆), from rats to humans. **Anticancer Res**, v. 25, n. 3c, p. 2593–7, mai./jun. 2005.
10. ITO, S.; HASHIMOTO, M.; WADGAONKAR, B.; SVIZERO, N.; CARVALHO, R. M.; YIU, C.; et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6449-59, nov. 2005.
11. JASTRZEBSKA, M.; ZALEWSKA-REJDAK, J.; WRZALIK, R.; KOCOT, A.; MROZ, I.; BARWINSKI, B.; et al. Tannic acid-stabilized pericardium tissue: IR spectroscopy, atomic force microscopy, and dielectric spectroscopy investigations. **J Biomed Mater Res A**, v. 78, n. 1, p. 148-56, jul. 2006.
12. KAPRAL, M.; WAWSZCZYK, J.; JURZAK, M.; HOLLEK, A.; WEGLARZ, L. The effect of inositol hexaphosphate on the expression of selected metalloproteinases and their tissue inhibitor in IL-1 β -stimulated colon cancer cells. **Int J Colorectal Dis**, v. 27, n. 11, p. 1419–28, nov. 2012.
13. KOIDE T, DAITO M. Effects of Various Collagen Crosslinking Techniques on Mechanical Properties of Collagen Film. **Dent Mater J**, v. 16, n. 1, p. 1-9, jun. 1997.
14. KONG, K.; KALYAN, K. Effect of phytic acid etchant on the structural stability of demineralized dentine and dentine bonding. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 48, p.145-52, ago. 2015.
15. KONG, K.; HIRASHI, N.; NASSAR, M.; OTSUKI, M; YIU, C. K. Y. , TAGAMI, J. Effect of phytic acid etchant on resin–dentin bonding: Monomer penetration and stability of dentin collagen. **J Prosthodont Res**, v. 61, n. 3, p. 251-8, out. 2016.

16. LIU Y., TJADERHANE, L.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; LI, N.; MAO, J.; et al. Limitation in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. **J Dent Res**, v. 90, n. 8, p. 953–68, ago. 2011.
17. MAGNE, D.; WEISS, P.; BOULER, J. M.; LABOUX, O.; DACULSI, G. Study of the maturation of the organic (type I collagen) and mineral (nonstoichiometric apatite) constituents of a calcified tissue (dentin) as a function of location: a Fourier transform infrared microspectroscopic investigation. **J Bone Miner Res**, v. 16, n. 4, p. 750–7, abr. 2001.
18. NAKABAYASHI, N.; NAKAMURA, M.; YASUDA, N. Hibrid layer as a dentin-bonding mechanism. **J Esthet Dent**, v. 3, n. 4, p. 133-8, jul./ago. 1991.
19. NASSAR, M.; HIRAIISHI, N.; ISLAM, M. S.; AIZAWA, M.; TAMURA, Y.; OTSUKI, M.; et al. Effect of phytic acid used as etchant on bond strength, smear layer, and pulpal cells. **Eur J Oral Sci**, v. 121, n. 5, p. 482–487, out. 2013.
20. NATSIR, N.; WAKASA, K.; YOSHIDA, Y.; SATOU, N.; SHINTANI, H. Effect of tannic acid solution on collagen structures for dental restoration. **J Mater Sci Mater Med**, v. 10, n. 8, p. 489-92, ago. 1999.
21. NIU, L. N.; ZHANG, W.; PASHLEY, D. H.; BRESCHI, L.; MAO, J.; CHEN, J. H.; TAY, F. R. Biomimetic remineralization of dentin. **Dent Mater**, v. 30, n. 1, p. 77-96, jan. 2014.
22. OKAMOTO, Y.; HEELEY, J. D.; DOGON, I. L.; SHINTANI, H. Effects of phosphoric acid and tannic acid on dentine collagen. **J Oral Rehabil**, v. 18, n. 6, p. 507-12, nov. 1991.

23. PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; YIU, C.; HASHIMOTO, M.; BRESCHI, L.; CARVALHO, R. M.; et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J Dent Res**, v. 83, n. 3, p. 216-21, mar. 2004.
24. PRATI, C.; MONTANARI, G.; BIAGINI, G.; FAVA, F.; PASHLEY, D. H. Effects of dentin surface treatments on the shear bond strength of Vitrabond. **Dent Mater**, v. 8, n. 1, p. 21-6.18; jan. 1992
25. RITTER, A. V.; HEYMANN, H.; PERDIGAO, J. Effects of Different Re- Wetting Techniques on Dentin Shear Bond Strengths. **J Esthet Dent**, v. 12, n. 2, p.85-96, 2000.
26. SANO, H.; TAKATSU, T.; CIUCCHI, B.; HORNER, J. A.; MATTHEWS, W. G.; PASHLEY, D. H. "Nanoleakage: leakage within the hybrid layer." **Oper Dent**, v. 20, n. 1, p. 18-25, jan./fev. 1995.
27. SAURO, S.; PASHLEY, D. H. Strategies to stabilise dentine-bonded interfaces through remineralising operative approaches – State of The Art. **Int J Adhes Adhes**, v. 69, n. 5, p. 39-57, 2016.
28. SELLE, P. H.; COWIESON, A. J.; COWIESON, N. P.; RAVINDRAN, V. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. **Nutr Res Rev**, v. 25, n. 1, p. 1–17, jun. 2012.
29. SCHLEMMER, U.; FROLICH, W.; PRIETO, R. M.; GRASES, F. Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. **Mol Nutr Food Res**, v. 53 (Suppl.2), p. S330–S375, set. 2009.
30. TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. **J Dent Res**, v. 88, n. 8, p. 719-24, ago. 2009.

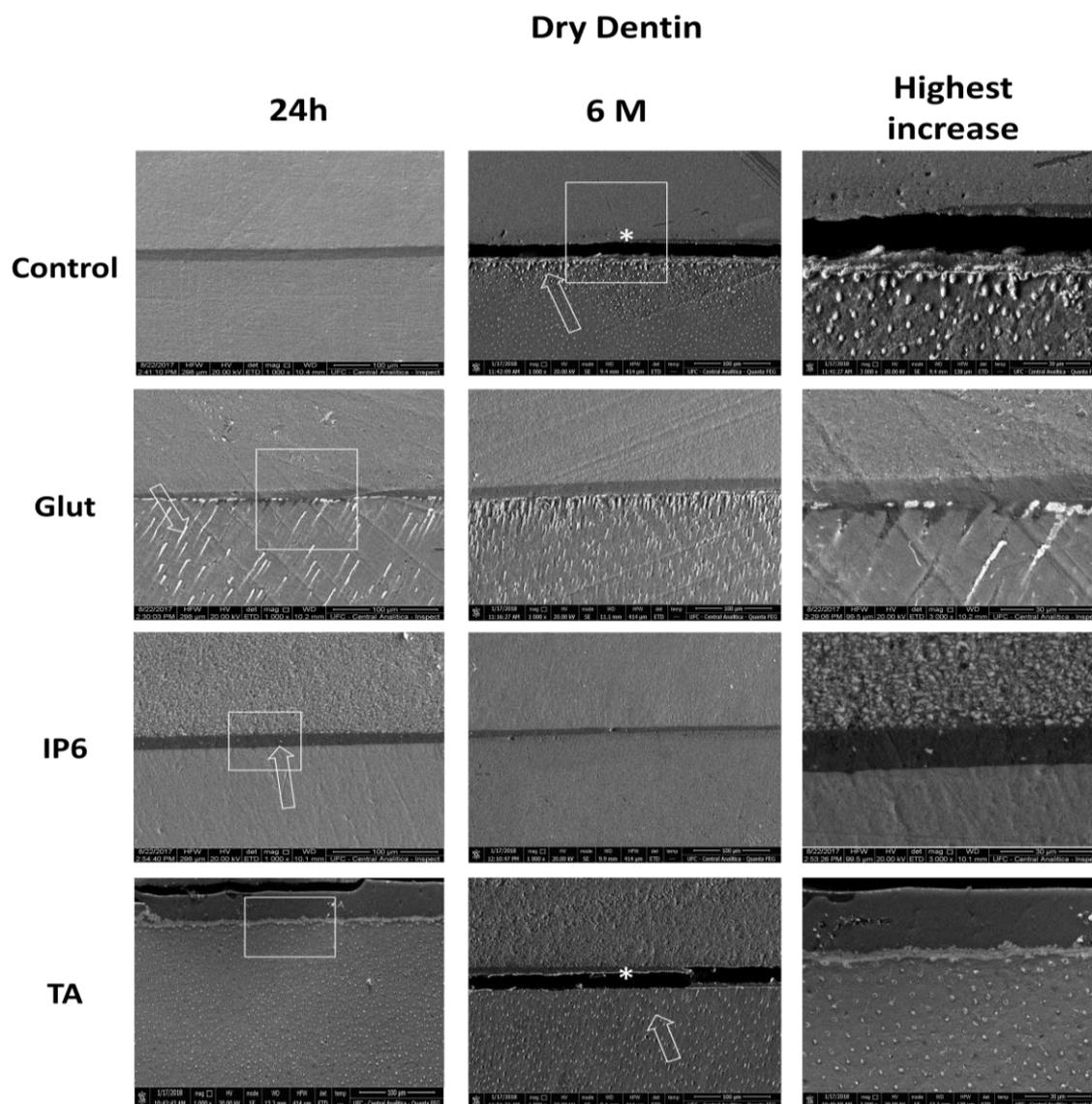
31. TOMIYAMA, K.; MUKAI, Y.; OKADA, S.; NEGISHI, H.; FUJIHARA, T.; KAWASE, T.; et al. Durability of FTLA treatment as a medicament for dentin hypersensitivity—abrasion resistance and profiles of fluoride release. **Dent Mater J**, v. 23, n. 4, p. 585-92, dez. 2004.
32. VAN MEERBEEK, B.; DHEM, A.; GORET-NICAISE, M.; BRAEM, M.; LAMBRECHTS, P.; VANHERLE, G. Comparative SEM and TEM examination of ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. **J Dent Res**, v. 72, n. 2, p. 495-501, fev. 1993.
33. YIU, C. K. Y.; PASHLEY, E. L.; HIRAISHI, N.; KING, N. M.; GORACCI, C.; FERRARI, M.; et al. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6863–72, dez. 2005.

Table 1:

	Dry Technique		Wet Technique	
	24H	6 M	24 H	6 M
Control	28,78 (7,8) Aa	30,28 (4,6)Aa	32,60(5,6)Aa	26,11(3,8)Aa
Glut.	30,45 (3,2) Aa	30,07(4,4)Aa	29,07(7,8)Aa	24,51(9,5)Aa
IP6	31,20(6,5)Aa	26,51(7,2)Aa	23,05(6,4)ABa	25,80(2,7)Aa
TA	14,07(3,8)Ba	13,57(4,4)Ba	10,23(4,4)Ba	9,97(3,7)Ba

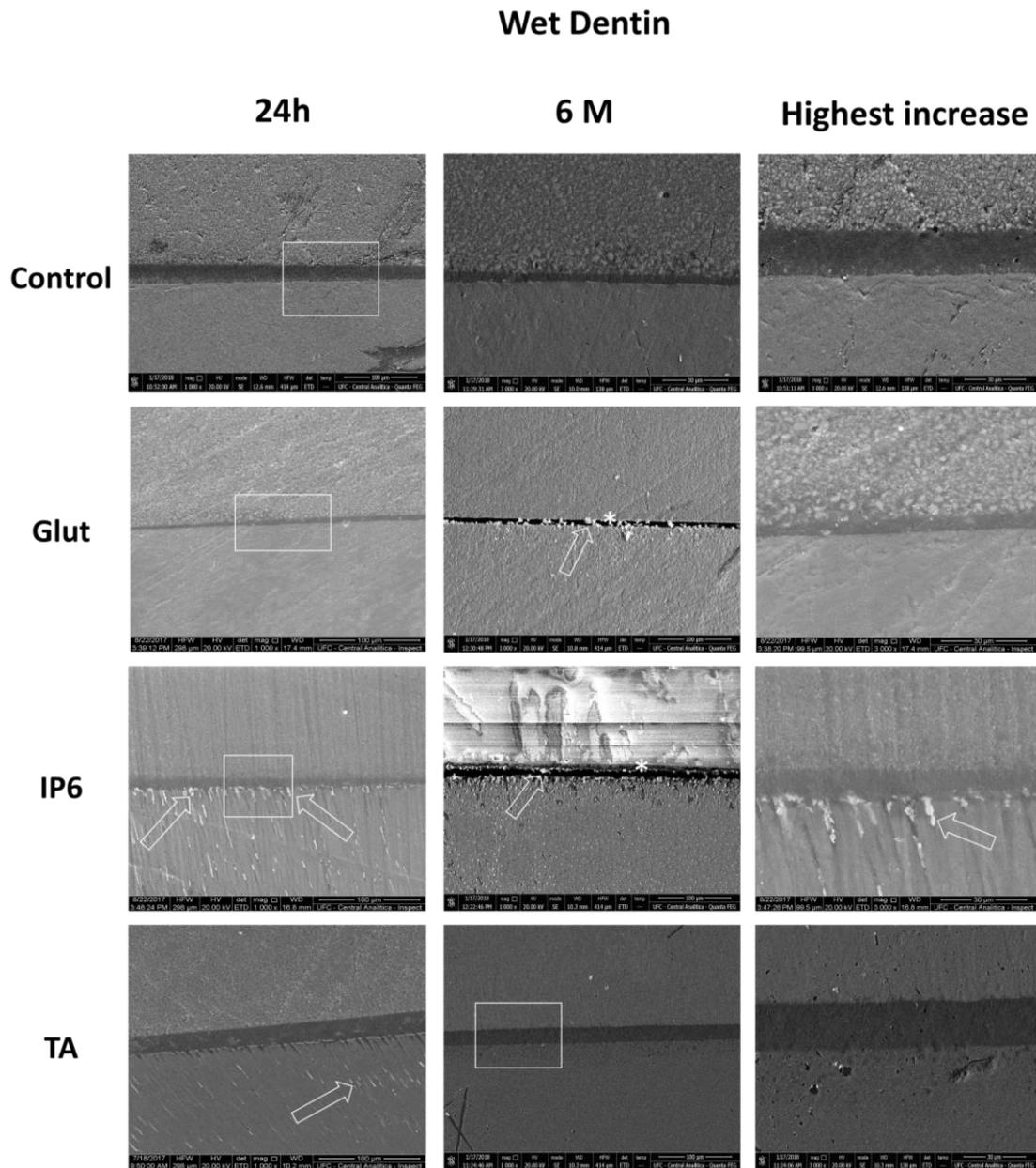
Different capital letters indicate statistically significant differences in the same group ($p < 0.05$). Different lowercase letters indicate significant differences among groups ($p < 0.05$).

Figure 1:



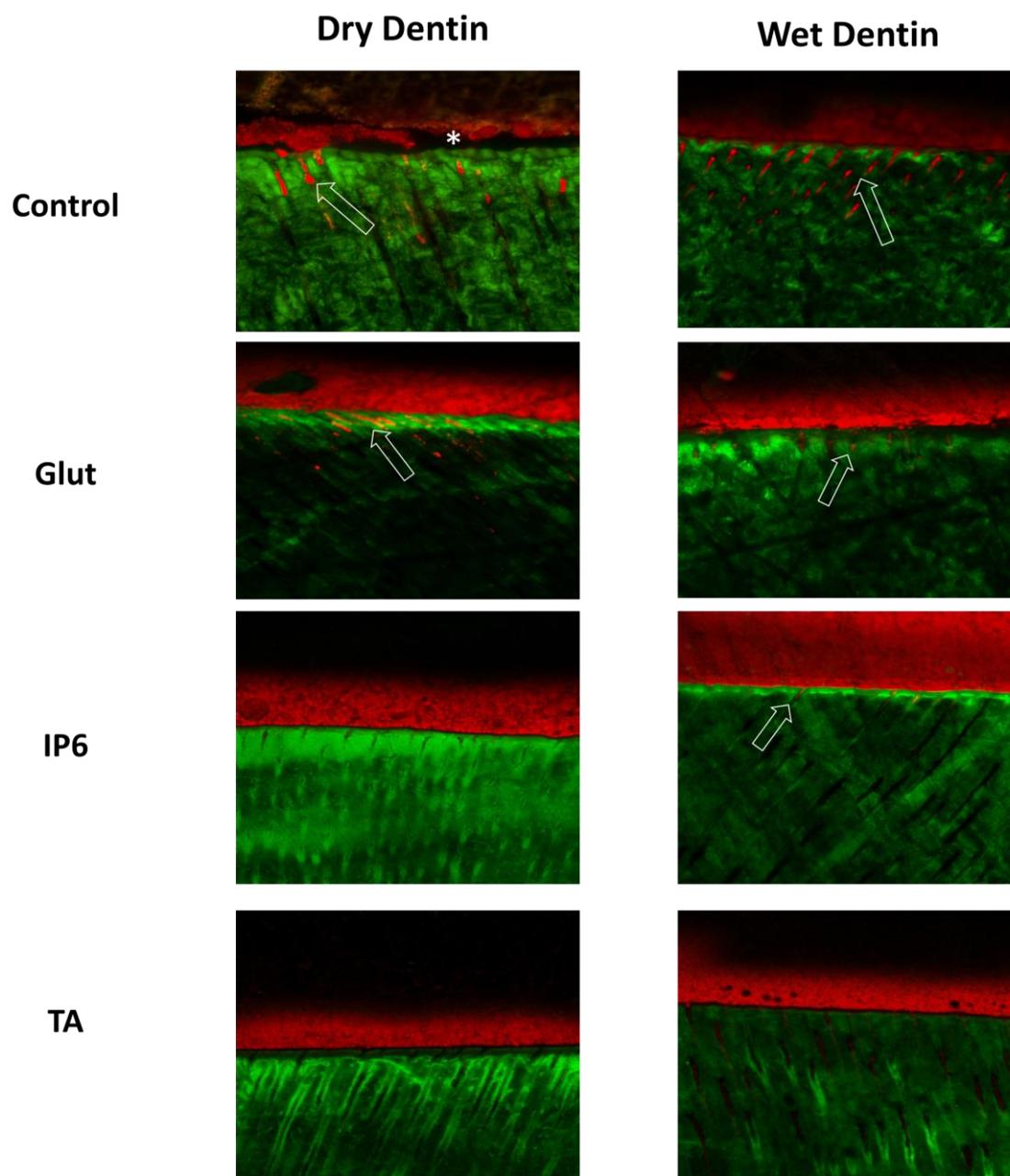
SEM micrographs of resin-dentin interfaces illustrating the most common nanoleakage characteristics observed after silver uptake. Open arrows indicate silver deposits. The asterisk in Control and TA groups indicates a gap.

Figure 2:



SEM micrographs of resin-dentin interfaces illustrating the most common nanoleakage characteristics observed after silver uptake. Open arrows indicate silver deposits.. The asterisk in Control and TA groups indicates a gap.

Figure 3 :



Confocal micrographs showing the main features of fluorescein micropermeability. Open arrows indicate fluorescein infiltration at and near hybrid layer. The asterisk indicates a gap.

Conclusão Geral

4. CONCLUSÃO GERAL

A incorporação de agentes biomodificadores como estratégia de condicionamento dentinário promoveu a manutenção da resistência de união ao longo do tempo, em ambas as estratégias (seca e úmida). Adicionalmente, o IP6 apresentou melhor eficiência na formação de uma interface de união mais compacta e homogênea.

Referências Bibliográficas

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAKEWELL, S. Phytic acid: a phytochemical with complementary and alternative benefits. **Cancer Biol Ther**, v. 5, n. 9, p. 1134–5, set. 2006.
2. BEDRAN-RUSSO, A. K. B.; YOO, K. J.; EMA, K. C.; PASHLEY, D. H. Mechanical Properties of Tannic-acid-treated Dentin Matrix. **J Dent Res**, v. 88, n. 9, p. 807-11, set. 2009.
3. BITTER, N. C. Tannic acid for smear layer removal: pilot study with scanning electron microscope. **J Prosthet Dent**, 61, p. 503-7, 1989.
4. BRACKETT, M. G.; LI, N.; BRACKETT, W. W.; SWORD, R. J.; OI, Y. P.; NIU, L. N.; et al. The critical barrier to progress in dentine bonding with the etch-and-rinse technique. **J Dent**, v. 39, n. 3, p.238-48, mar. 2011.
5. BYE, J. W.; COWIESON, N. P.; COWIESON, A. J.; SELLE, P. H., FALCONER, R. J. Dual effect of sodium phytate on the structural stability and Solubility of proteins. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 2, p. 290–5, jan. 2013.
6. CUTIVET, A.; SCHEMBRI, C.; KOVENSKY, J.; HAUPT, K. Molecularly imprinted microgels as enzyme inhibitors. **J Am Chem Soc**, v. 131, n. 41, p. 14699–702, out. 2009.
7. EBRAHIMI, M.; SHIRAZI, A. S.; ABDOLHOSEINPOUR, F.; ABDOLLAHI, M. Effect of Tannic Acid on Bond Strength of Etch and Rinse and Self-etch Adhesive Systems in Dentin of Primary Teeth. **J Contemp Dent Pract**, v. 18, n. 1, p. 34-8, jan. 2017.
8. FEITOSA, V.P; SAURO, S.; OGLIARI, F. A.; OGLIARI, A. O.; YOSHIHARA, K.; ZANCHI, C. H.; et al. Impact of hydrophilicity and length of spacer chains on the bonding of functional monomers. **Dent Mater**, v. 30, n. 12, p. e317-23, dez. 2014.

9. GRASES, F.; COSTA-BAUZA, A.; PRIETO, R. M. Intracellular and extracellular myo-inositol hexa phosphate (InsP₆), from rats to humans. **Anticancer Res**, v. 25, n. 3c, p. 2593–7, mai./jun. 2005.
10. ITO, S.; HASHIMOTO, M.; WADGAONKAR, B.; SVIZERO, N.; CARVALHO, R. M.; YIU, C.; et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6449-59, nov. 2005.
11. JASTRZEBSKA, M.; ZALEWSKA-REJDAK, J.; WRZALIK, R.; KOCOT, A.; MROZ, I.; BARWINSKI, B.; et al. Tannic acid-stabilized pericardium tissue: IR spectroscopy, atomic force microscopy, and dielectric spectroscopy investigations. **J Biomed Mater Res A**, v. 78, n. 1, p. 148-56, jul. 2006.
12. KAPRAL, M.; WAWSZCZYK, J.; JURZAK, M.; HOLLEK, A.; WEGLARZ, L. The effect of inositol hexaphosphate on the expression of selected metalloproteinases and their tissue inhibitor in IL-1 β -stimulated colon cancer cells. **Int J Colorectal Dis**, v. 27, n. 11, p. 1419–28, nov. 2012.
13. KOIDE T, DAITO M. Effects of Various Collagen Crosslinking Techniques on Mechanical Properties of Collagen Film. **Dent Mater J**, v. 16, n. 1, p. 1-9, jun. 1997.
14. KONG, K.; KALYAN, K. Effect of phytic acid etchant on the structural stability of demineralized dentine and dentine bonding. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 48, p.145-52, ago. 2015.
15. KONG, K.; HIRASHI, N.; NASSAR, M.; OTSUKI, M; YIU, C. K. Y. , TAGAMI, J. Effect of phytic acid etchant on resin–dentin bonding: Monomer penetration and stability of dentin collagen. **J Prosthodont Res**, v. 61, n. 3, p. 251-8, out. 2016.

16. LIU Y., TJADERHANE, L.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; LI, N.; MAO, J.; et al. Limitation in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. **J Dent Res**, v. 90, n. 8, p. 953–68, ago. 2011.
17. MAGNE, D.; WEISS, P.; BOULER, J. M.; LABOUX, O.; DACULSI, G. Study of the maturation of the organic (type I collagen) and mineral (nonstoichiometric apatite) constituents of a calcified tissue (dentin) as a function of location: a Fourier transform infrared microspectroscopic investigation. **J Bone Miner Res**, v. 16, n. 4, p. 750–7, abr. 2001.
18. NAKABAYASHI, N.; NAKAMURA, M.; YASUDA, N. Hibrid layer as a dentin-bonding mechanism. **J Esthet Dent**, v. 3, n. 4, p. 133-8, jul./ago. 1991.
19. NASSAR, M.; HIRAISHI, N.; ISLAM, M. S.; AIZAWA, M.; TAMURA, Y.; OTSUKI, M.; et al. Effect of phytic acid used as etchant on bond strength, smear layer, and pulpal cells. **Eur J Oral Sci**, v. 121, n. 5, p. 482–487, out. 2013.
20. NATSIR, N.; WAKASA, K.; YOSHIDA, Y.; SATOU, N.; SHINTANI, H. Effect of tannic acid solution on collagen structures for dental restoration. **J Mater Sci Mater Med**, v. 10, n. 8, p. 489-92, ago. 1999.
21. NIU, L. N.; ZHANG, W.; PASHLEY, D. H.; BRESCHI, L.; MAO, J.; CHEN, J. H.; TAY, F. R. Biomimetic remineralization of dentin. **Dent Mater**, v. 30, n. 1, p. 77-96, jan. 2014.
22. OKAMOTO, Y.; HEELEY, J. D.; DOGON, I. L.; SHINTANI, H. Effects of phosphoric acid and tannic acid on dentine collagen. **J Oral Rehabil**, v. 18, n. 6, p. 507-12, nov. 1991.

23. PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; YIU, C.; HASHIMOTO, M.; BRESCHI, L.; CARVALHO, R. M.; et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J Dent Res**, v. 83, n. 3, p. 216-21, mar. 2004.
24. PRATI, C.; MONTANARI, G.; BIAGINI, G.; FAVA, F.; PASHLEY, D. H. Effects of dentin surface treatments on the shear bond strength of Vitrabond. **Dent Mater**, v. 8, n. 1, p. 21-6.18; jan. 1992
25. RITTER, A. V.; HEYMANN, H.; PERDIGAO, J. Effects of Different Re- Wetting Techniques on Dentin Shear Bond Strengths. **J Esthet Dent**, v. 12, n. 2, p.85-96, 2000.
26. SANO, H.; TAKATSU, T.; CIUCCHI, B.; HORNER, J. A.; MATTHEWS, W. G.; PASHLEY, D. H. "Nanoleakage: leakage within the hybrid layer." **Oper Dent**, v. 20, n. 1, p. 18-25, jan./fev. 1995.
27. SAURO, S.; PASHLEY, D. H. Strategies to stabilise dentine-bonded interfaces through remineralising operative approaches – State of The Art. **Int J Adhes Adhes**, v. 69, n. 5, p. 39-57, 2016.
28. SELLE, P. H.; COWIESON, A. J.; COWIESON, N. P.; RAVINDRAN, V. Protein-phytate interactions in pigand poultry nutrition: a reappraisal. **Nutr Res Rev**, v. 25, n. 1, p. 1–17, jun. 2012.
29. SCHLEMMER, U.; FROLICH, W.; PRIETO, R. M.; GRASES, F. Phytate in foods and significance for humans: food sources, in take, processing, bioavailability, protective role and analysis. **Mol Nutr Food Res**, v. 53 (Suppl.2), p. S330–S375, set. 2009.
30. TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. **J Dent Res**, v. 88, n. 8, p. 719-24, ago. 2009.

31. TOMIYAMA, K.; MUKAI, Y.; OKADA, S.; NEGISHI, H.; FUJIHARA, T.; KAWASE, T.; et al. Durability of FTLA treatment as a medicament for dentin hypersensitivity—abrasion resistance and profiles of fluoride release. **Dent Mater J**, v. 23, n. 4, p. 585-92, dez. 2004.
32. VAN MEERBEEK, B.; DHEM, A.; GORET-NICAISE, M.; BRAEM, M.; LAMBRECHTS, P.; VANHERLE, G. Comparative SEM and TEM examination of ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. **J Dent Res**, v. 72, n. 2, p. 495-501, fev. 1993.
33. YIU, C. K. Y.; PASHLEY, E. L.; HIRAISHI, N.; KING, N. M.; GORACCI, C.; FERRARI, M.; et al. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6863–72, dez. 2005.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência do condicionamento dentário com ácidos naturais biomodificadores na resistência de união, selamento dentário e nanoinfiltração da interface dentina-resina composta.

Pesquisador: FRANCISCO ADEILSON ALVES DE MACEDO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 73797417.0.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Odontologia Restauradora

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.439.067

Apresentação do Projeto:

Na Odontologia atual tem-se priorizado restaurações minimamente invasivas e estéticas. Na tentativa de diminuir as falhas nos procedimentos restauradores tem sido propostas várias alternativas, como o uso de agentes biomodificadores da dentina com o intuito de promover melhorias nas propriedades, físicas e mecânicas, da camada híbrida e de proteger as fibrilas colágenas da degradação. O presente projeto tem como objetivo avaliar a utilização do ácido fítico (IP6), do ácido tânico e do glutaraldeído como agentes biomodificadores durante o condicionamento ácido, tanto na técnica úmida quanto na técnica seca, e como o condicionamento com os geis irão afetar na resistência de união, selamento e nanoinfiltração. Os grupos serão condicionados com o ácido fosfórico 37% (controle), ácido fosfórico 37% + Glutaraldeído 5%, Ácido Tânico 20% (pH 2,8) e Ácido Fítico a 2% (pH 1,2) por 30s, em dentina hígida, em seguida serão restaurados com incrementos de 1 mm, com as duas técnicas pré-definidas, e fotopolimerizados por 40s até antigir um platô de 5 mm e levados a uma máquina de corte acoplada com um disco de corte diamantado para a confecção dos espécimes, que serão armazenados por 24h e 06 meses. No total serão 72 dentes utilizados na realização dos testes, que serão avaliados por uma máquina de ensaios universais, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodovalho Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE **Município:** FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 2.439.067

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito do condicionamento dentinário utilizando-se ácidos naturais biomodificadores em dentina hígida.

Objetivo Secundário:

Analisar a influência do condicionamento ácido, utilizando diferentes substâncias naturais como agentes de ligações cruzadas de colágeno sobre a resistência de união em dentina hígida. Avaliar o selamento dentinário promovido pelo sistema adesivo testado após aplicação de agentes condicionantes com potencial biomodificador de dentina. Observar a influência das diferentes substâncias condicionantes sobre nanoinfiltração com nitrato de prata amoniacal na interface de união formada pelo adesivo resinoso e a dentina hígida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O estudo não apresentará riscos ao paciente, uma vez que primeiramente o mesmo deverá comparecer a um dentista externo, alheio a pesquisa, e de livre escolha do próprio paciente, que ao examinar irá observar a necessidade de exodontia dos 3 molares. Após esse momento o paciente que comparecer aos locais previamente descritos receberá as orientações necessárias e terá o acompanhamento profissional até sua total recuperação. Em seguida os dentes serão armazenados em timol 0,1% e recolhidos por integrante da pesquisa.

Benefícios:

A importância do trabalho consiste na busca por potenciais substitutos naturais para o ácido fosfórico, que é utilizado na etapa do condicionamento ácido da estrutura dentária, significando um avanço na tentativa de se obter uma maior estabilidade dos componentes da camada híbrida, especialmente do colágeno tipo I. Dessa forma, os procedimentos adesivos serão menos susceptíveis à degradação, melhorando a preservação dos tecidos dentários passíveis de remineralização. Atualmente, existe grande preocupação com a longevidade dos procedimentos adesivos e a obtenção de um material que possa contribuir para uma melhoria na estabilidade da interface de união dente-resina, evitando, dessa maneira, alguns problemas enfrentados na prática clínica diária e auxiliando no desenvolvimento de uma odontologia menos invasiva.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A importância do trabalho consiste na busca por potenciais substitutos naturais para o ácido fosfórico, que é utilizado na etapa do condicionamento ácido da estrutura dentária, significando um avanço na tentativa de se obter uma maior estabilidade dos componentes da camada híbrida,

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000	
Bairro: Rodolfo Teófilo	CEP: 60.430-275
UF: CE	Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344	E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 2.439.067

especialmente do colágeno tipo I.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram devidamente apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências e inadequações da versão anterior foram solucionadas. Por isso, proponho aprovação do presente projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_923545.pdf	30/11/2017 11:29:36		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Adeilson_30_11_2017_Versao_2.docx	30/11/2017 11:28:03	FRANCISCO ADEILSON ALVES DE MACEDO	Aceito
Folha de Rosto	digitalizar0001.pdf	03/11/2017 18:13:29	FRANCISCO ADEILSON ALVES DE MACEDO	Aceito
Outros	Termo_Compromisso_Dados.pdf	18/08/2017 10:50:14	FRANCISCO ADEILSON ALVES DE MACEDO	Aceito
Outros	Solicitacao_de_Apreciacao.pdf	18/08/2017 10:49:32	FRANCISCO ADEILSON ALVES DE MACEDO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Isencao_TCLE.pdf	18/08/2017 10:48:10	FRANCISCO ADEILSON ALVES DE MACEDO	Aceito
Orçamento	Declaracao_Orcamento.pdf	18/08/2017 10:47:13	FRANCISCO ADEILSON ALVES DE MACEDO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Concordancia_Pesquisadores.pdf	18/08/2017 10:46:32	FRANCISCO ADEILSON ALVES DE MACEDO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	18/08/2017 10:43:27	FRANCISCO ADEILSON ALVES DE MACEDO	Aceito
Cronograma	Cronograma_parte_2.pdf	18/08/2017 10:41:20	FRANCISCO ADEILSON ALVES DE MACEDO	Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodovalho Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.439.067

Cronograma	CronogramaParte1.pdf	18/08/2017 10:39:22	FRANCISCO ADEILSON ALVES DE MACEDO	Aceito
------------	----------------------	------------------------	--	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 14 de Dezembro de 2017

Assinado por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br