



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**



**ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE DENTINÁRIA
HÍGIDA E AFETADA POR CÁRIE E DA CAMADA
HÍBRIDA APÓS APLICAÇÃO DE EMULSÃO À BASE DE
ÓLEO DE COPAÍBA
(*Copaifera multijuga* Hayne)**

LUANNY GOMES MOURA

MANAUS - AM

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE DENTINÁRIA
HÍGIDA E AFETADA POR CÁRIE E DA CAMADA
HÍBRIDA APÓS APLICAÇÃO DE EMULSÃO À BASE DE
ÓLEO DE COPAÍBA
(*Copaifera multijuga* Hayne)**

LUANNY GOMES MOURA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Nikeila Chacon de Oliveira Conde

MANAUS - AM

2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M929a Moura, Luanny Gomes
Análise morfológica da superfície dentinária hígida e afetada por
cárie e da camada híbrida após aplicação de emulsão à base de
óleo de copaíba (Copaifera multijuga Hayne). / Luanny Gomes
Moura. 2016
136 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Maria Fulgência Costa Lima Bandeira
Coorientadora: Nikeila Chacon de Oliveira Conde
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Cárie Dentária. 2. Adesivos Dentinários. 3. Fitoterapia. 4.
Microscopia Eletrônica de Varredura. I. Bandeira, Maria Fulgência
Costa Lima II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

LUANNY GOMES MOURA

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE DENTINÁRIA
HÍGIDA E AFETADA POR CÁRIE E DA CAMADA
HÍBRIDA APÓS APLICAÇÃO DE EMULSÃO À BASE DE
ÓLEO DE COPAÍBA
(*Copaifera multijuga* Hayne)**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, 07 de Março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira, Presidente
Universidade Federal do Amazonas – Manaus/AM

Prof. Dr. Camillo Anauate Netto, Membro
Universidade Anhanguera de São Paulo – São Paulo/SP

Prof^a. Dr^a. Patrícia Pinto Lopes, Membro
Universidade Federal do Amazonas – Manaus/AM

A Deus, por guiar meus passos nessa longa jornada.
À minha família, pelo incentivo e apoio constantes.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e pela certeza de que sempre sou protegida e guiada em todos os meus passos durante essa jornada.

À minha **mãe, meu pai e meu irmão**, pelo amor, incentivo e apoio incondicional e por acreditarem em mim até mesmo quando eu não acreditava. Vocês são os responsáveis por todas as conquistas na minha vida.

À minha orientadora, **Profª Drª Maria Fulgência da Costa Lima Bandeira**, pela sua orientação, conselhos e incentivos que ultrapassaram o nível acadêmico e que levarei para a minha vida.

À minha coorientadora, **Profª Drª Nikeila Chacon de Oliveira Conde** pela orientação nas etapas dessa pesquisa.

À **Profª Drª Carina Toda**, por ser um exemplo de profissional, pela disposição a ajudar a qualquer momento e pela sua valiosa e fundamental contribuição na condução dessa pesquisa e na análise das imagens. Muito obrigada!

Ao **Gerson Paiva**, por ter sido um grande parceiro de pesquisa, sempre prestativo e atencioso. Muito obrigada pela ajuda e por fazer os dias no laboratório mais leves e alegres.

Ao **Anselmo Pedroso**, pelo companheirismo e cumplicidade nessa trajetória. Muito obrigada pela amizade, pelas longas conversas e por compartilharmos os mesmos desafios, dúvidas, incertezas, expectativas e vontade de superação.

Ao **grupo de Fitoterapia da Faculdade de Odontologia** pelo conhecimento e experiências compartilhados.

À **Universidade Federal do Amazonas**, pela oportunidade de fazer parte dessa Instituição e pela contribuição em minha formação acadêmica.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (PPGO/UFAM)** pelo acolhimento, incentivo intelectual e pela constante busca de melhorias e avanço científico do Programa.

Ao **CNPq** pelo incentivo financeiro que tornou possível a realização desta pesquisa (Chamada MCTI/CNPq/CT-Amazônia Nº 77/2013 – Processo 406457/2013-1 - Fomento de Projetos de P, D & I em Biotecnologia, na Amazônia Ocidental, com foco nas áreas de Fármacos, Fitoterápicos e Cosméticos).

À **Profª Drª Carolina Almeida** e ao técnico de laboratório **Alfredo Alexandrino**, pela realização das análises no microscópio eletrônico de varredura no laboratório de Técnicas Mineralógicas do Instituto de Ciências Exatas da UFAM, sempre prestativos e atenciosos, dando todo o apoio e suporte necessários para a minha pesquisa.

À **Profª Msc Sônia Lilian da Silva Bentes Lima**, pela realização da fase de leitura da espessura da camada híbrida na Central Agroanalítica da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM.

E a todos que direta e indiretamente fizeram parte dessa caminhada em busca do conhecimento científico.

LUANNY GOMES MOURA. Análise morfológica da superfície dentinária hígida e afetada por cárie e da camada híbrida após aplicação de emulsão à base de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). 2016. 134 folhas. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

RESUMO

O óleo-resina de copaíba, extraído da *Copaifera multijuga* Hayne é usado, popularmente, com diversas finalidades. Diante das suas propriedades biológicas, foi criada uma emulsão à base de óleo de copaíba para ser usada antes da aplicação do adesivo com a finalidade de melhorar a qualidade da adesão dentinária. O objetivo do estudo foi avaliar as características morfológicas da superfície dentinária e da camada híbrida formada com os sistemas adesivos convencional e autocondicionante nas dentinas hígida e afetada por cárie após o uso da emulsão à base de óleo de copaíba. Foram utilizados 96 terceiros molares humanos hígidos do Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO – UFAM). Metade dos dentes sofreu indução artificial de cárie e a outra metade foi formada pelos dentes hígidos. Todos os dentes tiveram suas raízes removidas, obtendo-se discos de dentina que foram divididos em grupos de acordo com as substâncias testes (clorexidina a 2%, emulsão à base de óleo de copaíba, solução de hidróxido de cálcio e água destilada), o substrato dentinário (hígido ou cariado) e o sistema adesivo (Adper Single Bond 2[®] ou Clearfil SE Bond[®]). A superfície dentinária e a camada híbrida dos espécimes obtidos foram analisadas em MEV, de acordo com os grupos experimentais. O tratamento da superfície dentinária com emulsão à base de óleo de copaíba não apresentou nenhuma barreira física aparente à penetração do adesivo. A superfície dentinária tratada com clorexidina a 2% apresentou sais de fosfato nos dois tipos de dentina. O tratamento da superfície com solução de hidróxido de cálcio resultou na deposição de precipitado mineral, obstruindo a luz dos túbulos dentinários em dentina hígida. A solução de hidróxido de cálcio aplicada sobre a dentina hígida condicionada foi diferente das demais substâncias ($p < 0,05$). Na superfície não condicionada, a água destilada em dentina hígida apresentou diferença significativa em relação a todos os grupos experimentais ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre as camadas híbridas formadas com o adesivo Adper Single Bond 2[®] nas dentinas hígidas e afetadas por cárie tratadas com as substâncias testes. A camada híbrida com Clearfil SE Bond[®] na dentina afetada por cárie tratada com emulsão à base do óleo de copaíba não apresentou diferença estatística em relação às substâncias testes, apresentando diferença somente em relação à solução de hidróxido de cálcio na dentina afetada ($p < 0,05$). Na dentina hígida, não houve diferença estatística na camada híbrida com Clearfil SE Bond[®], independente das substâncias testadas. A aplicação da emulsão à base de óleo de copaíba não apresentou nenhuma alteração morfológica nas superfícies dentinárias hígida e afetada por cárie, independente do condicionamento com ácido fosfórico; e apresentou uma camada híbrida uniforme, regular e com grande infiltração monomérica nas dentinas hígida e afetada por cárie, independente do adesivo utilizado.

Palavras-chaves: Cárie Dentária, Adesivos Dentinários, Fitoterapia, Microscopia Eletrônica de Varredura.

LUANNY GOMES MOURA. Análise morfológica da superfície dentinária hígida e afetada por cárie e da camada híbrida após aplicação de emulsão à base de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). 2016. 134 folhas. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

ABSTRACT

The copaiba oleoresin, extracted from *Copaifera multijuga* Hayne is used popularly for various purposes. Because of biological properties, a copaiba oil emulsion was formulated to be used before applying the adhesive in order to improve the quality of dentin bonding. The aim of this study was to evaluate the morphological characteristics of the dentin surface and the hybrid layer formed with etch-and-rinse and self-etching adhesive systems in sound and caries-affected dentin after using copaiba oil emulsion. 96 third molars from Biobank of the School of Dentistry, University Federal of Amazonas, were used. Half of the teeth underwent artificial induction of dental caries and the other half was formed by sound teeth. All teeth had their roots removed; yielding dentine disks were divided into groups according to test substances (2% chlorhexidine, copaiba oil emulsion, calcium hydroxide solution and distilled water), the dentin (sound or caries-affected) and the adhesive system (Adper Single Bond 2[®] or Clearfil SE Bond[®]). The dentin surface and the hybrid layer of the obtained specimens were analyzed by SEM according to the experimental groups. The treatment of dentin surface with copaiba oil emulsion showed no physical barrier to the adhesive penetration. The dentin surface treated with 2% chlorhexidine showed phosphate salts in two types of dentin. The treatment of the dentin surface with calcium hydroxide solution resulted in the deposition of mineral precipitate obstructing the lumen of the tubules in sound dentin. The calcium hydroxide solution applied on the conditioned sound dentin was different from the other substances ($p < 0.05$). In smeared surface, distilled water in sound dentin showed a significant difference from all experimental groups ($p < 0.05$). There was no statistical difference between the hybrid layer formed with the Adper Single Bond 2[®] adhesive in sound and caries-affected dentin treated with the test substances. The hybrid layer with Clearfil SE Bond[®] in caries-affected dentin treated with copaiba oil emulsion showed no statistical difference in relation to the tested substances, shown statistical difference only with calcium hydroxide solution in caries-affected dentin ($p < 0.05$). In sound dentin, there was no statistical difference in the hybrid layer with Clearfil SE Bond[®] irrespective of the tested substances. The application of copaiba oil emulsion showed no morphological change in sound and caries-affected dentin, regardless of phosphoric acid etching; and presented a uniform hybrid layer, regular and large monomer infiltration in sound and caries-affected dentin, regardless of the adhesive system.

Keywords: dentin, emulsion, Phytotherapy, adhesives.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Esquema 1 – Sequência do preparo dos dentes, condicionamento ácido, tratamento da superfície dentinária e aplicação do adesivo *Single Bond* para análise em microscópio eletrônico de varredura. 31
- Esquema 2 - Sequência do preparo dos dentes, tratamento da superfície dentinária e aplicação do adesivo *Clearfil* para análise em microscópio eletrônico de varredura. 32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Árvore <i>Copaifera multijuga</i> Hayne encontrada na Reserva Ducke.	17
Figura 2 – <i>Exsicata</i> para depósito no herbário.	17
Figura 3 – Emulsão à base do óleo de copaíba armazenada em frasco âmbar.	18
Figura 4 – Seleção dos dentes com auxílio de lupa estereoscópica.....	19
Figuras: 5 – A: Dente fixado na placa para corte; B: Dente posicionado na máquina de corte; C: Dente com a porção oclusal cortada.	20
Figura 6 – Polimento da superfície dentinária exposta para remoção de remanescentes de esmalte.	21
Figura 7 – A: Ápices perfurados com broca esférica para fixação do fio ortodôntico; B: Resina epóxi usada para impermeabilização da superfície dentária; C: Dente impermeabilizado com resina epóxi.	21
Figura 8 – A: Camada de esmalte aplicada na superfície dentária; B: Superfície oclusal exposta.	22
Figura 9 – A: Dentes suspensos com fio ortodôntico numa altura similar em recipiente de vidro contendo água para esterilização em autoclave; B: Dentes sem contato uns com os outros ou com a parede do recipiente de vidro.	22
Figura 10 – A: Solução cariogênica preparada; B: Solução autoclavada (20 minutos à 121°C) previamente à inoculação de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC2517.	23
Figura 11 – A: Tubo de ensaio com microrganismos; B: Contagem do número de colônias em espectrofotômetro; C: Contagem de colônias em placa de Petri com Ágar Mitis Salivarius.	24
Figura 12 - Dentes suspensos no meio cariogênico. A: Antes da incubação; B: 14 dias após a incubação.	24
Figura 13 – Dentes autoclavados após o período de incubação.	24
Figura 14 – A: Biofilme removido com gaze; B: Superfície oclusal cariada; C: Materiais isolantes removidos manualmente com lâmina de bisturi.	25
Figura 15 – A: Camada de dentina infectada removida com cureta; B: Padronização da <i>smear layer</i> com brocas.	26
Figura 16 – A: Câmara pulpar preenchida com resina <i>flow</i> ; B: Discos de dentina seccionados no sentido mesiodistal.	26
Figura 17 – Corte das raízes do dente hígido.	28
Figura 18 – A: Disco de dentina obtido; B: Disco de dentina seccionado no sentido mesiodistal.	28

Figura 19 – Agentes usados na superfície dentinária. A: Solução de hidróxido de cálcio; B: Emulsão à base de óleo de copaíba; C: Clorexidina a 2%.....	29
Figura 20 – A: Aplicação do ácido fosfórico sobre a superfície dentinária; B: Aplicação de emulsão à base de óleo de copaíba sobre a superfície dentinária, C: Emulsão à base de óleo de copaíba sobre a superfície dentinária; D: Remoção do excesso com papel absorvente. .	34
Figura 21- A: Espécimes preparados e montados em <i>stubs</i> para análise em microscópio eletrônico de varredura; B: Microscópio eletrônico de varredura.....	36
Figura 22 – A: Aplicação da substância teste; B: Aplicação do adesivo <i>Single Bond</i>	39
Figura 23 – A: Fotopolimerização do agente adesivo; B: Adesivo fotopolimerizado sobre o espécime.	39
Figura 24 – A: Secção do espécime em sentido mesiodistal para exposição da interface adesiva; B: Espécime seccionado; C: Polimento da interface adesiva.....	41
Figura 25 – A: Cuba ultrassônica com água destilada; B: Espécime colocado na cuba ultrassônica.	41
Figura 26 – A: Desmineralização e desproteínização dos espécimes realizadas com HCl e NaOCl; B: Armazenamento dos espécimes em ambiente com umidade.	42
Figura 27 – Dentina condicionada tratada com água destilada. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie. Os túbulos dentinários apresentam-se completamente desobstruídos (setas).....	77
Figura 28 – Dentina não condicionada tratada com água destilada. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie.....	77
Figura 29 – Dentina condicionada tratada com clorexidina 2%. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie. Cristais de fosfato na dentina hígida (setas).....	78
Figura 30 - Dentina não condicionada tratada com clorexidina 2%. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie.....	78
Figura 31 - Dentina condicionada tratada com emulsão à base de óleo de copaíba. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie. Os túbulos dentinários apresentam-se completamente desobstruídos (setas).	79
Figura 32 - Dentina não condicionada tratada com emulsão à base de óleo de copaíba. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie. Túbulos dentinários obstruídos (setas).	79
Figura 33 - Dentina condicionada tratada com solução de hidróxido de cálcio. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie. Túbulos dentinários obstruídos mesmo após o condicionamento ácido (setas).	80
Figura 34 - Dentina não condicionada tratada com solução de hidróxido de cálcio. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie. Produtos precipitados formados sobre a superfície dentinária (setas).....	80

Figura 35 - Camada híbrida formada com Adper Single Bond 2 [®] na dentina tratada com água destilada. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida (entre as barras). As setas apontam os <i>tags</i> de resina.	81
Figura 36 - Camada híbrida formada com Clearfil SE Bond [®] na dentina tratada com água destilada. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida (entre as barras). As setas apontam os <i>tags</i> de resina irregulares.	81
Figura 37 - Camada híbrida formada com Adper Single Bond 2 [®] na dentina tratada com clorexidina. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida (entre as barras). As setas apontam os <i>tags</i> de resina.	82
Figura 38 - Camada híbrida formada com Clearfil SE Bond [®] na dentina tratada com clorexidina. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida (entre as barras). As setas apontam os <i>tags</i> de resina.	82
Figura 39 - Camada híbrida formada com Adper Single Bond 2 [®] na dentina tratada com óleo de copaíba. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida. As setas apontam os <i>tags</i> de resina.	83
Figura 40 - Camada híbrida formada com Clearfil SE Bond [®] na dentina tratada com óleo de copaíba. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida (entre as barras). As setas apontam os <i>tags</i> de resina.	83
Figura 41 - Camada híbrida formada com Adper Single Bond 2 [®] na dentina tratada com solução de hidróxido de cálcio. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida (entre as barras). As setas apontam os <i>tags</i> de resina.	84
Figura 42 - Camada híbrida formada com Clearfil SE Bond [®] na dentina tratada com solução de hidróxido de cálcio. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida. As setas apontam os <i>tags</i> de resina.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de acordo com o substrato, a substância teste, condicionamento ácido e o sistema adesivo.	30
Tabela 2 - Nome do produto e do fabricante, tipo do produto, composição e pH.	38
Tabela 3 - Frequência e média dos escores das superfícies dentinárias hígida e afetada por cárie tratadas com as substâncias testes após o condicionamento com ácido fosfórico.	74
Tabela 4 - Frequência e média dos escores das superfícies dentinárias hígida e afetada por cárie tratadas com as substâncias testes sem condicionamento ácido prévio.	74
Tabela 5 - Frequência e média dos escores da camada híbrida formada com adesivo Adper Single Bond 2 [®] nas dentinas hígida e afetada por cárie após o tratamento com as substâncias testes.	75
Tabela 6 - Frequência e média dos escores da camada híbrida formada com adesivo Clearfil SE Bond [®] nas dentinas hígida e afetada por cárie após o tratamento com as substâncias testes.	75
Tabela 7 – Comparação das médias da espessura da camada híbrida de acordo como o substrato, sistema adesivo e substâncias testes.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	<i>American Dental Association</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
Bis-GMA	Bisfenol Diglicidil Metacrilato A
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
Ca(OH) ₂	Hidróxido de Cálcio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHX	Digluconato de Clorexidina
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
DC	Dentina afetada por cárie
DH	Dentina hígida
FAO	Faculdade de Odontologia
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Grupo
g	Gramas
h	Hora
HEMA	2 – hidroxietil Metacrilato
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
Km	Quilômetro
KOH	Hidróxido de potássio

kV	Quilovolt
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
mL	Militro
μL	Microlitro
mm	Milímetro
MMPs	Metaloproteinases
MOD	Mesio-ocluso-distal
mW	Miliwatt
n°	Número
p	Probabilidade calculada
pH	Potencial de hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFAM	Universidade Federal do Amazonas

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
δ	Gama
®	Marca Registrada
±	Mais ou menos
#	Número
%	Percentual
°C	Grau Celsius
>	Maior
<	Menor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1 Desenho do Estudo	15
2.2 Considerações Éticas	15
2.3 Riscos e Benefícios da Pesquisa	16
2.4 Formulação da Emulsão à base de Óleo de Copaíba	16
2.4.1 Coleta do Óleo-resina de Copaíba (<i>Copaifera multijuga</i> Hayne)	16
2.4.2 Preparo da Emulsão de Óleo de Copaíba (<i>Copaifera multijuga</i> Hayne)	17
2.5 Seleção dos Dentes	18
2.5.1 Critérios de Inclusão	18
2.5.2 Critérios de Exclusão	19
2.5.3 Cálculo Amostral	19
2.6 Preparo dos Dentes para Indução de Cárie	20
2.6.1 Indução Artificial de Cárie e Remoção da Dentina Infectada	22
2.7 Preparo dos Dentes Hígidos	27
2.8 Divisão dos grupos	28
2.9 Tratamento de Superfície	32
2.9.1 Tratamento de Superfície com Condicionamento Ácido prévio	33
2.9.2 Tratamento de Superfície sem Condicionamento Ácido prévio	35
2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura: Morfologia da Superfície Dentinária	35
2.11 Aplicação dos Sistemas Adesivos	37
2.12 Microscopia Eletrônica de Varredura: Camada Híbrida	42
2.13 Análise Estatística	43
3 ARTIGO	44
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
APÊNDICE 1	91
APÊNDICE 2	97
ANEXO 1	104
ANEXO 2	112

1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença crônica multifatorial, resultado da produção de ácidos bacterianos pelo biofilme aderido à superfície do esmalte, levando a um desequilíbrio no processo de desmineralização e remineralização, que se não for restabelecido, progride ocasionando a perda de estrutura dentária (FEJERSKOV, 1997; FEJERSKOV, 2004).

Dependendo do estágio da lesão de cárie, um tratamento preventivo é necessário. A perda da estrutura dentária leva à necessidade da realização de um tratamento restaurador para devolver a função do elemento dentário na cavidade bucal. Dessa forma, a maioria dos procedimentos restauradores é realizada no substrato dentinário afetado pelo processo carioso (KIDD, FEJERSKOV, 2004).

A lesão de cárie ativa em dentina apresenta uma camada superficial, não remineralizável e desvitalizada, com coloração amarelo-amarronzada e consistência amolecida, formada pela dentina infectada por bactérias, e uma camada subjacente, remineralizável, sensível e vital, com coloração marrom-clara e mais endurecida, formada pela dentina afetada por cárie (ZAVGORODNIY *et al.*, 2008).

A Odontologia Minimamente Invasiva preconiza que somente a dentina infectada deve ser removida por estar danificada irreversivelmente, preservando o tecido subjacente afetado por cárie passível de remineralização (WANG, SPENCER, WALKER, 2007).

As características estruturais diferentes da dentina afetada por cárie e da dentina hígida têm grande influência na união do material restaurador ao substrato dentinário. A

estrutura da dentina afetada por cárie é mais suscetível ao condicionamento ácido, o que é explicado pela desmineralização parcial já presente nesse tipo de dentina devido ao processo carioso. Essa característica da dentina afetada por cárie demonstra o seu desempenho adesivo inferior ao da dentina hígida (HAJ-ALI *et al.*, 2006; WANG, SPENCER, WALKER, 2007; LENZI, 2012; GUVEN, AKTOREN, 2015).

A adesão do material restaurador ao substrato acontece quando o adesivo infiltra a camada de dentina desmineralizada pelo condicionamento ácido, encapsulando o colágeno exposto e protegendo a interface adesiva da degradação proteolítica e hidrolítica. Essa zona composta por dentina desmineralizada infiltrada pelo sistema adesivo é denominada camada híbrida (NAKABAYASHI, 1992).

Devido ao fato de o colágeno ser suscetível à hidrólise e à ação proteolítica, uma falha nos passos operatórios pode comprometer a qualidade da camada híbrida e interferir negativamente na capacidade adesiva e resistência de união do material restaurador ao substrato dentinário (SKUPIEN, 2010).

Adesivos são combinações de monômeros hidrofílicos, que permitem a união do sistema adesivo à estrutura dentária, e monômeros hidrofóbicos, responsáveis pela adesão ao material restaurador. Os sistemas adesivos que interagem com a dentina são os sistemas convencionais, em versões com três e dois passos, e os autocondicionantes, em versões de dois passos e um passo. No sistema adesivo convencional, a desmineralização do substrato dentinário é realizada previamente à infiltração dos monômeros resinosos. Já o sistema adesivo autocondicionante contém monômeros acídicos, que desmineralizam e infiltram a dentina simultaneamente, incorporando a *smear layer* na camada híbrida em

vez de eliminá-la como acontece no sistema convencional (HASHIMOTO, 2011; OZER, BLATZ, 2013).

Uma vez que a adesão exige um íntimo contato entre o adesivo e o substrato, o tratamento dado à superfície dentinária influencia a formação da camada híbrida. A clorexidina a 2% é a solução de limpeza comumente usada na cavidade preparada. O uso da clorexidina a 2% antes da aplicação do agente adesivo tem atividade antimicrobiana e um efeito inibidor da ação de enzimas proteolíticas na degradação da matriz de colágeno da camada híbrida (BRESCHI *et al.*, 2009; LAFUENTE, 2012).

A limpeza de cavidade é baseada na remoção de resíduos oriundos do preparo cavitário, como raspas de dentina, bactérias, fragmentos ou partículas abrasivas e óleo proveniente dos instrumentos rotatórios, depositados sobre a superfície dentária (FRANCO *et al.*, 2007).

Mondelli (1998) classificou os agentes de limpeza de cavidade em dois grupos: desmineralizantes, representados pelos ácidos, e os não-desmineralizantes, que são os germicidas e alcalinizantes, podendo citar como respectivos exemplos a clorexidina e o hidróxido de cálcio. Os agentes desmineralizantes removem a camada de resíduos provenientes do preparo cavitário, desobstruindo os túbulos dentinários para a penetração do adesivo, e os agentes não-desmineralizantes têm a função principal de manter a cavidade asséptica (BUSATO, 2002).

Em preparos cavitários profundos, não é aconselhável a utilização de agentes de limpeza desmineralizantes, pois podem causar efeitos deletérios ao complexo dentinopulpar. A solução de hidróxido de cálcio neutraliza a acidez bacteriana e estimula

a formação de dentina reparadora, sendo bem indicada para esse tipo de cavidade (BUSATO, 2002).

Atualmente, há um aumento em estudos com plantas medicinais, objetivando validar cientificamente o conhecimento popular tradicional e produzir medicamentos fitoterápicos como alternativa aos tradicionais (BRASIL, 2005).

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares foi publicada em 2006 através da Portaria nº 971, Decreto nº 5813, em 03 de maio de 2006, com a proposta de incluir plantas medicinais e Fitoterapia como opções terapêuticas no âmbito médico no sistema público de saúde (BRASIL, 2006).

O uso da Fitoterapia pelo Cirurgião-Dentista somente foi reconhecido e regulamentado como prática integrativa e complementar à saúde bucal pelo Conselho Federal de Odontologia, no dia 19 de novembro de 2008, através da Resolução nº 082/2008-CFO.

É considerado fitoterápico o produto obtido exclusivamente da matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade curativa, profilática ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico (BRASIL, 2014).

O óleo-resina de copaíba é usado, popularmente, para diversas finalidades e tem sido assunto de vários estudos para comprovar suas atividades e indicá-las como opção terapêutica na área médica e odontológica (PIERI, MUSSI, MOREIRA, 2009).

Diante das propriedades biológicas do óleo de copaíba (BANDEIRA *et al.*, 1999; SIMÕES, 2004; ABINADER, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2008; PIERI *et al.*, 2012),

foi formulada uma emulsão à base de óleo de copaíba visando sua aplicação durante o processo restaurador.

O objetivo desse estudo foi avaliar, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), o efeito da emulsão à base de óleo de copaíba na morfologia da superfície dentinária e na camada híbrida formada com os sistemas adesivos convencional e autocondicionante nas dentinas hígida e afetada por cárie.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo do tipo primário, prospectivo, descritivo, qualitativo e experimental *in vitro* controlado.

2.2 Considerações Éticas

O projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO–UFAM), com o número CAAE 35573914.0.0000.5020 (Anexo 1).

A pesquisa foi realizada em Manaus, nos Laboratórios de Pesquisa e de Microbiologia da Faculdade de Odontologia, no Laboratório do Departamento de Geociências do Instituto de Ciências Exatas e no Centro Agroanalítico da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Para o

desenvolvimento da pesquisa, foram utilizados 96 terceiros molares hígidos fornecidos pelo Biobanco da Faculdade de Odontologia da UFAM.

2.3 Riscos e Benefícios da Pesquisa

A utilização de elementos dentários extraídos não implica em nenhum risco ao paciente, uma vez que esses dentes já foram removidos da arcada dentária por razões ortodônticas ou cirúrgicas. Não haverá acesso a qualquer informação que possa colocar em risco a confidencialidade do doador.

2.4 Formulação da Emulsão à base de Óleo de Copaíba

2.4.1 Coleta do Óleo-resina de Copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne)

O óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne foi coletado na Reserva Ducke, no Km 17 da Rodovia Manaus-Itacoatiara, catalogada sob o n° 69 pelo Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). A coleta foi realizada pelo mateiro da reserva seguindo o protocolo do Instituto. O óleo-resina foi coletado em um recipiente estéril previamente preparado para esse fim (BANDEIRA *et al.*, 1999; BARBOSA *et al.*, 2013). A *exsicata* foi depositada no herbário do INPA sob o n° 270709 (Figuras 1 e 2).



Figura 1- Árvore *Copaifera multijuga* Hayne encontrada na Reserva Ducke.



Figura 2 – *Exsicata* para depósito no herbário.

2.4.2 Preparo da Emulsão de Óleo de Copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne)

A emulsão à base de óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne, que está em processo de registro patente, foi formulada obedecendo às orientações da Farmacopeia Brasileira (2010) e Normas Técnicas da ANVISA. No preparo da emulsão, foram utilizados óleo-resina da copaíba, conservante, emulsificante e água destilada (COELHO, 2011).

A emulsão foi mantida em temperatura refrigerada, em frasco de vidro, na cor âmbar, com tampa rosqueável e selado com *Parafilm* (Figura 3).

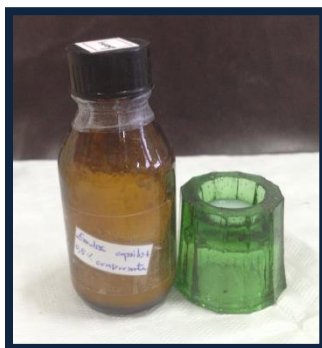


Figura 3 – Emulsão à base do óleo de copaíba armazenada em frasco âmbar.

2.5 Seleção dos Dentes

2.5.1 Critérios de Inclusão

Noventa e seis terceiros molares humanos hígidos foram obtidos do Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO – UFAM), extraídos por razões cirúrgicas. Os dentes foram examinados através de lupa estereoscópica OLYMPUS (20x de aumento) para detectar defeitos do esmalte, trincas ou fraturas que pudessem interferir nos resultados do estudo (Figura 4). Os dentes selecionados receberam profilaxia com taça de borracha, montada em contra-ângulo, pasta de pedra-pomes e água. Em seguida, foram armazenados em água destilada, à temperatura ambiente, até o momento da utilização para evitar desidratação (OLIVERA, 2010).

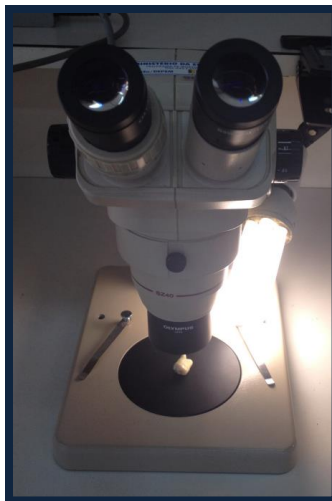


Figura 4 – Seleção dos dentes com auxílio de lupa estereoscópica.

2.5.2 Critérios de Exclusão

Os dentes que apresentaram áreas hipoplásicas, trincas, fraturas, restaurações ou cárie foram excluídos da pesquisa.

2.5.3 Cálculo Amostral

Um projeto piloto com três dentes por grupo foi realizado, totalizando 48 elementos dentários. Após a tabulação dos dados da espessura da camada híbrida, foram obtidas as informações necessárias para o cálculo do tamanho da amostra no programa BioEstat 5.0 (diferença mínima entre as médias dos tratamentos: 20,22; desvio padrão do erro: 5,86; poder do teste: 0.8 e alfa: 0,05), resultando em quatro amostras por grupo. Seis dentes por grupo foram usados na pesquisa para compensar possíveis perdas.

2.6 Preparo dos Dentes para Indução de Cárie

Metade dos dentes (n=48) foi seccionada 2 mm abaixo da região central da superfície oclusal para remoção do esmalte com auxílio de disco diamantado de 0,5 mm de espessura adaptado na máquina de corte Mecatome P100 (PRESI, Grenoble, França), sob refrigeração, com velocidade de 300 rpm e 200 g de força. A porção oclusal cortada não foi utilizada na pesquisa (Figura 5) (SANABE, COSTA, HEBLING, 2011).



Figura 5 – A: Dente fixado na placa para corte; B: Dente posicionado na máquina de corte; C: Dente com a porção oclusal cortada.

Em seguida, foram usadas lixas d'água de carboneto de silício (Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, USA) com granulação 320, em velocidade de 600 rpm e sob refrigeração constante, adaptadas a uma politriz AROTEC (Aropol 2V, Arotec S.A. Indústria e Comércio, série 040865 Cotia, SP, Brasil), com o objetivo de expor uma superfície plana de dentina, sem a presença de remanescentes de esmalte (Figura 6). A superfície dentinária foi novamente examinada com lupa estereoscópica com 20–40 x de magnificação para confirmar a ausência de remanescentes de esmalte (RICCI, 2014).

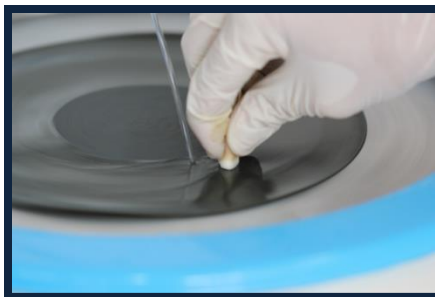


Figura 6 – Polimento da superfície dentinária exposta para remoção de remanescentes de esmalte.

Os ápices dos canais radiculares dos dentes foram perfurados com uma broca esférica diamantada nº 1012 (KG Sorensen[®], São Paulo-SP, Brasil) e um fio ortodôntico foi fixado na perfuração (RICCI, 2014). Em seguida, os ápices foram vedados com resina composta, após condicionamento ácido e aplicação de adesivo convencional. Sobre a superfície dentária foi aplicada uma camada de resina epóxi (Araldite[®], Brascola, São Bernardo do Campo, Brasil) e uma camada de esmalte cosmético ácido-resistente (Colorama[®], São Paulo-SP, Brasil), deixando exposta somente a superfície dentinária. Os dentes foram suspensos com auxílio do fio ortodôntico em um recipiente de vidro contendo água destilada, para esterilização em autoclave (20 minutos à 121°C) (Figuras 7-9) (SANABE, COSTA, HEBLING, 2011).



Figura 7 – A: Ápices perfurados com broca esférica para fixação do fio ortodôntico; B: Resina epóxi usada para impermeabilização da superfície dentária; C: Dente impermeabilizado com resina epóxi.

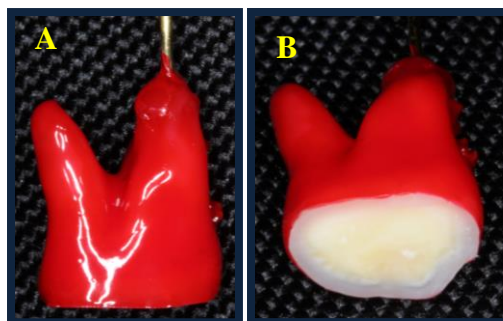


Figura 8 – A: Camada de esmalte aplicada na superfície dentária; B: Superfície oclusal exposta.

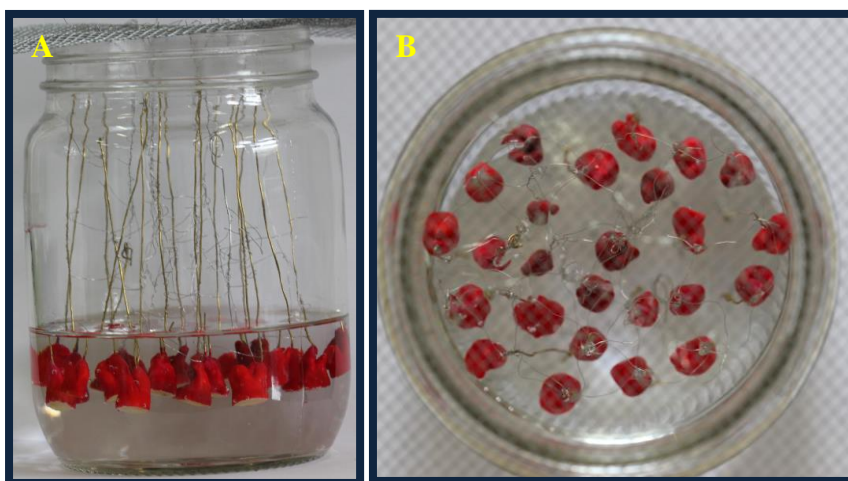


Figura 9 – A: Dentes suspensos com fio ortodôntico numa altura similar em recipiente de vidro contendo água para esterilização em autoclave; B: Dentes sem contato uns com os outros ou com a parede do recipiente de vidro.

2.6.1 Indução Artificial de Cárie e Remoção da Dentina Infectada

A solução cariogênica foi composta de 3,7 g de BHI caldo (*Brain Heart Infusion*, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA), 2 g de sacarose (Synth; LabSynth, São Paulo, Brasil), 1 g de glicose (Synth; LabSynth, São Paulo, Brasil) e 0,5 g de extrato de levedura (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA) para cada 100 mL de água destilada. Essa solução foi autoclavada (20 minutos à 121°C) previamente à inoculação de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC2517, fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Figura 10). Foram usados 2% (100 µL) do conteúdo de um

tubo de ensaio contendo 5 mL da cultura à 10^8 UFC/mL, confirmados em espectrofotômetro digital (QUIMIS, Diadema, São Paulo), com comprimento de onda de 600 nm e contagem de colônias em placas de Petri com Ágar Mitis Salivarius (Figura 11). Os dentes foram suspensos no meio cariogênico pelo fio ortodôntico, de modo que ficassem numa altura similar e sem contato uns com os outros ou com a parede do recipiente de vidro, e o conjunto foi mantido em jarra de microaerofilia à 37°C por 14 dias (Figura 12). Durante esse período, a solução cariogênica foi substituída a cada 48 horas, porém sem a inoculação de novos microrganismos. Após o período de incubação, os dentes foram autoclavados (20 minutos à 121°C), o biofilme removido com gaze e os materiais isolantes (adesivo epóxi e esmalte cosmético) removidos manualmente com lâmina de bisturi (Figuras 13 e 14). Os dentes foram abundantemente lavados em água deionizada, possibilitando a constatação de uma superfície de dentina amarelada e amolecida ao toque com sonda exploradora aplicada sem pressão (SANABE, COSTA, HEBLING, 2011; RICCI, 2014).

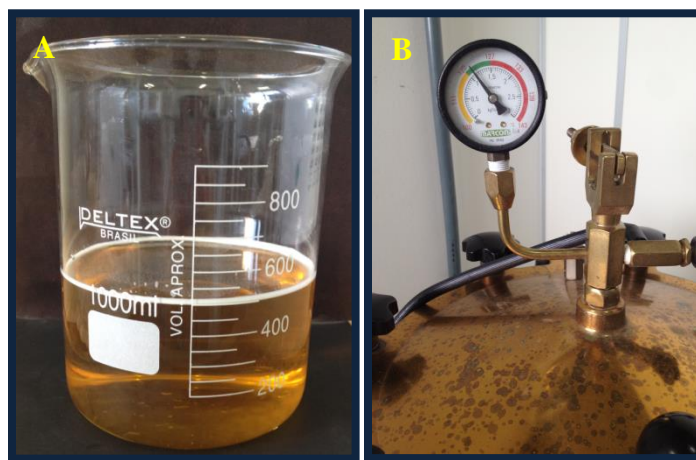


Figura 10 – A: Solução cariogênica preparada; B: Solução autoclavada (20 minutos à 121°C) previamente à inoculação de *Streptococcus mutans* ATCC2517.

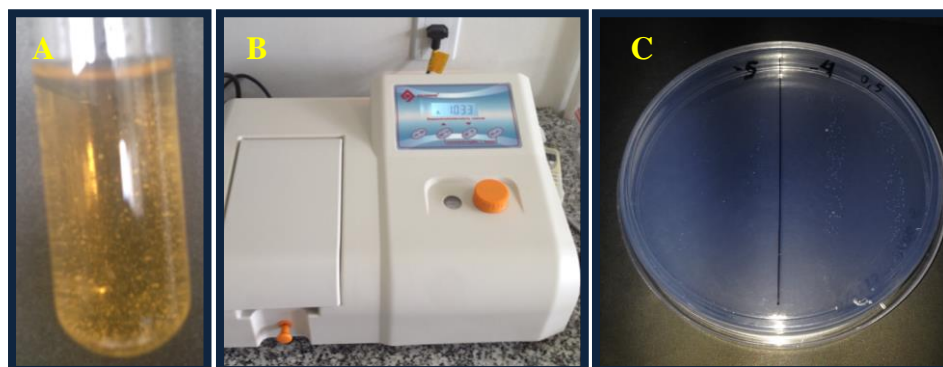


Figura 11 – A: Tubo de ensaio com microrganismos; B: Contagem do número de colônias em espectrofotômetro; C: Contagem de colônias em placa de Petri com Ágar Mitis Salivarius.



Figura 12 - Dentes suspensos no meio cariogênico. A: Antes da incubação; B: 14 dias após a incubação.

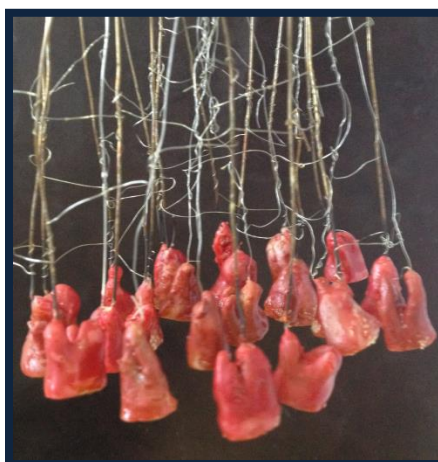


Figura 13 – Dentes autoclavados após o período de incubação.



Figura 14 – A: Biofilme removido com gaze; B: Superfície oclusal cariada; C: Materiais isolantes removidos manualmente com lâmina de bisturi.

A camada de dentina infectada foi removida com o auxílio de cureta de dentina, preservando a dentina afetada por cárie e brocas esféricas de aço nº 6 (KG Sorensen, Barueri, SP) foram utilizadas por 30 s para a produção de *smear layer*, em baixa rotação (Figura 15). A broca foi substituída por uma nova a cada quatro dentes preparados. O limite de remoção da dentina infectada foi estabelecido por meio de inspeção tátil com auxílio de uma sonda exploradora (BANERJEE, KIDD, WATSON, 2000). Dessa forma, a dentina resultante após a remoção do tecido infectado apresentou-se escurecida e ligeiramente resistente ao toque com sonda exploradora aplicada com leve pressão. Esse procedimento foi realizado pelo mesmo operador previamente treinado (SANABE, COSTA, HEBLING, 2011).

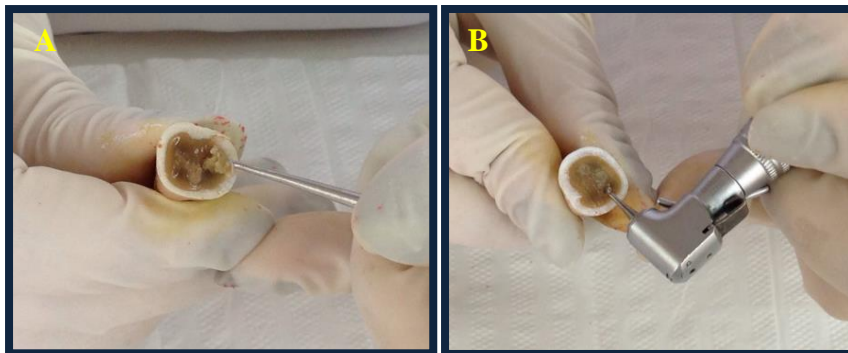


Figura 15 – A: Camada de dentina infectada removida com cureta; B: Padronização da *smear layer* com brocas.

Após a remoção da dentina infectada, os dentes tiveram suas raízes removidas com o uso da máquina de corte Mecatome P100 (PRESI, Grenoble, França) e a câmara pulpar foi preenchida com resina *flow*, após condicionamento com ácido fosfórico e aplicação do agente adesivo Adper Single Bond 2[®], e fotoativada por 10 segundos, com o intuito de não deixar espaço vazio (RICCI, 2012). Em seguida, os discos de dentina foram seccionados no sentido mesiodistal, obtendo-se duas secções do mesmo espécime. Uma secção foi usada para análise da superfície dentinária e a outra usada para análise da camada híbrida no MEV (Figura 16).

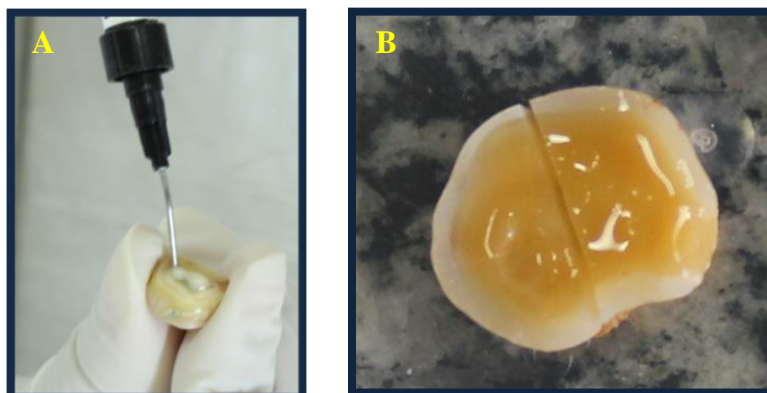


Figura 16 – A: Câmara pulpar preenchida com resina *flow*; B: Discos de dentina seccionados no sentido mesiodistal.

2.7 Preparo dos Dentes Hígidos

Os 48 dentes hígidos restantes foram seccionados 2 mm abaixo da região central da superfície oclusal para remoção do esmalte com auxílio de disco diamantado de 0,5 mm de espessura adaptado na máquina de corte Mecatome P100 (PRESI, Grenoble, França), sob refrigeração, com velocidade de 300 rpm e 200 g de força. A porção oclusal cortada não foi usada na pesquisa (SANABE, COSTA, HEBLING, 2011). Em seguida, as superfícies dentinárias foram abrasionadas com auxílio de lixas d'água de carboneto de silício (Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, USA) de granulação 320, sob refrigeração constante e velocidade de 600 rpm, adaptadas a uma politriz AROTEC (Aropol 2V, Arotec S.A. Indústria e Comércio, série 040865 Cotia, SP, Brasil), para exposição de uma superfície plana de dentina. Uma camada adicional de 0,5 mm de dentina foi removida com a lixa d'água de granulação 320 para compensar a remoção da dentina contaminada nos dentes cariados artificialmente (RICCI, 2014).

Sobre a superfície dentinária hígida, brocas esféricas de aço nº 6 em baixa rotação foram utilizadas por 30 s para a produção de *smear layer* (SANABE, COSTA, HEBLING, 2011). As raízes foram removidas com o uso de disco diamantado adaptado na máquina de corte Mecatome P100 (PRESI, Grenoble, França) (Figura 17) e a câmara pulpar preenchida com resina *flow*, após condicionamento com ácido fosfórico e aplicação do agente adesivo Adper Single Bond 2[®], e fotoativada por 10 segundos, com o intuito de não deixar espaço vazio.

Após esse procedimento, os discos de dentina obtidos foram seccionados no sentido mesiodistal, obtendo-se duas secções de cada espécime hígido. Uma secção foi usada para análise da superfície dentinária e a outra usada para análise da camada híbrida no MEV (Figura 18).



Figura 17 – Corte das raízes do dente hígido.

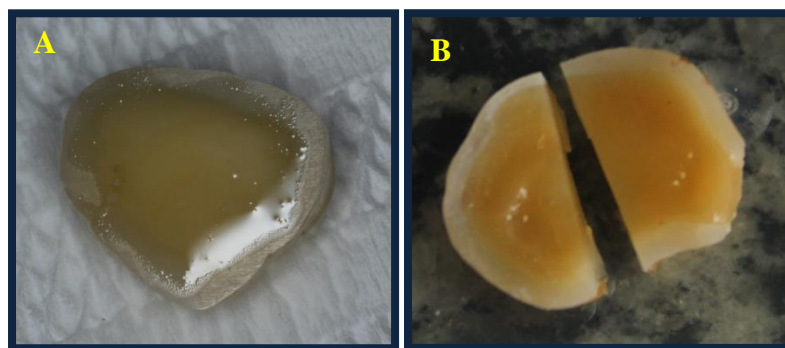


Figura 18 – A: Disco de dentina obtido; B: Disco de dentina seccionado no sentido mesiodistal.

2.8 Divisão dos grupos

Todos os espécimes foram aleatoriamente divididos em 16 grupos, de acordo com as substâncias testes empregadas (digluconato de clorexidina a 2%, emulsão à base de óleo de copaíba, solução de hidróxido de cálcio e água destilada) (Figura 19), substrato dentinário (hígido ou afetado por cárie), realização de condicionamento ácido prévio ou

não e aplicação do sistema adesivo (convencional ou autocondicionante) (Tabela 1 e Esquemas 1 e 2).

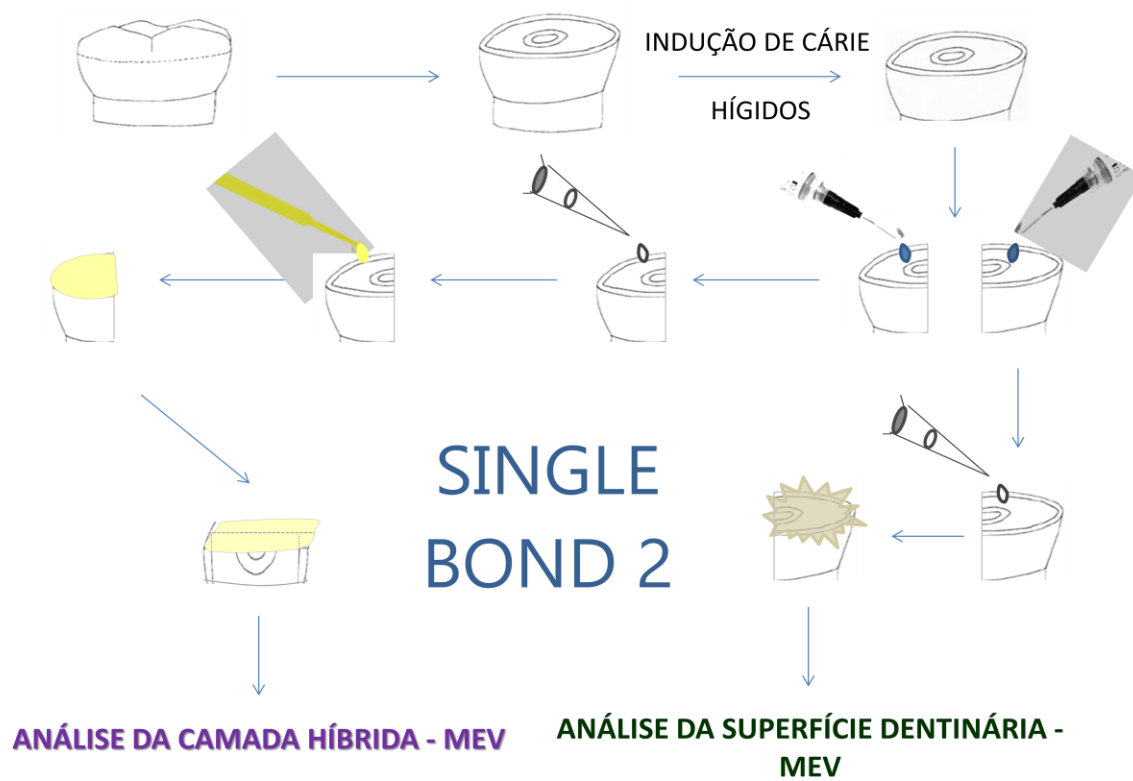


Figura 19 – Agentes usados na superfície dentinária. A: Solução de hidróxido de cálcio; B: Emulsão à base de óleo de copaíba; C: Digluconato de Clorexidina a 2%.

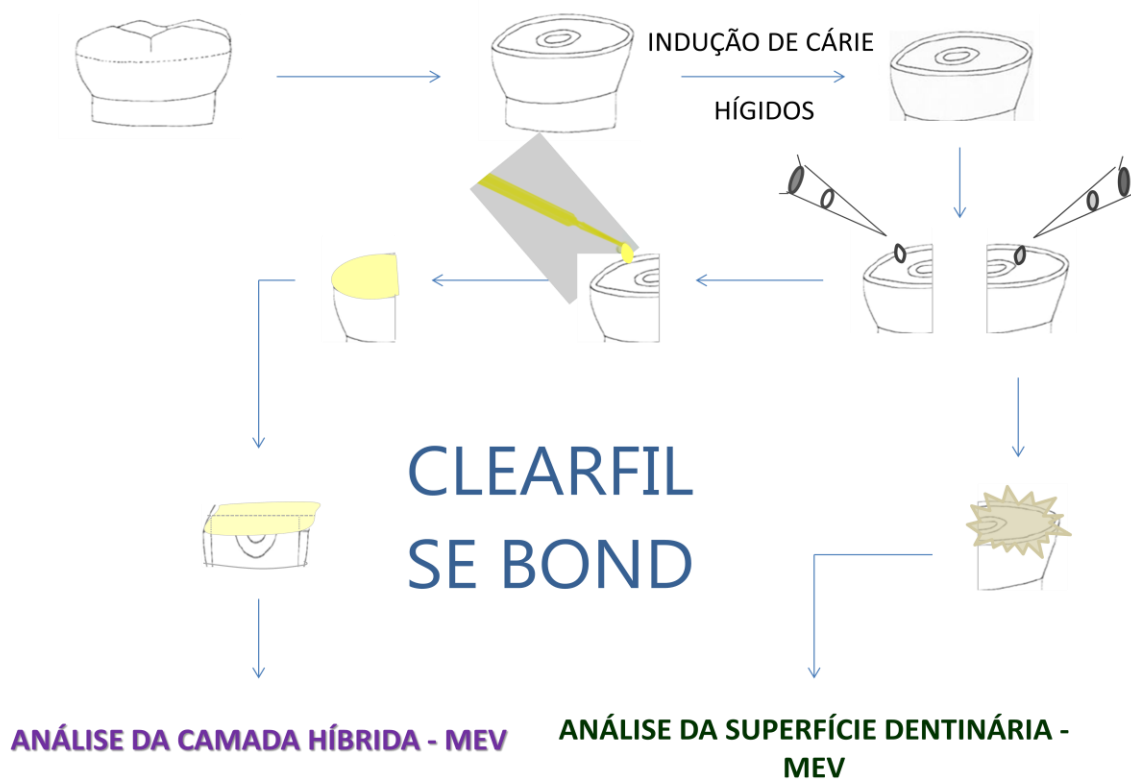
Tabela 1 - Distribuição dos grupos de acordo com o substrato, a substância teste, condicionamento ácido e o sistema adesivo.

<i>DIVISÃO DOS GRUPOS</i>								
Grupo	n de espécimes	n de secções	Substrato	Condicionamento ácido	Substâncias	MEV Superfície dentinária (n secções)	Sistema Adesivo	MEV Camada híbrida (n secções)
G1	6	12	DH	Sim	CHX	6	Single Bond	6
G2	6	12	DH	Não	CHX	6	Clearfil SE	6
G3	6	12	DH	Sim	Emulsão	6	Single Bond	6
G4	6	12	DH	Não	Emulsão	6	Clearfil SE	6
G5	6	12	DH	Sim	Solução Ca(OH) ₂	6	Single Bond	6
G6	6	12	DH	Não	Solução Ca(OH) ₂	6	Clearfil SE	6
G7	6	12	DH	Sim	Água destilada	6	Single Bond	6
G8	6	12	DH	Não	Água destilada	6	Clearfil SE	6
G9	6	12	DC	Sim	CHX	6	Single Bond	6
G10	6	12	DC	Não	CHX	6	Clearfil SE	6
G11	6	12	DC	Sim	Emulsão	6	Single Bond	6
G12	6	12	DC	Não	Emulsão	6	Clearfil SE	6
G13	6	12	DC	Sim	Solução Ca(OH) ₂	6	Single Bond	6
G14	6	12	DC	Não	Solução Ca(OH) ₂	6	Clearfil SE	6
G15	6	12	DC	Sim	Água destilada	6	Single Bond	6
G16	6	12	DC	Não	Água destilada	6	Clearfil SE	6

CHX: Digluconato de Clorexidina; DC: Dentina Afetada por Cárie; DH: Dentina Hígida; Ca(OH)₂: Hidróxido de cálcio



Esquema 1 – Sequência do preparo dos dentes, condicionamento ácido, tratamento da superfície dentinária e aplicação do adesivo *Single Bond* para análise em microscópio eletrônico de varredura.



Esquema 2 - Sequência do preparo dos dentes, tratamento da superfície dentinária e aplicação do adesivo *Clearfil* para análise em microscópio eletrônico de varredura.

2.9 Tratamento de Superfície

O tratamento de superfície de todos os grupos foi padronizado, alterando-se somente a substância utilizada. As substâncias testes foram utilizadas de acordo com os grupos descritos na Tabela 1:

- Digluconato de clorexidina a 2%;
- Emulsão à base de óleo de copaíba a 10%;
- Solução de Hidróxido de cálcio;
- Água destilada.

2.9.1 Tratamento de Superfície com Condicionamento Ácido prévio

Dentina impregnada com clorexidina

Os espécimes dos grupos descritos na Tabela 1 tiveram as superfícies dentinárias condicionadas com ácido fosfórico a 37% (Condicionador Dental Gel, 3M ESPE, São Paulo, Brasil) por 15 s, lavadas por mais 15 segundos com água destilada e secas com papel absorvente para manter a superfície úmida. Em seguida, foram aplicados sobre a dentina condicionada 20 μ L de uma solução aquosa de digluconato de clorexidina a 2% (Clorhexidina S 2%, FGM, 3M ESPE, São Paulo, Brasil), com auxílio de uma micropipeta para dispensar o volume determinado. A solução foi mantida passivamente por 60 s e os excessos removidos com papel absorvente para deixar uma superfície úmida (RICCI, 2011).

Dentina impregnada com emulsão à base de óleo de copaíba

Seguindo a mesma sequência descrita acima, após o condicionamento com ácido fosfórico a 37% da dentina coberta com *smear layer* e lavagem com água por 15 s, foram aplicados 20 μ L da emulsão à base de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) sobre a dentina condicionada, com auxílio de uma micropipeta. A solução foi mantida passivamente por 60 s e os excessos removidos com papel absorvente para deixar uma superfície úmida (Figura 20) (RICCI, 2011).

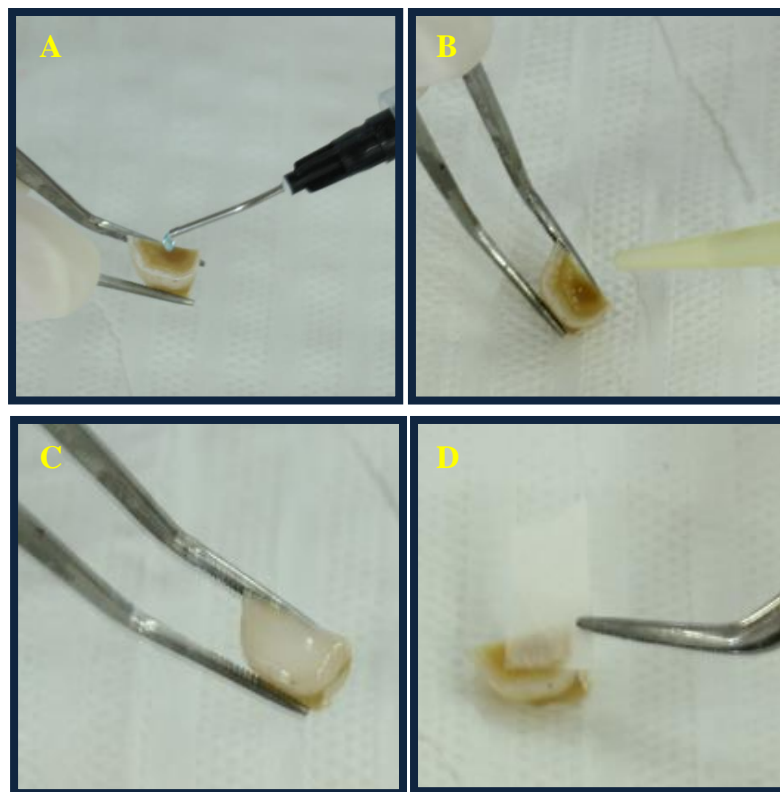


Figura 20 – A: Aplicação do ácido fosfórico sobre a superfície dentinária; B: Aplicação de emulsão à base de óleo de copaíba sobre a superfície dentinária, C: Emulsão à base de óleo de copaíba sobre a superfície dentinária; D: Remoção do excesso com papel absorvente.

Dentina impregnada por solução de hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$)

Para o preparo da solução de Hidróxido de Cálcio, um grama de pó de $Ca(OH)_2$ foi misturado com 20 mL de água destilada. A solução obtida foi armazenada em geladeira por 24 h para decantação e foi utilizado somente o sobrenadante.

Após o condicionamento ácido e lavagem com água destilada, foram aplicados sobre a dentina condicionada 20 μ L de solução de $Ca(OH)_2$, mantida passivamente por 60 s e os excessos foram removidos com papel absorvente para deixar uma superfície úmida.

Dentina impregnada por água destilada

Após o condicionamento ácido, a superfície dentinária foi lavada com água destilada pelo mesmo período de tempo do condicionamento (15 s) e seca com papel absorvente para deixar uma superfície úmida.

2.9.2 Tratamento de Superfície sem Condicionamento Ácido prévio

Os espécimes descritos na Tabela 1 que não sofreram condicionamento ácido foram tratados somente com as substâncias específicas para cada grupo, como foi descrito anteriormente (RICCI, 2011).

2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura: Morfologia da Superfície Dentinária

Após o tratamento de superfície, um espécime de cada dente teve a superfície dentinária analisada em microscópio eletrônico de varredura ambiental QUANTA (Modelo 250 FEI), sob corrente de 25 kV com detector de elétrons secundários e baixo vácuo (Figura 21).

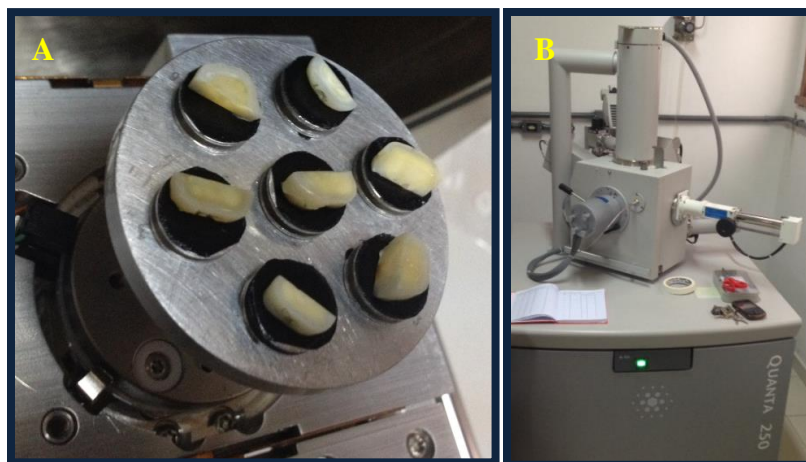


Figura 21- A: Espécimes preparados e montados em stubs para análise em microscópio eletrônico de varredura; B: Microscópio eletrônico de varredura.

Micrografias de toda a extensão da superfície dentinária tratada foram obtidas com 2000x de magnificação e distância de trabalho entre 12 e 20 mm, sendo atribuídos os seguintes escores (OLIVEIRA, 2010):

- Escore 0: ausência de *smear layer* e todos os túbulos dentinários abertos;
- Escore 1: mínima quantidade de *smear layer* e >50% dos túbulos dentinários abertos;
- Escore 2: moderada quantidade de *smear layer* e <50% dos túbulos dentinários abertos;
- Escore 3: Grande quantidade de *smear layer* e praticamente todos os túbulos dentinários obstruídos.

As micrografias obtidas foram observadas quanto à ação das substâncias aplicadas nas superfícies condicionadas e não condicionadas das dentinas hígida e afetada por cárie. As micrografias foram previamente codificadas e a análise foi realizada em duplicata, com intervalo de uma semana, por um examinador cego previamente calibrado

com imagens de referência de MEV para evitar a identificação dos grupos (BANERJEE, KIDD, WATSON, 2000; WANG, YAO, 2010). Quatro micrografias de cada espécime foram analisadas, somando 24 micrografias por grupo.

2.11 Aplicação dos Sistemas Adesivos

Após o tratamento de superfície dos espécimes, foram aplicados o adesivo convencional ou o adesivo autocondicionante, de acordo com a divisão dos grupos. Os produtos utilizados no processo adesivo estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Nome do produto e do fabricante, tipo do produto, composição e pH.

<i>NOME DO PRODUTO/ FABRICANTE</i>	<i>TIPO DO PRODUTO</i>	<i>COMPOSIÇÃO</i>	<i>pH</i>
Ácido fosfórico a 37%/ 3M ESPE	Gel de ácido fosfórico	37% de gel de ácido fosfórico	0,5
Clorhexidina S 2%/ FGM	Digluconato de clorexidina	Digluconato de clorexidina a 2%, água deionizada, surfactante volátil.	-
Emulsão à base de óleo de copaíba/ Teste	Emulsão à base de óleo de copaíba	Óleo de copaíba, emulsificante, conservante, água destilada.	-
Hidróxido de cálcio/ Biodinâmica	Hidróxido de Cálcio P.A.	Hidróxido de Cálcio P.A. (99 a 100,5%)	12,4
Adper Single Bond 2®/ 3M ESPE	Adesivo convencional	Bis-GMA, HEMA, dimetacrilato, fotoiniciador, copolímero funcional de metacrilato de ácido polialcenoico, etanol, água.	-
Clearfil SE Bond®/ Kuraray	Sistema adesivo autocondicionante/ 2 frascos	<u>PRIMER</u> : MDP, HEMA, dimetacrilato hidrofílico de canforoquinona, N.N Dietanol p-toluidina e água. <u>BOND</u> : MDP, Bis-GMA, HEMA, dimetacrilato hidrofóbico de canforoquinona, N.N Dietanol p-toluidina e Sílica coloidal silanizada.	2,0

Abreviações: Bis-GMA: **Bisfenol Diglicidil Metacrilato A**; HEMA: **2-Hidroxietyl Metacrilato**; MDP: **10-Ácido fosfórico metacrilóiloxidecametileno**.

Sistema Adesivo Convencional

A aplicação do adesivo convencional (Adper Single Bond 2®, 3M ESPE, São Paulo, Brasil) foi realizada da seguinte maneira: duas camadas consecutivas do agente adesivo foram aplicadas, sendo cada uma delas submetida individualmente a leves jatos

de ar por 5s a 10 cm de distância, para evaporação do solvente. Uma única fotopolimerização foi realizada por 15 s após a aplicação das duas camadas. Em seguida, foram aplicadas quatro camadas adicionais do adesivo e fotoativadas por 35 s após a aplicação da última camada, para permitir a secção dos espécimes na máquina de corte sem a remoção do adesivo durante o procedimento. A fotoativação foi realizada com aparelho fotopolimerizador Radii CAL 1200 mW/cm^2 (SDI, São Paulo, Brasil), com a potência monitorada por radiômetro, com irradiância entre 440 e 480 mW/cm^2 (Figuras 22 e 23).

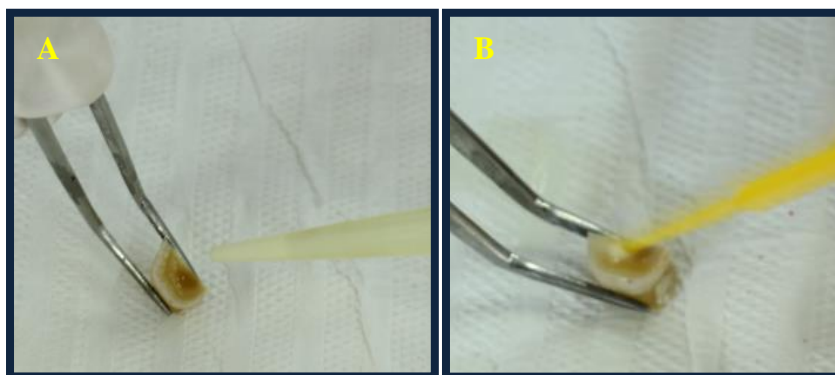


Figura 22 – A: Aplicação da substância teste; B: Aplicação do adesivo *Single Bond*.

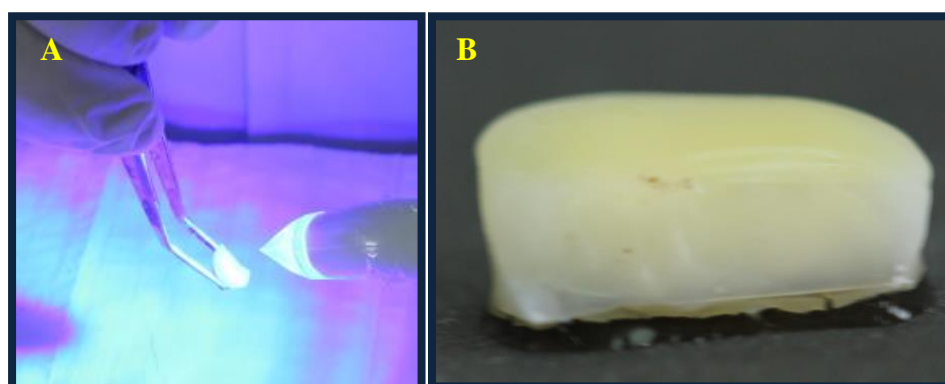


Figura 23 – A: Fotopolimerização do agente adesivo; B: Adesivo fotopolimerizado sobre o espécime.

Sistema Adesivo Autocondicionante

As etapas para a aplicação do sistema adesivo autocondicionante (Clearfil SE Bond[®], Kuraray, São Paulo, Brasil) foram: aplicação do *primer* por 20 s e secagem com jato de ar por 5 s, e aplicação de duas camadas do *bond*, sendo cada uma delas submetida individualmente a leves jatos de ar por 5s a 10 cm de distância, e fotoativação por 15 s.

Em seguida, foram aplicadas quatro camadas adicionais do *bond* e fotoativadas por 35 s após a aplicação da última camada, para permitir a secção dos espécimes na máquina de corte sem a remoção do *bond* durante o procedimento. A fotoativação foi realizada com aparelho fotopolimerizador Radium CAL 1200 mW/cm² (SDI, São Paulo, Brasil), com a potência monitorada por radiômetro, com irradiância entre 440 e 480 mW/cm².

Por fim, todos os espécimes foram armazenados em água destilada, em estufa a 37°C, por 24h (SANABE, COSTA, HEBLING, 2011). Após as 24 horas, os espécimes foram seccionados no sentido mesiodistal com um disco de diamante em alta rotação (Buehler, modelo 11 – 4253, série 15 LC, Lake Bluff, ILL 6004, USA), sob refrigeração constante, adaptado à máquina de corte Mecatome P100 (PRESI, Grenoble, França), obtendo-se duas hemisseções de cada espécime com o objetivo de expor a interface adesiva. A superfície exposta foi polida com auxílio de lixas d'água de carboneto de silício (Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, USA) de granulação 1000 e 4000, sob refrigeração constante e velocidade de 300 rpm, adaptadas a uma politriz AROTEC (Aropol 2V, Arotec S.A. Indústria e Comércio, série 040865 Cotia, SP, Brasil). Em seguida, as hemisseções foram limpas numa cuba ultrassônica contendo água destilada por 10 min

para remover qualquer resíduo resultante dos procedimentos de corte e polimento. Os espécimes foram desmineralizados com 6N HCl por 30 s, desproteinizados com 2,5% de NaOCl por 10 min e lavados com água destilada (HEDGE, HEDGE, CHANDRA, 2012; GUVEN, AKTOREN, 2015) (Figuras 24-26).

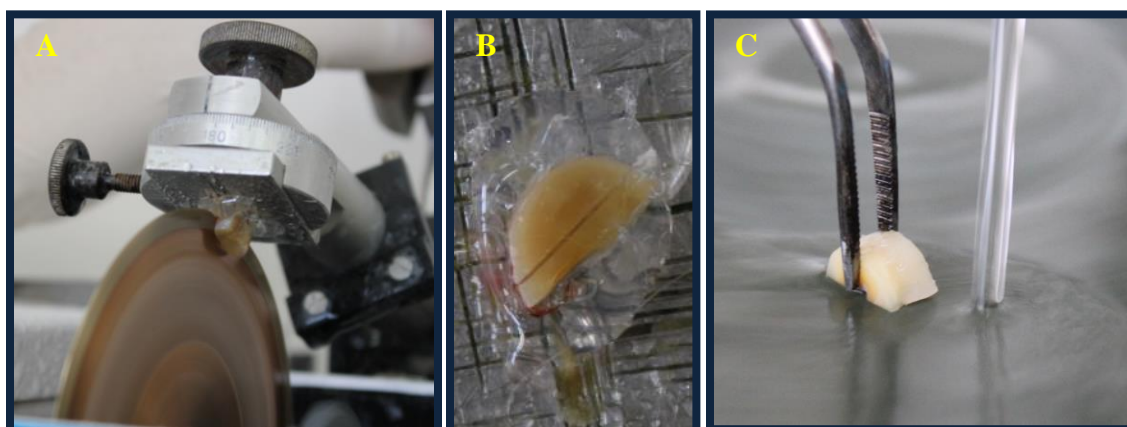


Figura 24 – A: Secção do espécime em sentido mesiodistal para exposição da interface adesiva; B: Espécime seccionado; C: Polimento da interface adesiva.

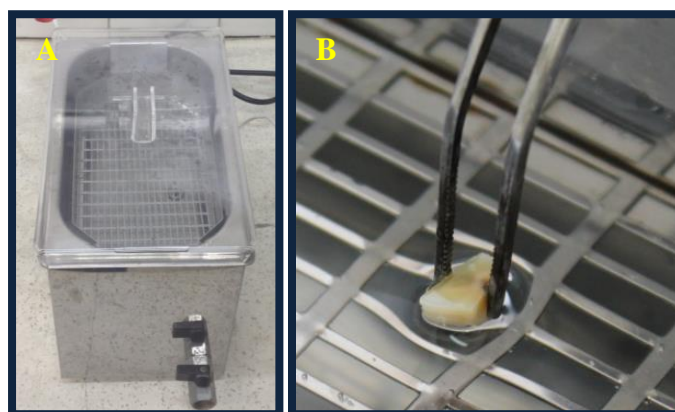


Figura 25 – A: Cuba ultrassônica com água destilada; B: Espécime colocado na cuba ultrassônica.

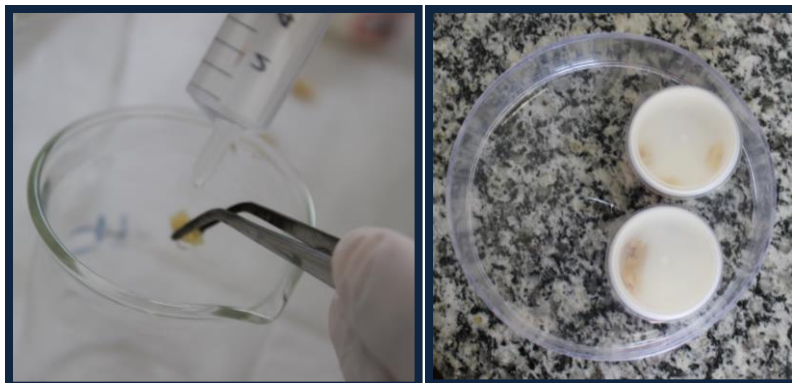


Figura 26 – A: Desmineralização e desproteíntização dos espécimes realizadas com HCl e NaOCl; B: Armazenamento dos espécimes em ambiente com umidade.

2.12 Microscopia Eletrônica de Varredura: Camada Híbrida

As hemisseções foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura ambiental (QUANTA Modelo 250 FEI), sob corrente de 25 kV com detector de elétrons secundários e baixo vácuo.

Foram obtidas fotomicrografias de toda a extensão da interface adesivo/dentina, em magnificação de 1000x para avaliação da camada híbrida, abordando os seguintes aspectos, segundo a metodologia de Gateva (2012) modificada:

- Formação e homogeneidade/uniformidade da camada híbrida;
- Espessura da camada híbrida, que foi medida com auxílio do programa Imaging Software NIS-Elements Advanced Research Versão 4.30 (Nikon, Japão), em três pontos: nas extremidades e no centro da foto. Os resultados foram obtidos em micrômetros.

As micrografias foram previamente codificadas e a análise das micrografias foi realizada em duplicata, com intervalo de uma semana, por um examinador cego

previamente calibrado com imagens de referência de MEV para evitar a identificação dos grupos (WANG, YAO, 2010).

A camada híbrida e os *tags* de resina foram analisados de acordo com os seguintes escores (OLIVEIRA, 2010):

- Escore 1: camada híbrida espessa com muitos *tags* de resina;
- Escore 2: camada híbrida espessa com poucos *tags* de resina;
- Escore 3: camada híbrida espessa sem *tags* de resina;
- Escore 4: camada híbrida fina com muitos *tags* de resina;
- Escore 5: camada híbrida fina com poucos *tags* de resina;
- Escore 6: camada híbrida fina sem *tags* de resina.

2.13 Análise Estatística

O teste Kappa ($p < 0,05$) foi utilizado para concordância intra-examinador (Apêndice 1). A análise estatística da morfologia da superfície dentinária e da camada híbrida foi realizada com o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com 5% de significância. Para os dados da espessura foi realizado o teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. Considerando a anormalidade dos dados, foi realizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com 5% de significância. Para o cálculo dos testes estatísticos foram utilizados os *softwares* IBM SPSS STATISTICS 21 e BioEstat 5.0.

3 ARTIGO

O artigo será submetido ao periódico Journal of Dentistry (ISSN: 0300-5712). A qualificação Qualis do periódico em 2014 foi A1 e o seu Fator de Impacto segundo a *Journal Citation Reports* (JCR) em 2014 foi 2.929.

ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE DENTINÁRIA HÍGIDA E AFETADA POR CÁRIE E DA CAMADA HÍBRIDA APÓS APLICAÇÃO DE EMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera multijuga* Hayne).

RESUMO

Objetivo: Avaliar, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), as características morfológicas da superfície dentinária e da camada híbrida formada com os sistemas adesivos convencional e autocondicionante nas dentinas hígida e afetada por cárie após o uso da emulsão à base de óleo de copaíba.

Metodologia: 96 terceiros molares humanos hígidos foram obtidos do Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO–UFAM). Metade dos dentes sofreu indução artificial de cárie e a outra metade foi formada pelos dentes hígidos. Todos os dentes tiveram suas raízes removidas, obtendo-se discos de dentina que foram divididos em grupos de acordo com as substâncias testes (clorexidina a 2%, emulsão à base de óleo de copaíba, solução de hidróxido de cálcio e água destilada), o substrato dentinário (hígido ou cariado) e o sistema adesivo utilizado (Adper Single Bond 2[®] ou Clearfil SE Bond[®]). A superfície dentinária e a camada híbrida dos espécimes obtidos foram analisadas em MEV, de acordo com os grupos.

Resultados: A solução de hidróxido de cálcio aplicada sobre a dentina hígida condicionada foi diferente das demais substâncias ($p < 0,05$). Na superfície não condicionada, a água destilada em dentina hígida apresentou diferença significativa em relação a todos os grupos experimentais ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre as camadas híbridas formadas com o adesivo Adper Single Bond 2[®] nas dentinas hígidas

e afetadas por cárie tratadas com as substâncias testes. A camada híbrida formada com Clearfil SE Bond® na dentina afetada por cárie tratada com emulsão à base do óleo de copaíba não apresentou diferença estatística das substâncias testes, apresentando diferença somente em relação à solução de hidróxido de cálcio na dentina afetada ($p < 0,05$). Na dentina hígida não houve diferença estatística na camada híbrida com Clearfil SE Bond®, independente das substâncias testadas.

Conclusão: A aplicação da emulsão à base de óleo de copaíba não apresentou nenhuma alteração morfológica nas superfícies dentinárias hígida e afetada por cárie, independente do condicionamento com ácido fosfórico; e apresentou uma camada híbrida uniforme, regular e com grande infiltração monomérica na dentina, independente do adesivo utilizado.

Relevância clínica: Devido às propriedades biológicas do óleo de copaíba, principalmente atividade antibacteriana e antiinflamatória, o uso de emulsões à base do óleo-resina de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) sobre a superfície dentinária poderá contribuir na resposta pulpar em cavidades profundas, em cárie recorrente e na integridade da camada híbrida devido à sua característica oleosa. Além disso, pode viabilizar a introdução de um fitoterápico, como opção terapêutica, na Odontologia.

Palavras-chaves: Plantas Medicinais, Cárie Dentária, Adesivos Dentinários, Microscopia Eletrônica de Varredura.

INTRODUÇÃO

A adesão do material restaurador ao substrato dentinário acontece quando o adesivo infiltra a camada de dentina desmineralizada pelo condicionamento ácido, encapsulando o colágeno exposto e protegendo a interface adesiva da degradação proteolítica e hidrolítica. Essa zona composta por dentina desmineralizada infiltrada pelo sistema adesivo é denominada camada híbrida [1].

Os sistemas adesivos que interagem com a dentina são os sistemas convencionais e os autocondicionantes. No sistema adesivo convencional, a desmineralização do substrato dentinário é realizada previamente à infiltração dos monômeros resinosos. Já o sistema adesivo autocondicionante contém monômeros acídicos, que desmineralizam e infiltram a dentina simultaneamente, incorporando a *smear layer* na camada híbrida em vez de eliminá-la como acontece no sistema convencional [2].

Uma vez que a adesão exige um íntimo contato entre o adesivo e a superfície dentinária, uma falha nos passos operatórios pode comprometer a qualidade da camada híbrida e interferir negativamente na capacidade adesiva e resistência de união do material restaurador ao substrato dentinário [3]. O tratamento dado à superfície dentinária antes do processo restaurador influencia a formação da camada híbrida e o fato de o colágeno ser suscetível à hidrólise e à ação proteolítica pode comprometer a longevidade da restauração [4,5].

A atividade proteolítica é causada pelas metaloproteinases, enzimas endógenas dependentes de zinco que são responsáveis pela degradação do colágeno exposto na base da camada híbrida [6]. O uso da clorexidina a 2% antes da aplicação do agente adesivo

tem um efeito inibidor da ação de enzimas proteolíticas, na degradação da matriz de colágeno da camada híbrida [4,5].

Vários estudos com plantas medicinais têm sido realizados objetivando produzir medicamentos fitoterápicos como alternativa aos tradicionais. O óleo-resina de copaíba tem sido assunto de pesquisas para comprovar suas atividades e indicá-las como opção terapêutica na área odontológica [7,8,9]. Diante das propriedades biológicas do óleo de copaíba [7,10,11], foi formulada uma emulsão à base de óleo de copaíba para ser usada antes da aplicação do adesivo.

O objetivo desse estudo foi avaliar, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), as características morfológicas da superfície dentinária e da camada híbrida com o uso da emulsão à base de óleo de copaíba antes da aplicação do sistema adesivo nas dentinas hígida e afetada por cárie.

MATERIAL E MÉTODO

Para o desenvolvimento da pesquisa, foram utilizados 96 terceiros molares hígidos fornecidos pelo Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO-UFAM) após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FAO-UFAM) sob o número CAAE 35573914.0.0000.5020. Os dentes foram examinados através de lupa estereoscópica OLYMPUS (20x de aumento) para detectar defeitos do esmalte, trincas ou fraturas que pudessem interferir nos resultados do estudo. Os dentes selecionados receberam profilaxia com taça de borracha, montada em contra-

ângulo, pasta de pedra-pomes e água. Em seguida, foram armazenados em água destilada, à temperatura ambiente, até o momento da utilização para evitar desidratação [12].

O óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne foi coletado na Reserva Ducke, no Km 17 da Rodovia Manaus-Itacoatiara, catalogada sob o n° 69 pelo Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). A coleta foi realizada pelo mateiro da reserva seguindo o protocolo do Instituto. O óleo-resina foi coletado em um recipiente estéril previamente preparado para esse fim [10,13]. A *exsicata* foi depositada no herbário do INPA sob o n° 270709.

A emulsão à base de óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne, formulada obedecendo às orientações da Farmacopeia Brasileira (2010) [14], está em processo de registro de patente e é composta por água destilada, óleo-resina de copaíba a 10%, emulsificante e conservante.

PREPARO DOS DENTES

Os dentes foram seccionados 2 mm abaixo da região central da superfície oclusal para remoção do esmalte com auxílio de disco diamantado de 0,5 mm de espessura adaptado na máquina de corte Mecatome P100 (PRESI, Grenoble, França), sob refrigeração, com velocidade de 300 rpm e 200 g de força. A porção oclusal cortada não foi utilizada na pesquisa [15]. Em seguida, foram usadas lixas d'água de carboneto de silício (Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, USA) com granulação 320, em velocidade de 600 rpm e sob refrigeração constante, adaptadas a uma politriz AROTEC (Aropol 2V, Arotec S.A. Indústria e Comércio, série 040865 Cotia, SP, Brasil), com o objetivo de expor uma

superfície plana de dentina, sem a presença de remanescentes de esmalte. A superfície dentinária foi novamente examinada com lupa estereoscópica com 20–40 x de magnificação para confirmar a ausência de remanescentes de esmalte [16].

INDUÇÃO ARTIFICIAL DE CÁRIE

Quarenta e oito dentes tiveram os ápices dos canais radiculares perfurados com uma broca esférica diamantada nº 1012 (KG Sorensen[®], São Paulo-SP, Brasil) e um fio ortodôntico foi fixado na perfuração [16]. Em seguida, os ápices foram vedados com resina composta, após condicionamento ácido e aplicação de adesivo convencional. Sobre a superfície dentária foi aplicada uma camada de resina epóxi (Araldite[®], Brascola, São Bernardo do Campo, Brasil) e uma camada de esmalte cosmético ácido-resistente (Colorama[®], São Paulo-SP, Brasil), deixando exposta somente a superfície dentinária. Os dentes foram suspensos com auxílio do fio ortodôntico em um recipiente de vidro contendo água destilada, para esterilização em autoclave (20 min à 121°C) [15].

A solução cariogênica foi composta de 3,7 g de BHI caldo (*Brain Heart Infusion*, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA), 2 g de sacarose (Synth; LabSynth, São Paulo, Brasil), 1 g de glicose (Synth; LabSynth, São Paulo, Brasil) e 0,5 g de extrato de levedura (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA) para cada 100 mL de água destilada. Essa solução foi autoclavada (20 min à 121°C) previamente à inoculação de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC2517, fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Foram usados 2% (100 µL) do conteúdo de um tubo de ensaio contendo 5 mL da cultura à 10⁸ UFC/mL, confirmados em espectrofotômetro digital (QUIMIS,

Diadema, São Paulo), com comprimento de onda de 600 nm e contagem de colônias de *Streptococcus mutans* em placas de Petri com Ágar Mitis Salivarius. Os dentes foram suspensos no meio cariogênico pelo fio ortodôntico, de modo que ficassem numa altura similar e sem contato uns com os outros ou com a parede do recipiente de vidro, e o conjunto foi mantido em jarra de microaerofilia à 37°C por 14 dias. Durante esse período, a solução cariogênica foi substituída a cada 48 h, porém sem a inoculação de novos microrganismos. Após o período de incubação, os dentes foram autoclavados (20 min à 121°C), o biofilme removido com gaze e os materiais isolantes (adesivo epóxi e esmalte cosmético) removidos manualmente com lâmina de bisturi. Os dentes foram abundantemente lavados em água deionizada, possibilitando a constatação de uma superfície de dentina amarelada e amolecida ao toque com sonda exploradora aplicada sem pressão [15,16].

REMOÇÃO DA DENTINA INFECTADA

A camada de dentina infectada foi removida com o auxílio de cureta de dentina, preservando a dentina afetada por cárie e brocas esféricas de aço nº 6 (KG Sorensen, Barueri, SP) foram utilizadas por 30 s para a produção de *smear layer*, em baixa rotação. A broca foi substituída por uma nova a cada quatro dentes preparados. O limite de remoção da dentina infectada foi estabelecido por meio de inspeção tátil com auxílio de uma sonda exploradora [17]. Dessa forma, a dentina resultante após a remoção do tecido infectado apresentou-se escurecida e ligeiramente resistente ao toque com sonda

exploradora aplicada com leve pressão. Esse procedimento foi realizado pelo mesmo operador previamente treinado [15].

Após a remoção da dentina infectada, os dentes tiveram suas raízes removidas com o uso da máquina de corte Mecatome P100 (PRESI, Grenoble, França) e a câmara pulpar foi preenchida com resina *flow*, após condicionamento ácido e aplicação do agente adesivo Adper Single Bond 2[®], e fotoativada por 10 s, com o intuito de não deixar espaço vazio. Em seguida, os discos de dentina foram seccionados no sentido mesiodistal, obtendo-se duas secções do mesmo espécime.

PREPARO DOS DENTES HÍGIDOS

Os 48 dentes hígidos restantes tiveram o esmalte removido como descrito acima. Em seguida, foi removida, aproximadamente, uma camada adicional de 0,5 mm de dentina com a lixa d'água de granulação 320 para compensar a remoção da dentina contaminada nos dentes cariados artificialmente [16]. Sobre a superfície dentinária hígida, brocas esféricas de aço nº 6 em baixa rotação foram utilizadas por 30 s para a produção de *smear layer* [15]. As raízes foram removidas da mesma forma descrita anteriormente.

Os discos de dentina obtidos foram seccionados no sentido mesiodistal, obtendo-se duas secções de cada espécime hígido.

DIVISÃO DOS GRUPOS

Após o seccionamento dos 96 espécimes no sentido mesiodistal, uma secção de cada espécime foi usada para análise da superfície dentinária e a outra do mesmo espécime usada para análise da camada híbrida no MEV. Os dentes foram aleatoriamente divididos em 16 grupos (oito grupos de dentes que sofreram indução de cárie e oito grupos de dentes hígidos), de acordo com as substâncias testes (digluconato de clorexidina a 2%, emulsão à base de óleo de copaíba, solução de hidróxido de cálcio e água destilada), realização de condicionamento ácido prévio ou não e aplicação do sistema adesivo convencional ou autocondicionante (Tabela 1).

TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE

O tratamento de superfície de todos os grupos foi padronizado, alterando-se somente a substância utilizada. Foram usadas as seguintes substâncias de acordo com os grupos descritos na Tabela 1:

- Digluconato de clorexidina a 2%;
- Emulsão à base de óleo de copaíba a 10%;
- Solução de Hidróxido de cálcio;
- Água destilada.

TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE COM CONDICIONAMENTO ÁCIDO PRÉVIO

Dentina impregnada com emulsão à base de óleo de copaíba

Os espécimes dos grupos descritos na Tabela 1 tiveram as superfícies dentinárias condicionadas com ácido fosfórico a 37% (Condicionador Dental Gel, 3M ESPE, São Paulo, Brasil) por 15 s, lavadas por mais 15 s com água destilada e secas com papel absorvente para manter a superfície úmida. Em seguida, foram aplicados sobre a dentina condicionada 20 µL da emulsão à base de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne), com auxílio de uma micropipeta para dispensar o volume determinado. A solução foi mantida passivamente por 60 s e os excessos removidos com papel absorvente para deixar uma superfície úmida [18].

Dentina impregnada com clorexidina

Seguindo a mesma sequência descrita acima, após o condicionamento ácido da dentina coberta com *smear layer* e lavagem com água por 15 s, foram aplicados 20 µL de uma solução aquosa de digluconato de clorexidina a 2% (Clorhexidina S 2%/ FGM, 3M ESPE, São Paulo, Brasil) sobre a dentina condicionada, com auxílio de uma micropipeta. A solução foi mantida passivamente por 60 s e os excessos removidos com papel absorvente para deixar uma superfície úmida [18].

Dentina impregnada por solução de hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂)

Para o preparo da solução de Hidróxido de Cálcio, um grama de pó de Ca(OH)₂ foi misturado com 20 mL de água destilada. A solução obtida foi armazenada em geladeira por 24 h para decantação e foi utilizado somente o sobrenadante.

Após o condicionamento ácido, foi realizada a mesma sequência descrita para a emulsão do óleo de copaíba.

Dentina impregnada por água destilada

Após o condicionamento ácido, a superfície dentinária foi lavada com água destilada pelo mesmo período de tempo do condicionamento (15 s) e seca com papel absorvente para deixar uma superfície úmida.

TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE SEM CONDICIONAMENTO ÁCIDO PRÉVIO

Os espécimes que não sofreram condicionamento ácido foram tratados somente com as substâncias específicas para cada grupo, como foi descrito anteriormente e analisados imediatamente no microscópio eletrônico de varredura.

APLICAÇÃO DOS SISTEMAS ADESIVOS

Após o tratamento de superfície dos espécimes, foram aplicados o adesivo convencional ou o adesivo autocondicionante, de acordo com a divisão dos grupos (Tabela 1). Os produtos utilizados no processo adesivo estão descritos na Tabela 2.

Sistema Adesivo Convencional

A aplicação do adesivo convencional (Adper Single Bond 2[®], 3M ESPE, São Paulo, Brasil) foi realizada da seguinte maneira: duas camadas consecutivas do agente adesivo foram aplicadas, sendo cada uma delas submetida individualmente a leves jatos de ar por 5s a 10 cm de distância, para evaporação do solvente. Foi realizada uma única fotopolimerização por 15 s após a aplicação das duas camadas. Em seguida, foram aplicadas quatro camadas adicionais do adesivo e fotoativadas por 35 s após a aplicação da última camada, para permitir a secção dos espécimes na máquina de corte sem a remoção do adesivo durante o procedimento. A fotoativação foi realizada com aparelho fotopolimerizador Radian CAL 1200 mW/cm² (SDI, São Paulo, Brasil), com a potência monitorada por radiômetro, com irradiância entre 440 e 480 mW/cm [19].

Sistema Adesivo Autocondicionante

As etapas para a aplicação do sistema adesivo autocondicionante (Clearfil SE Bond[®], Kuraray, São Paulo, Brasil) foram: aplicação do *primer* e secagem com jato de ar por 20 segundos, e aplicação de duas camadas do *Bond*, sendo cada uma delas submetida individualmente a leves jatos de ar por 5s a 10 cm de distância, e fotoativação por 15 s.

Em seguida, foram aplicadas quatro camadas adicionais do *bond* e fotoativadas por 35 s após a aplicação da última camada, para permitir a secção dos espécimes na máquina de corte sem a remoção do *bond* durante o procedimento. A fotoativação foi realizada com aparelho fotopolimerizador Radian CAL 1200 mW/cm² (SDI, São Paulo,

Brasil), com a potência monitorada por radiômetro, com irradiância entre 440 e 480 mW/cm [19].

Por fim, todos os espécimes foram armazenados em água destilada, em estufa a 37°C, por 24h [15]. Após as 24 h, os espécimes foram seccionados no sentido mesiodistal com um disco de diamante em alta rotação (Buehler, modelo 11 – 4253, série 15 LC, Lake Bluff, ILL 6004, USA), sob refrigeração constante, adaptado à máquina de corte Mecatome P100 (PRESI, Grenoble, França), obtendo-se duas hemisseções de cada espécime com o objetivo de expor a interface adesiva. A superfície exposta foi polida com auxílio de lixas d'água de carboneto de silício (Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, USA) de granulação 1000 e 4000, sob refrigeração constante e velocidade de 300 rpm, adaptadas a uma politriz AROTEC (Aropol 2V, Arotec S.A. Indústria e Comércio, série 040865 Cotia, SP, Brasil). Em seguida, as hemisseções foram limpas numa cuba ultrassônica contendo água destilada por 10 min para remover qualquer resíduo resultante dos procedimentos de corte e polimento. Os espécimes foram desmineralizados com 6N HCl por 30s, desproteinizados com 2,5% de NaOCl por 10 min e lavados com água destilada [2,21].

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Morfologia de Superfície Dentinária

Após o tratamento de superfície, os espécimes preparados para a análise de superfície dentinária foram analisados em microscópio eletrônico de varredura ambiental QUANTA (Modelo 250 FEI), sob corrente de 25 kV com detector de elétrons

secundários e baixo vácuo. Não foi necessário realizar nenhum preparo dos espécimes para análise no MEV. Foram obtidas micrografias de toda a extensão da superfície dentinária tratada, com 2000x de magnificação, sendo atribuídos os seguintes escores [12]:

- Escore 0: ausência de *smear layer* e todos os túbulos dentinários abertos;
- Escore 1: mínima quantidade de *smear layer* e >50% dos túbulos dentinários abertos;
- Escore 2: moderada quantidade de *smear layer* e <50% dos túbulos dentinários abertos;
- Escore 3: Grande quantidade de *smear layer* e praticamente todos os túbulos dentinários obstruídos.

As micrografias foram previamente codificadas e a análise foi realizada em duplicata, com intervalo de uma semana, por um examinador cego previamente calibrado com imagens de referência de MEV para evitar a identificação dos grupos [17,22]. Quatro micrografias de cada espécime foram analisadas.

Morfologia da Camada Híbrida

As hemisseções foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura ambiental (QUANTA Modelo 250 FEI), sob corrente de 25 kV com detector de elétrons secundários e baixo vácuo. A randomização e a análise das micrografias foram realizadas da mesma forma descrita anteriormente.

Foram obtidas fotomicrografias de toda a extensão da interface adesivo/dentina, em magnificação de 1000x para avaliação da camada híbrida, abordando os seguintes aspectos, segundo a metodologia de Gateva [19] modificada:

- Formação e homogeneidade/uniformidade da camada híbrida;
- Espessura da camada híbrida (em micrômetros), que foi medida com auxílio do programa Imaging Software NIS-Elements Advanced Research Versão 4.30 (Nikon, Japão), em três pontos: nas extremidades e no centro da foto.

A camada híbrida e os *tags* de resina foram analisados de acordo com os seguintes escores [12]:

- Escore 1: camada híbrida espessa com muitos *tags* de resina;
- Escore 2: camada híbrida espessa com poucos *tags* de resina;
- Escore 3: camada híbrida espessa sem *tags* de resina;
- Escore 4: camada híbrida fina com muitos *tags* de resina;
- Escore 5: camada híbrida fina com poucos *tags* de resina;
- Escore 6: camada híbrida fina sem *tags* de resina.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste Kappa ($p < 0,05$) foi utilizado para concordância intra-examinador. A análise estatística da morfologia da superfície dentinária e da camada híbrida foi realizada com o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com 5% de significância. Para os dados da espessura foi realizado o teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados.

Considerando a anormalidade dos dados, foi realizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com 5% de significância. Para o cálculo dos testes estatísticos foram utilizados os *softwares* SPSS STATISTICS 21 e BioEstat 5.0.

RESULTADOS

Superfície Dentinária

As Figuras 27 a 34 correspondem a fotomicrografias obtidas através do MEV e mostram o comportamento das substâncias testadas (água destilada, clorexidina a 2%, emulsão à base de copaíba e solução de hidróxido de cálcio) sobre a superfície dentinária coberta por *smear layer* e superfície condicionada com ácido fosfórico a 37%.

As superfícies dentinárias hígida e afetada por cárie tratadas com água destilada após o condicionamento ácido apresentaram exposição de dentina peritubular, ausência de *smear layer* e todos os túbulos dentinários abertos. As superfícies dentinárias tratadas com água destilada, sem condicionamento ácido, apresentaram moderada quantidade de *smear layer* e a maioria dos túbulos dentinários obstruídos (Figuras 27 e 28).

A aplicação do digluconato de clorexidina 2% sobre a superfície dentinária condicionada hígida e afetada por cárie com ácido fosfórico resultou em mínima quantidade de *smear layer*, praticamente todos os túbulos dentinários abertos e a presença de cristais de fosfato precipitados sobre a superfície dentinária em algumas áreas. A dentina tratada com digluconato de clorexidina 2% sem condicionamento ácido prévio apresentou moderada quantidade de *smear layer* e a maioria dos túbulos dentinários obstruídos (Figuras 29 e 30).

A superfície dentinária hígida e afetada por cárie tratada com a emulsão à base de óleo de copaíba após o condicionamento ácido apresentou mínima quantidade de *smear layer* e praticamente todos os túbulos dentinários abertos. A dentina não condicionada e tratada com a emulsão à base de óleo de copaíba apresentou moderada quantidade de *smear layer* e a maioria dos túbulos dentinários obstruídos (Figuras 31 e 32).

A dentina hígida condicionada e tratada com solução de hidróxido de cálcio apresentou praticamente todos os túbulos dentinários obliterados. A dentina condicionada e afetada por cárie apresentou maior número de túbulos dentinários abertos. A dentina não condicionada e tratada com a solução de hidróxido de cálcio apresentou grande quantidade de *smear layer* com a formação de produtos precipitados sobre a superfície e todos os túbulos dentinários obstruídos (Figuras 33 e 34).

Os escores das superfícies hígidas e afetadas por cárie, de acordo com a realização ou não de condicionamento ácido e a substância testada (água destilada, digluconato de clorexidina 2%, emulsão à base de óleo de copaíba e solução de hidróxido de cálcio) são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

A Tabela 3 demonstra que nas superfícies dentinárias hígidas e afetadas por cárie tratadas com as substâncias testes após o condicionamento com ácido fosfórico a 37% somente a solução de hidróxido de cálcio na dentina hígida apresentou diferença estatística significativa ($p < 0.05$).

A Tabela 4 demonstra que nas superfícies dentinárias hígidas e afetadas por cárie tratadas com as substâncias testes sem o condicionamento ácido, a água destilada em dentina hígida apresentou diferença significativa em relação a todos os grupos experimentais ($p < 0.05$); o digluconato de clorexidina a 2% e a emulsão à base de óleo de copaíba nas dentinas hígida e afetada por cárie não apresentaram diferença estatística significativa.

Camada híbrida

A camada híbrida formada com o adesivo Adper Single Bond 2[®] nas dentinas hígida e afetada por cárie tratadas com água destilada apresentou-se espessa e homogênea com longos e numerosos *tags* de resina. A camada híbrida formada com o adesivo Clearfil SE Bond[®] apresentou-se regular e homogênea, porém com *tags* de resina irregulares e com menor infiltração na dentina intratubular em comparação com a camada híbrida formada com Adper Single Bond 2[®] (Figuras 35 e 36).

Nas dentinas hígida e afetada por cárie tratadas com digluconato de clorexidina a 2%, a camada híbrida formada com Adper Single Bond 2[®] apresentou-se espessa, regular e homogênea, com longos *tags* de resina, porém em menor quantidade que no grupo da água destilada. A camada híbrida formada com Clearfil SE Bond 2[®] na dentina tratada com digluconato de clorexidina apresentou poucos e irregulares *tags* de resina com pouca infiltração na dentina (Figuras 37 e 38).

A camada híbrida formada com Adper Single Bond 2[®] nas dentinas hígida e afetada por cárie tratadas com emulsão à base de óleo de copaíba apresentou-se espessa, regular e homogênea, com longos *tags* de resina, porém em menor quantidade que no grupo da água destilada (Figuras 35 e 39). A camada híbrida formada com o adesivo Clearfil SE Bond[®] nas dentinas hígida e afetada por cárie tratadas com a emulsão à base de óleo de copaíba apresentou-se regular e homogênea com grande quantidade de *tags* de resina (Figura 40).

A camada híbrida formada com Adper Single Bond 2[®] nas dentinas hígida e afetada por cárie tratadas com solução de hidróxido de cálcio apresentou-se espessa e homogênea com moderada quantidade de *tags* de resina. A camada híbrida formada com Clearfil SE Bond[®] nas dentinas hígida e afetada por cárie tratadas com solução de hidróxido de cálcio apresentou-se regular e homogênea com mínima quantidade de *tags* de resina e mínima infiltração na dentina (Figuras 41 e 42).

Poucas imagens dos grupos apresentaram falhas na interface adesiva, como total remoção do adesivo, irregularidade e descontinuidade da camada híbrida. As imagens com falha total da camada híbrida foram consideradas erro de técnica e descartadas da análise. Para padronização da quantidade de imagens, considerando o grupo que apresentou o maior número de perdas, foram utilizadas para análise estatística somente 19 imagens por grupo, que foram selecionadas por aleatorização realizada no programa BioEstat 5.0. Com relação aos valores de espessura, as imagens onde não foi possível visualizar o limite da camada híbrida não foram utilizadas na análise estatística. Portanto, pelo mesmo motivo de padronização, foram analisadas 10 imagens por grupo, que foram selecionadas por aleatorização realizada no programa BioEstat 5.0.

Os escores da camada híbrida formada com os adesivos Adper Single Bond 2[®] e Clearfil SE Bond[®] nas dentinas hígida e afetada por cárie tratadas com as substâncias testadas são apresentados nas Tabelas 5 e 6. As diferenças entre as médias dos escores de todos os grupo pode ser observada no Gráfico 1.

A Tabela 5 demonstra que não houve diferença estatística entre as camadas híbridas formadas com o adesivo Adper Single Bond 2[®] nas dentinas híginas e afetadas por cárie tratadas com as substâncias testes.

A camada híbrida formada com Clearfil SE Bond[®] na dentina afetada por cárie tratada com solução de hidróxido de cálcio apresentou diferença estatística do grupo da emulsão à base do óleo de copaíba com Clearfil SE Bond[®] na dentina afetada ($p < 0,05$). Na dentina hígida não houve diferença estatística na camada híbrida com Clearfil SE Bond[®], independente das substâncias testadas (Tabela 6).

A camada híbrida formada com Clearfil SE Bond[®] nas dentinas hígida e afetada por cárie tratadas com emulsão à base de copaíba apresentou a menor espessura ($2,60 \pm 0,84 \mu\text{m}$ e $2,60 \pm 0,96 \mu\text{m}$, respectivamente). Diferente das outras substâncias, a camada híbrida formada com o adesivo Clearfil SE Bond[®] na dentina hígida tratada com água destilada apresentou-se mais espessa que a camada híbrida formada com Adper Single Bond 2[®]. Analisando comparativamente as substâncias, substrato e sistema adesivo, não houve diferença estatística entre a espessura da camada híbrida formada com Clearfil SE Bond[®] na dentina hígida tratada com emulsão à base de copaíba e água destilada ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre digluconato de clorexidina a 2%, emulsão à base de copaíba e água destilada na dentina afetada por cárie com Clearfil SE Bond[®]. Não houve diferença estatística entre a espessura da camada híbrida formada com Adper Single Bond 2[®] nas dentinas hígida e afetada por cárie tratadas com as substâncias ($p < 0,05$) (Tabela 7).

DISCUSSÃO

Um protocolo microbiológico de indução de cárie foi utilizado nessa pesquisa para simular o processo cariioso natural em dentina. De acordo com MARQUEZAN *et al.*

[23], o método microbiológico produz lesões de cárie morfológicamente semelhantes às lesões naturais, com um padrão similar de degradação de colágeno e com a formação de uma evidente camada de dentina infectada, extensa desmineralização de dentina intertubular e discreta abertura dos túbulos dentinários, características encontradas nesse estudo.

As superfícies dentinárias afetadas por cárie tiveram o tecido amolecido removido com o auxílio de instrumentos manuais, deixando apenas o tecido passível de remineralização, simulando uma situação clínica. A preferência por este instrumento em detrimento das brocas foi pelo fato de este garantir ao operador maior controle na remoção do tecido cariado, conferindo uma característica conservadora ao preparo. Além disso, o trabalho de Li [24] mostrou menor quantidade de *smear layer* sobre a superfície do preparo, bem como maior quantidade de túbulos dentinários abertos na superfície preparada pelo método químico-mecânico, em comparação aos instrumentos rotatórios.

O tratamento da superfície dentinária antes da aplicação do sistema adesivo tem grande influência sobre a adesão. Estudos recentes demonstraram a ação do digluconato de clorexidina a 2% sobre componentes orgânicos da dentina quando usada como agente terapêutico após o condicionamento ácido, melhorando a qualidade e aumentando a longevidade da interface adesiva [25,26,27]. Segundo Singh *et al.* [28], o uso do digluconato de clorexidina a 0,2% promove maior ligação à dentina parcialmente desmineralizada do que mineralizada, uma vez que essa solução se liga aos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina quando aplicada após o condicionamento com ácido fosfórico a 37%.

No presente estudo, o tratamento da superfície dentinária condicionada e não condicionada com digluconato de clorexidina a 2% apresentou a formação de sais de fosfato, que foram vistos em mínima quantidade na dentina condicionada e incorporados na *smear layer* na dentina não condicionada. Esses sais de fosfato são visíveis sobre a hidroxiapatita sob a forma de cristais em forma de agulha [29].

Os resultados encontrados nesse estudo com relação ao uso da solução de hidróxido de cálcio confirmaram a sua indicação em cavidades profundas e em casos de

exposição pulpar [30,31,32]. No presente estudo, a aplicação da solução de hidróxido de cálcio na dentina não condicionada resultou na formação de precipitados sobre a superfície, aumentando a irregularidade da camada de *smear layer*. E mesmo após o condicionamento com ácido fosfórico 37%, o hidróxido de cálcio obliterou os túbulos dentinários, sugerindo a sua contra-indicação em cavidades rasas.

A aplicação da emulsão à base do óleo de copaíba na dentina coberta por *smear layer* e na dentina condicionada com ácido fosfórico a 37% resultou em uma superfície dentinária sem variações em sua morfologia, com as mesmas características do uso da água destilada, não demonstrando nenhuma barreira física aparente à penetração do agente adesivo. Esses resultados não possuem, ainda, embasamento na literatura que os justifique.

Em comparação ao digluconato de clorexidina, a aplicação da emulsão à base de óleo de copaíba possui outras propriedades biológicas que podem auxiliar na resposta do tecido pulpar e não apresentou interferência aparente na camada híbrida, principalmente com o sistema autocondicionante.

Além da presença da *smear layer* e as substâncias usadas sobre a superfície dentinária, o tipo de dentina deve ser considerado, pois a característica da dentina, hígida ou afetada por cárie, têm influência sobre a estrutura da interface adesiva. A camada híbrida na dentina afetada por cárie apresentou irregular e insuficiente penetração dos *tags* de resina devido à grande profundidade de desmineralização pela maior suscetibilidade ao condicionamento ácido. Essa situação também foi relatada por alguns autores que observaram uma maior discrepância entre profundidade de desmineralização e infiltração de monômeros resinosos e uma extensa zona de colágeno exposto na base da camada híbrida formada na dentina afetada por cárie em comparação com a dentina hígida [33,34,35].

Uma camada híbrida espessa formada com adesivo convencional, baixa efetividade e resistência adesiva são relacionadas com o substrato afetado pelo processo carioso [36,37,38]. Hsu *et al.* [37] e Moura *et al.* [39] relataram variações das características morfológicas da interface adesiva de acordo com o sistema adesivo

utilizado, observando que a camada híbrida formada com o adesivo autocondicionante (Clearfil SE Bond[®]) apresentou-se com menor espessura e menor quantidade de *tags* de resina em comparação com o sistema adesivo convencional (Adper Single Bond 2[®]), mesmo resultado encontrado no presente estudo, apresentando diferença estatística no grupo da emulsão à base de óleo de copaíba na dentina hígida.

Neste estudo foram encontradas ausência e irregularidades de *tags* de resina na dentina. Essas características na interface adesiva formada com os adesivos convencional e autocondicionante podem ser provavelmente devido à direção dos túbulos dentinários, dificultando a formação de *tags* de resina em túbulos dentinários paralelos à interface adesiva e facilitando a penetração do adesivo em túbulos dispostos perpendicularmente à interface [37,39].

Wang *et al.* [34] observaram a penetração irregular dos *tags* de resina na dentina afetada por cárie e relataram que essa desmineralização irregular da dentina pode ser provocada pelo processo carioso, devido à perda de mineral em algumas áreas e precipitação de mineral nos túbulos dentinários em outras áreas, fato que possivelmente ocorreu neste estudo na formação da camada híbrida em dentina afetada por cárie.

No presente estudo, a camada híbrida nas dentinas hígida e afetada por cárie tratadas com emulsão à base de óleo de copaíba apresentou as mesmas características dos grupos tratados com água destilada, independente do adesivo utilizado.

Pashley *et al.* [40] e Sanabe, Costa, Hebling [15] indicaram o óleo mineral como solução para armazenamento de espécimes para preservação da interface adesiva e redução da degradação hidrolítica e enzimática do colágeno, considerando que a atividade colagenolítica não acontece na ausência de água. Como a emulsão testada é oleosa, portanto hidrofóbica, sugere-se que o óleo de copaíba possua as mesmas vantagens que o óleo mineral. Acredita-se que o uso da emulsão reduza a degradação do colágeno na camada híbrida por ser uma substância hidrofóbica e, por isso, envolver e proteger o colágeno da degradação hidrolítica e reduzir a degradação enzimática, pelo fato das metaloproteinasas serem dependentes da água e da presença de íons cálcio e zinco para serem ativadas.

Além da sua característica hidrofóbica, o óleo de copaíba apresenta propriedades como atividade antimicrobiana [41], atividade antiinflamatória [42] e compatibilidade biológica [7,10]. Pieri et al. [11] e Vasconcelos *et al.* [7] observaram atividade antimicrobiana do óleo de copaíba frente ao *Streptococcus mutans*, podendo contribuir na diminuição da incidência de cárie recorrente através da redução da quantidade dos microrganismos presentes na cavidade antes da inserção do material restaurador.

As médias de espessura da camada híbrida com Adper Single Bond 2[®] encontradas nesse estudo foram similares aos trabalhos relatados na literatura, diferente dos grupos com o adesivo Clearfil SE Bond[®] que apresentaram uma espessura de camada híbrida maior. A menor espessura de camada híbrida encontrada neste estudo foi na emulsão à base de óleo de copaíba em dentina hígida, com média de $2,60 \pm 0,84 \mu\text{m}$ (Clearfil SE Bond[®]). Com o adesivo Adper Single Bond 2[®], a menor média foi $3,2 \pm 0,63 \mu\text{m}$ para o digluconato de clorexidina a 2% em dentina afetada por cárie. Na literatura são relatados valores para médias de espessura como $2,44 \pm 0,52 \mu\text{m}$ [3], 3 - 6 μm [20] e média de $3,04 \mu\text{m}$ [43] com Adper Single Bond 2[®] e média de $1,43 \pm 0,64 \mu\text{m}$ e $0,37 \pm 0,23 \mu\text{m}$ [3] com adesivos autocondicionantes.

Essa divergência nos valores da espessura com o adesivo Clearfil SE Bond[®] possivelmente está relacionada à variabilidade das metodologias utilizadas, principalmente em relação à quantidade de camadas de adesivo aplicada. Considerando os resultados obtidos, sugere-se que é mais importante a homogeneidade da camada híbrida com a formação regular de *tags* de resina do que a sua espessura, pois esse fato pode proporcionar uma camada híbrida de qualidade [44].

A análise em microscopia eletrônica de varredura é bastante usada para avaliação de superfícies dentárias e interface adesiva, apresentando imagens de alta qualidade, porém o preparo das amostras para análise envolve os processos de desidratação, metalização e fixação. Os processos de desidratação e fixação podem levar a alterações na estrutura da dentina quando há a mudança da pressão atmosférica para as condições de vácuo, e a metalização das amostras, principalmente com ouro, superestima a qualidade das imagens, pois torna a amostra condutora de elétrons [22,45]. A microscopia no modo

ambiental, escolhida para análise nesta pesquisa, permitiu que os espécimes fossem analisados no seu estado natural, hidratados e sem necessidade de preparo das amostras, pois segundo Pereira *et al.* [45], a análise das amostras em alto vácuo favorece a maior formação de defeitos e *gaps* comparada com a análise em baixo vácuo. Neste sentido, optou-se pelo MEV ambiental em baixo vácuo com detector de elétrons secundários.

Durante a análise em MEV, em altas voltagens, os elétrons interagem com a superfície e aumentam a sua temperatura, causando evaporação ou sublimação de substâncias orgânicas e oleosas, tornando-as indetectáveis. A análise em baixa voltagem e menor magnificação previne essa situação. Nesse estudo, a análise foi realizada com 25kV e magnificações de 1000x e 2000x. A explicação para a análise em altas magnificações é o seu uso para detectar túbulos dentinários, *smear layer* e detalhes menores da superfície dentinária e camada híbrida [47].

Wang e Spencer [47] observaram que o polimento dos espécimes para análise em MEV altera a morfologia da interface adesiva, superestimando a qualidade da camada híbrida, pois o polimento causa defeitos na interface e produz debris que pode ser depositado em porosidades existente na camada híbrida. Entretanto, a influência do polimento na qualidade da camada híbrida depende da qualidade original da camada e do sistema adesivo utilizado.

Outro fator a ser considerado na análise em MEV é a descontinuidade da camada híbrida observada em pequena magnificação e ótima qualidade em alta magnificação pela seleção das áreas sem artefatos ou defeitos [45]. Algumas imagens obtidas dos espécimes analisados nesse estudo apresentaram falhas como *gaps* e descontinuidade da camada híbrida, situação que foi descrita anteriormente.

Tendo em vista o exposto, a Dentística pode ganhar com a incorporação de emulsões à base de óleo de copaíba no procedimento restaurador, atuando de forma terapêutica na estrutura dentária devido às suas propriedades biológicas, tornando o seu uso mais vantajoso em comparação com o dígluconato de clorexidina a 2% e água destilada.

CONCLUSÃO

A aplicação da emulsão à base de óleo de copaíba, possivelmente, não interferiu na morfologia natural das superfícies dentinárias hígida e afetada por cárie, apresentando uma camada híbrida uniforme, regular e com grande infiltração monomérica nas dentinas hígida e afetada por cárie, independente do adesivo utilizado. Considerando as características apresentadas e suas propriedades biológicas, a aplicação da emulsão à base de óleo de copaíba, um fitoterápico, antes do sistema adesivo convencional e autocondicionante, mostra-se promissora na Odontologia.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento desta pesquisa (Chamada MCTI/CNPq/CT-Amazonia Nº 77/2013 – Processo 406457/2013-1 - Fomento de Projetos de P, D & I em Biotecnologia, na Amazônia Ocidental, com foco nas áreas de Fármacos, Fitoterápicos e Cosméticos).

REFERÊNCIAS

- [1] Nakabayashi N. The hibrid layer: A resin-dentin composite. *Proceedings of the Finnish Dental Society* 1992; **88** (1): 322-29.
- [2] Ozer F, Blatz MB. In: Adhesive Systems Compendium. Self-Etch and Etch-and-Rinse Adhesive Systems in Clinical Dentistry. 2013; **34**(1): 12-20.
- [3] Skupien JA et al. Micromorphological effects and the thickness of the hybrid layer – a comparison of current adhesive. *Journal of Adhesive Dentistry* 2010; **12**: 435-442.
- [4] Breschi L. et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *Journal of Adhesive Dentistry* 2009; **11**(3): 191-98.
- [5] Lafuente D. SEM analysis of hybrid layer and bonding interface after chlorhexidine use, *Operative Dentistry* 2012; **37**(2): 172-180.
- [6] Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions, *Journal of Dental Research* 1998; **77**:1622–9.
- [7]. Vasconcelos KRF et al. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. *Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2008; **18**: 733-38.
- [8]. Garrido AD et al. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on *Copaifera multijuga* oil-resin. *International Endodontic Journal* 2010; **4**: 283-291.
- [9] Pieri FA, Mussi MC, Moreira MAS. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 2009; **11**(4): 465-472.
- [10] Bandeira MFCL; Oliveira MRB, Benatti-Neto C, Lia RC. Estudo comparativo da compatibilidade biológica em molares de rato do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba) associados ao hidróxido de cálcio. *Jornal Brasileiro de Clínica e Estética em Odontologia* 1999; **3**(16): 42-49.
- [11] Pieri FA et al. Bacteriostatic Effect of Copaiba Oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Brazilian Dental Journal* 2012; **23**(1): 36-38.

- [12] Oliveira ACM et al. Evaluation of the smear layer and hybrid layer in noncarious and carious dentin prepared by air abrasion system and diamond tips. *Microscopy Research and Technique* 2010; **73**: 597–605.
- [13] Barbosa PCS et al. Phytochemical fingerprints of Copaiba Oils (*Copaifera multijuga* Hayne) Determined by multivariate analysis. *Chemistry & Biodiversity* 2013; **10**: 1350-1360..
- [14] Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa; 2010. p546.
- [15] Sanabe ME, Costa CAS, Hebling J. Exposed Collagen in Aged Resin-Dentin Bonds Produced on Sound and Caries-affected Dentin in the Presence of Chlorhexidine. *Journal of Adhesive Dentistry* 2011; **13**: 117-124.
- [16] Ricci HA et al. Wettability of chlorhexidine treated non-carious and caries-affected dentine. *Australian Dental Journal* 2014; **59**: 37–42.
- [17] Banerjee A, Kidd EAM, Watson TF. Scanning electron microscopic observations of human dentine after mechanical caries excavation. *Journal of Dentistry* 2000; **28**: 179-86.
- [18] Ricci HA et al. Influência da Clorexidina na Capacidade de Umectabilidade da Dentina Hígida e Afetada por Cárie por um Sistema Adesivo. *Revista Odontológica do Brasil Central* 2011; **20**(53): 119-124.
- [19] Gateva N, Kabaktchieva R. Hybrid layer thickness in primary and permanent teeth – a comparison between total etch adhesives, *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)* 2012; **18**(2): 191-99.
- [20] Hegde MN, Hegde P, Chandra CR. Morphological evaluation of new total etching and self etching adhesive system interfaces with dentin. *Journal of Conservative Dentistry* 2012; **15**(2): 151-155.
- [21] Guven Y, Aktoren O. Shear bond strength and ultrastructural interface analysis of different adhesive systems to Er:YAG laser-prepared dentin. *Lasers Medical Science* 2015; **30**(2): 769-78.
- [22] Wang Y, Yao X. Morphological/chemical imaging of demineralized dentin layer in its natural, wet state. *Dental Materials* 2010; **26**: 433–442.

- [23] Marquezan M et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Archives of Oral Biology* 2009; **59**: 1111-1117.
- [24] Li H, Wang WM, Yu SL, Wen Q, Morphological and microtensile bond strength evaluation of three adhesive systems to caries-affected human dentine with chemomechanical caries removal. *Journal of Dentistry* 2011; **39**: 332–339.
- [25] Carrilho MRO et al. *In vivo* preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *Journal of Dental Research* 2007; **86**(6): 529-533.
- [26] Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho MRO, Visintini E, Tjäderhane L, Ruggeri Jr. A, Tay F, Dorigo ES, Pashley DH, Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year *in vitro* study. *Dental Materials* 2010; **26**: 320–325.
- [27] Francisconi-Dos-Rios LF, Calabria MP, Casas-Apayco LC, Honório HM, Carrilho MRO, Pereira JC, Wang L. Chlorhexidine does not improve but preserves bond strength to eroded dentin. *American Journal of Dentistry* 2015; **28**(1): 28-32.
- [28] Singh H. *et al.* Evaluation of substantivity of chlorhexidine to human dentin and its application in adhesive dentistry – an *in vitro* analysis. *Indian Journal of Dentistry* 2011; **2**(2): 8-10.
- [29] Misra DN. Interaction of chlorhexidine digluconate with and adsorption of chlorhexidine on hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Material Research* 1994; **28**: 1375–81.
- [30] Neri VF, Passos FBA, Viana LKA, Rodrigues VPA, Saboia SL. Efficacy of smear layer removal by cavity cleaning solutions: an atomic force microscopy study. *Revista Odonto Ciência* 2011; **26**(3): 253-257.
- [31] Franco APGO et al. Desinfecção de cavidades com clorexidina. UEPG. *Ciências Biológicas e da Saúde* 2007; **13**: 53-58.
- [32] Busato ALS. *Dentística: Restaurações estéticas*. 1 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2002.
- [33] Haj-Ali R et al., Histomorphologic Characterization of Noncarioues and Caries-Affected Dentin/Adhesive Interfaces. *Journal of Prosthodontics* 2006; **15**(2): 82-88.
- [34] Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *Journal of Biomedical Material Research* 2007; **81**(2): 279–286.

- [35] Wei X, Ben-Xiang H, Ya-Lin L. Bond strength of different adhesives to normal and caries-affected dentins. *Chinese Medical Journal* 2010; **123**(3): 332-336.
- [36] Erhardt MCG, Toledano M, Osorio R, Pimenta LA. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: Effects of long-term water exposure. *Dental Materials* 2008; **24**: 786–798.
- [37] Hsu KW, Marshall SJ, Pinzon LM, Watanabe L, Saiz E, Marshall GW. SEM evaluation of resin-carious dentin interfaces formed by two dentin adhesive systems. *Dental Materials* 2008; **24**: 880–887.
- [38] Neves AA, Coutinho E, Cardoso MV, Lambrechts P, Meerbeek BV. Current Concepts and Techniques for Caries Excavation and Adhesion to Residual Dentin. *Journal of Adhesive Dentistry* 2011; **13**: 7-22.
- [39] Moura SK, Santos JFF, Ballester RY. Morphological Characterization of the Tooth/Adhesive Interface. *Brazilian Dental Journal* 2006; **17**(3): 179-185.
- [40] Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen Degradation by Host-derived Enzymes during Aging. *Journal of Dental Research* 2004; **83**(3): 216-221.
- [41] Mendonça DE, Onofre SB. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba–*Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2009; **19**(2B): 577-581.
- [42] Gomes NM et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; **128**: 177–183.
- [43] Rosa AJ, Silva EM, Tostes MA. Scanning electron microscopy analysis of microstructure of the adhesive interface between resin and dentin treated with papain gel. *Indian Journal of Dental Research* 2015; **26** (1): 77-81.
- [44] Hori FS, Carvalho RCR. Experimental adhesives with different hydrophilicity: microshear test in after 1, 7, and 90 days' storage. *Journal of Adhesive Dentistry* 2012; **14**(2): 107-111.
- [45] Pereira CNB; Daleprane B; Barbosa PF; Moreira AN; Magalhães CS. Qualitative Evaluation of Scanning Electron Microscopy Methods in a Study of the Resin Cement/Dentine Adhesive Interface. *Microscopy and Microanalysis* 2014; **20**: 268–275.
- [46] Saghiri MA; Asgar K; Lotfi M; Karamifar K; Saghiri AM; Neelakantan P; Gutmann JL; Sheibaninia A. Back-scattered and secondary electron images of scanning electron

microscopy in dentistry: a new method for surface analysis. *Acta Odontologica Scandinavica* 2012; **70**: 603–609.

[47] Wang Y, Spencer P. Overestimating hybrid layer quality in polished adhesive/dentin interfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* 2004; **68**(4): 735-46.

TABELAS

Tabela 3 - Frequência e média dos escores das superfícies dentinárias hígida e afetada por cárie tratadas com as substâncias testes após o condicionamento com ácido fosfórico.

	<i>Água destilada</i>		<i>Clorexidina</i>		<i>Emulsão à base de óleo de copaíba</i>		<i>Solução de hidróxido de cálcio</i>	
	Hígida	Afetada	Hígida	Afetada	Hígida	Afetada	Hígida	Afetada
Escore 0	22	24	21	16	15	16	3	16
Escore 1	2	0	3	5	5	8	10	5
Escore 2	0	0	0	3	4	0	7	3
Escore 3	0	0	0	0	0	0	4	0
Média dos escores	0,08	0	0,12	0,46	0,54	0,33	1,5 ^a	0,46

H = 41,9256; (p) Kruskal-Wallis < 0.0001

Letra a significa diferença estatística (p < 0.05).

Tabela 4 - Frequência e média dos escores das superfícies dentinárias hígida e afetada por cárie tratadas com as substâncias testes sem condicionamento ácido prévio.

	<i>Água destilada</i>		<i>Clorexidina</i>		<i>Emulsão à base de óleo de copaíba</i>		<i>Solução de hidróxido de cálcio</i>	
	Hígida	Afetada	Hígida	Afetada	Hígida	Afetada	Hígida	Afetada
Escore 0	0	0	0	0	0	0	0	0
Escore 1	21	3	5	5	5	4	0	1
Escore 2	3	15	14	10	10	6	2	6
Escore 3	0	6	5	9	9	14	22	17
Média dos escores	1,12	2,12 ^a	2 ^a	2,17 ^a	2,17 ^a	2,42 ^{ab}	2,98 ^b	2,67 ^{ab}

H = 74,9031; (p) Kruskal-Wallis < 0.0001

Letras diferentes significam diferença estatística (p < 0.05)

Tabela 5 - Frequência e média dos escores da camada híbrida formada com adesivo Adper Single Bond 2[®] nas dentinas hígida e afetada por cárie após o tratamento com as substâncias testes.

	<i>Água destilada</i>		<i>Clorexidina</i>		<i>Emulsão à base de óleo de copaíba</i>		<i>Solução de hidróxido de cálcio</i>	
	Hígida	Afetada	Hígida	Afetada	Hígida	Afetada	Hígida	Afetada
Escore 1	19	19	18	13	18	17	16	12
Escore 2	0	0	1	6	1	2	3	3
Escore 3	0	0	0	0	0	1	0	4
Escore 4	0	0	0	0	0	0	0	0
Escore 5	0	0	0	0	0	0	0	0
Escore 6	0	0	0	0	0	0	0	0
Média dos escores	1 ^a	1 ^a	1,05 ^a	1,3 ^a	1,05 ^a	1,1 ^a	1,16 ^a	1,6 ^a

H = 23,8358; (p) Kruskal-Wallis = 0.0012
 Não houve diferença estatística entre os grupos (p> 0.05)

Tabela 6 - Frequência e média dos escores da camada híbrida formada com adesivo Clearfil SE Bond[®] nas dentinas hígida e afetada por cárie após o tratamento com as substâncias testes.

	<i>Água destilada</i>		<i>Clorexidina</i>		<i>Emulsão à base de óleo de copaíba</i>		<i>Solução de hidróxido de cálcio</i>	
	Hígida	Afetada	Hígida	Afetada	Hígida	Afetada	Hígida	Afetada
Escore 1	8	11	5	13	15	16	7	6
Escore 2	8	6	14	3	4	3	10	7
Escore 3	3	2	0	3	0	0	2	6
Escore 4	0	0	0	0	0	0	0	0
Escore 5	0	0	0	0	0	0	0	0
Escore 6	0	0	0	0	0	0	0	0
Média dos escores	1,7 ^{ab}	1,53 ^{ab}	1,7 ^{ab}	1,47 ^{ab}	1,2 ^{ab}	1,16 ^a	1,7 ^{ab}	2 ^b

H = 25,3053; (p) Kruskal-Wallis = 0.0007
 Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (p< 0.05).

Tabela 7 – Comparação das médias da espessura da camada híbrida de acordo como o substrato, sistema adesivo e substâncias testes.

<i>DENTINA</i>	<i>SUBSTÂNCIA</i>	<i>ADESIVO</i>	<i>ESPESSURA EM μm – MÉDIA (DP)</i>	<i>TAMANHO DA AMOSTRA</i>
HÍGIDA	AD	SINGLE BOND	4,5 (1,17) ^b	10
	AD	CLEARFIL	4,7 (0,67) ^b	10
	CHX	SINGLE BOND	4,0 (0,94) ^b	10
	CHX	CLEARFIL	3,5 (1,17) ^{b,c}	10
	CM	SINGLE BOND	5,1 (0,73) ^b	10
	CM	CLEARFIL	2,6 (0,84) ^a	10
	HC	SINGLE BOND	3,9 (0,56) ^b	10
	HC	CLEARFIL	3,5 (0,52) ^b	10
AFETADA POR CÁRIE	AD	SINGLE BOND	4,2 (0,78) ^b	10
	AD	CLEARFIL	3,0 (0,47) ^c	10
	CHX	SINGLE BOND	3,2 (0,63) ^c	10
	CHX	CLEARFIL	2,7 (0,48) ^a	10
	CM	SINGLE BOND	4,0 (0,94) ^b	10
	CM	CLEARFIL	2,6 (0,96) ^a	10
	HC	SINGLE BOND	4,1 (0,73) ^b	10
	HC	CLEARFIL	- *	3

H=48,1433; (p) Kruskal-Wallis < 0.0001

Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos (p< 0.05).

* Grupo não entrou na análise estatística.

FIGURAS

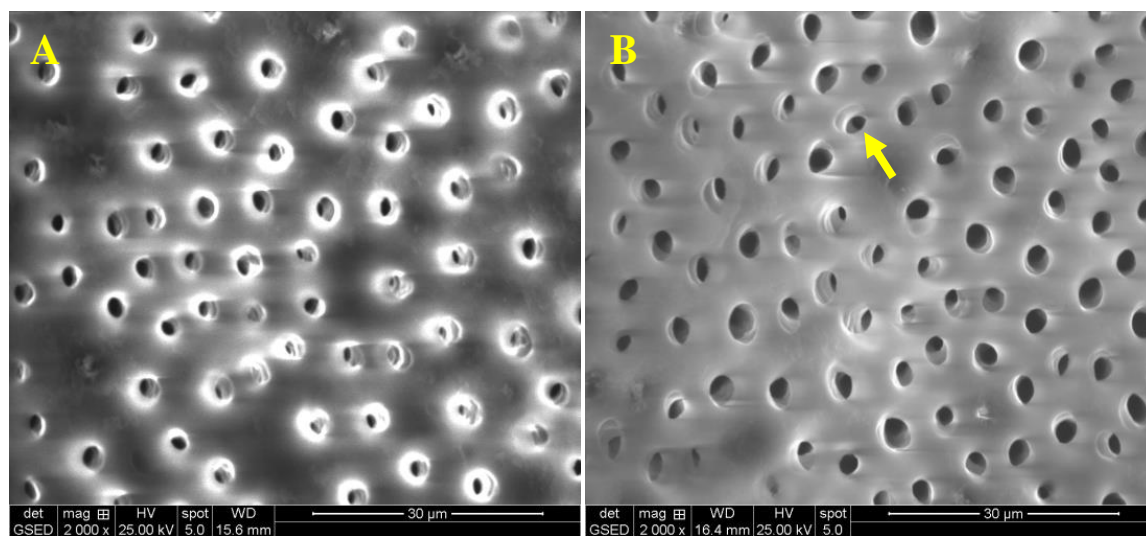


Figura 27 – Dentina condicionada tratada com água destilada. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie. Os túbulos dentinários apresentam-se completamente desobstruídos (setas).

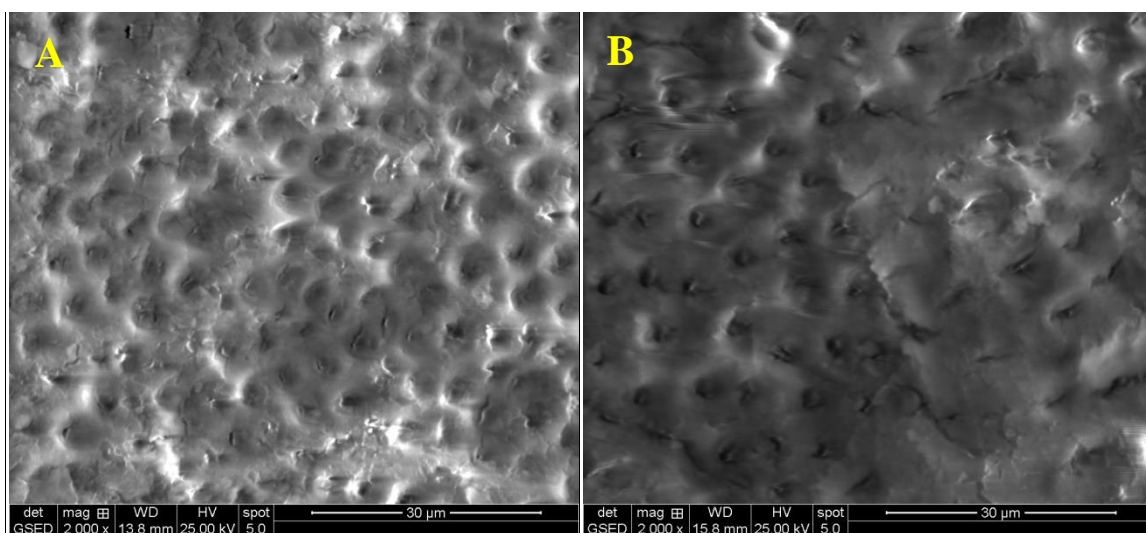


Figura 28 – Dentina não condicionada tratada com água destilada. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie.

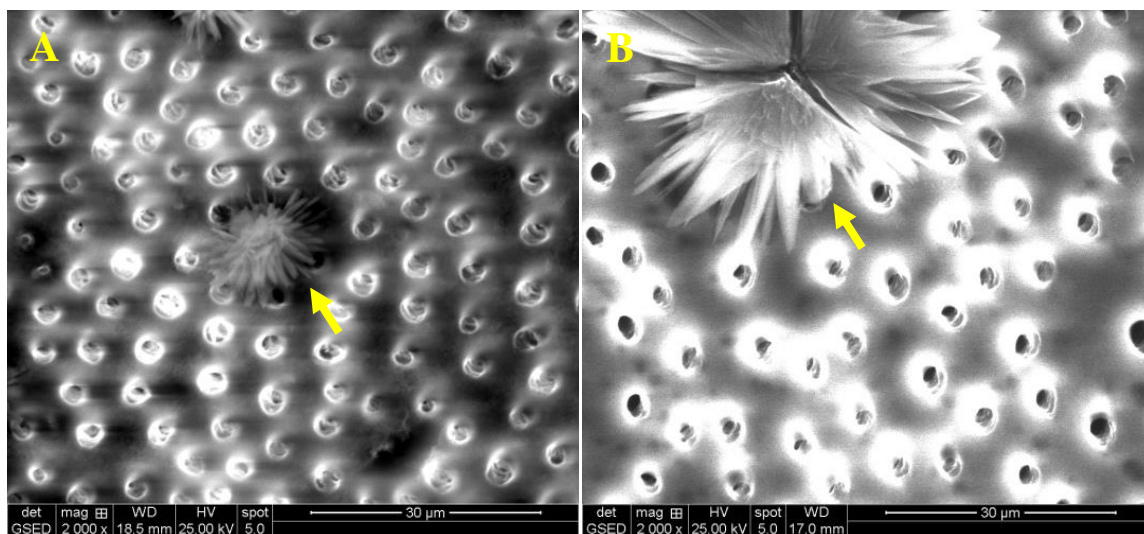


Figura 29 – Dentina condicionada tratada com clorexidina 2%. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie. Cristais de fosfato na dentina hígida (setas).

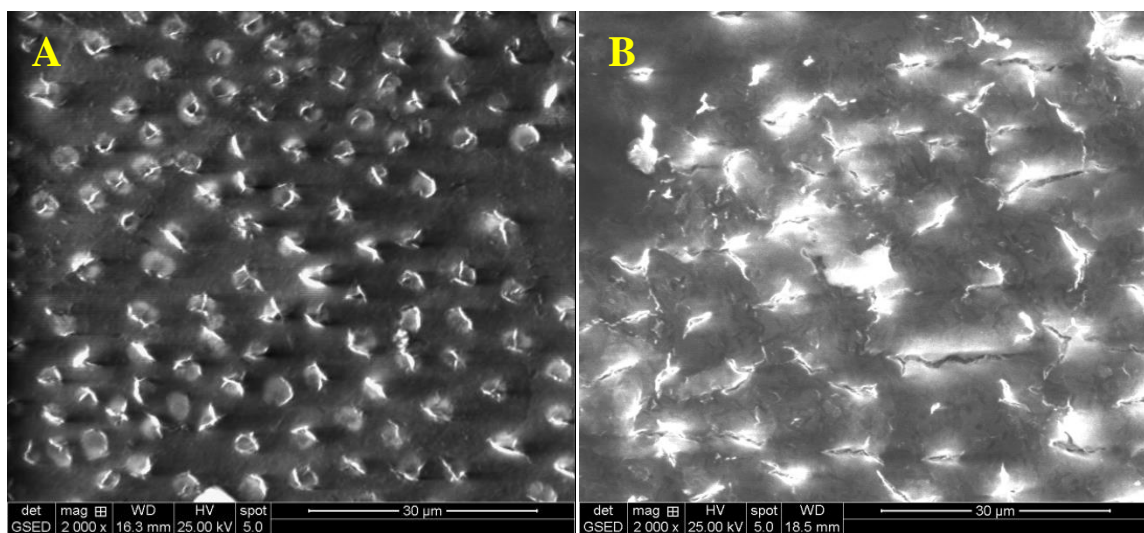


Figura 30 - Dentina não condicionada tratada com clorexidina 2%. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie.

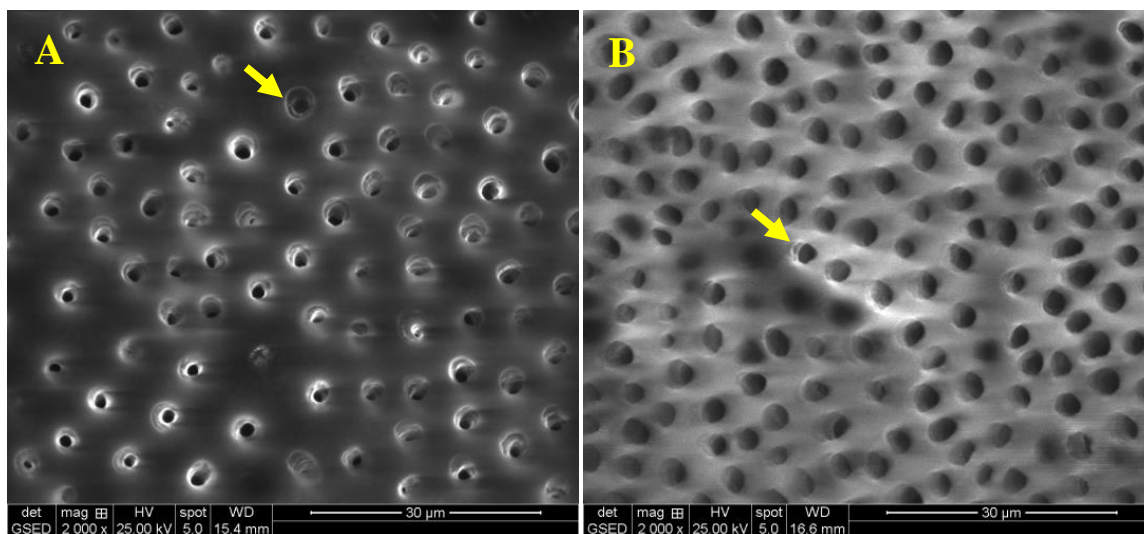


Figura 31 - Dentina condicionada tratada com emulsão à base de óleo de copaíba. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie. Os túbulos dentinários apresentam-se completamente desobstruídos (setas).

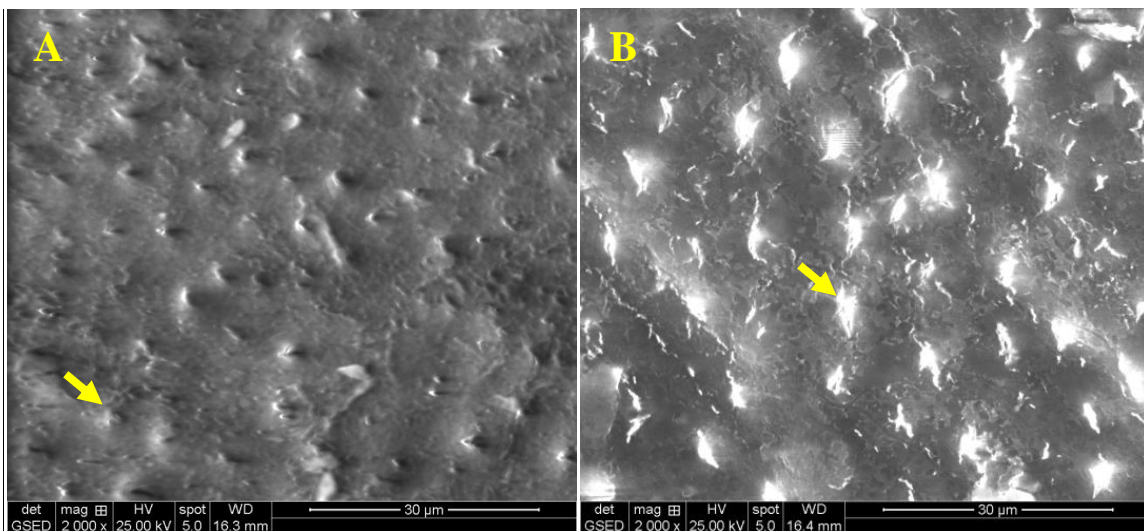


Figura 32 - Dentina não condicionada tratada com emulsão à base de óleo de copaíba. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie. Túbulos dentinários obstruídos (setas).

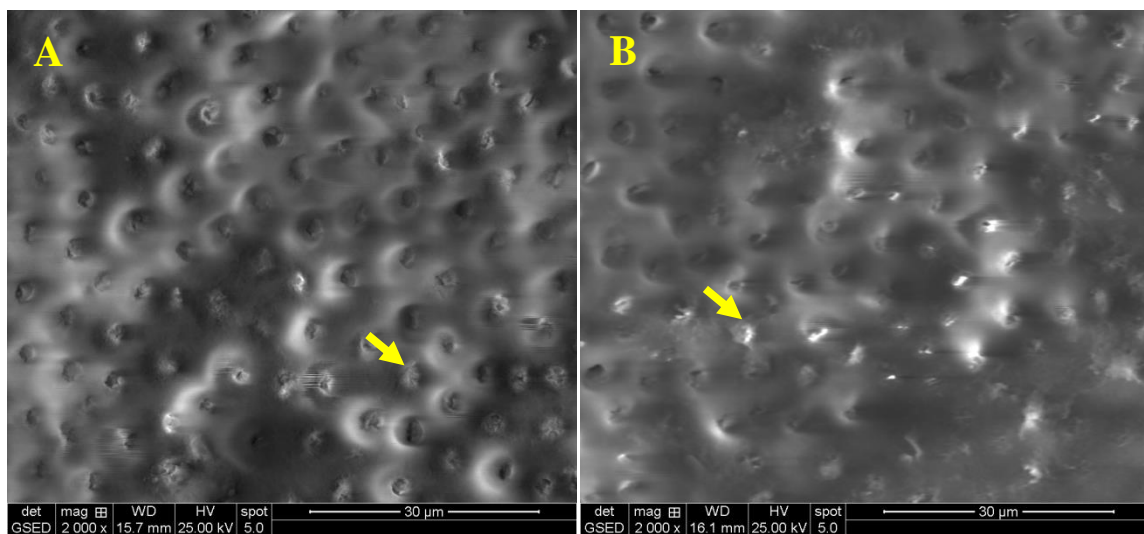


Figura 33 - Dentina condicionada tratada com solução de hidróxido de cálcio. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie. Túbulos dentinários obstruídos mesmo após o condicionamento ácido (setas).

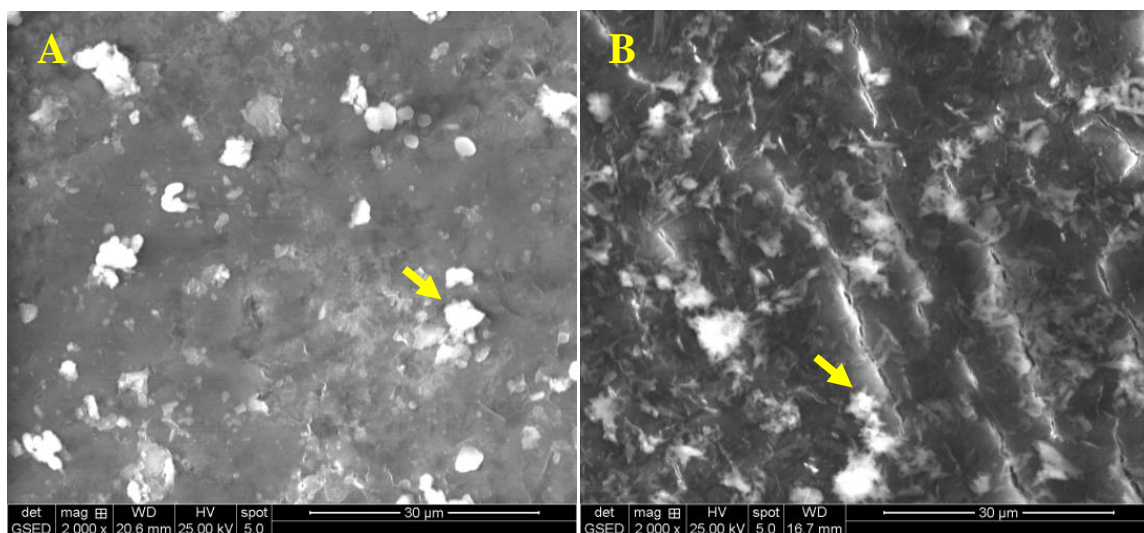


Figura 34 - Dentina não condicionada tratada com solução de hidróxido de cálcio. A) Dentina hígida. B) Dentina afetada por cárie. Produtos precipitados formados sobre a superfície dentinária (setas).

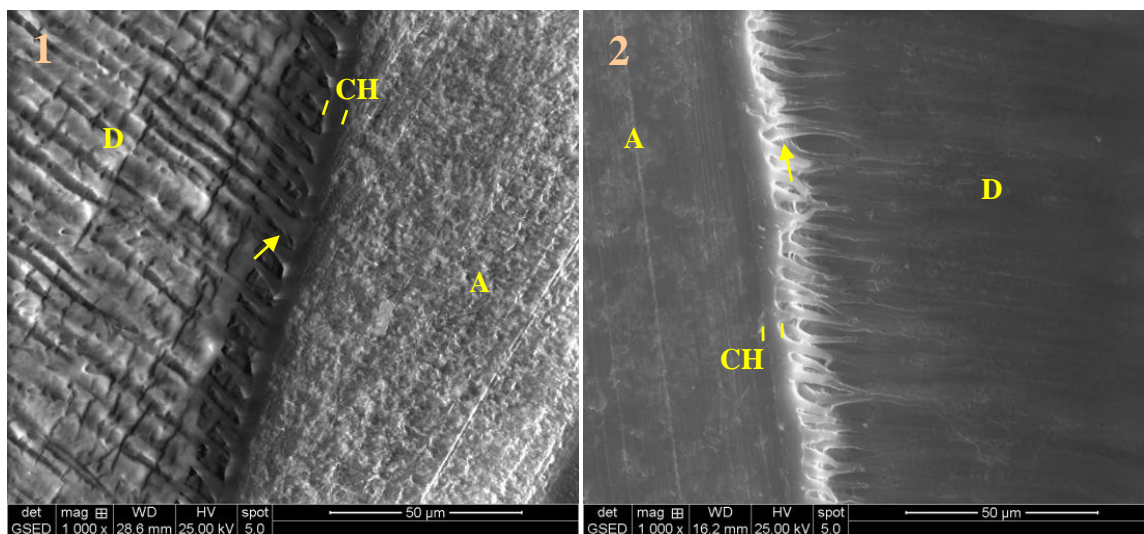


Figura 35 - Camada híbrida formada com Adper Single Bond 2® na dentina tratada com água destilada. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida (entre as barras). As setas apontam os *tags* de resina.

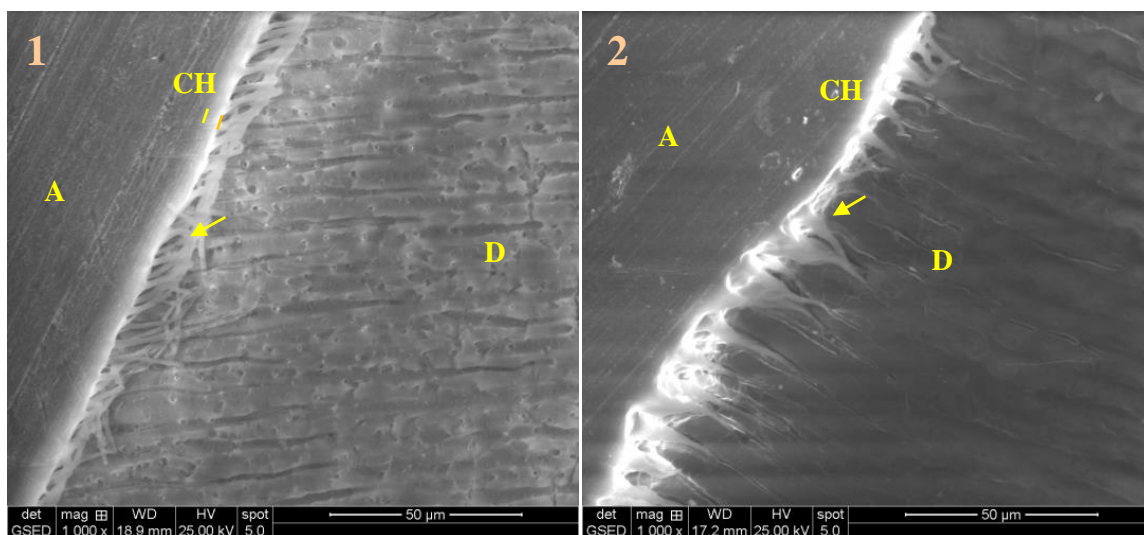


Figura 36 - Camada híbrida formada com Clearfil SE Bond® na dentina tratada com água destilada. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida (entre as barras). As setas apontam os *tags* de resina irregulares.

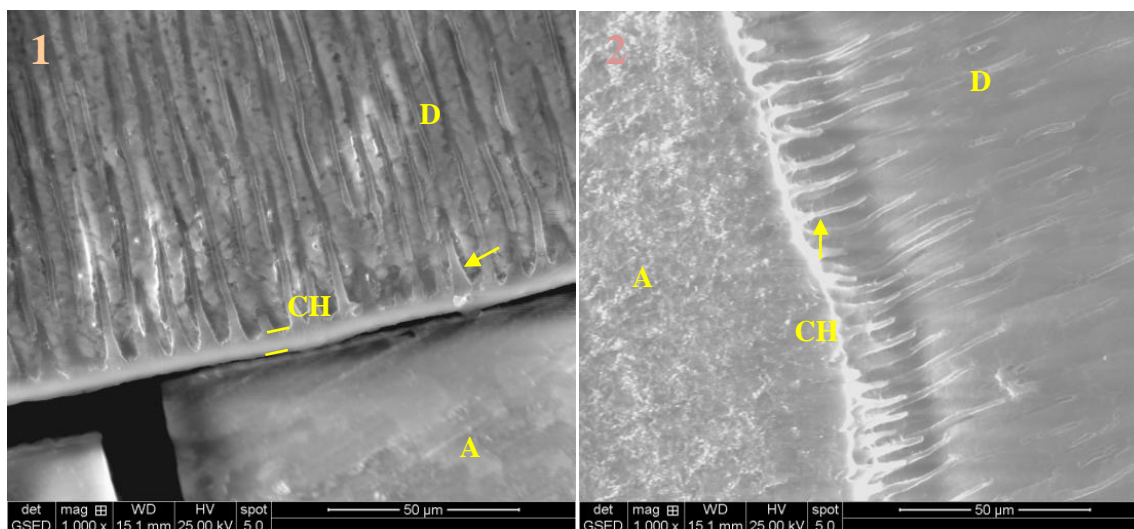


Figura 37 - Camada híbrida formada com Adper Single Bond 2[®] na dentina tratada com clorexidina. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida (entre as barras). As setas apontam os tags de resina.

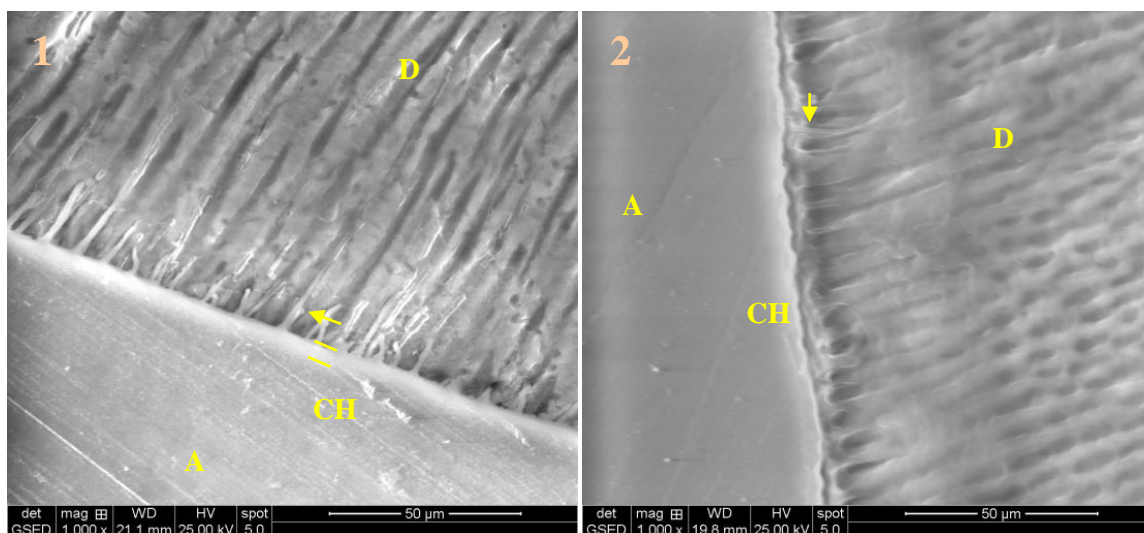


Figura 38 - Camada híbrida formada com Clearfil SE Bond[®] na dentina tratada com clorexidina. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida (entre as barras). As setas apontam os tags de resina.

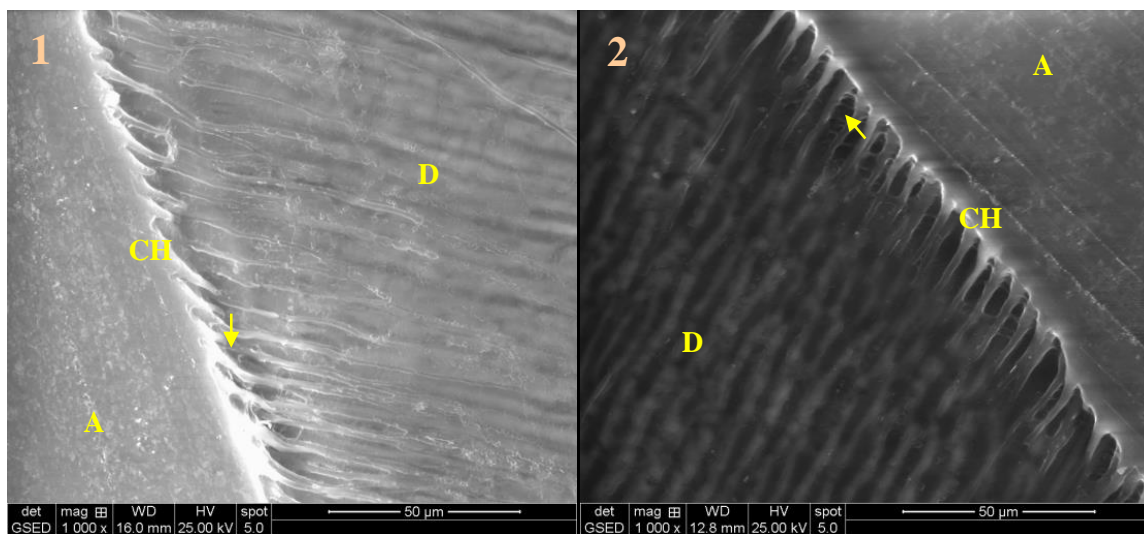


Figura 39 - Camada híbrida formada com Adper Single Bond 2[®] na dentina tratada com óleo de copaíba. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida. As setas apontam os *tags* de resina.

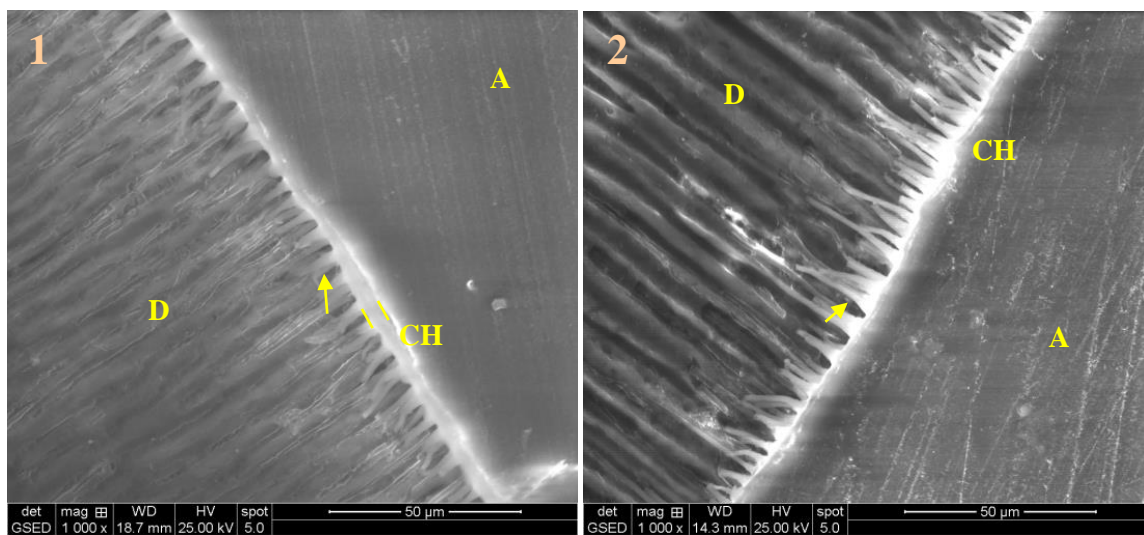


Figura 40 - Camada híbrida formada com Clearfil SE Bond[®] na dentina tratada com óleo de copaíba. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida (entre as barras). As setas apontam os *tags* de resina.

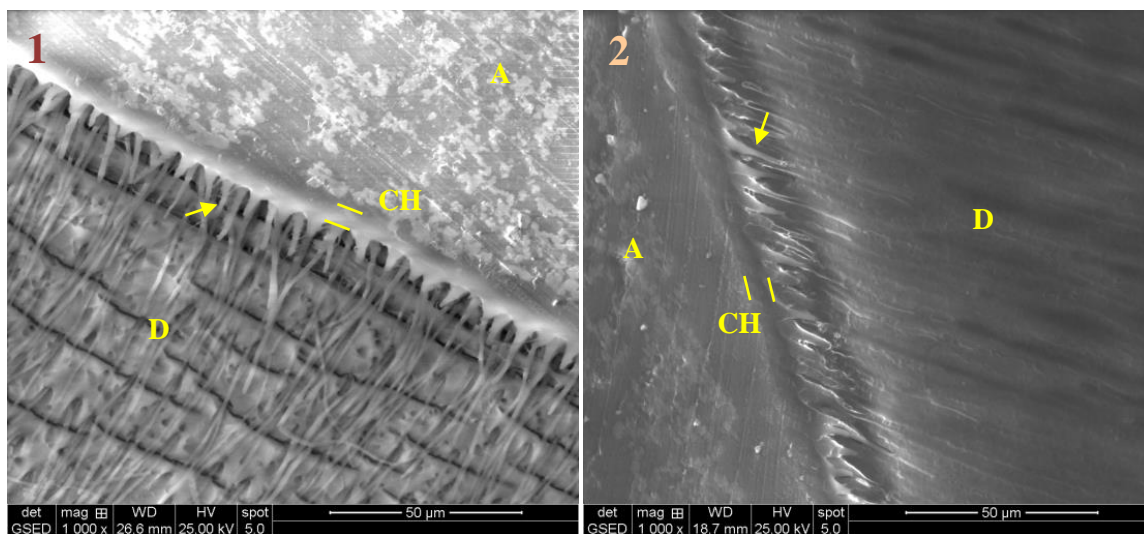


Figura 41 - Camada híbrida formada com Adper Single Bond 2[®] na dentina tratada com solução de hidróxido de cálcio. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida (entre as barras). As setas apontam os *tags* de resina.

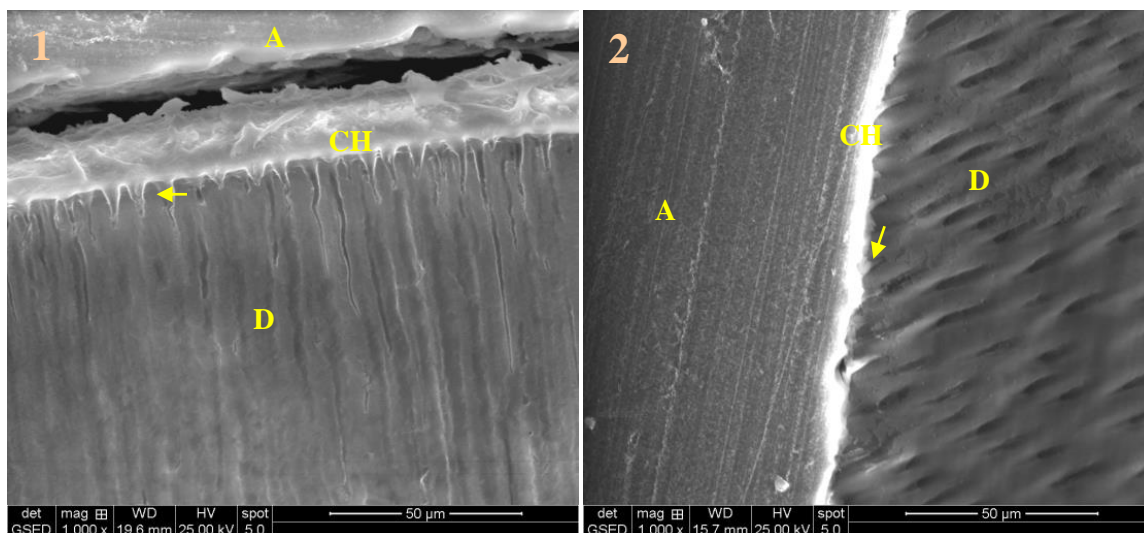


Figura 42 - Camada híbrida formada com Clearfil SE Bond[®] na dentina tratada com solução de hidróxido de cálcio. 1) Dentina hígida. 2) Dentina afetada por cárie. A: Adesivo. D: Dentina. CH: Camada híbrida. As setas apontam os *tags* de resina.

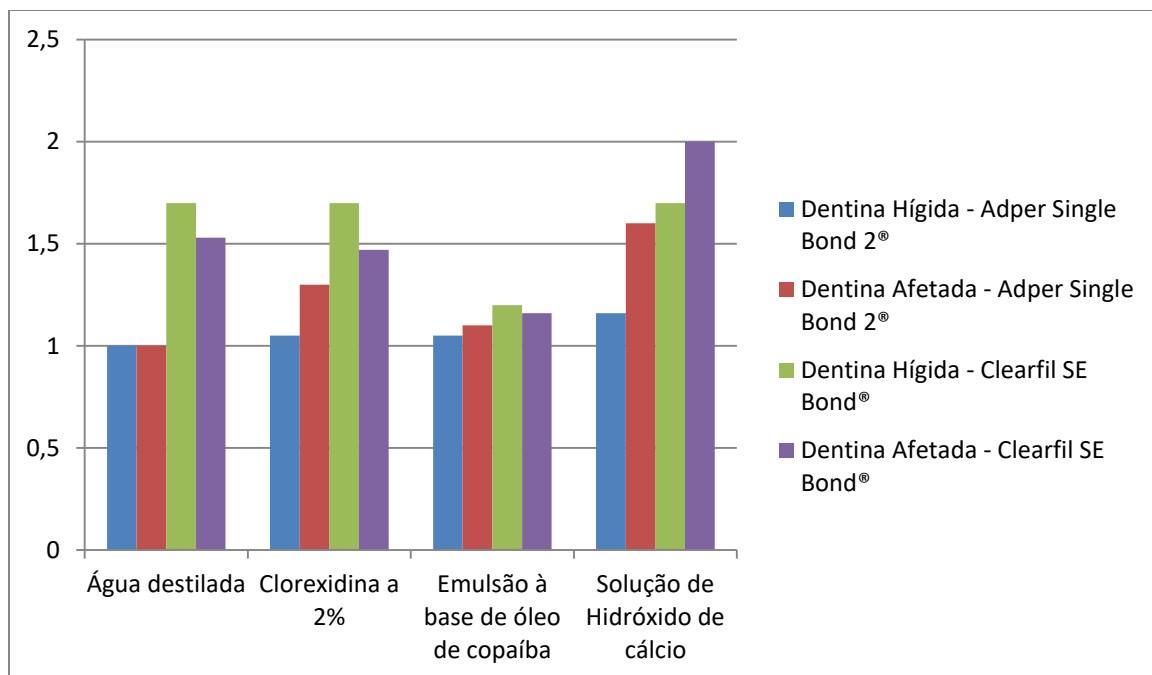


Gráfico 1 – Diferença entre as médias dos escores da camada híbrida formada com os adesivos Adper Single Bond® e Clearfil SE Bond® nas dentinas hígida e afetada por cárie após o tratamento com as substâncias testes.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido às propriedades biológicas do óleo de copaíba, principalmente atividades antibacteriana e antiinflamatória, o uso de emulsões à base do óleo-resina de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) sobre a superfície dentinária poderá contribuir na resposta pulpar em cavidades profundas, em cárie recorrente e na integridade da camada híbrida devido à sua característica oleosa. Além disso, poderá viabilizar a introdução da Fitoterapia como uma opção terapêutica na Odontologia.

REFERÊNCIAS

ABINADER, C.D. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada a diferentes veículos frente à *Candida albicans* e ao *Enterococcus faecalis*. 2005. 143p. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas.

BANDEIRA, M.F.C.L.; OLIVEIRA, M.R.B.; BENATTI-NETO, C.; CAMELLI LIA, R.C. Estudo comparativo da compatibilidade biológica em molares de rato do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba) associados ao hidróxido de cálcio. *JBC*. v. 3, n. 16, p. 42-49, 1999.

BANERJEE, A.; KIDD, E.A.M., WATSON, T.F. Scanning electron microscopic observations of human dentine after mechanical caries excavation. *J Dent*. v. 28, p. 179-86, 2000.

BARBOSA, P.C.S. et al. Phytochemical Fingerprints of Copaiba Oils (*Copaifera multijuga* Hayne) Determined by Multivariate Analysis. *Chem & Biod*, v. 10, p. 1350-1360, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares – PMNPC. Brasília, p. 1-14, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília : Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº - 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Rio Grande do Sul: ANVISA, 2014.

BRESCHI, L. et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month *in vitro* study. *J Adhes Dent*, v. 11, n. 3, p. 191-198, 2009.

BUSATO, A.L.S. Dentística: Restaurações estéticas. 1 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2002.

COELHO, C. N. Emulsões amazônicas bioativas para limpeza do preparo cavitário: atividade antibacteriana, compatibilidade biológica e alteração de cor. 2011. 147f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Amazonas.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa; 2010. 546p.

FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* v.25, p.5-12, 1997.

FEJERSKOV, O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. *Caries Res.* v.38, p.82–191, 2004.

FRANCO, A.P.G.O. et al. Desinfecção de cavidades com clorexidina. UEPG. *Cien Biol e da Sa.* v. 13, n. 1-2, p. 53-58, 2007.

GATEVA, N.; KABAKTCHIEVA, R. Hybrid Layer Thickness in Primary and Permanent Teeth – A Comparison Between Total Etch Adhesives. *J of IMAB.* v.18, n.2, p. 191-199, 2012.

GUVEN, Y; AKTOREN, O. Shear bond strength and ultrastructural interface analysis of different adhesive systems to Er:YAG laser-prepared dentin. *Lasers Med Sci.* v.30, n.2, p.769-78, 2015.

HAJ-ALI, R. et al. Histomorphologic Characterization of Noncarious and Caries-Affected Dentin/Adhesive Interfaces. *J of Prost.* v. 15, n. 2, p. 82-88, 2006.

HASHIMOTO, M; NAGANO, F; ENDO, K; OHNO, H. A review: Biodegradation of resin-dentin bonds. *Japan Dent Sci Rev,* v. 47, p. 5-12, 2011.

HEGDE, M.N.; HEGDE, P.; CHANDRA, C.R. Morphological evaluation of new total etching and self etching adhesive system interfaces with dentin. *J of Cons Dent.* v.15, n.2, p.151-155, 2012.

KIDD, E.A.M.; FEJERSKOV, O. What Constitutes Dental Caries? Histopathology of Carious Enamel and Dentin Related to the Action of Cariogenic Biofilms. *J Dent Res.* v.83, p.35-38, 2004.

LAFUENTE, D. SEM Analysis of Hybrid Layer and Bonding Interface After Chlorhexidine Use. *Oper Dent.* v.37, n.2, 172-180, 2012.

LENZI, T.L. et al. Chlorhexidine does not Increase Immediate Bond Strength of Etch-and-Rinse Adhesive to Caries-Affected Dentin of Primary and Permanent Teeth. *Braz Dent J.* v.23, n.4, p.438-442, 2012.

MONDELLI, J. Proteção do Complexo Dentinopulpar. São Paulo: Artes Médicas, 1998.

NAKABAYASHI N. The hybrid layer: A resin-dentin composite. *Proceedings of the Finnish Dental Society*. v. 88, n.1, p. 322-29, 1992.

OLIVEIRA, A.C.M. et al. Evaluation of the Smear Layer and Hybrid Layer in Noncarious and Carious Dentin Prepared by Air Abrasion System and Diamond Tips. *Micros Res Tec*. v. 73, p. 597–605, 2010.

OZER, F.; BLATZ, M.B. In: ADHESIVE SYSTEMS COMPENDIUM. Self-Etch and Etch-and-Rinse Adhesive Systems in Clinical Dentistry. v.34, n.1, p.12-20, 2013.

PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Rev Bras Pl Med*, Botucatu, v.11, n.4, p.465-472, 2009.

PIERI, F.A. et al. Bacteriostatic Effect of Copaiba Oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Braz Dent J*. v.23, n.1, p.36-38, 2012.

RICCI, H.A. et al. Influência da Clorexidina na Capacidade de Umectabilidade da Dentina Húmida e Afetada por Cárie por um Sistema Adesivo. *Rev Odontol Bras Central*. v.20, n.53, 2011.

RICCI, H.A. Efeito de diferentes soluções de clorexidina na produção e estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie. 2012. 137 f. Dissertação (Tese de Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araraquara.

RICCI, H.A. et al. Wettability of chlorhexidine treated non-cariou and caries-affected dentine. *A Den J*. v. 59, p 37–42, 2014.

SANABE, M.E.; COSTA, C.A.S.; HEBLING, J. Exposed Collagen in Aged Resin-Dentin Bonds Produced on Sound and Caries-affected Dentin in the Presence of Chlorhexidine. *J Adhes Dent*. v.13, p.117-124, 2011.

SIMÕES, C.A.C.G. Formulação de um gel de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e avaliação de sua atividade antibacteriana sobre cepas de *Streptococcus* sp. isoladas da placa dental. 2004. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SKUPIEN, J.A. et al. Micromorphological Effects and the Thickness of the Hybrid Layer – A Comparison of Current Adhesive. *J Adhes Dent*. v. 12, p. 435-442, 2010.

VASCONCELOS, K.R.F. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. *Braz J of Pharm*. v. 18, p. 733-738, 2008.

WANG, Y.; SPENCER, P.; WALKER, M.P. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res A*. v.81, n.2, p.279–286, 2007.

WANG, Y.; YAO, X. Morphological/chemical imaging of demineralized dentin layer in its natural, wet state. *Dent Mat*. v. 26, p. 433–442, 2010.

ZAVGORODNIY, A.V.; ROHANIZADEH, R.; SWAIN, M.V. Ultrastructure of dentine carious lesions. *Arch of Oral Biol*. v.53, p.124–132, 2008.

APÊNDICE 1

SUPERFÍCIE DENTINÁRIA

TESTE KAPPA

```

CROSSTABS
  /TABLES=A_1a_leitura BY A_2a_leitura
  /FORMAT=AVALUE TABLES
  /STATISTICS= KAPPA

```

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_AD_HÍGIDO_ÁCIDO * 2a_AD_HÍGIDO_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	1,000	,000	4,899	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_AD_HÍGIDO_SEM_ÁCIDO * 2a_AD_HÍGIDO_SEM_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,833	,161	4,140	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_CHX_HÍGIDO_ÁCIDO * 2a_CHX_HÍGIDO_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,833	,161	4,140	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_CHX_HÍGIDO_SEM_ÁCIDO *	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%
2a_CHX_HÍGIDO_SEM_ÁCIDO						

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	1,000	,000	6,684	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_CM_HÍGIDO_ÁCIDO * 2a_CM_HÍGIDO_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,845	,105	5,546	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_CM_HÍGIDO_SEM_ÁCIDO * 2a_CM_HÍGIDO_SEM_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,581	,123	4,060	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_HC_HÍGIDO_ÁCIDO * 2a_HC_HÍGIDO_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,941	,058	7,486	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_HC_HÍGIDO_SEM_ÁCIDO * 2a_HC_HÍGIDO_SEM_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,625	,235	3,303	,001
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_AD_CÁRIE_ÁCIDO * 2a_AD_CÁRIE_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^b	Approx. T ^c	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,000 ^a	,000	,000	1,000
N of Valid Cases		24			

a. No statistics are computed because 2a_AD_CÁRIE_ÁCIDO is a constant.

b. Not assuming the null hypothesis.

c. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_AD_CÁRIE_SEM_ÁCIDO * 2a_AD_CÁRIE_SEM_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,843	,108	5,401	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_CHX_CÁRIE_ÁCIDO * 2a_CHX_CÁRIE_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,837	,105	5,334	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_CHX_CÁRIE_SEM_ÁCIDO * 2a_CHX_CÁRIE_SEM_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,735	,119	5,125	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_CM_CÁRIE_ÁCIDO * 2a_CM_CÁRIE_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,903	,094	4,446	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_CM_CÁRIE_SEM_ÁCIDO * 2a_CM_CÁRIE_SEM_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,674	,127	4,821	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_HC_CÁRIE_ÁCIDO * 2a_HC_CÁRIE_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	1,000	,000	6,447	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1a_HC_CÁRIE_SEM_ÁCIDO * 2a_HC_CÁRIE_SEM_ÁCIDO	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,486	,146	3,189	,001
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

APÊNDICE 2

CAMADA HÍBRIDA

TESTE KAPPA

```
CROSSTABS
  /TABLES=LEITURA_1A_1 BY LEITURA_3A_1
  /FORMAT=AVALUE TABLES
  /STATISTICS=CHISQ KAPPA
```

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_AD_HÍGIDO_SINGLE_BOND *	22	88,0%	3	12,0%	25	100,0%
3A_AD_HÍGIDO_SINGLE_BOND						

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^b	Approx. T ^c
Measure of Agreement	Kappa	,000 ^a	.	.
N of Valid Cases		22		

a. No statistics are computed because 3A_AD_HÍGIDO_SINGLE_BOND is a constant.

b. Not assuming the null hypothesis.

c. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_AD_HÍGIDO_CLEARFIL *	18	72,0%	7	28,0%	25	100,0%
3A_AD_HÍGIDO_CLEARFIL						

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,600	,160	3,019	,003
N of Valid Cases		18			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_CHX_HÍGIDO_SINGLE_BOND *	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%
2A_CHX_HÍGIDO_SINGLE_BOND						

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,400	,246	1,960	,050
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_CM_HÍGIDO_SINGLE_BOND *	20	83,3%	4	16,7%	24	100,0%
3A_CM_HÍGIDO_SINGLE_BOND						

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,643	,325	3,078	,002
N of Valid Cases		20			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_CM_HÍGIDO_CLEARFIL * 3A_CM_HÍGIDO_CLEARFIL	22	88,0%	3	12,0%	25	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,861	,135	4,077	,000
N of Valid Cases		22			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_HC_HÍGIDO_SINGLE_BOND *	23	92,0%	2	8,0%	25	100,0%
3A_HC_HÍGIDO_SINGLE_BOND						

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,862	,133	4,175	,000
N of Valid Cases		23			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_HC_HÍGIDO_CLEARFIL * 3A_HC_HÍGIDO_CLEARFIL	20	80,0%	5	20,0%	25	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,385	,161	2,696	,007
N of Valid Cases		20			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_AD_CÁRIE_SINGLE_BOND *	24	96,0%	1	4,0%	25	100,0%
3A_AD_CÁRIE_SINGLE_BOND						

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^b	Approx. T ^c
Measure of Agreement	Kappa	,000 ^a	.	.
N of Valid Cases		24		

a. No statistics are computed because 1A_AD_CÁRIE_SINGLE_BOND is a constant.

b. Not assuming the null hypothesis.

c. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_AD_CÁRIE_CLEARFIL * 3A_AD_CÁRIE_CLEARFIL	24	96,0%	1	4,0%	25	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,529	,135	3,682	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_CHX_CÁRIE_SINGLE_BOND * 3A_CHX_CÁRIE_SINGLE_BOND	24	96,0%	1	4,0%	25	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,438	,194	2,143	,032
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_CHX_CÁRIE_CLEARFIL * 3A_CHX_CÁRIE_CLEARFIL	24	96,0%	1	4,0%	25	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,386	,145	2,737	,006
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_CM_CÁRIE_SINGLE_BOND *	22	88,0%	3	12,0%	25	100,0%
3A_CM_CÁRIE_SINGLE_BOND						

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,554	,199	2,944	,003
N of Valid Cases		22			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_CM_CÁRIE_CLEARFIL * 3A_CM_CÁRIE_CLEARFIL	24	96,0%	1	4,0%	25	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,603	,157	3,547	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1A_HC_CÂRIE_SINGLE_BOND *	24	96,0%	1	4,0%	25	100,0%
3A_HC_CÂRIE_SINGLE_BOND						

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,517	,134	3,586	,000
N of Valid Cases		24			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
3A_HC_CÂRIE_CLEARFIL * 4A_HC_CÂRIE_CLEARFIL	21	87,5%	3	12,5%	24	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,438	,147	3,054	,002
N of Valid Cases		21			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

ANEXO 1

PARECER DO CEP

ANEXO 2
NORMAS DA REVISTA

