LUANA PARAISO MUNIZ

EFEITO DO DIAMINO FLUORETO DE PRATA NA INTERFACE RESINA-DENTINA SUBMETIDA A UM DESAFIO CARIOGÊNICO IN SITU E SOBRE A LONGEVIDADE DAS PROPRIEDADES ADESIVAS DA DENTINA CARIADA

EFFECT OF SILVER DIAMINE FLUORIDE ON THE RESIN-DENTIN INTERFACE UNDER IN SITU CARIOGENIC CHALLENGE AND ON THE LONGEVITY OF ADHESIVE PROPERTIES IN CARIOUS DENTIN

SÃO LUÍS, 2024

LUANA PARAISO MUNIZ

# EFEITO DO DIAMINO FLUORETO DE PRATA NA INTERFACE RESINA-DENTINA SUBMETIDA A UM DESAFIO CARIOGÊNICO IN SITU E SOBRE A LONGEVIDADE DAS PROPRIEDADES ADESIVAS DA DENTINA CARIADA

EFFECT OF SILVER DIAMINE FLUORIDE ON THE RESIN-DENTIN INTERFACE UNDER IN SITU CARIOGENIC CHALLENGE AND ON THE LONGEVITY OF ADHESIVE PROPERTIES IN CARIOUS DENTIN

> Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de Doutora em Odontologia.

> Área de Concentração: Odontologia Integrada

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Suelen Figuerêdo de Siqueira

Co-orientador: Prof. Dr. Andres Felipe Millan Cardenas

SÃO LUÍS, 2024

Dados Internacionais de Catalogação na PublicaçãoUniversidade CEUMA Rede de Bibliotecas CEUMA Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Proibida a reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio eletrônico ou mecânico, inclusive através de processos xerográficos, sem permissãoexpressa do Autor. (Artigo 184 do Código Penal Brasileiro, com a nova redação dada pela Lei n.8635, de 16-03-1993). Universidade Ceuma - UNICEUMA Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão Doutorado em Odontologia

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese apresentada por Luana Paraiso Muniz

E aprovada pela comissão julgadora em \_\_\_/\_\_/

Profa. Dra. Fabiana Suelen Figuerêdo de Siqueira Presidente da Banca e orientador Universidade CEUMA

Prof Dr<sup>o</sup> Alessandro Dourado Loguércio Universidade Estadual de Ponta Grossa- UEPG

Profa. Dra. Ana Cláudia Rodrigues Chibinski Universidade Estadual de Ponta Grossa- UEPG

Profa. Dra. Leily Macedo Firoozmand Universidade Federal do Maranhão- UFMA

Prof. Drº Edilausson Moreno Carvalho

Universidade CEUMA

## AGRADECIMENTOS

A Deus, porque sem Ele nada sou. Meu coração sempre será seu, Senhor! Toda honra e toda glória a Ti, que me guiou, fortaleceu e me trouxe até aqui.

Ao meu marido João, tão fundamental na minha caminhada. Obrigada por todo o amor, por ser mais do que minha melhor companhia, e por ser um dos maiores e melhores exemplos de profissional. Aprendo com você todos os dias. Obrigada por cuidar de nós e por estar ao meu lado sempre. Amo você.

Aos meus filhos, Vinicius e Luísa, que são a razão de tudo. Vocês são tão pequenos, mas gigantes no significado que têm em minha vida. A doçura, o amor, o carinho e a compreensão que vocês me oferecem, mesmo vendo-me lutar para tornar suas vidas mais felizes, aquecem meu coração e fazem de mim a pessoa mais feliz do mundo. Obrigada, Deus, por essas bênçãos!

Aos meus pais, Sônia e Adolfo, minha eterna gratidão! Obrigada por sempre estarem ao meu lado, por acreditarem em mim e por me apoiarem incondicionalmente. Ter vocês como pais é uma bênção. O amor e a força que me deram me tornaram uma pessoa mais forte e confiante. Todo o meu amor e gratidão.

Aos meus professores e orientadores, Fabiana e Andres, que se tornaram grandes inspirações acadêmicas em minha vida. Vocês são muito mais que mestres: são exemplos de dedicação e doação, sempre guiando de forma motivadora e gentil. Serei eternamente grata por ter tido a honra de ser aluna de vocês.

Aos professores da pós-graduação do UNICEUMA e da Universidade Federal de Uberlândia, que foram essenciais na construção da minha jornada acadêmica e pessoal. Continuarão sendo parte fundamental dessa trajetória

Aos meus amigos de jornada, Rossana, Gustavo Garcia e Pedro Henrique, que foram indispensáveis para tudo o que construí. Não teria chegado até aqui sem vocês. Minha gratidão eterna, amigos!

À FAPEMA, pela concessão da bolsa de estudos durante dois anos, que possibilitou a realização deste curso de pós-graduação.

"Mais bonito que o canto dos pássaros, são seus voos pois nem todo canto é de alegria, mas todo voo é de liberdade".

(Mario Quintana)

## SUMÁRIO

| INTRODUÇÃO GERAL                         | 15 |
|--|----|
| CAPÍTULO 1                               | 18 |
|  | 21 |
| MATERIALS AND METHODS                    | 22 |
| Selection And Teeth Preparation          | 22 |
| Experimental Design                      | 22 |
| Randomization And Allocation Concealment | 23 |
| Blinding                                 | 23 |
| Production Of Artificial Dentine Caries  | 23 |
| Restorative Procedures                   | 24 |
| Microtensile Bond Strength Test (Mtbs)   | 25 |
| Chemical Microanalysis By Edx-Sem        | 26 |
| Statistical Analysis                     | 30 |
| RESULTS                                  | 30 |
| Microhardness Test (Khn)                 | 30 |
| Microtensile Bond Strength (Mtbs)        | 31 |
| Chemical Microanalysis By Edx-Sem        | 32 |
| DISCUSSION                               | 37 |
| CONCLUSION                               | 40 |
| REFERENCES                               | 42 |
| CAΡ(ΤΙΙΙ Ο 2                             | 47 |

| CAPITULO 2   | 47 |
|--|----|
| INTRODUÇÃO   | 51 |
| MATERIAIS E MÉTODOS                                | 52 |
| Aspectos Éticos                                    | 52 |
| Cálculo Amostral                                   | 53 |
| Desenho Experimental                               | 53 |
| Procedimento Restaurador E Preparo Dos Espécimes   | 56 |
| Desafio Cariogênico <i>In Situ</i>                 | 56 |
| Teste De Resistência De União À Microtração (Mtbs) | 57 |
|  |    |

| Microanálise Química Por Edx-Sem | .58 |
|----------------------------------|-----|
| Análise Estatística Dos Dados    | .58 |
| RESULTADOS                       | .59 |
| In Situ                          | .61 |
| Microanálise Química Por Edx-Sem | .63 |
| DISCUSSÃO                        | .65 |
| CONCLUSÃO                        | .68 |
| REFERÊNCIAS                      | .69 |

| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 73 |
|----------------------|----|
| REFERÊNCIAS          | 74 |
| APÊNDICE             | 77 |
| ANEXOS               | 80 |

## LISTA DE TABELAS

## **CAPÍTULO 1**

| Table 1. Adhesive systems, groups, compositions, and application modes | 24   |
|--|------|
| Table 2. Knoop microhardness values                                    | . 28 |
| Table 3. Number of specimens (%)                                       | . 30 |
| Table 4. Means and standard deviations of microtensile bond strength   | . 31 |

## **CAPÍTULO 2**

| Tabela 1. Modo de aplicação dos adesivos                                   | . 51 |
|--|------|
| Tabela 2. Número de palitos (%) de acordo com o modo de fratura            | . 58 |
| Tabela 3. Médias e desvios-padrão da resistência de união resina-dentina p | bara |
| todos os grupos experimentais  | . 59 |

## LISTA DE FIGURAS

## **CAPÍTULO 1**

Figura 1A. Representative EDX images of caries-affected dentin after treatment % % with 12 and 38 silver diamine fluoride (SDF) Figura 1B. Representative EDX images of caries-affected dentin treated with 12 % and 38 % SDF solutions using Single Bond Universal after 2 years of water Figura 1C. Representative EDX images of caries-affected dentin after treatment with 12 % and 38 % SDF solutions for Clearfil Universal Bond Quick, evaluated at Figura 1D. Representative EDX images of caries-affected dentin treated with 12 % and 38 % SDF solutions for Clearfil Universal Bond Quick after 2 years of water 

## CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Imagens representativas de EDX das interfaces adesivas resina-dentina após tratamento com soluções de diamino fluoreto de prata (DFP) ...... 61

MUNIZ, LP. Efeito do diamino fluoreto de prata na interface resina-dentina submetida a um desafio cariogênico in situ e sobre a longevidade das propriedades adesivas da dentina cariada (tese). São Luís; Universidade CEUMA; 2024.

#### RESUMO

Introdução: O diamino fluoreto de prata (DFP) é o único material odontológico disponível que associa a remineralização das estruturas dentárias proporcionada pelo fluoreto de sódio com efeito antibacteriano sobre os microorganismos da cárie pela ação do nitrato de prata Objetivo: Este estudo investiga as propriedades adesivas do DFP em lesões cariosas de dentina, tanto imediatamente quanto após dois anos de armazenamento em água, bem como as propriedades mecânicas e adesivas da interface resina-dentina tratadas com DFP 38% sob desafio cariogênico in situ. Materiais e métodos: No capítulo 1, foram utilizados 96 molares humanos, que foram submetidos à produção artificial de cárie dentinária e divididos em 12 grupos. Os grupos foram organizados conforme a aplicação de diferentes soluções de DFP (12% e 38%), dois adesivos universais (Clearfil Universal Bond Quick [CUQ] e Single Bond Universal [SBU]), e duas estratégias adesivas (etch-and-rinse [ER] e self-etch [SE]). Após a aplicação do DFP e dos adesivos, os dentes foram restaurados, seccionados e submetidos ao teste de resistência de união por microtração (µTBS), bem como à análise por espectrometria de raios X por energia dispersiva para analisar a deposição de Ag e aumento dos picos de Ca para avaliar qualitativamente a composição guímica da camada adesiva e propriedades mecânicas da interface adesiva. Estes testes foram realizados tanto imediatamente quanto após dois anos de armazenamento em água. Os dados foram analisados por ANOVA de guatro fatores e teste de Tukey ( $\alpha$  = 0,05). No capítulo 2, 56 molares humanos foram divididos em 8 grupos para avaliar o efeito do DFP 38% em combinação com dois sistemas adesivos (SBU e ZIPbond [ZIP]) e duas estratégias adesivas (ER e SE). Os espécimes foram avaliados imediatamente e após 14 dias de desafio cariogênico in situ, durante o qual os dentes foram expostos a um ambiente cariogênico utilizando dispositivos intraorais em 20 voluntários. Após o período de exposição, os espécimes foram submetidos a testes de resistência de união e microanálise química qualitativa para analisar a deposição de Ag e aumento do pico de Ca. Os dados também foram analisados por ANOVA de quatro fatores e teste de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) (tempo de armazenamento, DFP, adesivo e estratégia adesiva). Resultados: No Capítulo 1, após dois anos de armazenamento, os grupos que receberam DFP apresentaram valores de µTBS mais elevados em comparação ao grupo controle. Houve uma diminuição insignificante nos valores de µTBS para SBU ao comparar os resultados imediatos com os de dois anos. No entanto, houve uma diminuição significativa nos valores de µTBS para CUQ após dois anos. No Capítulo 2, após o desafio in situ, os valores mais altos de resistência de união foram observados nos grupos onde DFP foi aplicado, independentemente do adesivo universal ou da estratégia adesiva utilizada. A análise da interface resina-dentina mostrou um aumento dos picos de cálcio (Ca) e presença de picos de prata (Ag) após o tratamento com DFP, tanto no início quanto após o desafio *in situ*. **Conclusão:** O uso do DFP, independentemente da estratégia adesiva, mostrou-se uma alternativa promissora para manter a adesão dos adesivos universais em lesões cariosas de dentina ao longo do tempo. A aplicação de DFP 38% preservaram os valores de resistência de união e aumentou os picos de cálcio e prata na interface resina-dentina, mesmo após o desafio cariogênico *in situ*, indicando sua eficácia em manter a integridade da resistência de união.

**Descritores:** Diamino fluoreto de prata, Resistência de união à microtração, Longevidade da ligação, Dentina afetada por cárie.

MUNIZ, LP. Effect of silver diamine fluoride on the resin-dentin interface under in situ cariogenic challenge and on the longevity of adhesive properties in carious dentin. (*thesis*). São Luis; CEUMA University; 2024.

## ABSTRACT

Introduction: Silver diamine fluoride (SDF) is the only dental material available that combines the remineralization of dental structures, provided by sodium fluoride, with an antibacterial effect on cariogenic microorganisms through the action of silver nitrate. Materials and methods In Chapter 1, 96 human molars were used, which were subjected to artificial dentin caries production and divided into 12 groups. The groups were organized according to the application of different concentrations of SDF (12% and 38%), two universal adhesives (Clearfil Universal Bond Quick [CUQ] and Single Bond Universal [SBU]), and two adhesive strategies (etch-and-rinse [ER] and self-etch [SE]). After the application of SDF and the adhesives, the teeth were restored, sectioned, and subjected to microtensile bond strength testing (µTBS) as well as energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis to evaluate Ag deposition and increased Ca peaks, aimed at qualitatively assessing the chemical composition of the adhesive layer and the mechanical properties of the adhesive interface. These tests were performed both immediately and after two years of water storage. The data were analyzed using four-way ANOVA and Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ ). In Chapter 2, 56 human molars were divided into 8 groups to evaluate the effect of 38% SDF in combination with two adhesive systems (SBU and ZIPbond [ZIP]) and two adhesive strategies (ER and SE). The specimens were evaluated immediately and after 14 days of in situ cariogenic challenge, during which the teeth were exposed to a cariogenic environment using intraoral devices in 20 volunteers. After the exposure period, the specimens underwent bond strength testing and qualitative chemical microanalysis to assess Ag deposition and increased Ca peaks. The data were also analyzed using four-way ANOVA and Tukey's test (a = 0.05) (storage time, SDF, adhesive, and adhesive strategy). Results: In Chapter 1, after two years of storage, the groups that received SDF showed higher µTBS values compared to the control group. There was an insignificant decrease in µTBS values for SBU when comparing immediate results to those after two years. However, there was a significant decrease in µTBS values for CUQ after two years. In Chapter 2, after the in situ challenge, the highest bond strength values were observed in the groups where SDF was applied, regardless of the universal adhesive or adhesive strategy used. The analysis of the resindentin interface showed an increase in calcium (Ca) peaks and the presence of silver (Ag) peaks after SDF treatment, both at the initial time point and after the in situ challenge. Conclusion: The use of SDF, regardless of the adhesive strategy, proved to be a promising alternative for maintaining the adhesion of universal adhesives to carious dentin lesions over time. The application of 38% SDF preserved bond strength values and increased calcium and silver peaks at the resin-dentin interface, even after the in situ cariogenic challenge, indicating its effectiveness in maintaining bond strength integrity.

Keywords: Silver diamine fluoride, Microtensile bond strength, Bond longevity, Caries-affected dentin.

#### INTRODUÇÃO GERAL

A cárie dentária é uma doença altamente prevalente [1], sendo um importante problema de saúde pública. Esta doença multifatorial afeta de forma adversa a estrutura do dente [2], gerando perda da estrutura dentária devido a uma redução nos componentes minerais que aumentam a porosidade, promovendo alterações na estrutura do colágeno, no conteúdo de proteínas não colagenosas, e reduzindo significativamente as propriedades mecânicas desse substrato [3,4].

Essas modificações químicas, biológicas e físicas que ocorrem durante o processo de cárie afetam a adesão a essa estrutura [5,6]. Como resultado, observa-se uma menor resistência de união à dentina desmineralizada por cárie em comparação com a resistência de união à dentina sadia [7-9], juntamente com uma camada mal hibridizada [9], independe da estratégia adesiva empregada [10,11].

Notavelmente, o diamino fluoreto de prata (DFP) emergiu como uma alternativa eficaz [12]. Composto por prata iônica, amônia, água e flúor [13], o DFP eleva o pH do biofilme, atenuando a desmineralização da dentina, e exibe atividade antimicrobiana contra bactérias cariogênicas por meio de nitrato de prata [12,14-16]. Uma vez que a progressão das lesões cariosas é interrompida, a restauração adesiva surge como uma solução potencial para abordar esses problemas. No entanto, ainda não se chegou a um consenso sobre o impacto do DFP nas propriedades adesivas dos materiais restauradores [17].

Não há consenso na literatura se o diamino fluoreto de prata afeta negativamente a adesão quando adesivos são aplicados na dentina [18-20]. Diante dessa variabilidade, investigações adicionais sobre a influência do DFP nas propriedades adesivas na dentina afetada por cárie são consideradas pertinentes. Considerando a necessidade de restaurações duradouras, torna-se fundamental explorar os efeitos a longo prazo [17].

Adicionalmente, seguindo a tendência de simplificação e atendendo às necessidades dos dentistas por procedimentos mais rápidos, menos sensíveis e técnicas mais fáceis de usar [21], foram lançados no mercado sistemas adesivos universais, proporcionando aos dentistas a opção de escolher entre uma estratégia adesiva etch-and-rinse (ER) e self-etch (SE), ou "condicionamento ácido seletivo do esmalte dentário" [22].

Esses avanços nos sistemas adesivos universais oferecem maior flexibilidade aos profissionais, permitindo otimizar o tratamento de acordo com as necessidades clínicas. No entanto, além de considerar a escolha do sistema adesivo, também é fundamental analisar o impacto de fatores clínicos e biológicos no sucesso dos procedimentos restauradores. Nesse contexto, o modelo de estudo *in situ* surge como uma ferramenta relevante para investigar a influência do DFP, especialmente na adesão à dentina afetada por cárie, na composição do biofilme dental e no processo de desmineralização frente ao desafio cariogênico

Os estudos *in situ* mostraram-se uma metodologia viável e de curta duração para investigar degradação do substrato dental [23]. Estes envolvem o uso de aparelhos ou dispositivos que criam condições definidas na boca humana e expõe as amostras ao ambiente oral mais próximo do possível da realidade [24]. Servem como uma ponte entre a situação clínica natural não controlada e a laboratorial altamente controlada.

Esses modelos incluem um substrato dental (esmalte ou dentina), biofilme dental com potencial cariogênico (presença ou formação), desafio cariogênico (controlado experimentalmente ou fornecido ao indivíduo) e tempo (período do experimento). A intenção desses modelos é transcrever o que ocorre no processo natural das amostras submetidas ao desafio cariogênico e ainda prover informações clínicas relevantes em um curto período sem causar danos irreversíveis aos dentes naturais [24].

No presente estudo, foram desenvolvidos dois estudos laboratoriais. O primeiro, teve como objetivo avaliar a resistência à microtração (µTBS) e a composição química da camada adesiva por espetroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX-SEM) imediata e após dois anos de armazenamento em água de dois adesivos universais em dentina afetada por cárie aplicados nas estratégias ER ou SE. As hipóteses nulas testadas foram que, em cárie, o uso de diamino fluoreto de prata não influenciaria a resistência de união à microtração (µTBS) independentemente do (i) adesivos universais aplicados; (ii) modo de aplicação (condicionamento total e autocondicionante) e (iii) quando avaliados imediatamente ou após dois anos de armazenamento em água.

O segundo estudo, tem como o objetivo avaliar a interface adesiva tratada com DFP 38% quando submetido a desafio cariogênico *in situ*. As

seguintes hipóteses nulas testadas:(i) as propriedades mecânicas (resistência de união a microtração (µTBS) e (i) propriedades adesivas da interface de união resina-dentina (EDX/SEM) tratadas com DFP 38% não são afetadas por desafios cariogênicos *in situ.* 

**CAPÍTULO 1** 

# Effect of silver diamine fluoride on the longevity of adhesive properties to caries-affected dentine.

### Artigo publicado no Journal of Dentistry

Luana Paraiso Muniz, DDS, MSc, PhD Student. Department of Postgraduate Program in Dentistry, CEUMA University, São Luis, Maranhão, Brazil.E-mail: <u>luanaparaiso@yahoo.com.br</u>

Michel Wendlinger, DDS, MSc, PhD Student. Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil. E-mail: <u>michelwenflinger@gmail.com</u>

Gabriel David Cochinski. Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil. E-mail: gabriel.d.cochinski@gmail.com

Pedro Henrique de Aguiar Moreira, DDS, MSc, PhD Student. Department of Postgraduate Program in Dentistry, CEUMA University, São Luis, Maranhão, Brazil. E-mail: <u>opedrohenrique@yahoo.com</u>

Andres Felipe Millan Cardenas, DDS, MSc, PhD. Professor of Department of Postgraduate Program in Dentistry, CEUMA University, São Luis, Maranhão, Brazil. E-mail: <u>andresfelipemillancardenas@hotmail.com</u>

Thiago Saads Carvalho. Universität Bern | UniBe · Department of Restorative Preventive and Pediatric Dentistry, Switzerland.

\*Alessandro D. Loguercio, DDS, MSc, PhD. Professor of Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil. E-mail: <u>aloguercio@hotmail.com</u>

Alessandra Reis, DDS, PhD. Professor of Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil. E-mail: reisale@hotmail.com

Fabiana Suelen Figuerêdo de Siqueira, DDS, MSc, PhD. Professor of Department of Postgraduate Program in Dentistry, CEUMA University, São Luis, Maranhão, Brazil. E-mail: <u>fabisfsiqueira@hotmail.com</u>

\*Corresponding author. E-mail address: <u>aloguercio@hotmail.com</u> (A. Loguercio).

Received 21 November 2023; Received in revised form 16 February 2024; Accepted 20 February 2024 Available online 21 February 2024 0300-5712/© 2024 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### ABSTRACT

**Objectives:** This study aimed to evaluate the adhesive properties in dentine after the application of silver diamine fluoride (SDF) on carious dentine lesions immediately and after 2 years of water storage. Methods: 96 human molars used were subjected to artificial dentine caries production, and then randomly divided into 12 experimental groups according to 1. application of an SDF solution (carious dentine lesion without SDF treatment [control], with 12 % silver diamine fluoride [SDF 12 %] or 38 % silver diamine fluoride [SDF 38 %]);2. Universal adhesives (Clearfil Universal Bond Quick [CUQ] and Single Bond Universal [SBU]); 3. Adhesive strategy (etch-and-rinse [ER] and self-etch [SE]). After restoration, the specimens were sectioned and submitted to the microtensile bond strength test (µTBS) and energy-dispersive X-ray spectrometry analysis (SEM/EDX). All tests were performed immediately and after 2 years of water storage. Data from the µTBS were analyzed using four-way ANOVA and Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ ). **Results:** Only the interaction of factors 'SDF' vs 'time' was significant (p = 0.03). After 2 years of storage, the groups where SDF was applied showed higher µTBS values compared to the control group. No significant decrease in µTBS values was observed for SBU when comparing immediate and 2-year results, but a significant reduction in µTBS values was observed after 2 years for CUQ. Conclusion: Independent of the adhesive strategy, the use of SDF may be a promising alternative to maintain the bonding of universal adhesives to carious dentinal lesions.

**Clinical relevance** This study may clarify and support clinicians regarding the longevity of resin-based restoration in caries-affected dentine treated with silver diamine fluoride.

Keywords: Silver diamine fluoride. Microtensile bond strength. Bonding longevity

Caries-affected dentine

#### INTRODUCTION

Dental caries is a highly prevalent disease, with a global prevalence estimated at 35 % by 2020 [1,2]. While its occurrence has decreased in most countries in recent years, it still constitutes a significant public health issue [3]. This multifactorial disease adversely affects tooth structure, leading to structural loss due to diminished mineral components, heightened porosity, and alterations in collagen structure [4,5].

Conventional dentine caries management has historically focused on resolving the issue through the removal of diseased tissues and subsequent restoration of the defect [5]. It is crucial to acknowledge that mechanical tooth preparation is a destructive and irreversible procedure that involves the removal of natural dental tissues [6]. The contemporary philosophy of caries management has transitioned from the traditional surgical approach to a medical model, often integrating fluoride therapy.

Notably, silver diamine fluoride (SDF) has emerged as an efficacious alternative [7]. Comprising ionic silver, ammonia, water, and fluorine [8], SDF raises the pH of the biofilm, mitigating dentine demineralization, and exhibits antimicrobial activity against cariogenic bacteria through silver nitrate [7,9–11]. However, the use of SDF treatment results in the discoloration of carious lesions, turning them black [8]. This discoloration may raise aesthetic concerns. Once the progression of carious lesions has been halted, adhesive restoration emerges as a potential solution to address these issues.

Nevertheless, a consensus regarding the impact of SDF on the adhesive properties of restorative materials is yet to be reached. While some studies suggest that the application of SDF does not affect bond properties [12], others demonstrate a negative impact on bonding, with the severity of this impact appearing to be closely tied to the specific application protocol employed [13]. Given this variability, further investigations into the influence of SDF on bonding properties in caries-affected dentine are deemed pertinent. Notably, another study has already delved into this subject [14]. Siqueira et al. [12] assessed the effect of SDF on caries-affected dentine, revealing an enhancement in adhesive properties, albeit with a focus solely on immediate data. Considering the necessity for enduring restorations, it becomes imperative to explore the longterm effects. As far as the authors are aware, the impact of SDF on cariesaffected dentine over an extended period remains unknown.

Therefore, the present study aimed to evaluate the microtensile bond strength ( $\mu$ TBS) and chemical composition of the adhesive layer by energy dispersive x-ray spectroscopy (EDX-SEM) of two universal adhesives in caries-affected dentine applied in the etch-and-rinse (ER) and self-etch (SE) strategies. The null hypotheses tested were that, in carious dentine, the use of silver diamine fluoride would not influence the microtensile bond strength ( $\mu$ TBS) regardless (i) universal adhesives applied or (i) application mode (i.e., etch-and-rinse or self-etch) or when evaluated (iii) immediately or after two years water storage.

#### MATERIALS AND METHODS

#### Selection and teeth preparation

A total of 96 extracted caries-free human molars were used in this study. The teeth were collected after the patient's informed consent and approval of the ethics committee of the State University of Ponta Grossa, PR, Brazil, under protocol #2.631.289. Teeth were disinfected in 0.5 % chloramine and the occlusal dentine surface was exposed by removal of the occlusal third of the crown for all teeth with a diamond saw (Isomet, Buehler; Lake Bluff, IL, USA) under water cooling, to obtain a flat dentine surface.

#### **Experimental design**

The present study was made up of four main variables: I) Silver diamine fluoride treatment, subdivided into 3 levels; II) Adhesive System, with 2 levels; III) Adhesive Strategy, with 2 levels; and IV) Storage Time with 2 levels. A total of 96 teeth were divided into 12 groups (n =8), according to variables I, II, and III. For variable IV (Storage Time), specimens from the same tooth were taken for both levels. Silver diamine fluoride treatment levels were: (1) no use of silver diamine fluoride treatment (control); (2) application of 12 % silver diamine fluoride (SDF 12 %); 3) 38 % silver diamine fluoride (SDF 38 %).

The adhesive Systems were: (1) Clearfil Universal Bond Quick (CUQ, Kuraray Noritake; Tokyo, Japan), and (2) Single Bond Universal (SBU, also known as Scotchbond Universal in some countries, 3M Oral Care; St Paul, MN,

USA). The adhesive strategy levels were: (1) Self-etch (SE) and (2) Etch-andrinse (ER). And then storage times were: (1) Immediately and (2) after 2 years of storage. The materials used, batch numbers, composition, and application modes are described in Table 1.

#### Randomization and allocation concealment

Block randomization was performed for 96 teeth, with block sizes of 3, based on the 'Silver diamine fluoride treatment' factor to ensure equal-sized groups with an equal allocation ratio. The randomization was stratified for 'Adhesive System' and 'Adhesive Strategy'. Tools available on the website www.sealedenvelope.com were utilized for this process. A researcher not involved in the research protocol (blinded) carried out the randomization, and the details of the allocated groups were recorded on cards within black, sealed, opaque, and sequentially numbered envelopes. These envelopes were opened only on the day of the restorative procedure, ensuring the blinding of the randomization sequence.

#### Blinding

This study was a blinded study in which the evaluator (responsible for testing specimens in microtensile bond strength and chemical microanalysis) was blinded to the assigned group. Unfortunately, due to differences in the packaging of the two SDF formulations evaluated, as well as the formation of visible precipitates on the dentin surface after SDF application, the operator (responsible for restoring all specimens) was not blinded to the group assignment. In addition to the operator and evaluator, a third person, not involved in the tasks, was responsible for the production of artificial dentine caries and removal of decayed dentin, previously to restorative procedure.

#### Production of artificial dentine caries

The teeth were initially sealed with a layer of epoxy adhesive (Ciba Espec Quim, São Paulo, SP, Brazil) followed by a layer of nail polish leaving the occlusal dentine surface exposed. The specimens were then immersed in a cariogenic medium consisting of 3.7 g of BHI [Becton Dickinson in Sparks, MD, USA] along with 2 g of sucrose, 1 g of glucose, and 0.5 g of yeast extract (Sigma-Aldrich in

St Louis, MO, USA) in 100 ml of distilled water. The solution was sterilized at 121 •C for 20 min in an autoclave before being inoculated with 108 CFU/ml of Streptococcus mutans ATCC 25,175 (obtained from the National Institute of Quality Control in Health in Fiocruz, RJ, Brazil). The teeth were then incubated at 37 °C in a micro-aerophilic jar for 14 days. During this time, the cariogenic solution was replaced every 48 h without new bacterial inoculation. The biofilm was removed with gauze, and the insulating materials were manually removed with scalpel blades. The teeth were washed thoroughly in deionized water, and a darkened, softened dentine surface was easily identified using an exploratory probe [12,15]. The outer softened carious dentine layer was removed through hand-polishing with 600-grit silicon carbide paper for 20 s, with soft pression. This procedure was applied only once to preserving the firm carious dentine lesion and yielding a flat dentine surface [12]. The limit for the removal of the softened carious tissue was identified when the dark dentine surface firmly resisted a sharp excavator but needed some pressure during manual removal [16]. This procedure was carried out by a single calibrated, and experienced operator who had been trained beforehand.

All teeth underwent a microhardness test before the demineralization process (sound dentin), immediately after inducing the caries lesion on the tooth surface, and after removing the outer softened carious dentin layer, as previously described. To confirm dentin demineralization, a microhardness test was performed using a Shimadzu HMV II microhardness meter (Kyoto, Japan) with a Knoop indenter. A static load of 25 g was applied for 30 s on sound dentin, while 10 g was applied for 30 s on carious dentin. The use of different loads was necessary, as it would not be feasible to achieve well-defined indentations with minimal fractures around them in both types of tissues, considering their distinct structures, using the same load [17]. All these procedures were performed to standardize the creation of carious lesions in all teeth to be tested.

#### **Restorative procedures**

Following the removal of the soft carious tissue, the teeth were randomized and allocated into the experimental groups, each with eight teeth. For the control groups, no treatment with SDF was made, and for the other groups, the dentine surface underwent treatment SDF of 12 % or 38 %. For SDF 12 %, it was applied for 3 min and rinsed for 30 s (Table 1). Regarding SDF 38 %, step one (grey label) was applied for 1 min, immediately followed by the application of a generous amount of solution (green label) until the creamy precipitate turned clear, and then rinsed for 30 s and air-dry for 5 s (Table 1). The different concentrations of SDF were applied using a microbrush (Points, SDI Limited, Bayswater, Victoria, Australia). Bonding procedures were then carried out, according to the specific experimental groups. All application procedures were carried out by a single calibrated operator, adhering to the instructions provided by the respective manufacturers (Table 1).

After the bonding procedure, a composite restoration (Opallis, FGM, Joinville, SC, Brazil) was applied in 2 and 3 increments of 2 mm thickness, and each was light-cured for 40 s at 1 mm of distance, using an LED unit set at 1,200 mW/cm2 (Raddi, SDI Limited, Bayswater, Victoria, Australia) for all specimens. The teeth were then stored in distilled water at 37 °C for 24 h. Subsequently, they were sectioned into mesiodistal and buccal-lingual segments using a precision cutting machine (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) to obtain resin-dentine bonded sticks with a cross-sectional area of approximately 0.8 mm2, measured by a digital caliper (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Tokyo, Japan). Also, the all resindentine bonded sticks were inspected under an optical microscope (SZH- 131, Olympus; Tokyo, Japan) at 40x magnification to detect voids or cracks in the bonded interface.

The resin-dentin bonded sticks obtained per tooth were randomly assigned as follows: two resin-dentin bonded stick (one to be tested immediately and one to be tested after two years of water storage) from each tooth and each experimental condition were designated for chemical microanalysis by EDX-SEM, while the remaining specimens were allocated for  $\mu$ TBS testing. From each tooth, half of the resin-dentine bonded sticks were tested immediately, and the other half was stored in distilled water at 37 °C for 2 years.

#### Microtensile bond strength test (µTBS)

Each resin-dentine bonded stick was affixed to a Geraldeli's Jig using cyanoacrylate resin (IC-Gel, BSI Inc., Atascadero, CA, USA) and subjected to a

tensile force using a universal testing machine (Kratos, São Paulo, SP, Brazil) at a rate of 0.5 mm/min. The microtensile bond strength ( $\mu$ TBS) in megapascals (MPa) was determined by dividing the load at failure by the cross-sectional bonding area. For statistical analysis, the average  $\mu$ TBS was calculated for all resin-dentine bonded sticks originating from the same tooth and stored for the same duration (immediately or 2 years). The failure mode was assessed under an optical microscope (SZH-131, Olympus; Tokyo, Japan) at 40x magnification and classified based on previous studies [12,18,19]. The number of premature failures (PF) was documented but not included in the overall mean bond strength.

#### Chemical microanalysis by EDX-SEM

Three resin-dentine bonded sticks, from each experimental group and each storage time that had not been used in the  $\mu$ TBS test, were separated for chemical evaluation. All resin-dentine bonded sticks were ultrasonically cleaned, air-dried, mounted on stubs, polished with wet #600, 1000-, 1500-, 2000- grit SiC paper, for 10 s each with a low pressure, and coated with carbon-gold (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein).

The resin-dentine bonded stick interfaces were analyzed using a field emission scanning electron microscope (MIRA, TESCAN ORSAY HOLDING, Warrendale, PA, USA) coupled with an energy-dispersive X-ray spectrometer (EDX). The bonding area was observed, and the analyses focused on the middle of the hybrid layer. Three photomicrographs of representative surface areas were obtained at 2.500× magnification and a semiquantitative chemical microanalysis was performed via EDX-SEM. 
 Table 1. Adhesive systems (batch number), groups, compositions, and application modes\*.

| Adhesive system (batch number)  | Groups/composition   | Adhesive strategies  |  |  |  |  |  |
|---|--|--|--|--|--|--|--|
| and composition**   |  | Etch-and-Rinse (ER)  | Self-Etch (SE)   |  |  |  |  |
|   | Caries-affected dentine (CAD)  | <ol> <li>Apply etchant for 15 s.</li> <li>Rinse thoroughly.</li> <li>Blot excess water.</li> <li>Apply adhesive as for the self-etch mode.</li> </ol>  | <ol> <li>Apply adhesive to the entire<br/>surface with a microbrush and<br/>rubbing. No waiting time is required.</li> <li>Dry by blowing mild air for 5 s until<br/>the adhesive did not move.</li> <li>Light cure for 10 s at 1.200 mW/<br/>cm<sup>2</sup>.</li> </ol>   |  |  |  |  |
| Clearfil Universal Bond Quick (CUQ);<br>Kuraray CD0012) 10-MDP, BisGMA,<br>HEMA, hydrophilic amide resin<br>monomers, colloidal silica, silane<br>coupling agent, NaF,<br>camphorquinone, ethanol, water pH 2 | CAD + silver diamine fluoride 12 %<br>(CAD + SDF 12 %) (Cariestop<br>Cariostatic Biodinâmica LTDA,<br>Ibiporã, PR, Brazil) Hydrofluoridric<br>acid, 12 % silver nitrate, ammonia<br>hydroxide, and deionized water | <ol> <li>Apply etchant for 15 s.</li> <li>Rinse thoroughly.</li> <li>Blot excess water.</li> <li>Apply the SDF solution during 3 min.</li> <li>Rinsing for 30 s and air-dry for 5 s to keep the surface slightly moist.</li> <li>Apply adhesive as for the self-etch mode</li> </ol>   | <ol> <li>Apply the SDF solution during 3 min.</li> <li>Air-dry for 30 s with distilled water.</li> <li>Apply bond to the entire cavity with a microbrush and rubbing. No waiting time is required.</li> <li>Dry by blowing mild air for 5 s until the adhesive does not move.</li> <li>Light curefor 10 s at 1.200 mW/ cm<sup>2</sup>.</li> </ol>  |  |  |  |  |
|   | CAD + silver diamine fluoride 38 %<br>(CAD + SDF 38 %) (Riva Start, SDI<br>Limited, Bayswater, Victoria,<br>Australia) 30–35 % Silver fluoride,60<br>% ammonia solution, saturated KI<br>solution                  | <ol> <li>Apply etchant for 15 s.</li> <li>Rinse thoroughly.</li> <li>Blot excess water.</li> <li>Apply the grey capsule with a microbrush (1 min).</li> <li>Apply, immediately after, a generous amount of solution from green capsule to the surface until the creamy precipitate turns clear.</li> <li>Rinsing for 30 s and air-dry for 5 s to keep the surface slightly moist.</li> </ol> | <ol> <li>Apply the silver capsule with silver<br/>brush.</li> <li>Apply a generous amount of<br/>solution from green capsule to the<br/>surface until the creamy precipitate<br/>turns clear.</li> <li>Apply bond to the entire cavity with<br/>a microbrush and rubbing. No waiting<br/>time is required.</li> <li>Dry by blowing mild air for 5 s until<br/>the adhesive does not move.</li> </ol> |  |  |  |  |

|  |  | 7. Apply adhesive as for the self-etch mode.   | 5. Light cure for 10 s at 1.200 mW/cm <sup>2</sup> .   |
|--|--|--|--|
|  | Caries-affected dentine (CAD)  | <ol> <li>Apply etchant for 15 s.</li> <li>Rinse thoroughly.</li> <li>Blot excess water.</li> <li>Apply adhesive as for the self-etch mode.</li> </ol>  | <ol> <li>Applied the adhesive to the entire preparation and left undisturbed for 20 s.</li> <li>Direct a gentle stream of air over the liquid for about 5 s until it no longer moves, and the solvent evaporates completely.</li> <li>Light cure for 10 s at 1,200 mW/ cm<sup>2</sup>.</li> </ol>  |
| Scotchbond Universal (SBU); 3M<br>Oral Care (638,367) 10-MDP,<br>Dimethacrylate resins, HEMA,<br>methacrylate- modified polyalkenoic<br>acid copolymer, nanofiller, ethanol,<br>water, initiators, silane pH 2.7 | CAD + silver diamine fluoride 12 %<br>(CAD + SDF 12 %) (Cariestop<br>Cariostatic Biodinâmica LTDA,<br>Ibiporã, PR, Brazil) Hydrofluoridric<br>acid, 12 % silver nitrate, ammonia<br>hydroxide, and deionized water | <ol> <li>Apply etchant for 15 s.</li> <li>Rinse thoroughly.</li> <li>Blot excess water.</li> <li>Apply the SDF solution during 3 min.</li> <li>Rinsing for 30 s and air-dry for 5 s to keep<br/>the surface slightly moist.</li> <li>Apply adhesive as for the self-etch mode.</li> </ol>                  | <ol> <li>Apply the SDF solution during 3 min.</li> <li>Air-dry for 30 s with distilled water.</li> <li>Apply the adhesive to the entire preparation and left undisturbed for 20 s.</li> <li>Direct a gentle stream of air over the liquid for about 5 s until it no longer moved, and the solvent was evaporated completely.</li> <li>Light cure for 10 s at 1.200 mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol> |
|  | CAD + silver diamine fluoride 38 %<br>(CAD + SDF 38 %) (Riva Start, SDI<br>Limited, Bayswater, Victoria,<br>Australia) 30–35 % Silver fluoride,60<br>% ammonia solution, saturated KI<br>solution                  | <ol> <li>Apply etchant for 15 s.</li> <li>Rinse thoroughly.</li> <li>Blot excess water.</li> <li>Apply the grey capsule with a microbrush (1 min).</li> <li>Apply, immediately after, a generous amount of solution from green capsule to the surface until the creamy precipitate turns clear.</li> </ol> | <ol> <li>Apply the silver capsule with silver<br/>brush.</li> <li>Apply a generous amount of<br/>solution from green capsule to the<br/>surface until the creamy precipitate<br/>turns clear.</li> <li>Applied the adhesive to the entire<br/>preparation and left undisturbed for<br/>20 s.</li> <li>Directed a gentle stream of air over<br/>the liquid for about 5 s until it no</li> </ol>   |

|  | 6. Rinsing for 30 s and air-dry for 5 s | longer moved, and the solvent was |
|--|---|-----------------------------------|
|  | to keep the surface slightly moist      | evaporated completely.            |
|  | 7. Apply adhesive as for the self-etch  | 5. Light cured for 10 s at 1.200  |
|  | mode.                                   | mW/cm <sup>2</sup> .              |

\*The materials were applied according to the recommendation of their respective manufacturers.

\*\*10-MDP: 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate; bis-GMA: bisphe (\*\*) According to the manufacturer's instructions yl methacrylate; HEMA: 2hydroxyethyl methacrylate.

#### Statistical analysis

The sample size was calculated using www.sealedenvelope.com. The bond strength for Single Bond Universal in caries-affected dentine were considered for sample size calculation. According to the literature, the bond strength means, and standard deviation of Single Bond Universal were  $19.5 \pm 5.3$  MPa [20,21]. To detect a difference of 8.1 MPa among the test groups, using a significance level of 5 %, a power of 80 %, and a two-sided test, the minimum sample size was 8 teeth per group [18].

In each tooth, eight resin-dentin bonded sticks were randomly selected, considering the center of the restored tooth. These eight resin-dentin bonded sticks per tooth were randomly allocated for testing as follows: two for chemical analysis (one immediately and another after two years of water storage) and six for bond strength (three immediately and three after two years of water storage). The mean µTBS (MPa) values of three resin-dentin bonded sticks from the same tooth, according to the storage time (immediately or after two years of water storage), were averaged for statistical purposes; thus, the experimental unit in this study was a hemi-tooth. After observing the normality of the data distribution (Kolmogorov-Smirnov test) and the equality of the variances (Bartlett's test), the data from the microhardness (KHN) were subjected to a Student T-test. The µTBS (MPa) were subjected to a four-way repeated measures ANOVA (SDF vs. adhesive vs. strategy vs. storage time), where storage time was considered as the repeated-measures variable. Tukey's post hoc test for pairwise comparisons. The chemical analysis of the resin-dentine interface was assessed by EDX-SEM and it was evaluated gualitatively. All analyses were performed with a 5 % level of significance. Failure modes were statistically evaluated using  $\chi^2$  test ( $\alpha = 0.05$ ) (Jamovi, Statistical software, version 2.3).

#### RESULTS

#### Microhardness test (KHN)

The KHN values are presented in Table 2. It was not possible to assess he HN of the tooth surface immediately after inducing the caries lesion because it was too soft. When comparing the KHN values of sound dentin with those obtained after removing the outer softened carious dentin layer, the former exhibited a higher and statistically significant difference (p < 0.0001, Table 2). It is worth mentioning that the KHN values obtained after removing the outer softened carious dentin layer are similar to those previously described [22].

 Substrate
 Hardness

 Hardness
 Hardness

\*Different capital letters indicate a difference between the groups (Student T'test; p < 001).

\*\*It was not possible to perform the test because it was an outer softened carious dentin layer.

#### Microtensile bond strength (µTBS)

The most frequent mode of failure in the present study was adhesive or adhesive/mixed failures, accounting for 84 % of all specimens, followed by premature failures (15.1 %) and cohesive failures (0.9 % of all specimens; Table 3). Most premature failures were observed after 2 years of storage (10.8 %) compared to the immediate time (4.3 %) (p = 0.00017). Additionally, premature failures were slightly more frequent in the caries-affected dentine without treatment (16.7 %) and in dentine treated with 12 % SDF (16.7 %) than in dentine treated with 38 % SDF (12 %; p = 0.18). The number of premature failures was also slightly higher with etch-and-rinse (ER) (16.7 %) than self-etch (SE) (13.5 %; p = 0.29). Only the two-way interaction 'SDF' vs 'time' was significant (p =0.03). Also, the main factors 'SDF' (p = 0.00001), 'adhesive' (p = 0.001), and 'time' (p = 0.0000001) were individually statistically significant (Table 4). The application of SDF improves the immediate mean µTBS to dentine for both universal adhesives tested, regardless of adhesive strategy when compared to the control group.

However, comparing the 12 % and 38 % SDF concentrations, Single Bond Universal presented no significant difference in the mean  $\mu$ TBS to dentine, while for Clearfill Universal Bond Quick, a significant and higher mean  $\mu$ TBS to dentine was observed for 38 % SDF in comparison with 12 % SDF in the immediate time. After 2 years of water storage, experimental groups where SDF was applied, showed higher mean  $\mu$ TBS values, when compared to the control group. Furthermore, Single Bond Universal showed no significant decrease in the mean of  $\mu$ TBS values between immediate and 2-year results, whereas Clearfil Universal Bond Quick presented a significant drop in mean  $\mu$ TBS values after 2 years (Table 4). In general, Single Bond Universal showed a higher mean of  $\mu$ TBS values when compared to Clearfil Universal Bond Quick (Table 4).

#### Chemical microanalysis by EDX-SEM

Independent of the adhesive, strategy, and concentration of SDF, silver deposition is observed on the adhesive interface of the treated caries-affected dentine (Fig. 1a–d). This silver precipitation was observed in the adhesive interfaces, as well as the dentine tubules, independent of the adhesive strategy. Additionally, an increase in the Capeak was observed after SDF treatment that was proportional to the concentration, as well as the presence of Ag peaks, independent of the adhesive used, immediately and after two years of water storage (Fig. 1a–d).

| <b>_</b>     |             | Single Bond Universal |       |          |           |           |          |           | Clearfil Universal Bond Quick |          |           |           |          |  |
|--------------|-------------|-----------------------|-------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|-------------------------------|----------|-----------|-----------|----------|--|
| Experimental | Time        | Time Etch- and- rinse |       |          |           | Self-etch |          |           | Etch- and- rinse              |          |           | Self-etch |          |  |
| Groups       |             | A/M                   | С     | PF       | A/M       | С         | PF       | A/M       | С                             | PF       | A/M       | С         | PF       |  |
| Control      | Immediately | 20 (83.3)             | 0 (0) | 4 (16.7) | 22 (91.7) | 0 (0)     | 2 (8.3)  | 21 (87.5) | 0 (0)                         | 3 (12.5) | 22 (91.7) | 0 (0)     | 2 (8.3)  |  |
|              | 2 years     | 17 (70.8)             | 0 (0) | 7 (29.2) | 19 (79.2) | 0 (0)     | 5 (20.8) | 19 (79.2) | 0 (0)                         | 5 (20.8) | 20 (83.3) | 0 (0)     | 4 (16.7) |  |
| 12 % SDF     | Immediately | 22 (91.7)             | 0 (0) | 2 (8.3)  | 21 (87.5) | 0 (0)     | 3 (12.5) | 23 (95.8) | 0 (0)                         | 1 (4.2)  | 21 (87.5) | 0 (0)     | 3 (12.5) |  |
|              | 2 years     | 18 (75.0)             | 0 (0) | 6 (25.0) | 20 (83.3) | 0 (0)     | 4 (16.7) | 18 (75.0) | 0 (0)                         | 6 (25.0) | 17 (70.8) | 0 (0)     | 7 (29.2) |  |
| 38 % SDF     | Immediately | 22 (91.7)             | 0 (0) | 2 (8.3)  | 20 (83.3) | 4 (16.7)  | 0 (0)    | 21 (87.5) | 0 (0)                         | 3 (12.5) | 23 (95.8) | 1 (4.2)   | 0 (0)    |  |
|              | 2 years     | 20 (83.3)             | 0 (0) | 4 (16.7) | 19 (79.2) | 0 (0)     | 5 (20.8) | 19 (79.2) | 0 (0)                         | 5 (20.8) | 20 (83.3) | 0 (0)     | 4 (16.7) |  |

Table 3. Number of specimens (%) according to the fracture mode. \*

\*A/M: adhesive or mixture failures; C: cohesive failure; PF: premature failure

| Table | 4. Mea | ans and | standard | deviations | of microtensil | e bond : | strength | (MPa) | for all experime | ntal groups | , as well | as statistical | analysis | (*) |
|-------|--------|---------|----------|------------|----------------|----------|----------|-------|------------------|-------------|-----------|----------------|----------|-----|
|       |        |         |          |            |                |          |          | · ·   |                  | <u> </u>    | ,         |                |          | · · |

| Experimental Groups | Time        | Single Bond Universal |                | Clearfil Universal Bond Quick |                |
|---------------------|-------------|-----------------------|----------------|-------------------------------|----------------|
|                     |             | Etch- and- rinse      | Self-etch      | Etch- and- rinse              | Self-etch      |
| Control             | Immediately | 19.8 ± 4.5 C          | 19.6 ± 5.0 C   | 17.6 ± 4.9 C                  | 17.4 ± 4.2 C   |
|                     | 2 years     | 12.7 ± 3.7 D          | 11.9 ± 3.3 D   | 12.5 ± 3.7 D                  | 10.8 ± 3.5 D   |
| 12 % SDF            | Immediately | 23.5 ± 4.8 A,B        | 23.7 ± 5.4 A,B | 21.2 ± 5.3 B                  | 20.2 ± 5.4 B   |
|                     | 2 years     | 19.6 ± 3.9 B          | 19.0 ± 3.5 B   | 16.4 ± 4.8 C                  | 16.8 ± 3.3 C   |
| 38 % SDF            | Immediately | 26.3 ± 3.7 A          | 27.2 ± 4.3 A   | 24.0 ± 4.4 A                  | 25.2 ± 4.1 A   |
|                     | 2 years     | 22.8 ± 3.9 A,B        | 23.4 ± 3.9 A,B | 19.9 ± 3.5 B,C                | 18.4 ± 3.9 B,C |

\*Similar superscript capital letters indicate similarity groups (4-way ANOVA and Tukey's test; p = 000,001).



Fig. 1A. Representative EDX images of caries-affected dentin after treatment with 12 % and 38 % silver diamine fluoride (SDF) solutions using Single Bond Universal in both etch-and-rinse and self-etch strategies, evaluated at baseline. Increased Ag and Ca peak intensities (black hands) confirm the presence of silver particles immediately after SDF treatment, regardless of concentration or adhesive strategy, compared to control groups (red hands).



Fig. 1B. Representative EDX images of caries-affected dentin treated with 12 % and 38 % SDF solutions using Single Bond Universal after 2 years of water storage. Ag and Ca peak intensities (black hands) persist, indicating the continued presence of silver particles, irrespective of SDF concentration or adhesive strategy, compared to control groups (red hands).



Fig. 1C. Representative EDX images of caries-affected dentin after treatment with 12 % and 38 % SDF solutions for Clearfil Universal Bond Quick, evaluated at baseline. Increased Ag and Ca peak intensities (black hands) confirm the presence of silver particles immediately after SDF treatment, regardless of concentration or adhesive strategy, compared to control groups (red hands).



Fig. 1D. Representative EDX images of caries-affected dentin treated with 12 % and 38 % SDF solutions for Clearfil Universal Bond Quick after 2 years of water storage. Ag and Ca peak intensities (black hands) persist, indicating the continued presence of silver particles, irrespective of SDF concentration or adhesive strategy, compared to control groups (red hands).
#### DISCUSSION

The mineral and organic changes that occur in caries-affected dentine make the bonding to this substrate more complex than to sound dentine [23,24]. Moreover, due to a large number of variables, such as lesion depth, tissue hardness, type of caries (acute, chronic, and arrested), age, and location (tooth surface), it is virtually impossible for laboratory studies to mimic the natural dentine caries [25]. In this way, the present study standardized the lesions, trying to mimic some natural aspects of dentine caries lesions. One positive aspect is the use of microbiological methods to induce artificial caries lesions. This was chosen due to its ability to replicate aspects like color, contaminated and demineralized carious dentine tissues, as well the morphological changes that resemble those observed in a naturally occurring carious lesion [22,26]. Also, this method has been used by several authors, mainly when evaluating the bonding to caries-affected dentine [25,27–29].

For this study, two different concentrations of SDF (12 and 38 %) were used on the caries-affected dentine before the application of two universal adhesives. Usually, caries-affected dentine has an inferior quality of the adhesive interface [30]. However, when treated with SDF (at both concentrations), for both adhesives, the bonding properties were maintained or even increased for all experimental groups, which led to the rejection of all null hypotheses. We can therefore stipulate that a pre-treatment with SDF prior to the bonding protocol can increase the performance of the universal adhesives.

SDF is commonly used as a cavity liner of demineralized dentine [7]. Because the SDF solution is alkali, it provides the optimum environment for covalent bonds to form between the phosphate groups and the collagen fibrils [31], allowing phosphate to build into the collagen [32].

This phosphorylation process leads to a negatively charged dentine surface, which in turn can attract calcium ions through electrostatic forces and favor a scenario for the growth of hydroxyapatite crystallites [32]. With this increase in the binding sites for phosphate and calcium ions, a nucleation process is initiated, leading to the growth of hydroxyapatite crystals and, eventually, enhancing the mineral content on the surface of the dentine [33]. This may explain the evident Ca peaks in the hybrid layer obtained in our 24 h (immediate) results when SDF was used at two different concentrations. Interestingly, these groups also presented higher  $\mu$ TBS. Since the adhesives contain 10-MDP in their composition, the MDP monomers probably adsorbed onto the newly formed hydroxyapatite crystals and formed MDP-calcium salts [34], allowing the monomers to interact with the collagen fibrils and, thus, contribute to the increased  $\mu$ TBS.

Besides these positive immediate results, the most important outcome of the present study is the long-term evaluation of the caries-affected dentine. After two years of water storage, there was a reduction of the  $\mu$ TBS values for the untreated caries-affected dentine group. Although the exact mechanism that causes the degradation of the hybrid layer is not yet completely understood [35], it is well established that the hybrid layer degrades by hydrolysis and leaching of the hydrophilic resinous monomers from the interfibrillar spaces and by the disorganization and solubilization of collagen fibrils. In addition, it is known that dentine caries can anticipate or potentiate proteolytic activity in dentine [35,36].

Metalloproteinases represent a family of zinc and calcium-dependent endopeptidases present in the dentine and saliva that are capable of degrading extracellular matrix components, including collagen, in their natural and denatured forms [37]. These enzymes are exposed and activated when dentine is solubilized [35]. Thus, a poor infiltration of demineralized collagen and the increased activity of the metalloproteinases in caries-affected may have contributed to the decrease in  $\mu$ TBS values after two years of water storage in the untreated caries-affected dentine groups, as observed by previous studies [38–40].

Interestingly, a lower reduction in bond strengths was observed after two years for caries-affected dentine when the two different SDF concentrations (12 and 38 %) were applied, for both adhesives used, which is at least curious, since due to a higher demineralization in this substrate [41], even with the SDF application, was expected that some degradation would occur. These findings can be justified by the presence of silver (Ag) in the SDF composition and the hybrid layer, as observed in the SEM/EDX results after two years.

Ag nanoparticles have an effective antimicrobial activity, and they can promote caries arrestment, preventing biofilm formation [42]. Due to these properties, they have been included in some dentine adhesive formulations, as a means to improve the longevity of the restorations [43,44]. There are several mechanisms by which SDF can improve the µTBS of the restorations. Firstly, SDF has been shown to completely inhibit matrix metalloproteinases, such as MMP-2, MMP-8, and MMP-9 [45]. These MMPs are responsible for the degradation of the collagen fibrils that can, in turn, lead to the degradation of the hybrid layer [46]. Second, the presence of Ag particles in the hybrid layer can be responsible for the sustained release of silver ions over time, maintaining a sustained level of MMP inhibition and, thus, maintaining the integrity of the adhesive layer for longer [47]. Third, previous studies have shown that the incorporation of copper filler particles into adhesive systems can enhance the mechanical properties and the resin-dentin bond strength of restorations [48,49]. So, the addition of Ag (from SDF) into the hybrid layer just prior to applying the adhesives could have had a similar effect, where silver filler particles are formed in the hybrid layer system, improving the adhesive properties of the restorations. Fourth, previous studies using stannous-containing rinse prior to applying the adhesive system have been shown to significantly benefit the bond strength of restorations [50]. It was argued that stannous ions could function similarly to calcium ions to promote the "docking" of MDP to collagen fibrils [51]. It is therefore reasonable to hypothesize that the Ag ions in the hybrid layer will also have a similar mechanism of action.

It is worth mentioning that, even though both SDF concentrations were effective in maintaining the bond strength, SDF 38 % was more effective in remineralizing the dentine. The 38 % product contains 44,800 ppm of fluoride (F) and 253,870 ppm of silver [52], while the 12 % product contains 14,150 ppm of fluoride (F) and 80,170 ppm of silver [53]. The higher concentration of silver and fluoride compounds probably caused a better spread of the active ingredients into the dentinal tubules, leading to better inhibition of the enzymatic activity, promoting remineralization [54], and increasing the concentration of calcium (Ca)and phosphorus (P) in the interface. So, when SDF 38 % was applied to the surface, there was a noticeable increase in the intensity of the Ca peak observed during EDX-SEM analysis in both evaluation times. Although this is a plausible hypothesis, it should be noted that the present study was conducted without any clinical simulation. Therefore, additional evaluation is needed in the future. When comparing the two kinds of adhesives, a significant difference was observed,

here SBU showed better results than CUQ. Although both products contain 10-MDP, which is responsible for the chemical adhesion to hydroxyapatite [55], SBU also contains a methacrylate-modified polyalkenoic acid copolymer, which also improves the chemical bonding to hydroxyapatite. In this case, the improved results observed for SBU can be explained by the additional chemical adhesion from both components [56]. The authors of the present study did not provide a clear explanation for these results. CUQ contains a cocktail of hydrophilic amide resin monomers, which, according to the manufacturer, facilitates rapid monomer infiltration during application. It is plausible that some chemical interaction between the higher concentrated SDF and these components could enhance the immediate bond strength values of CUB, as observed earlier [12]. However, after two years of water storage, no significant difference was observed when comparing SDF 12 and 38 %, indicating that the observed difference in the immediate time was not substantial.

It is worth mentioning that no significant difference between the ER and SE strategies was observed for both dentin substrate and evaluation time. This can be related to the fact that, for this study, universal adhesives were used, and they were developed to simplify both the existing adhesive strategies [57], being effective in both, allowing the application of each strategy according to the clinician's preference or clinical demand [58].

In summary, the treatment of caries-affected dentine with different concentrations of SDF did not impact negatively the longevity of the bond. On the contrary, it seems to be an effective step to maintain the bond strength over the years. Given that the present study is an in vitro investigation, limited to the assessment of two properties ( $\mu$ TBS and chemical analysis), future in vitro studies simulating intra-pulpal pressure and evaluating the bioactivity of SDF, along with in situ studies, should be conducted to further elucidate the various hypotheses discussed in this research. Furthermore, future randomized clinical trials are necessary to validate the clinical application of the present results.

#### CONCLUSION

Regardless of the adhesive approach, employing silver diamine fluoride at both concentrations could be a feasible option to enhance and maintain the bond strength of universal adhesives in caries-affected dentine, for at least over 2 years.

#### Credit authorship contribution statement

LP Muniz: Writing – original draft, Methodology, Investigation, Conceptualization. M Wendlinger: Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Methodology, Conceptualization. GD Cochinski: Writing – original draft, Validation, Investigation, Conceptualization. PHA Moreira: Writing – original draft, Validation, Methodology, Conceptualization. AFM Cardenas: Writing – review & editing, Writing – original draft, Project administration, Data curation, Conceptualization. TS Carvalho: Writing – review & editing, Writing – original draft, Funding acquisition, Conceptualization. AD Loguercio: Writing – review & editing, Writing – original draft, Project administration, Investigation, Conceptualization. A Reis: Writing – review & editing, Writing – visualization, Project administration. FSF Siqueira: Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization Declarations

#### **Declaration of competing interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Bleaching&Bond group (Brazil).This study was partially supported by the State Foundation of Support to Research, Scientific and Technological Development of Maranhão (FAPEMA) from State Government of Maranhão, Brazil, grant numbers 01233, 2019 and 01811/21, and by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) under grants 304817/2021-0 and 308286/2019-7 and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001.

# REFERENCES

[1] S. Kale, P. Kakodkar, S. Shetiya, R. Abdulkader, Prevalence of dental caries among children aged 5-15 years from 9 countries in the Eastern Mediterranean Region: meta-analysis, East Mediterr. Health J. 26 (6) (2020) 726–735, https://doi.org/10.6719/emhj.20.050.

[2] S.S. Kale, P. Kakodkar, S.H. Shetiya, S.A. Rizwan, Dental caries prevalence among 5- to 15-year-old children from SEAR countries of WHO: a systematic review and meta-analysis, Indian J. Dent. Res. 30 (6) (2019) 937–947, <u>https://doi.org/</u> 10.4103/ijdr.IJDR\_654\_17.

[3] P.Y.F. Wen, M.X. Chen, Y.J. Zhong, Q.Q. Dong, H.M. Wong, Global burden and inequality of dental caries, 1990 to 2019, J. Dent. Res. 101 (4) (2022) 392– 399, https://doi.org/10.1177/00220345211056247.

[4] R.H. Selwitz, A.I. Ismail, N.B. Pitts, Dental caries, Lancet 369 (9555) (2007) 51–59, https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)60031-2.

[5] V.K. Kutsch, Dental caries: an updated medical model of risk assessment, J. Prosthet. Dent. 111 (4) (2014) 280–285, https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2013.07.014.

[6] P.W. Tsang, F. Qi, A.K. Huwig, M.H. Anderson, D. Wesley, W. Shi, A medical approach to the diagnosis and treatment of dental caries, AHIP Cover 47 (2) (2006) 38–42.

[7] A.C. Chibinski, L.M. Wambier, J. Feltrin, A.D. Loguercio, D.S. Wambier, A. Reis, Silver diamine fluoride has efficacy in controlling caries progression in primary teeth: a systematic review and meta-analysis, Caries Res. 51 (5) (2017) 527–541, https://doi.org/10.1159/000478668.

[8] A. Rosenblatt, T.C. Stamford, R. Niederman, Silver diamine fluoride: a caries "silver-fluoride bullet", J. Dent. Res. 88 (2) (2009) 116–125, <u>https://doi.org/</u>10.1177/0022034508329406.

[9] V. Contreras, M.J. Toro, A.R. Elías-Boneta, A. Encarnaci´on-Burgos, Effectiveness of silver diamine fluoride in caries prevention and arrest: a systematic literature review, Gen. Dent. 65 (3) (2017) 22–29.

[10] J.L. Castillo, S. Rivera, T. Aparicio, R. Lazo, T.C. Aw, L.L. Mancl, P. Milgrom, The short-term effects of diammine silver fluoride on tooth sensitivity: a randomized controlled trial, J. Dent. Res. 90 (2) (2011) 203–208, https://doi.org/10.1177/ 0022034510388516.

[11] Y.O. Crystal, R. Niederman, Evidence-based dentistry update on silver diamine fluoride, Dent. Clin. N. Am. 63 (1) (2019) 45–68, <u>https://doi.org/10.1016/j</u>. cden.2018.08.011.

[12] F.S.F. Siqueira, L.A.R. Morales, M.C.P. Granja, B.O. de Melo, V. Monteiro-Neto, A. Reis, A.F.M. Cardenas, A.D. Loguercio, Effect of silver diamine fluoride on the bonding properties to caries-affected dentin, J. Adhes. Dent. 22 (2) (2020) 161–172, https://doi.org/10.3290/j.jad.a44281.

[13] P. Lutgen, D. Chan, A. Sadr, Effects of silver diammine fluoride on bond strength of adhesives to sound dentin, Dent. Mater. J. 37 (6) (2018) 1003–1009, <u>https://doi</u>. org/10.4012/dmj.2017-401.

[14] M. Firouzmandi, M. Mohaghegh, M. Jafarpisheh, Effect of silver diamine fluoride on the bond durability of normal and carious dentin, J. Clin. Exp. Dent. 12 (5) (2020) e468–e473, https://doi.org/10.4317/jced.56303.

[15] M.E. Sanabe, C.A. Costa, J. Hebling, Exposed collagen in aged resin-dentin bonds produced on sound and caries-affected dentin in the presence of chlorhexidine, J. Adhes. Dent. 13 (2) (2011) 117–124, https://doi.org/10.3290/j.jad.a19239.

[16] C.A. Arrais, M. Giannini, M. Nakajima, J. Tagami, Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine, Eur. J. Oral Sci. 112 (5) (2004) 458–464, https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2004.00159.x.

[17] Y. Hosoya, S.J. Marshall, L.G. Watanabe, G.W. Marshall, Microhardness of carious deciduous dentin, Oper. Dent. 25 (2) (2000) 81–89.

[18] S. Armstrong, L. Breschi, M. <sup>•</sup>Ozcan, F. Pfefferkorn, M. Ferrari, B. Van Meerbeek, Academy of dental materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μTBS) approach, Dent. Mater. 33 (2) (2017) 133–143, <u>https://doi.org/10.1016/j</u>. dental.2016.11.015.

[19] M.A. Muñoz, I. Luque, V. Hass, A. Reis, A.D. Loguercio, N.H. Bombarda, Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine, J. Dent. 41 (5) (2013) 404–411, https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.03.001.

[20] A.C. Follak, L.L. Miotti, T.L. Lenzi, R.O. Rocha, F.Z. Maxnuck Soares, The impact of artificially caries-affected dentin on bond strength of multi-mode adhesives, J. Conserv. Dent. 21 (2) (2018) 136–141, https://doi.org/10.4103/jcd.Jcd\_234\_17.

[21] A.C. Follak, L.L. Miotti, T.L. Lenzi, R.O. Rocha, F.Z. Soares, Degradation of multimode adhesive system bond strength to artificial caries-affected dentin due to water storage, Oper. Dent. 43 (2) (2018) E92–e101, https://doi.org/10.2341/17-129-l.

[22] M. Marquezan, F.N. Corrêa, M.E. Sanabe, L.E. Rodrigues Filho, J. Hebling, A. C. Guedes-Pinto, F.M. Mendes, Artificial methods of dentine caries induction: a hardness and morphological comparative study, Arch. Oral Biol. 54 (12) (2009) 1111–1117, https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.09.007.

[23] Y. Wang, P. Spencer, M.P. Walker, Chemical profile of adhesive/cariesaffected dentin interfaces using Raman microspectroscopy, J. Biomed. Mater. Res. A 81 (2) (2007) 279–286, https://doi.org/10.1002/jbm.a.30981.

[24] A.R. Costa, F. Garcia-Godoy, L. Correr-Sobrinho, L.Z. Naves, L.H. Raposo, F. G. Carvalho, M.A. Sinhoreti, R.M. Puppin-Rontani, Influence of different dentin substrate (caries-affected, caries-infected, sound) on long-term µTBS, Braz. Dent. J.

28 (1) (2017) 16–23, <u>https://doi.org/10.1590/0103-6440201700879</u>. [25] M.M. Scherer, N.F. Lunkes, I.P.M. Soares, C.A. de Oliveira, J.C.P. Imparato, J. Hebling, T.L. Lenzi, Does silver diammine fluoride concentration influence on bonding to carious dentinal lesions in primary teeth? Eur. Arch. Paediatr. Dent. 23 (5) (2022) 813–820, <u>https://doi.org/10.1007/s40368-022-00730-w</u>.

[26] B.H. Clarkson, J.S. Wefel, I. Miller, A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacteria in vitro, J. Dent. Res. 63 (10) (1984) 1186–1189, https://doi.org/10.1177/00220345840630100201.

[27] G.F. Nicoloso, B.F. Antoniazzi, T.L. Lenzi, F.Z.M. Soares, R.O. Rocha, The Bonding Performance of a Universal Adhesive to Artificially-created Cariesaffected Dentin, J. Adhes. Dent. 19 (4) (2017) 317–321, https://doi.org/10.3290/j.jad.a38890.

[28] T.L. Lenzi, F.Z. Soares, D.P. Raggio, G.K. Pereira, R.O. Rocha, Dry-bonding etch-and-rinse strategy improves bond longevity of a universal adhesive to sound and artificially-induced caries-affected primary dentin, J. Adhes. Dent. 18 (6) (2016) 475–482, https://doi.org/10.3290/j.jad.a36670.

[29] T.L. Lenzi, D.P. Raggio, F.Z. Soares, O. Rocha Rde, Bonding performance of a multimode adhesive to artificially-induced caries-affected primary dentin, J. Adhes. Dent. 17 (2) (2015) 125–131, https://doi.org/10.3290/j.jad.a34058.

[30] C.P. Isolan, R. Sarkis-Onofre, G.S. Lima, R.R. Moraes, Bonding to sound and caries- affected dentin: a systematic review and meta-analysis, J. Adhes. Dent. 20 (1) (2018) 7–18, https://doi.org/10.3290/j.jad.a39775.

[31] M.L. Mei, Q.L. Li, C.H. Chu, C.K. Yiu, E.C. Lo, The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases, Dent. Mater. 28 (8) (2012) 903–908, https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.011.

[32] M.L. Mei, L. Ito, Y. Cao, E.C. Lo, Q.L. Li, C.H. Chu, An ex vivo study of arrested primary teeth caries with silver diamine fluoride therapy, J. Dent. 42 (4) (2014) 395–402, https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.007.

[33] Y. Cao, M.L. Mei, J. Xu, E.C. Lo, Q. Li, C.H. Chu, Biomimetic mineralisation of phosphorylated dentine by CPP-ACP, J. Dent. 41 (9) (2013) 818–825, https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.06.008.

[34] K. Yoshihara, Y. Yoshida, S. Hayakawa, N. Nagaoka, M. Irie, T. Ogawa, K.L. Van Landuyt, A. Osaka, K. Suzuki, S. Minagi, B. Van Meerbeek, Nanolayering of phosphoric acid ester monomer on enamel and dentin, Acta Biomater. 7 (8) (2011) 3187–3195, https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.04.026.

[35] A. Mazzoni, L. Tj¨aderhane, V. Checchi, R. Di Lenarda, T. Salo, F.R. Tay, D. H. Pashley, L. Breschi, Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability, J. Dent. Res. 94 (2) (2015) 241–251, https://doi.org/10.1177/0022034514562833.

[36] M. Toledano, F.S. Aguilera, M. Yamauti, M.E. Ruiz-Requena, R. Osorio, In vitro load-induced dentin collagen-stabilization against MMPs degradation, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 27 (2013) 10–18, <u>https://doi.org/10.1016/j</u>. jmbbm.2013.06.002.

[37] M. Toledano, M. Yamauti, E. Osorio, R. Osorio, Zinc-inhibited MMPmediated collagen degradation after different dentine demineralization procedures, Caries Res. 46 (3) (2012) 201–207, https://doi.org/10.1159/000337315.

[38] A. D'avila-S'anchez, M.F. Gutierrez, J.P. Bermudez, M.L. Méndez-Bauer, B. Hilgemberg, S. Sauro, A.D. Loguercio, C.A.G. Arrais, Influence of flavonoids on long-term bonding stability on caries-affected dentin, Dent. Mater. 36 (9) (2020) 1151–1160, https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.05.007.

[39] A.C. Follak, L.L. Miotti, T.L. Lenzi, R.O. Rocha, F.Z.M. Soares, Self-etch approach of universal adhesives as an alternative to minimize bond degradation on sound dentin vs caries-affected dentin over time, J. Adhes. Dent. 23 (3) (2021) 243–252, https://doi.org/10.3290/j.jad.b1367889.

[40] F.S.F. Siqueira, M. Wendlinger, L.C.R. Araújo, P.H.A. Moreira, A.F.M. Cardenas, T. S. Carvalho, A. Reis, A.D. Loguercio, Bonding performance of universal adhesives to eroded dentine: a 6-year evaluation, J. Dent. 136 (2023) 104633, https://doi.org/10.1016/j.jdent.2023.104633.

[41] M.K. Pugach, J. Strother, C.L. Darling, D. Fried, S.A. Gansky, S.J. Marshall, G. W. Marshall, Dentin caries zones: mineral, structure, and properties, J. Dent. Res.88 (1) (2009) 71–76, https://doi.org/10.1177/0022034508327552.

[42] V.T. Noronha, A.J. Paula, G. Dur´an, A. Galembeck, K. Cogo-Müller, M. Franz- Montan, N. Dur´an, Silver nanoparticles in dentistry, Dent. Mater. 33 (10) (2017) 1110–1126, https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.07.002.

[43] K. Zhang, M.A.S. Melo, L. Cheng, M.D. Weir, Y. Bai, H.H.K. Xu, Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms, Dent. Mater. 28 (8) (2012) 842–852, https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.027.

[44] M.A.S. Melo, L. Cheng, K. Zhang, M.D. Weir, L.K.A. Rodrigues, H.H.K. Xu, Novel dental adhesives containing nanoparticles of silver and amorphous calcium phosphate, Dent. Mater. 29 (2) (2013) 199–210, <u>https://doi.org/10.1016/j</u>. dental.2012.10.005.

[45] I.S. Zhao, S.S. Gao, N. Hiraishi, M.F. Burrow, D. Duangthip, M.L. Mei, E.C. Lo, C. H. Chu, Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review, Int. Dent. J. 68 (2) (2018) 67–76, https://doi.org/10.1111/idj.12320.L. Muniz et al. Journal of Dentistry 143 (2024) 104897 10

[46] M. Sulkala, J. Wahlgren, M. Larmas, T. Sorsa, O. Teronen, T. Salo, L. Tj¨aderhane, The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats, J. Dent. Res. 80 (6) (2001) 1545–1549, https://doi.org/10.1177/00220345010800061301.

[47] Z. Jowkar, F. Shafiei, E. Asadmanesh, F. Koohpeima, Influence of silver nanoparticles on resin-dentin bond strength durability in a self-etch and an etchand-rinse adhesive system, Restor. Dent. Endod. 44 (2) (2019) e13, <u>https://doi</u>. org/10.5395/rde.2019.44.e13.

[48] T.P. Matos, R. Naupari-Villasante, P.V.M. Kunz, V. Hass, A. Reis, M.F. Gutiérrez, A. D. Loguercio, 48-month clinical evaluation of a copper-containing universal adhesive in non-carious cervical lesions: a double-blind randomised clinical trial, Dent. Mater. 39 (9) (2023) 820–830, https://doi.org/10.1016/j.dental.2023.07.002.

[49] T.P. Matos, M.F. Gutiérrez, T.A. Hanzen, P. Malaquias, A.M. de Paula, J.J. de Souza, V. Hass, E. Fernández, A. Reis, A.D. Loguercio, 18-month clinical evaluation of a copper-containing universal adhesive in non-carious cervical lesions: a double-blind, randomized controlled trial, J. Dent. 90 (2019) 103219, https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.103219.

[50] A. Peutzfeldt, T. Koch, C. Ganss, S. Flury, A. Lussi, Effect of tin-chloride pretreatment on bond strength of two adhesive systems to dentin, Clin. Oral Investig. 18 (2) (2014) 535–543, https://doi.org/10.1007/s00784-013-0975-6.

[51] S. Flury, T. Koch, A. Peutzfeldt, A. Lussi, C. Ganss, The effect of a tincontaining fluoride mouth rinse on the bond between resin composite and erosively demineralised dentin, Clin. Oral Investig. 17 (1) (2013) 217–225, https://doi.org/10.1007/s00784-012-0697-1.

[52] Q.H. Zhi, E.C. Lo, H.C. Lin, Randomized clinical trial on effectiveness of silver diamine fluoride and glass ionomer in arresting dentine caries in preschool children, J. Dent. 40 (11) (2012) 962–967, https://doi.org/10.1016/j. ident.2012.08.002.

[53] J.A. Horst, H. Ellenikiotis, P.L. Milgrom, UCSF protocol for caries arrest using silver diamine fluoride: rationale, indications and consent, J. Calif Dent. Assoc. 44 (1) (2016) 16–28.

[54] L.L. Cheng, Limited evidence suggesting silver diamine fluoride may arrest dental caries in children, J. Am. Dent. Assoc. 148 (2) (2017) 120–122, https://doi.org/10.1016/j.adaj.2016.11.022.

[55] Y. Yoshida, K. Nagakane, R. Fukuda, Y. Nakayama, M. Okazaki, H. Shintani, S. Inoue, Y. Tagawa, K. Suzuki, J. De Munck, B. Van Meerbeek, Comparative

study on adhesive performance of functional monomers, J. Dent. Res. 83 (6) (2004) 454–458, https://doi.org/10.1177/154405910408300604.

[56] A. Sezinando, J. Perdigão, L. Ceballos, Long-term in vitro adhesion of polyalkenoate-based adhesives to dentin, J. Adhes. Dent. 19 (4) (2017) 305–316,https://doi.org/10.3290/j.jad.a38895.

[57] M.A. Munoz, I. Luque, V. Hass, A. Reis, A.D. Loguercio, N.H. Bombarda, Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine, J. Dent. 41 (5) (2013) 404–411, https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.03.001.

[58] A. Wagner, M. Wendler, A. Petschelt, R. Belli, U. Lohbauer, Bonding performance of universal adhesives in different etching modes, J. Dent. 42 (7) (2014) 800–807, https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.04.012.

# CAPÍTULO 2

# Efeito da aplicação de diamino fluoreto de prata nas propriedades adesivas da interface resina-dentina submetida a um desafio cariogênico *in situ*

## Artigo a ser publicado no Journal of Dentistry

Luana Paraiso Muniz, DDS, MS, PhD Student. Department of Postgraduate Program in Dentistry, CEUMA University, São Luis, Maranhão, Brazil. E-mail: <u>luanaparaiso@yahoo.com.br</u>

Michel Wendlinger, DDS, MS, PhD Student. Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil. E-mail: <u>michelwendlinger@gmail.com</u>

Pedro Henrique de Aguiar Moreira, DDS, MS, PhD Student. Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil. E-mail: <u>opedrohenrique@yahoo.com</u>

Alessandra Reis, DDS, PhD. Professor of Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil. E-mail: reisale@hotmail.com

Alessandro D. Loguercio, DDS, MSc, PhD. Professor of Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil. E-mail: <u>aloguercio@hotmail.com</u>

Andres Felipe Millan Cardenas, DDS, MSc, PhD. Professor of Department of Postgraduate Program in Dentistry, CEUMA University, São Luis, Maranhão, Brazil. E-mail: <u>andresfelipemillancardenas@hotmail.com</u>

Fabiana Suelen Figuerêdo de Siqueira, DDS, MSc, PhD. Professor of Department of Postgraduate Program in Dentistry, CEUMA University, São Luis, Maranhão, Brazil. E-mail: <u>fabisfsiqueira@hotmail.com</u>

#### RESUMO

Objetivo: Avaliação das propriedades mecânicas e adesivas da interface resinadentina tratada com diamino fluoreto de prata 38% (DFP) guando submetida a desafio cariogênico in situ. Materiais e Métodos: Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa sob o protocolo 2.631.289, cinquenta e seis molares humanos foram alocados de acordo com: Sistema adesivo (Zip Bond Universal; Single Bond Universal) e desafio cariogênico (In-situ). Os sistemas adesivos foram aplicados de acordo com as especificações do fabricante e restaurados incrementalmente com resina composta. Os dentes foram seccionados em "palitos". Para a avaliação in-situ, os palitos foram acoplados a um dispositivo intra-oral, que foi utilizado por 20 voluntários durante 14 dias em ambiente cariogênico. Após esse período, os palitos foram alocados para testes de resistência de união, para avaliar as propriedades adesivas, e microanálise química por EDX-SEM, para avaliar as propriedades mecânicas da interface adesiva qualitativamente. Para análise estatística, a unidade experimental foi o dente, e os dados foram submetidos à ANOVA de 4 fatores e ao teste de Tukey para comparação de médias (alfa = 0,05). Apenas três interações duplas cruzadas foram significativas (tempo de armazenamento vs. DFP; tempo de armazenamento vs. adesivo; e DFP vs. adesivo) (P=0,002; P=0,001; P=0,005, respetivamente). Resultados: Após o desafio in-situ, os valores mais elevados de resistência de união foram observados quando o DFP foi aplicado em comparação com os grupos onde o DFP não foi aplicado (P<0,002), independentemente do adesivo universal ou da estratégia adesiva utilizada. A maioria das amostras (97,7%-100%) apresentou falhas adesivas/mistas. Foi observado um aumento do pico de Ca, bem como a presença de picos de Ag na interface resina-dentina após o tratamento com DFP, independentemente do adesivo utilizado inicialmente ou após o desafio in-situ. Conclusão: A aplicação de DFP 38% preservaram os valores de resistência de união e aumentou os picos de Ca e Ag na interface resina-dentina após o desafio cariogênico in-situ.

Palavras-chave: Cárie; Dentina; DFP 38%; Adesivos universais; In situ.

# ABSTRACT

**Objective:** Evaluation of the mechanical and adhesive properties of the resindentin interface treated with 38% DFP when subjected to in situ cariogenic challenge. Materials and methods: After approval by the Research Ethics Committee under protocol 2.631.289, fifty-six human molars were allocated according to: Adhesive system (Zip Bond Universal; Single Bond Universal) and cariogenic challenge (In-situ). The adhesive systems were applied according to the manufacturer's specifications and incrementally restored with composite resin. The teeth were sectioned into "sticks." For in-situ evaluation, the sticks were attached to an intraoral device, which was used by 20 volunteers for 14 davs in a cariogenic environment. After this period, the sticks were allocated for bond strength tests to evaluate adhesive properties, and chemical microanalysis by EDX-SEM to assess the mechanical properties of the adhesive interface. For statistical analysis, the experimental unit was the tooth, and the data were subjected to 4-factor ANOVA and Tukey's test for comparison of means (alpha = 0.05). Only three crossed double interactions were significant (storage time vs. DFP; storage time vs. adhesive, and DFP vs. adhesive) (P=0.002; P=0.001; P=0.005, respectively). *Results:* After the in-situ challenge, the highest bond strength values were observed when DFP was applied compared to the groups where DFP was not applied (P<0.002), regardless of the universal adhesive or adhesive strategy used. Most samples (97.7%-100%) showed adhesive/mixed failures. An increase in the Ca peak as well as the presence of Ag peaks were observed at the resin-dentin interface after treatment with DFP, regaradhesive used initially or after the in-situ environment. Conclusion: The application of 38% DFP preserved bond strength values and increased Ca and Ag peaks at the resin-dentin interface after in-situ cariogenic challenge

Keywords: Caries; Dentin; 38% DFP; Universal adhesives; In situ.

#### INTRODUÇÃO

Os sistemas adesivos têm sido empregados com sucesso na odontologia operatória minimamente invasiva. No entanto, a durabilidade e estabilidade da interface resina-dentina ainda continua sendo questionável (1, 2). A falha da interface de união resina-dentina é causada principalmente pela deterioração da camada híbrida, particularmente pela degradação das fibrilas de colágeno (3, 4). Uma incompleta difusão dos monômeros resinosos dentro da dentina exposta a ácidos resulta em zonas de infiltração incompleta ao longo da base das camadas híbridas que contêm fibrilas de colágeno exposta, (5) tornando-as facilmente degradas pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) e cisteínas catepsinas (6, 7).

Subsequentemente, a falha na interface adesiva geralmente ocorre com microinfiltrações na medida em que as interfaces se degradam, permitindo o crescimento e a reprodução de biofilmes bacterianos ao redor da restauração, o que leva a cárie secundária (8, 9). Além disso, uma proliferação aumentada de bactérias cariogênicas na superfície de uma restauração de resina composta, como *Streptococcus mutans (S. mutans),* aumenta o risco de degradação da interface adesiva, devido à hidrólise da resina e biodegradação por atividade enzimática (10), especialmente para esterases produzidas por *S. mutans*, que podem degradar ligações éster compostas (11).

Assim, lesões de cárie ao redor das restaurações são uma das principais causas de falha e, consequentemente, requerem substituição (12, 13), cujo custo é considerável tanto para o indivíduo quanto para o sistema de saúde (14). Diante dessa situação, pesquisar materiais antibacterianos que interfiram no crescimento e acúmulo de bactérias que permanecem ou posteriormente invadem a interface, reduzindo assim a ocorrência de lesões de cáries melhorando a longevidade clínica das restaurações dentárias e mantendo a saúde dos tecidos dentais, é uma estratégia viável.

Nesse contexto, o diamino Fluoreto de Prata (DFP), foi introduzido pela primeira vez na década de 1970 com o intuito de deter/estacionar a cárie dentária. O DFP é um líquido transparente que combina os efeitos antibacterianos da prata e os efeitos remineralizantes do flúor e é um agente terapêutico promissor para a o tratamento de lesões de cárie. Adicionalmente, ele tem chamado atenção pela capacidade de reduzir o crescimento bacteriano

cariogênico e formação de biofilme (15), ocluir túbulos dentinários (16), aumentar a formação de dentina terciária (17) e inibir a desmineralização da dentina e promover sua remineralização (18, 19).

No entanto, um consenso sobre o impacto do DFP nas propriedades adesivas dos materiais restauradores ainda não foi alcançado. Enquanto alguns estudos sugerem que a aplicação do DFP não afeta as propriedades adesivas imediatamente (20) ou ao longo do tempo (21), outros estudos demostraram um impacto negativo na adesão, parecendo estar intimamente ligado com o protocolo de aplicação (22).

Contudo, a maioria das evidências disponíveis são oriundas de ensaios laboratoriais *in vitro* (20, 21, 22), que apesar de fornecerem dados preliminares valiosos, não replicam completamente as condições clínicas encontradas na cavidade oral humana. Assim, estudos *in situ*, realizados em seres humanos, oferecem uma perspectiva mais realista dos efeitos do DFP e da performance dos adesivos universais em condições clínicas reais.

Até o presente momento, nenhum trabalho avaliou a interface resinadentina submetida a desafios cariogênicos *in situ*. Portanto, o objetivo do presente trabalho é avaliar a resistência de união µTBS da interface adesiva tratada com DFP 38% submetida a desafios cariogênicos *in situ* e microanálise química por EDX-SEM dessa interface. As seguintes hipóteses nulas serão testadas: A resistência de união (1) e análise química da interface (2) resinadentina tratadas com DFP 38% não são afetadas após desafios cariogênicos *in situ*.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

#### Aspectos Éticos

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (2.631.289) aprovou este estudo. O estudo seguiu as diretrizes de prática clínica e conformou-se à Declaração de Helsinque. Cinquenta e seis dentes humanos foram utilizados. Foram devidamente desinfetados com Cloramina a 0,5% e esterelizados em autoclave de calor úmido. (23, 24) O terço oclusal da coroa de todos os dentes foi removido usando um disco diamantado sob refrigeração com água em uma máquina de corte (Isomet, Buehler; Lake Bluff, IL, EUA) para obter uma superfície dentinária plana. O esmalte presente ao longo das margens foi removido usando uma ponta diamantada (# 3195, KG Sorensen, Barueri, Brasil) com uma caneta de alta rotação sob refrigeração. Para confirmar a ausência de esmalte na superfície dentinária, foi realizada uma cuidadosa examinação sob um microscópio óptico (Olympus SZ40, Tóquio, Japão) com ampliação de 30X. As superfícies de dentina expostas foram ainda polidas em lixas de carbeto de silício (#600-grit) úmido por 30 segundos para padronizar a camada de *smear layer*.

#### Cálculo amostral

0 tamanho da amostra foi calculado usando site 0 www.sealedenvelope.com. Para o cálculo do tamanho da amostra, foram considerados os valores de resistência de união do Scotchbond Universal em dentina cariada após a aplicação de diamino fluoreto de prata. De acordo com a literatura, a média e o desvio padrão da resistência de união do Scotchbond Universal são 25,4 ± 4,0 MPa (20, 21). Para detectar uma diferença de 10 MPa (25) entre os grupos de teste, utilizando um nível de significância de 5%, um poder de 80% e um teste bilateral, o tamanho mínimo da amostra foi de 5 dentes por grupo. Para compensar as possíveis perdas, dois dentes por cada grupo foram adicionados, totalizando 7 dentes por cada grupo experimental.

#### Desenho experimental

Os dentes foram aleatoriamente divididos em 8 grupos experimentais (n = 7) de acordo com as seguintes variáveis: 1) Aplicação de diamino fluoreto de prata (Sem aplicação de DFP e aplicação de DFP 38% [Riva Start Aqua, SDI; Bayswater, Victoria, Australia]); 2) Sistema adesivo em 2 níveis (Single bond universal [SBU, 3M Oral Care, St Paul, MN, USA, also known as Single Bond Universal in some countries] e ZIPbond [ZIP, SDI, Bayswater, Victoria, Australia]): (3) Estratégia adesiva (Condicionamento e lavagem [ER] e Autocondicionante [SE]). Para a variável tempo de avaliação, espécimes do mesmo dente foram avaliados (Imediato e após 14 dias de desafio cariogênico *in situ*).

| Sistema adaciva | Grupo   | Modo de aplicação  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----------------|---------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Sistema auesivo |         | ER   | SE   |  |  |  |  |  |  |
|                 | Sem DFP | <ol> <li>Aplicar o ácido fosfórico por 15 segundos.</li> <li>Enxaguar por 15 segundos e secar com ar<br/>por 5 segundos para manter a superfície<br/>ligeiramente úmida.</li> <li>Aplicar o adesivo conforme o modo SE.</li> </ol>   | <ol> <li>Aplicar o adesivo em toda a superfície por<br/>20 segundos.</li> <li>Aplicar um suave jato de ar sobre o adesivo<br/>por aproximadamente 5 segundos até que<br/>ele não se mova mais e o solvente evapore<br/>completamente.</li> <li>Fotopolimerizar por 10 segundos a 1200<br/>mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>  |  |  |  |  |  |  |
| SBU             | Com DFP | <ol> <li>Aplicar o ácido fosfórico por 15 segundos.</li> <li>Enxaguar por 15 segundos e secar com ar<br/>por 5 segundos para manter a superfície<br/>ligeiramente úmida.</li> <li>Aplicar a cápsula de prata com o<br/>microaplicador prata.</li> <li>Aplicar uma quantidade generosa de<br/>solução da cápsula verde na superfície até<br/>que o precipitado cremoso fique<br/>transparente.</li> <li>Enxaguar por 30 segundos e secar com ar<br/>por 5 segundos para manter a superfície<br/>ligeiramente úmida.</li> <li>Aplicar o adesivo conforme o modo SE (3<br/>a 5 passos)</li> </ol> | <ol> <li>Aplicar a cápsula de prata com um pincel de<br/>prata.</li> <li>Aplicar uma quantidade generosa de<br/>solução da cápsula verde na superfície até<br/>que o precipitado cremoso fique<br/>transparente.</li> <li>Aplicar o adesivo em toda a superfície por<br/>20 segundos.</li> <li>Aplicar um suave jato de ar sobre o adesivo<br/>por aproximadamente 5 segundos até que<br/>ele não se mova mais e o solvente evapore<br/>completamente.</li> <li>Fotopolimerizar por 10 segundos a 1200<br/>mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol> |  |  |  |  |  |  |
| ZIP             | Sem DFP | <ol> <li>Aplicar o ácido fosfórico por 15 segundos.</li> <li>Enxaguar por 15 segundos.</li> <li>Secar ao ar por 2 segundos.</li> <li>Aplicar o adesivo conforme o modo SE.</li> </ol>  | <ol> <li>Aplicar o adesivo em toda a superfície com<br/>um microbrush e esfregar por 10 segundos.</li> <li>Esperar mais 10 segundos.</li> <li>Evaporar o excesso de solvente secando<br/>com ar por 5 segundos.</li> <li>Fotopolimerizar por 10 segundos 1200<br/>mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>  |  |  |  |  |  |  |
|                 | Com DFP | <ol> <li>Aplicar o ácido fosfórico por 15 segundos.</li> <li>Enxaguar por 15 segundos.</li> </ol>  | <ol> <li>Aplicar a cápsula de prata com o<br/>microaplicador prata.</li> </ol>   |  |  |  |  |  |  |

# Tabela 1. Modo de aplicação dos adesivos (número do lote), grupos, composições e modos de aplicação

| <ol> <li>Secar ao ar por 2 segundos.</li> <li>Aplicar a cápsula de prata com o</li> </ol>   | <ol> <li>Aplicar uma quantidade generosa de solução<br/>da cápsula verde na superfície até que o</li> </ol>   |
|---|---|
| microaplicador prata.   | precipitado cremoso fique transparente.   |
| <ol> <li>Aplicar uma quantidade generosa de<br/>solução da cápsula verde na superfície até<br/>que o precipitado cremoso fique<br/>transparente.</li> </ol> | <ul> <li>a. Enxaguar por 30 segundos e secar com ar<br/>por 5 segundos para manter a superfície<br/>ligeiramente úmida.</li> <li>4. Aplicar o adesivo em toda a superfície com</li> </ul> |
| <ol> <li>Enxaguar por 30 segundos e secar com ar<br/>por 5 segundos para manter a superfície<br/>ligeiramente úmida</li> </ol>                              | um microbrush e esfregar por 10 segundos.<br>5. Esperar mais 10 segundos.<br>6. Evaporar o excesso de solvente secando  |
| 7. Aplicar o adesivo conforme o modo SE (4  | com ar por 5 segundos.  |
| a 7 passos).  | <ol> <li>Fotopolimerizar por 10 segundos 1200<br/>mW/cm<sup>2</sup>.</li> </ol>   |

#### Procedimento restaurador e preparo dos espécimes

Os sistemas adesivos foram aplicados de acordo com a Tabela 1. Em seguida, os dentes foram restaurados com dois ou três incrementos de até 2mm cada de resina composta e cada um fotopolimerizado por 20 segundos com aparelho LED de 1000mW/cm<sup>2</sup> de intensidade (Valo, Ultradent Prod. South Jordan, UT, USA) para todos os espécimes. Um único operador treinado e calibrado realizou todos OS procedimentos restauradores. Após 0 armazenamento em água destilada por 24 h, os dentes restaurados foram seccionados, para obtenção de palitos com uma área de secção transversal de aproximadamente 0,8 mm<sup>2</sup>, que foram individualmente mensurados com um paquímetro digital (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Tokyo, Japão).

Um total de 20-25 palitos de resina-dentina foram obtidos por dente, incluindo as falhas prematuras. A metade dos palitos do mesmo dente foram testados imediatamente e a outra metade foi submetida a desafio cariogênico *in situ*.

#### Desafio cariogênico in situ

Para esta parte do estudo, 20 voluntários adultos com idade entre 20-30 anos saudáveis foram selecionados. Todos os pacientes deviam apresentar os seguintes critérios de inclusão: Boa saúde geral, fluxo salivar normal, não ter ingerido antibiótico nos últimos dois meses antes do experimento. Pacientes com doença sistêmica, gravidez ou em amamentação, uso de aparelhos ortodônticos fixos ou removíveis, uso de flúor enxaguatório bucal ou aplicação profissional de flúor nos últimos 2 meses ou hipossalivação foram excluídos do estudo.

Todos os voluntários receberam por escrito o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e somente após o aceite do voluntário, estes iniciaram sua participação.

Dispositivos palatinos foram individualmente preparados para cada paciente. Para isso, todos os voluntários foram moldados com alginato (Hydrogum 5, Zhermack, SpA, Roma, Italia) para obtenção de modelos para confecção dos dispositivos palatinos intraorais de acrílico. Quatro cavidades de (6.5 mm x 6.5 mm x 4 mm) foram distribuídas nos lados esquerdo e direito de cada dispositivo. Dentro de cada cavidade, 8 palitos do mesmo adesivo foram posicionados de acordo com uma randomização em blocos de 4 realizada no

site <u>www.sealedenvelope.com</u> para que cada aparelho tivesse espécimes com as variáveis aplicação de diamino fluoreto e estratégia adesiva. Para permitir o acúmulo de biofilme e proteção de distúrbios mecânicos, uma rede plástica foi fixada com resina acrílica deixando espaço de 1,0 mm da superfície do espécime (26, 27).

Durante 1 semana antes de iniciar a fase experimental, os voluntários deixaram de escovar seus dentes com dentifrício fluoretado, e passaram a utilizar um dentifrício não-fluoretado (Dental Clean Sem Flúor, Rabbit Ind.Com. Prods Hig. Pessoal Ltda, Londrina-PR, MA, Brasil) fornecido pela equipe de pesquisa. Para induzir um desafio cariogênico em todos os espécimes, os voluntários foram instruídos a remover o dispositivo e gotejar solução de sacarose 20% (Formulare, São Luis, Brasil) sobre os palitos, 4 vezes ao dia durante 14 dias. Cinco minutos depois, o dispositivo era reinserido na cavidade bucal (26, 27).

Nenhuma restrição em relação à dieta foi determinada aos voluntários. Eles foram instruídos a usar o dispositivo oral o tempo todo durante os 14 dias, removendo somente para higienização bucal e durante as refeições. A higienização do dispositivo era realizada extra-oralmente com escovação, exceto ao local onde estavam os palitos de resina-dentina, e os voluntários foram orientados para escovar cuidadosamente sobre a área do dispositivo, evitando remoção do biofilme sobre a rede plástica. No 15° dia de fase intra-oral, em torno das 12 h após a última aplicação da solução de sacarose, os voluntários pararam de utilizar o dispositivo, que foram recolhidos, os palitos de resina-dentina removidos, lavados com água da torneira.

#### Teste de resistência de união à microtração (µTBS)

No final do desafio cariogênico, todos os aparelhos foram coletados e os espécimes foram aleatoriamente assignados para cada teste. Os "palitos" de resina-dentina foram fixados em garras de Geraldeli com cola de cianoacrilato em gel e testados em uma máquina de ensaio universal a 0,5 mm/min de tensão com uma carga de 100N, até a ruptura da interface adesiva. Os valores de  $\mu$ TBS em (MPa) foram anotados. Para análise estatística, foi calculada a média do  $\mu$ TBS de palitos do mesmo dente.

O modo de falha dos palitos foi classificado como coesiva ([C] falha exclusivamente na dentina ou resina composta) e falha adesiva ([A/M] na interface resina-dentina / falha coesiva parcial em substratos vizinhos) (20, 21, 28). O modo de falha foi avaliado em um estereomicroscópio com aumento de 100x (Olympus SZ40, Tóquio, Japão). Espécimes com falhas prematuras (FP) foram incluídos na média por dente para análise estatística.

#### Microanálise química por EDX-SEM

Três palitos colados resina-dentina, de cada grupo experimental e de cada tempo de armazenamento que não haviam sido utilizados no teste µTBS, foram separados para avaliação química. Todos os palitos colados com resinadentina foram limpos ultrassonicamente, secos ao ar, montados em stubs, polidos com lixas de SiC úmidas de grão #600, 1000, 1500, 2000, por 10 s cada com baixa pressão, e revestidos com carbono-ouro (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein).

As interfaces dos palitos colados, entre resina-dentina, foram analisadas usando um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (Mira, Tescan Orsay Holding, Warrendale, PA, EUA) acoplado a um espectrômetro de raios X de energia dispersiva (EDX). A área de ligação foi observada e as análises focaram no meio da camada híbrida. Três fotomicrografias de áreas superficiais representativas foram obtidas com ampliação de 2.500× e uma microanálise química semiquantitativa foi realizada via EDX-SEM.

#### Análise estatística dos dados

Os valores médios de resistência de união µTBS (MPa) dos palitos de resina-dentina do mesmo dente em cada tempo de armazenamento (inicial e desafio *in situ*) foram calculados para fins estatísticos; assim, a unidade experimental foi o dente. Os espécimes que apresentaram falhas prematuras foram incluídos na média do dente para a análise estatística. O valor atribuído foi 0 MPa, conforme a orientação da Academy of Dental Materials sobre testes de resistência de união µTBS (28).

Inicialmente, os dados foram submetidos à análise estatística, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade e o teste de Bartlett para verificar a igualdade de variâncias (dados não relatados). Após a comprovação da distribuição normal dos dados, os valores de µTBS (MPa) foram submetidos a uma ANOVA de medidas repetidas de 4 fatores (tempo de armazenamento, DFP, adesivo e estratégia adesiva). A medida repetida foi o dente. O teste de Tukey foi aplicado para comparações *post hoc.* Todas as análises foram realizadas com um nível de significância de 5%. Os modos de falhas foram avaliados estatisticamente usando o teste  $\chi^2$  ( $\alpha$ =0,05) (Jamovi, software estatístico, versão 2.3). A microanálise química por EDX-SEM foi avaliada qualitativamente.

#### RESULTADOS

A porcentagem de falhas prematuras e distribuições de padrão de fratura são mostradas na Tabela 2. O modo de falha mais frequente foram falhas adesivas ou adesivas/mistas (97,7% de todos os espécimes), seguido por falhas coesivas (0,4%) e falhas prematuras (1,9%). Quando submetidos à análise estatística, todos os grupos apresentaram resultados semelhantes em termos de modo de falha (p > 0,05).

Os resultados de ANOVA medidas repetidas de 4 fatores mostraram apenas três interações duplas cruzadas significativas (tempo de armazenamento vs. SDF, tempo de armazenamento vs. adesivo e DFP vs. adesivo) (Tabela 2, p = 0,002; p = 0,001; p = 0,005, respectivamente). Além disso, vale mencionar que o fator principal estratégia adesiva não foi significativo (p = 0,82).

No *baseline*, não foram observadas diferenças significativas nos valores de resistência de união a microtração entre os grupos com ou sem DFP, bem como para ambas as estratégias adesivas avaliadas, independentemente do adesivo universal utilizado (Tabela 3, p > 0,05). Isso indica que a aplicação de DFP não afetou significativamente os valores de resistência de união iniciais.

Por outro lado, após o desafio *in situ*, uma diferença significativa foi observada nos valores de resistência de união a microtração entre os grupos quando o DFP foi utilizado. Valores mais altos de resistência de união foram observados quando o DFP foi aplicado em comparação com os grupos onde o DFP não foi aplicado (Tabela 3, p < 0,002), independentemente do adesivo universal ou da estratégia adesiva utilizada.

Além disso, ao comparar grupos sem tratamento, uma diminuição significativa nos valores de resistência de união foi observada após o desafio *in* 

*situ* quando o DFP não foi aplicado. Por outro lado, nenhuma diminuição significativa nos valores de resistência de união foi observada após o desafio *in situ* quando o DFP foi aplicado, independentemente do adesivo ou da estratégia adesiva utilizada (Tabela 3, p > 0,05). Isso indica que a aplicação de DFP preservou significativamente os valores de resistência de união quando avaliada *in situ*.

|          |         | SBU      |       |       |          | ZIP   |       |          |       |       |          |       |       |
|----------|---------|----------|-------|-------|----------|-------|-------|----------|-------|-------|----------|-------|-------|
|          |         | ER       |       | SE    |          |       | ER    |          |       | SE    |          |       |       |
|          |         | A/M      | С     | FP    |
| Baseline | Sem DFP | 74 (98)  | 2 (2) | 0 (0) | 80 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 76 (99)  | 0 (0) | 1 (1) | 82 (96)  | 0 (0) | 3 (4) |
|          | Com DFP | 82 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 82 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 80 (98)  | 1 (1) | 1 (1) | 85 (98)  | 2 (2) | 0 (0) |
| In situ  | Sem DFP | 80 (97)  | 0 (0) | 2 (3) | 80 (94)  | 0 (0) | 5 (6) | 75 (94)  | 0 (0) | 5 (6) | 70 (92)  | 0 (0) | 6 (8) |
|          | Com DFP | 85 (99)  | 0 (0) | 1 (1) | 80 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 84 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 86 (100) | 0 (0) | 0 (0) |

 Tabela 2. Número de palitos (%) de acordo com o modo de fratura.

\*A/M: falha de tipo adesiva/mista; C: Falha coesiva; FP: Falha prematura

|           |         | SI                    | BU                    | Z                     | (IP                   |
|-----------|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|           |         | ER                    | SE                    | ER                    | SE                    |
| Deceline  | Sem DFP | $52.2\pm3.8~\text{A}$ | 52.7 ± 2.9 A          | $41.2\pm2.5~\text{C}$ | 40.1 ± 2.2 C          |
| Baseline  | Com DFP | $54.2\pm3.3~\text{A}$ | 53.1 ± 3.9 A          | $40.2\pm2.6~C$        | 40.3 ± 2.7 C          |
| In situ - | Sem DFP | $46.4\pm2.8~\text{B}$ | $43.6\pm2.2~\text{B}$ | $30.8\pm2.1~\text{D}$ | $30.9\pm2.5~\text{D}$ |
|           | Com DFP | 50.6 ± 2.8 A          | 49.9 ± 2.4 A          | 37.7 ± 2.6 C          | 38.0 ± 2.5 C          |

**Table 3.** Médias e desvios-padrão dos valores de resistência de união resina-dentina, bem como análise estatística (MPa) para todos os grupos experimentais (\*)

(\*) Letras diferentes representam médias significativas estatisticamente diferentes entre os grupos (ANOVA de quatro fatores; teste de Tukey; p < 0,05). Abreviaturas: SBU (Single Bond Universal); CEP (Zipbond); ER (lavar e enxaguar). SE (autocondicionante). SDF (Fluoreto de Diamina de Prata).

#### Microanálise química por EDX-SEM

Independentemente do tempo de armazenamento, adesivo e estratégia adesiva, a deposição de prata foi observada na interface adesiva resina-dentina quando o DFP foi aplicado (Figura 1 A-D) Além disso, alguma precipitação de prata foi observada na interface resina-dentina, bem como nos túbulos dentinários. Além disso, um aumento no pico de Ca foi observado após o tratamento com DFP, bem como a presença de picos de Ag, independentemente do adesivo utilizado, no início ou após o ambiente in situ (Figura 1 A-D). Como ambos os adesivos universais testados mostraram um padrão semelhante de deposição de prata, todas as imagens são de um adesivo universal (SBU).



**Figura 1.** Imagens representativas de EDX das interfaces adesivas resina-dentina após tratamento com soluções diamino fluoreto de prata (DFP) utilizando Single Bond Universal em estratégias tanto de condicionamento total quanto de autocondicionamento, avaliadas em linha de base e in situ. Aumento das intensidades dos picos de Ag e Ca (mãos pretas) confirmam a presença de partículas de prata imediatamente após o tratamento com DFP, independentemente do tempo de armazenamento ou estratégia adesiva, em comparação com os grupos controle (mãos vermelhas).

#### DISCUSSÃO

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas nos valores de resistência de união a microtração entre os grupos com ou sem DFP, bem como para ambas as estratégias adesivas avaliadas, independentemente do adesivo universal utilizado, no *baseline*. Assim, podemos constatar que a aplicação do DFP não afetou negativamente os valores da resistência de união e a implicância clínica por trás deste achado é que se o DFP é usado para tratar e/ou prevenir cárie dentinária em um dente, a resistência de união em dentina não cariada desse dente não será afetada.

No entanto, após o desafio *in situ,* valores mais altos de resistência de união foram observados quando o DFP foi aplicado em comparação com os grupos onde não foi aplicado, rejeitando a primeira hipótese nula. Sabe-se que o DFP é uma solução comumente usado para deter a cárie dentinária (29) ou para prevenir o avanço da lesão de cárie nas margens das restaurações (30). Como a solução de DFP é alcalina, ela proporciona o ambiente ideal para a formação de ligações covalentes entre os grupos fosfato e as fibrilas de colágeno (31), permitindo que o fosfato se incorpore ao colágeno (18).

Esse processo de fosforilação leva a uma superfície dentinária carregada negativamente, que, por sua vez, pode atrair íons cálcio através de forças eletrostáticas e favorecer um cenário para o crescimento de cristais de hidroxiapatita (18). Com este aumento nos sítios de ligação para íons fosfato e cálcio, um processo de nucleação é iniciado, levando ao crescimento de cristais de hidroxiapatita e, eventualmente, aumentando o conteúdo mineral na superfície da dentina (32). Isso pode explicar os picos evidentes de Ca na camada híbrida obtida em nossos resultados após o desafio *in situ* quando o DFP foi usado, levando-nos a rejeitar a segunda hipótese nula.

Adicionalmente, ambos os adesivos universais utilizados no presente estudo contêm 10-MDP em sua composição. Sabe-se que o monômero MDP provavelmente se aderem nos cristais de hidroxiapatita recém-formados e formaram sais de MDP-cálcio (33), permitindo que os monômeros interagissem com as fibrilas de colágeno e, assim, contribuindo para o aumento do µTBS.

Entretanto, ao comparar o grupo sem tratamento ao *in situ*, uma diminuição significativa nos valores de resistência de união foi observada após o desafio *in situ* quando o DFP não foi aplicado. Isso demonstra que o modelo *in* 

*situ* conduzido por um curto período, mas sob um desafio cariogênico, pode ser um método útil para a durabilidade de restaurações adesivas, com a vantagem de assemelhar-se à maioria das condições desafiadoras quando as restaurações são submetidas a um ambiente oral (34). A interface dentina-adesivo provavelmente apresenta vazios que podem ser mais afetados pelo ambiente oral, aumentando a permeabilidade interna do sistema adesivo, e consequentemente a durabilidade da camada híbrida por fatores mecânicos, térmicos e químicos, como produtos bacterianos (35).

Quando a interface adesiva é submetida a um biofilme continuamente exposto à sacarose, ela aumenta a cariogenicidade e as características virulentas do biofilme de *S. mutans*, promovendo a adesão bacteriana, a formação de biofilme maduro e a síntese de polissacarídeos extracelulares (36). Além disso, *S. mutans* possui atividades esterase em níveis que degradam materiais poliméricos (37), o que sugere que bactérias orais podem comprometer a interface adesiva, contribuindo assim para a progressão de cáries secundárias nessa interface. Portanto, a durabilidade da interface diminui devido à degradação da dentina e da camada híbrida adjacente, principalmente pela produção ácida do biofilme, causando perda mineral. As ligações adesivas à dentina podem se degradar *in vivo* devido a processos hidrolíticos que atacam a matriz de colágeno (38), através da plastificação do polímero (39) ou devido à produção ácida do biofilme (40).

Por outro lado, nenhuma diminuição significativa nos valores de resistência de união foi observada após o ambiente *in situ* quando o DFP foi aplicado, independentemente do adesivo universal ou da estratégia adesiva utilizada.

A solução de DFP a 38% usada neste estudo tinha uma alta concentração de íons de prata (253.870 ppm) e flúor (44.800 ppm) (41, 42). Íons de flúor liberados do DFP reagiram com hidroxiapatita formando fluoreto de cálcio (CaF<sub>2</sub>) e fosfato de prata em um ambiente básico (43). O CaF<sub>2</sub> é importante porque atua como um reservatório de fluoreto de liberação lenta regulado por pH durante o desafio cariogênico. Além disso, os íons de fosfato de hidrogênio (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) facilitam o fluoreto de cálcio a formar fluorapatita. O fosfato de prata é mais solúvel do que a hidroxiapatita e a fluorapatita, portanto, atua

como um reservatório de íons de fosfato, facilitando a formação de fluorapatita a partir do CaF<sub>2</sub> (44).

Além disso, a grande quantidade de íons de Ag contribuiu para preservar os valores de resistência de união após o ambiente *in situ* quando o DFP foi aplicado. Sabe-se que íons de prata se ligam fortemente a grupos sulfidrila e proteínas nas membranas celulares bacterianas, inibindo a atividade enzimática intracelular, bem como a replicação do DNA (45), eventualmente causando a morte celular bacteriana e inibindo a formação de biofilme (46), além de reduzir a formação de células de biofilmes bacterianos ao redor da interface resinadentina (47).

Adicionalmente, quando o DFP é aplicado, íons de Ag são altamente reativos e tem um alto poder de polarização (44) e infiltração (48), reagindo com a hidroxiapatita formando fosfato de prata (Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (49) que podem agir dentro da camada hibrida de várias formas. A primeira é a capacidade do DFP de inibir completamente as metaloproteinases da matriz, como a MMP-2, MMP-8 E MMP-9. (22, 31) Essas MMPs são responsáveis pela degradação das fibrilas de colágeno que podem, por sua vez, levar à degradação da camada híbrida. A presença de partículas de Ag na camada hibrida pode ser responsável pela liberação sustentada de íons de prata ao longo do tempo (48), mantendo um nível sustentado de inibição de MMP e, assim, mantendo a integridade da camada adesiva por mais tempo. E terceiro, é devido a grande quantidade de partículas de Ag e maior deposição mineral, que podem ocupar melhor os espaços dentro da interface adesiva, e consequentemente promovem uma camada híbrida mecanicamente mais resistente devido a uma melhor infiltração adesiva (20, 50).

Por outro lado, apesar de ambos os adesivos manterem os valores de resistência de união após o desafio cariogênico *in situ* quando o DFP foi aplicado, o adesivo SBU apresentou maiores valores quando comparado ao ZIP. Embora ambos os produtos contenham 10-MDP, que é responsável pela adesão química à hidroxiapatita (51), o SBU também contém um copolímero de ácido polialquenoico modificado com metacrilato, que também melhora a adesão química à hidroxiapatita. Neste caso, os resultados melhorados observados para o SBU podem ser explicados pela adesão química adicional de ambos os componentes (52) Além disso, o ZIP contém uma maior quantidade de solventes

(30 – 35%) comparado com o SBU (10 – 15%). Assim, a evaporação completa dessa maior quantidade de solventes muitas vezes não é viável, mesmo que aumentando ou estendendo o tempo de aplicação, prejudicando muitas vezes o grau de conversão do ZIP dentro da camada híbrida (53). Portanto, acredita-se que uma incompleta evaporação dos solventes tenha prejudicado o desempenho deste adesivo e tenha contribuído para uma redução dos valores de resistência de união. No entanto, essa hipótese ainda precisa ser mais estudada.

Vale ressaltar que uma das principais limitações clínicas do uso do Diamino Fluoreto de Prata (DFP), principalmente em áreas muitos visíveis e estéticas é a coloração escura que ele provoca nos dentes após a sua aplicação, o que dificulta sua aceitação mais ampla (54). Isso ocorre porque, ao interromper o processo de cárie, íons de prata se precipitam nos tecidos dentários, resultando em manchas de tonalidade castanho-preta (55, 56). No entanto, neste estudo, utilizamos o DFP a 38% (Riva Star Aqua -SDI), seguindo o protocolo clínico recomendado pelo fabricante, onde o passo 1 que é a aplicação do DFP e seguido do passo 2 que é a aplicação do composto de iodeto de potássio cujo objetivo é minimizar o escurecimento do dente. Adicionalmente, o DFP oferece Odontologia de Mínima Intervenção que adota a filosofia de integrar prevenção, remineralização e procedimentos menos invasivos.

## CONCLUSÃO

A aplicação de DFP 38% preservaram os valores de resistência de união e um aumento nos picos de Cálcio e Prata na interface resina-dentina após desafio cariogênico *in situ*.

# REFERÊNCIAS

1. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. Dent Mater. 2011;27(1):1-16.

2. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. Dent Mater. 2008;24(1):90-101.

3. Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability--A literature review. Dent Mater. 2016;32(2):e41-53.

4. Amaral FL, Colucci V, Palma-Dibb RG, Corona SA. Assessment of in vitro methods used to promote adhesive interface degradation: a critical review. J Esthet Restor Dent. 2007;19(6):340-53; discussion 54.

5. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. J Dent Res. 2004;83(3):216-21.

6. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjaderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. Biomaterials. 2006;27(25):4470-6.

7. Perdigao J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. J Esthet Restor Dent. 2013;25(4):219-41.

8. Spencer P, Ye Q, Song L, Parthasarathy R, Boone K, Misra A, et al. Threats to adhesive/dentin interfacial integrity and next generation bio-enabled multifunctional adhesives. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2019;107(8):2673-83.

9. Betancourt DE, Baldion PA, Castellanos JE. Resin-Dentin Bonding Interface: Mechanisms of Degradation and Strategies for Stabilization of the Hybrid Layer. Int J Biomater. 2019;2019:5268342.

10. Kreth J, Merritt J, Pfeifer CS, Khajotia S, Ferracane JL. Interaction between the oral microbiome and dental composite biomaterials: Where we are and where we should go. J Dent Res. 2020;99(10):1140-9.

11. Kusuma Yulianto HD, Rinastiti M, Cune MS, de Haan-Visser W, Atema-Smit J, Busscher HJ, et al. Biofilm composition and composite degradation during intra-oral wear. Dent Mater. 2019;35(5):740-50.

12. Demarco FF, Collares K, Correa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJ. Should my composite restorations last forever? Why are they failing? Braz Oral Res. 2017;31(suppl 1):e56.

13. Askar H, Krois J, Gostemeyer G, Bottenberg P, Zero D, Banerjee A, et al. Secondary caries: what is it, and how it can be controlled, detected, and managed? Clin Oral Investig. 2020;24(5):1869-76.

14. Peres MA, Daly B, Guarnizo-Herreno CC, Benzian H, Watt RG. Oral diseases: a global public health challenge - Authors' reply. Lancet. 2020;395(10219):186-7.

15. Mei ML, Li QL, Chu CH, Lo EC, Samaranayake LP. Antibacterial effects of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013;12:4.

16. Kiesow A, Menzel M, Lippert F, Tanzer JM, Milgrom P. Dentin tubule occlusion by a 38% silver diamine fluoride gel: an in vitro investigation. BDJ Open. 2022;8(1):1.

17. Rossi G, Squassi A, Mandalunis P, Kaplan A. Effect of silver diamine fluoride (SDF) on the dentin-pulp complex: ex vivo histological analysis on human primary teeth and rat molars. Acta Odontol Latinoam. 2017;30(1):5-12.

18. Mei ML, Ito L, Cao Y, Lo EC, Li QL, Chu CH. An ex vivo study of arrested primary teeth caries with silver diamine fluoride therapy. J Dent. 2014;42(4):395-402.

19. Mei ML, Nudelman F, Marzec B, Walker JM, Lo ECM, Walls AW, et al. Formation of fluorohydroxyapatite with silver diamine fluoride. J Dent Res. 2017;96(10):1122-8.

20. Siqueira FSF, Morales LAR, Granja MCP, de Melo BO, Monteiro-Neto V, Reis A, et al. Effect of Silver Diamine Fluoride on the Bonding Properties to Caries-affected Dentin. J Adhes Dent. 2020;22(2):161-72.

21. Muniz LP, Wendlinger M, Cochinski GD, Moreira P, Cardenas A, Carvalho TS, et al. Effect of silver diamine fluoride on the longevity of the bonding properties to caries-affected dentine. J Dent. 2024;143:104897.

22. C DA, Mancuso E, Mazzitelli C, Maravic T, Josic U, D DU, et al. Comparisons of ammonia- and water-based silver-containing solutions on dentin bonding and enzymatic activity: 1-yr evaluation. Dent Mater. 2024;40(5):777-88.

23. DeWald JP. The use of extracted teeth for in vitro bonding studies: a review of infection control considerations. Dent Mater. 1997;13(2):74-81.

24. Moreira PHdA, Wendlinger M, Nonato RdF, Calixto AL, Binz-Ordonez MC, Siqueira FSFd, et al. Do in vitro and in situ erosive challenges alter the bonding performance of universal adhesives? International Journal of Adhesion and Adhesives. 2024;134:103809.

25. De Munck J, Mine A, Poitevin A, Van Ende A, Cardoso MV, Van Landuyt KL, et al. Meta-analytical review of parameters involved in dentin bonding. J Dent Res. 2012;91(4):351-7.

26. Hass V, de Paula AM, Parreiras S, Gutierrez MF, Luque-Martinez I, de Paris Matos T, et al. Degradation of dentin-bonded interfaces treated with collagen cross-linking agents in a cariogenic oral environment: An in situ study. J Dent. 2016;49:60-7.

27. Vidal O, de Paris Matos T, Nunez A, Mendez-Bauer L, Sutil E, Naupari-Villasante R, et al. A universal adhesive containing copper nanoparticles improves the stability of hybrid layer in a cariogenic oral environment: An in situ study. J Mech Behav Biomed Mater. 2022;126:105017.

28. Armstrong S, Breschi L, Ozcan M, Pfefferkorn F, Ferrari M, Van Meerbeek B. Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (muTBS) approach. Dent Mater. 2017;33(2):133-43.

 Chibinski AC, Wambier LM, Feltrin J, Loguercio AD, Wambier DS, Reis A.
 Silver Diamine Fluoride Has Efficacy in Controlling Caries Progression in Primary Teeth: A Systematic Review and Meta-Analysis. Caries Res. 2017;51(5):527-41.
 Jokstad A. Secondary caries and microleakage. Dent Mater.
 2016;32(1):11-25.

31. Mei ML, Li QL, Chu CH, Yiu CK, Lo EC. The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. Dent Mater. 2012;28(8):903-8.

32. Cao Y, Mei ML, Xu J, Lo EC, Li Q, Chu CH. Biomimetic mineralisation of phosphorylated dentine by CPP-ACP. J Dent. 2013;41(9):818-25.

33. Yoshihara K, Yoshida Y, Hayakawa S, Nagaoka N, Irie M, Ogawa T, et al. Nanolayering of phosphoric acid ester monomer on enamel and dentin. Acta Biomater. 2011;7(8):3187-95.

34. Mutluay MM, Zhang K, Ryou H, Yahyazadehfar M, Majd H, Xu HH, et al. On the fatigue behavior of resin-dentin bonds after degradation by biofilm. J Mech Behav Biomed Mater. 2013;18:219-31.

35. Montagner AF, Opdam NJ, Ruben JL, Bronkhorst EM, Cenci MS, Huysmans MC. Behavior of failed bonded interfaces under in vitro cariogenic challenge. Dent Mater. 2016;32(5):668-75.

36. Diaz-Garrido N, Lozano C, Giacaman RA. Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. Eur J Dent. 2016;10(3):345-50.

37. Nedeljkovic I, De Munck J, Ungureanu AA, Slomka V, Bartic C, Vananroye A, et al. Biofilm-induced changes to the composite surface. J Dent. 2017;63:36-43.

38. Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. Dent Mater. 2013;29(1):116-35.

39. Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, et al. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. Ann Biomed Eng. 2010;38(6):1989-2003.

40. Sakaguchi RL. Review of the current status and challenges for dental posterior restorative composites: clinical, chemistry, and physical behavior considerations. Summary of discussion from the Portland Composites Symposium (POCOS) June 17-19, 2004, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon. Dent Mater. 2005;21(1):3-6.

41. Zhi QH, Lo EC, Lin HC. Randomized clinical trial on effectiveness of silver diamine fluoride and glass ionomer in arresting dentine caries in preschool children. J Dent. 2012;40(11):962-7.

42. Cheng LL. Limited evidence suggesting silver diamine fluoride may arrest dental caries in children. J Am Dent Assoc. 2017;148(2):120-2.

43. Rosenblatt A, Stamford TC, Niederman R. Silver diamine fluoride: a caries "silver-fluoride bullet". J Dent Res. 2009;88(2):116-25.

44. Peng JJ, Botelho MG, Matinlinna JP. Silver compounds used in dentistry for caries management: a review. J Dent. 2012;40(7):531-41.

45. Lansdown AB. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. Curr Probl Dermatol. 2006;33:17-34.

46. Wu MY, Suryanarayanan K, van Ooij WJ, Oerther DB. Using microbial genomics to evaluate the effectiveness of silver to prevent biofilm formation. Water Sci Technol. 2007;55(8-9):413-9.

47. Klanliang K, Asahi Y, Maezono H, Sotozono M, Kuriki N, Machi H, et al. An extensive description of the microbiological effects of silver diamine fluoride on dental biofilms using an oral in situ model. Sci Rep. 2022;12(1):7435.

48. Sayed M, Matsui N, Uo M, Nikaido T, Oikawa M, Burrow MF, et al. Morphological elemental analysis of silver penetration and into sound/demineralized dentin after SDF application. Dent Mater. 2019;35(12):1718-27.

49. Lou YL, Botelho MG, Darvell BW. Reaction of silver diamine [corrected] fluoride with hydroxyapatite and protein. J Dent. 2011;39(9):612-8.

50. Fatemeh K, Mohammad Javad M, Samaneh K. The effect of silver nanoparticles on composite shear bond strength to dentin with different adhesion protocols. J Appl Oral Sci. 2017;25(4):367-73.

51. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. J Dent Res. 2004;83(6):454-8.

52. Sezinando Á, Perdigao J, Ceballos L. Long-term In Vitro Adhesion of Polyalkenoate-based Adhesives to Dentin. J Adhes Dent. 2017;19(4):305-16.

53. Wendlinger M, Nunez A, Moreira P, Carneiro TS, Cochinski GD, Siqueira F, et al. Effect of the absence of HEMA on the bonding properties of universal adhesive systems containing 10-MDP: An in vitro study. Oper Dent. 2023;48(5):500-12.

54. Chibinski A N, Wambier L M, Feltrinb J, Loguercio A D; Wambier D S, Reis A ,Caries Res 2017;51:527-541.

55. (Zhao IS, Gao SS, Hiraishi N, Burrow MF, Duangthip D, Mei ML, et al. Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review. Vol. 68, International Dental Journal. Wiley-Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 67–76.

56. Mei ML, Lo ECM, Chu CH. Arresting Dentine Caries with Silver Diamine Fluoride: What's Behind It? Vol. 97, Journal of Dental Research. SAGE Publications Inc.; 2018. p. 751–8.)
## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No experimento 1, foi avaliado a resistência a microtração (µTBS) onde os resultados mostraram que apenas a interação dos fatores do DFP vs tempo foi significativo (P=0,03). A aplicação de DFP melhora a média imediata de µTBS a dentina para ambos os adesivos universais quando comparado ao grupo controle. No tempo imediato, o adesivo CQB apresentou uma média significativa e maior à dentina quando aplicado do DFP 38%. Após 2 anos, grupos que o DFP foi aplicado tiveram valores médios mais altos de µTBS em comparação ao grupo controle, mantendo os valores das médias de µTBS além de redução significativa nos valores de µTBS para o adesivo CUQ. Na microanálise química por EDX/SEM, nos resultados foram observadas precipitações de prata nas interfaces adesivas e nos túbulos dentinários independente da estratégia adesiva, teve aumento ao pico de Ca após tratamento com DFP que foi proporcional à concentração, além de picos de Ag independente do adesivo utilizado no tempo imediato e após 2 anos.

No experimento 2, foram avaliadas as propriedades adesivas da interface resina-dentina tratada com DFP 38% submetidas ao desafio cariogênico *in situ*. Em relação aos resultados, no baseline não foram observadas diferenças significativas nos valores de µTBS bem como para ambas as estratégias adesivas, independente dos adesivos universais utilizados. Após o desafio cariogênico *in situ*, valores mais altos de µTBS foram observados quando o DFP foi aplicado em comparação com os grupos sem aplicação de DFP. A aplicação de DFP preservou significantemente os valores de µTBS além de apresentar um aumento do pico de Cálcio e Prata na interface resina dentina quando avaliado após o desafio cariogênico *in situ*.

## REFERÊNCIAS

[1] K. Yoshihara, Y. Yoshida, S. Hayakawa, N. Nagaoka, M. Irie, T. Ogawa, K.L. Van Landuyt, A. Osaka, K. Suzuki, S. Minagi, B. Van Meerbeek, Nanolayering of phosphoric acid ester monomer on enamel and dentin, Acta Biomater. 7 (8) (2011) 3187–3195, <u>https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.04.026</u>.

[2] A. Mazzoni, L. Tj¨aderhane, V. Checchi, R. Di Lenarda, T. Salo, F.R. Tay, D.
H. Pashley, L. Breschi, Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability, J. Dent. Res. 94 (2) (2015) 241–251, https://doi.org/10.1177/0022034514562833.

[3] M. Toledano, F.S. Aguilera, M. Yamauti, M.E. Ruiz-Requena, R. Osorio, In vitro load-induced dentin collagen-stabilization against MMPs degradation, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 27 (2013) 10–18, <u>https://doi.org/10.1016/j</u>. jmbbm.2013.06.002.

[4] M. Toledano, M. Yamauti, E. Osorio, R. Osorio, Zinc-inhibited MMP-mediated collagen degradation after different dentine demineralization procedures, Caries Res. 46 (3) (2012) 201–207, https://doi.org/10.1159/000337315.

[5] A. Rosenblatt, T.C. Stamford, R. Niederman, Silver diamine fluoride: a caries "silver-fluoride bullet", J. Dent. Res. 88 (2) (2009) 116–125, <u>https://doi.org/</u>10.1177/0022034508329406.

[6] A.C. Follak, L.L. Miotti, T.L. Lenzi, R.O. Rocha, F.Z.M. Soares, Self-etch approach of universal adhesives as an alternative to minimize bond degradation on sound dentin vs caries-affected dentin over time, J. Adhes. Dent. 23 (3) (2021) 243–252, https://doi.org/10.3290/j.jad.b1367889.

[7] F.S.F. Siqueira, M. Wendlinger, L.C.R. Araújo, P.H.A. Moreira, A.F.M. Cardenas, T. S. Carvalho, A. Reis, A.D. Loguercio, Bonding performance of universal adhesives to eroded dentine: a 6-year evaluation, J. Dent. 136 (2023) 104633, https://doi.org/10.1016/j.jdent.2023.104633.

[8] M.K. Pugach, J. Strother, C.L. Darling, D. Fried, S.A. Gansky, S.J. Marshall, G. W. Marshall, Dentin caries zones: mineral, structure, and properties, J. Dent. Res.88 (1) (2009) 71–76, https://doi.org/10.1177/0022034508327552.

[9] V.T. Noronha, A.J. Paula, G. Dur'an, A. Galembeck, K. Cogo-Müller, M. Franz- Montan, N. Dur'an, Silver nanoparticles in dentistry, Dent. Mater. 33 (10) (2017) 1110–1126, https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.07.002.

[10] K. Zhang, M.A.S. Melo, L. Cheng, M.D. Weir, Y. Bai, H.H.K. Xu, Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms, Dent. Mater. 28 (8) (2012) 842–852, https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.027.

[11] M.A.S. Melo, L. Cheng, K. Zhang, M.D. Weir, L.K.A. Rodrigues, H.H.K. Xu, Novel dental adhesives containing nanoparticles of silver and amorphous calcium phosphate, Dent. Mater. 29 (2) (2013) 199–210, <u>https://doi.org/10.1016/j</u>. dental.2012.10.005.

[12] M. Sulkala, J. Wahlgren, M. Larmas, T. Sorsa, O. Teronen, T. Salo, L. Tj¨aderhane, The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats, J. Dent. Res. 80 (6) (2001) 1545–1549, https://doi.org/10.1177/00220345010800061301.

[13] Z. Jowkar, F. Shafiei, E. Asadmanesh, F. Koohpeima, Influence of silver nanoparticles on resin-dentin bond strength durability in a self-etch and an etch-and-rinse adhesive system, Restor. Dent. Endod. 44 (2) (2019) e13, <u>https://doi</u>. org/10.5395/rde.2019.44.e13.

[14] T.P. Matos, R. Naupari-Villasante, P.V.M. Kunz, V. Hass, A. Reis, M.F. Guti'errez, A. D. Loguercio, 48-month clinical evaluation of a copper-containing universal adhesive in non-carious cervical lesions: a double-blind randomised clinical trial, Dent. Mater. 39 (9) (2023) 820–830, https://doi.org/10.1016/j.dental.2023.07.002.

[15] T.P. Matos, M.F. Guti'errez, T.A. Hanzen, P. Malaquias, A.M. de Paula, J.J. de Souza, V. Hass, E. Fernández, A. Reis, A.D. Loguercio, 18-month clinical evaluation of a copper-containing universal adhesive in non-carious cervical lesions: a double-blind, randomized controlled trial, J. Dent. 90 (2019) 103219, https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.103219.

[16] A. Peutzfeldt, T. Koch, C. Ganss, S. Flury, A. Lussi, Effect of tin-chloride pretreatment on bond strength of two adhesive systems to dentin, Clin. Oral Investig. 18 (2) (2014) 535–543, https://doi.org/10.1007/s00784-013-0975-6.

[17] S. Flury, T. Koch, A. Peutzfeldt, A. Lussi, C. Ganss, The effect of a tincontaining fluoride mouth rinse on the bond between resin composite and erosively demineralised dentin, Clin. Oral Investig. 17 (1) (2013) 217–225, <u>https://doi.org/10.1007/s00784-012-0697-1</u>.

[18] Q.H. Zhi, E.C. Lo, H.C. Lin, Randomized clinical trial on effectiveness of silver diamine fluoride and glass ionomer in arresting dentine caries in preschool children, J. Dent. 40 (11) (2012) 962–967, https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.08.002.

[19] J.A. Horst, H. Ellenikiotis, P.L. Milgrom, UCSF protocol for caries arrest using silver diamine fluoride: rationale, indications and consent, J. Calif Dent. Assoc. 44 (1) (2016) 16–28.

[20] L.L. Cheng, Limited evidence suggesting silver diamine fluoride may arrest dental caries in children, J. Am. Dent. Assoc. 148 (2) (2017) 120–122, <u>https://doi.org/10.1016/j.adaj.2016.11.022</u>.

[21] Y.O. Crystal, R. Niederman, Evidence-based dentistry update on silver diamine fluoride, Dent. Clin. N. Am. 63 (1) (2019) 45–68, <u>https://doi.org/10.1016/j</u>. cden.2018.08.011.

[22] S. Armstrong, L. Breschi, M. <sup>•</sup>Ozcan, F. Pfefferkorn, M. Ferrari, B. Van Meerbeek, Academy of dental materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μTBS) approach, Dent. Mater. 33 (2) (2017) 133–143, <u>https://doi.org/10.1016/j</u>. dental.2016.11.015.

[23] Reinke SM, Lawder JÁ, Divardin S, Raggio D, Reis A, Loguercio AD. Degradation of the resin-dentin bonds after simulated and inhibited cariogenic challenge in in situ model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2012; 100(6): 1466-71

[24] Zero, D. T. In situ caries models. Advances in dental research 9.3. 1995 214-230.



**Apêndice 1.** Termo de consentimento livre e esclarecido estudo 2.

# Universidade Ceuma

# TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

# INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

## Título do Estudo EFEITO DA APLICAÇÃO DE DIAMINO FLUORETO DE PRATA NAS PROPRIEDADES ADESIVAS DA INTERFACE RESINA-DENTINA SUBMETIDA A UM DESAFIO CARIOGÊNICO IN SITU

Você está sedo convidado a participar de um estudo de pesquisa que se destina a avaliar as propriedades adesivas com o uso do Diamino Fluoretro de Prata. Este estudo é importante porquê vai auxiliar em futuros estudos clínicos.

O estudo será feito da seguinte maneira: o voluntário usára dispositivos intra orais por 14 dias consecutivos com uso da sacarose simulando um ambiente bucal cariogênico.

Sempre que você desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo. A qualquer momento, você poderá recusar a continuar participando do estudo e, também, poderá retirar seu consentimento, sem que para isto sofra qualquer penalidade ou prejuízo, ou seja sem qualquer prejuízo da continuidade do seu acompanhamento médico.

Será garantido o sigilo quanto a sua identificação e das informações obtidas pela sua participação, exceto aos responsáveis pelo estudo, e a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Você será indenizado(a) por qualquer despesa que venha a ter com sua participação nesse estudo e, também, por todos os danos que venha a sofrer pela mesma razão, sendo que, para essas despesas estão garantidos os recursos.

Pesquisador responsável

Luana Paraiso Muniz - CPF 959449743-20 Rua: Josue Montello, 1 – UNICEUMA Telefone: (98)996180199

Assinatura do sujeito ou responsável

São Luis\_\_\_/\_\_/



# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - UEPG

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da aplicação de diamino fluoreto de prata nas propriedades adesivas e químicas da interfase resina-dentina.

Pesquisador: Alessandro Dourado Loguercio

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 88739318.7.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

## Número do Parecer: 2.631.289

### Apresentação do Projeto:

O objetivo do presente estudo será avaliar o efeito do uso de diamino fluoreto de prata nas propriedades adesivas, químicas e micro-morfológicas da interface resina-dentina in vitro e in situ. Primeiramente serão avaliados noventa e seis molares humanos, que serão submetidos à produção artificial de cárie dentinária e divididos em 12 grupos. Os grupos serão organizados conforme a aplicação de diferentes soluções de diamino fluoreto de prata DFP (12% e 38%), dois adesivos universais (Clearfil Universal Bond Quick [CUQ] e Single Bond Universal [SBU]), e duas estratégias adesivas (etch-and-rinse [ER] e self-etch [SE]). Após a aplicação do DFP e dos adesivos, os dentes serão restaurados com resina composta de forma incremental, seccionados e submetidos ao teste de resistência de união por microtração (µTBS), bem como à análise por espectrometria de raios X por energia dispersiva (MEV/EDX). Esses testes serão realizados tanto imediatamente quanto após dois anos de armazenamento em água. Os dados dessa etapa da pesquisa serão analisados por ANOVA de quatro fatores e teste de Tukey (α = 0,05). Em um segundo momento, cinquenta e seis molares humanos serão divididos em 8 grupos para avaliar o efeito do DFP 38% em combinação com dois sistemas adesivos (Single Bond Universal [SBU]e ZIPbond universal [ZIP]) e duas estratégias adesivas (etch-and-rinse [ER] e self-etch [SE]). Após a aplicação do diamino fluoreto de prata e dos adesivos, os dentes serão restaurados com resina composta de forma incremental e seccionados em espécimes de palitos. Os espécimes em palitos foram avaliados imediatamente e após 14 dias de desafio cariogênico in situ, durante o qual os dentes foram expostos a um ambiente cariogênico utilizando dispositivos intraorais (aparelhos) em 20 voluntários. Após o período de exposição, os espécimes foram submetidos a testes de resistência de união e microanálise química por Scanning Electron Microscopy por meio da Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX-SEM). Os dados também foram analisados por ANOVA de quatro fatores e teste de Tukey (α = 0,05).

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