

**Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba**

Mariana Dias Moda

**ANÁLISE DA INTERFACE DE UNIÃO ENTRE
CIMENTO RESINOSO AUTO-ADESIVO À
DENTINA ERODIDA *IN VITRO***

ARAÇATUBA - SP

2016

Mariana Dias Moda

**ANÁLISE DA INTERFACE DE UNIÃO ENTRE
CIMENTO RESINOSO AUTO-ADESIVO À DENTINA
ERODIDA *IN VITRO***

ARAÇATUBA - SP

2016

Mariana Dias Moda

**ANÁLISE DA INTERFACE DE UNIÃO ENTRE
CIMENTO RESINOSO AUTO-ADESIVO À DENTINA
ERODIDA *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de Concentração em Dentística.

Orientador: Prof. Adj. Paulo Henrique dos Santos

Co-orientadora: Profa. Ass. Dra. Ticiane Cestari Fagundes

ARAÇATUBA - SP

2016

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M689a	Moda, Mariana Dias. Análise da interface de união entre cimento resinoso auto-adesivo à dentina erodida in vitro / Mariana Dias Moda. - Araçatuba, 2016 88 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Paulo Henrique dos Santos Coorientadora: Profa. Ticiane Cestari Fagundes 1. Erosão dentária 2. Dentina 3. Cimentos de resina I. Título Black D2 CDD 617.6
-------	--

Dedicatória

Dedicatória

A Deus

Pela presença onipotente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais,

Marcos e Heloísa,

Pela força, dedicação, paciência e pela imensa contribuição para que eu pudesse realizar muitos sonhos e alcançar objetivos. Obrigada pelo maior presente que vocês puderam me dar: a vida!

À minha irmã Lígia,

Não tenho palavras para descrever o quanto a admiro. Muitas lembranças de infância que estarão sempre vivas. Te amo!

Aos meus avós,

Antonio, Neide, Antenor e Elza,

Alguns infelizmente não estão mais presentes... eternas e doces lembranças que guardarei sempre comigo. Saudades!

Agradecimentos
Especiais

Agradecimentos Especiais

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

Ao meu orientador,

Prof. Paulo Henrique dos Santos

Quero agradecê-lo pela oportunidade em trabalhar ao seu lado e poder fazer parte dessa equipe tão competente.

Professor, às vezes não falamos muitas coisas, dentre elas, o quanto já ouvi palavras bonitas a seu respeito e que com certeza estão de acordo com o que penso.

Obrigada por ser um professor tão acessível e sempre disposto a ajudar.

Me sinto muito honrada em tê-lo como orientador!

Muito Obrigada!!!

À minha co-orientadora,

Profa. Ticiane Cestari Fagundes

Professora, foi um presente tê-la como co-orientadora! Me faltam palavras para dizer o quanto sou grata a você, pelos conselhos, pelo olhar de incentivo, pelo abraço amigo em momentos cruciais.

Aprendi muito com você nesse pouco tempo de convivência. Seja pela sua objetividade, competência e sensibilidade.

Obrigada por se fazer tão participativa em minha orientação enaltecendo este trabalho!

Muito Obrigada!!!

“A amizade é uma predisposição recíproca que torna dois seres igualmente ciosos da felicidade um do outro.”

Platão

Ao meu amigo,

Leonardo Portilha Gomes da Costa

O que dizer a você, Léo! Meu grande amigo, meu psicólogo canceriano... aquele que quando eu mais precisei, estava ali, estendendo a mão pra me levantar e ao mesmo tempo apontando onde eu poderia evoluir, que nunca se conformou em me ver mal... Não tenho palavras para dizer tudo o que penso a seu respeito, saiba que te admiro muito e torço muito por você, pelo seu sucesso. Você merece tudo de bom nesse mundo, meu amigo!

À minha amiga,

Silvana Zanello Zawadneak

Sil, há 11 anos, nos conhecíamos no nosso trote dos calouros, doces lembranças da minha querida UFPR... e desde então, embora eu tenha voltado pra cá, a nossa amizade, afinidade e cumplicidade continuam vivas. Saiba que você é minha irmã de coração. Torço muito por você, sei da sua imensa capacidade. Você merece todo sucesso amiga!

À minha amiga,

Josiane Braga Scarpa

Josi, você traz alegria para os meus dias, sempre tem algo que me faça rir. Nunca esqueci do meu primeiro emprego... foi você que arrumou! Saiba que estamos juntas, seja em momentos difíceis, como em momentos felizes. Desejo tudo de bom pra você!!

Aos colegas e amigos de pós-graduação,

Ana Teresa Maluly Proni, Bruna de Oliveira, Ebele Adaobi Silva, Fábio Martins Salomão, Henrico Badaoui Strazzi Sahyon, Janaína Cardoso Moreira, Laura Molinar Franco, Lucas Silveira Machado, Marjorie de Oliveira Gallinari, Morganna Borges de Almeida Souza, Nara Santos Araújo, Sandra Meira Borghi Frascino, Thaís Yumi Umeda Suzuki, Úrsula Aparecida Escalero Silva, Vanessa Rahal.

Ana Teresa Maluly Proni

Anatê, o que dizer de você... em pouco tempo de convivência pude notar o quanto você é do bem! O quanto você se dispõe em ajudar o outro. Sabe aquelas pessoas com aura boa? É você, garota! Desejo mais sucesso a você, competência você tem de sobra!

Janaína Cardoso Moreira

Jana, estamos juntas desde o começo da pós, hein! Foi uma longa aventura no qual compartilhamos risadas, choros, alegrias... Saiba que estamos juntas, o que precisar, pode contar comigo! Sucesso a você!
Será uma excelente professora!

Laura Molinar Franco e Fábio Martins Salomão,

Vocês são nossos “docs”... Laura, você será uma grande professora, seja pela sua competência e objetividade. Fábio, você sempre nos traz as mais novas tecnologias e sempre tem algo novo a nos mostrar, você é um grande clínico! Sucesso a vocês!

Marjorie de Oliveira Gallinari

Marjô, também estamos juntas desde o começo da pós, e passamos por várias coisas... Obrigada pelas inúmeras vezes em que me ajudou... inclusive em um momento muito difícil! Sucesso pra você, já é uma grande pesquisadora!

Morganna Borges de Almeida Souza

Conheci você ano passado, quando ainda estava na graduação... Sempre muito atenciosa e educada.. torço pelo seu sucesso nessa nova caminhada. Adoro você! Conte comigo sempre!

Sandra Meira Borghi Frascino

Sandrine, rs.. sempre temos uma história pra rir ou contar não é mesmo? Saiba que estamos juntas, conte sempre comigo! Você já é uma excelente professora! Sucesso a você!

Úrsula Aparecida Escalero Silva

O que dizer de você? Sempre disposta a ajudar a todos... Você é muito competente e atenciosa! Saiba que gosto muito de você! Obrigada pela parceria! Te desejo muito sucesso!

Carla Oliveira Fravetto e Marcelle Danelon

Carla, quero agradecê-la por sua ajuda no início deste trabalho! Sou muito grata a você por todos os ensinamentos e pela paciência que teve comigo! Marcelle, quero deixar aqui o meu agradecimento a você, em etapas importantes desse projeto, pela paciência e disponibilidade! Muito sucesso a vocês! Vocês merecem!

As queridas alunas de iniciação científica: *Ana Carolina, Érika, Karina e Morgana*. Saibam que é muito bom conviver com vocês, contem sempre comigo!

Aos meus queridos primos *Ana Paula Pinholi Dias, André Carvalho*
Dias e Camila Moda Trevelin. Saudades da infância que
compartilhamos juntos, momentos que ficarão gravados para sempre!
É muito bom reencontrá-los e dividir novas experiências!

Agradecimientos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, ao diretor Prof. Dr. Wilson Roberto Poi, e ao vice-diretor Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho, pela gentileza e atenção com que nos recebem.

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso, pelo seu empenho para que possamos ter uma formação de pós-graduação de excelência.

À Cordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão inicial da bolsa de mestrado, de suma importância para que esse trabalho fosse realizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº 2014/11734-8) e por todo suporte financeiro indispensável para realização deste trabalho.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, Cristiane Lui, Lilian Mada e Valéria Zagato, por todo o suporte, paciência e atenção com que nos tratam.

Aos bibliotecários, por estarem sempre dispostos a nos ajudar. Obrigada por todo o valioso apoio prestado.

A todos professores do curso de Pós-Graduação, pela oportunidade de aprendizado constantes.

Aos alunos da turma de pós-graduação em Odontologia, pelas experiências compartilhadas ao longo de todo o curso.

Aos professores da disciplina de Dentística,

Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso, Prof. Dr. Renato Herman Sundfeld, Prof. Dr. Ricardo Coelho Okida, Prof. Dr. Sílvio José Mauro, Profa. Dra. Ticiane Cestari Fagundes. Muito obrigada por ter o privilégio de conviver e aprender com cada um de vocês. Em especial ao Prof. Dr. Ricardo Coelho Okida e, à minha co-orientadora, Profa. Dra. Ticiane Cestari Fagundes, pelo aprendizado que tive com vocês no acompanhamento às clínicas de graduação.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, Elaine Cristina Francischini Ferreira, Nelci Vieira, Peterson Moura. Pela convivência durante essa caminhada, por sempre estarem dispostos a nos ajudar, por fazer nossos dias mais agradáveis. Muito obrigada!

Ao meu querido Departamento de Odontologia Restauradora, a todos que fazem parte desse departamento, tornando um lugar agradável de se trabalhar e conviver.

Aos professores da disciplina de Materiais Dentários,

Profa. Dra. Aimeé Maria Guiotti, Profa. Dra. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende e, ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Henrique dos Santos, pela oportunidade de ter acompanhado os alunos de graduação nas aulas teóricas e práticas ministradas.

Aos Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem do programa de Pós-graduação em Ciência Odontológica, pela autorização para que eu pudesse utilizar o laboratório de Odontopediatria e por toda a ajuda em etapas laboratoriais indispensáveis para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Juno Gallego, da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, pela autorização do uso do ultramicrodurômetro, e toda a atenção e suporte prestados, de suma importância para a realização do trabalho piloto.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, pela disponibilidade na realização da microscopia eletrônica de varredura, tão importante nesse trabalho.

À Márcia Graeff, da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, técnica responsável pelo aparelho de microscopia confocal. Obrigada pela geração das bonitas imagens de microscopia confocal, indispensáveis para a ilustração deste trabalho.

Aos professores da banca de qualificação, representada pelo Prof. Tit. Renato Herman Sundfeld e pela Profa. Adj. Denise Pedrini Ostini. Muito obrigada por terem aceito meu convite e contribuído sobremaneira para o meu crescimento.

Aos professores da banca examinadora, representada pelo Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP e pela Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Agradeço a disponibilidade em aceitarem nosso convite e participarem deste momento tão especial e importante para mim. Será uma honra tê-los em minha defesa. Muito obrigada!

Epígrafe

Epígrafe

*“A coragem é a primeira das qualidades humanas porque
garante todas as outras”*

Aristóteles

Resumo

MODA, M.D. Análise da interface de união entre cimento resinoso auto-adesivo à dentina erodida *in vitro*. [Dissertação]. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; Araçatuba, 2016.

Resumo

Considerando o expressivo aumento de lesões erosivas e a necessidade de estudos que avaliem a adesão sobre um substrato erodido. O propósito deste estudo foi avaliar a interface de união entre cimento resinoso auto-adesivo à dentina submetida à erosão *in vitro*. Setenta e dois terceiros molares humanos foram utilizados e divididos em dois grupos: grupo 1 (dentina normal) e grupo 2 (dentina erodida). Para a obtenção da erosão *in vitro* foi empregado um protocolo, no qual os espécimes ficaram imersos em solução desmineralizante, 2 minutos por ciclo, e em solução remineralizante, 10 minutos por ciclo, ao longo de 9 dias. Na sequência, ambos os grupos foram submetidos a quatro tratamentos de superfície dentinária: grupo controle (sem tratamento), clorexidina 2%, ácido poliacrílico 20%, e EDTA 0,1M (n=9), previamente ao processo de união. Blocos de resina composta TPH foram cimentados com cimento resinoso auto-adesivo RelyX U200 às superfícies dentinárias. Os dentes foram submetidos à cortadeira de precisão, onde obteve-se amostras em forma de palitos, os quais foram submetidos ao teste de microtração para avaliar a resistência de união entre o cimento resinoso e dentina, 24 horas e 8 meses após o procedimento de união. Associada a microtração, a análise do padrão de fratura dessas interfaces foi realizada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Em amostras distintas, foram obtidas fatias longitudinais dos dentes, sendo três espécimes de cada grupo, os quais foram avaliados em microscopia confocal (MC), para análise qualitativa da interface dentina/cimento. Os resultados mostraram que a dentina previamente erodida apresentou considerável aumento na densidade e profundidade de *tags* resinosos em relação à dentina normal para os diferentes grupos, embora pouca diferença nos valores de resistência de união tenha sido encontrada. Os diferentes tipos

de tratamentos realizados em dentina, de uma forma geral, aumentaram os valores de resistência de união em comparação ao grupo controle. O armazenamento das amostras em saliva artificial por 8 meses, parece não ter sido suficiente para causar uma significativa degradação da interface adesiva.

Palavras-chave: Cimentos de resina. Dentina. Erosão dentária.

Abstract

MODA, M.D. Analysis of bonding interface between self-adhesive resin cement to in vitro eroded dentin. [Dissertação]. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; Araçatuba, 2016.

Abstract

Considering the significant increase of erosive lesions and the need for studies to evaluate the adhesion on a eroded substrate. The purpose of this study was to evaluate the bonding interface between self-adhesive resin cement to in vitro eroded dentin. Seventy-two third molars were used and divided into two groups: group 1 (sound dentin) and group 2 (eroded dentin). The in vitro erosion was created following a demineralization protocol, in which the specimens of group 2 were immersed in demineralizing solutions 2 minutes per cycle, and in remineralizing solution, 10 minutes per cycle, during 9 days. Both groups were submitted to four dentin surface treatments: control group (without any treatment), 2% chlorhexidine, 20% polyacrylic acid, and 0,1M EDTA pH 7.4 (n=9). TPH resin-based composite blocks were bonded with RelyX U200 self-adhesive resin cement on the pretreated dentin surfaces. The teeth were submitted to precision cutter, thus obtaining samples forms of sticks. The samples were submitted to microtensile bonding test to evaluate the bonding strength between self-adhesive resin cement to dentin, 24 hours and 8 months after the bonding procedure. The fractured samples were evaluated in scanning electron microscopy (SEM), to classify the fracture pattern of these interfaces. Finally, three specimens of each group were longitudinal cut and obtained three slices per group and evaluating by confocal laser scanning microscopy (CLSM), with the purpose to analyze qualitatively the dentin/cement interface. The results showed that the etched dentin showed significant increase in density and depth of resinous tags compared to sound dentin, although little difference in bond strength values has been found. Different types of treatments performed on dentin, in general, increased the bonding strength values compared to the control group. The storage of the samples in artificial saliva

for 8 months, seems to have been not enough to cause significant degradation of the adhesive interface.

Keywords: Dental erosion. Dentin. Resin cement.

Listas e Sumário

Lista de Figuras

Figura 1. Análise em microscopia eletrônica de varredura dos diferentes grupos em dentina normal e erodida, 24 horas após o processo adesivo	74
Figura 2. Análise em microscopia eletrônica de varredura dos diferentes grupos em dentina normal e erodida, 8 meses após o processo adesivo	76
Figura 3. Análise em microscopia confocal das dentinas normal e erodida submetidas a diferentes tratamentos de superfície	78/79

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores de resistência à microtração, em MPa, 24 horas após adesão, dos diferentes tipos de tratamentos empregados em dentina (normal ou erodida)	70
Tabela 2. Valores de resistência à microtração, em MPa, 8 meses após adesão, dos diferentes tipos de tratamentos empregados em dentina (normal ou erodida)	70
Tabela 3. Análises qualitativa (escores) em microscopia confocal	71

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Incidência (%) dos modos de falhas entre os grupos de tratamento, 24 horas após o processo de adesão72

Gráfico 2. Incidência (%) dos modos de falhas entre os grupos de tratamento, 8 meses após o processo de adesão72

Lista de Fluxograma

Fluxograma 1. Delineamento experimental empregado neste estudo	73
---	----

Listas de abreviaturas, símbolos e siglas

°C = grau Celsius

± = mais ou menos

% = percentagem

X = vezes

µm = micrometro

ANOVA = Análise da variância

Ass = Assistente

CA = Califórnia

CEP = Comitê de Ética e Pesquisa

Dr = Doutor

Dra = Doutora

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

EUA = Estados Unidos da América

et al. = e colaboradores

g = grama

HCl = ácido clorídrico

M = molar

MC = Microscopia Confocal

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

mg = miligrama

mm = milímetro (unidade de medida equivalente a 10^{-3}m)

MMP = metaloproteinase

MN = Minnessota

min = minuto

MPa = Megapascal

n° = número

nm = nanômetro

Prof. = Professor

Profa = Professora

s = segundo

SP = São Paulo

UNESP = Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Sumário

1. Introdução		37
2. Proposição		40
3. Materiais e Método		42
4. Resultados		51
5. Discussão		55
6. Conclusão		63
Referências		65
Anexos		80

Introdução

1. Introdução

O foco da Odontologia Restauradora vem se modificando ao longo do tempo. Num passado recente, havia maior preocupação com a doença cárie, entretanto, as chamadas lesões não cariosas vem ganhando relevância clínica pela grande incidência de casos¹, em especial, as lesões erosivas. Tal fato se deve ao envelhecimento natural de grande parte da população, o qual permite que os dentes sejam mantidos por mais tempo na boca devido à melhoria das condições de saúde bucal, assim como pelo aumento no consumo de alimentos ácidos^{2,3}.

A erosão dentária pode ser definida como uma perda irreversível de tecido dentário, quando exposto a processos químicos sem envolvimento bacteriano⁴. Sua etiologia é multifatorial, podendo ser intrínseca e/ou extrínseca. A origem intrínseca ocorre quando a perda tecidual está associada a problemas gastroesofágicos como: vômitos recorrentes em indivíduos com bulimia e anorexia, geralmente ligados a doenças psicossomáticas⁵, sendo vistas com maior frequência em sociedades ocidentais, especialmente entre mulheres de 16 e 35 anos de idade⁶. A origem extrínseca ocorre pela ingestão de bebidas e alimentos ácidos, além do uso de produtos de higiene e medicamentos contendo ácidos. Acredita-se que o potencial erosivo de bebidas ácidas não esteja apenas ligado ao seu pH⁷, mas está associado também ao conteúdo mineral dos tecidos dentários, da acidez titulável e propriedades quelantes do cálcio², podendo, ainda, o processo erosivo ser relacionado ao consumo de álcool⁵. O papel da saliva também se torna extremamente relevante na dinâmica erosiva, pois de acordo com sua composição mineral e sua capacidade de neutralizar ácidos contidos na dieta alimentar, poderia contribuir sobremaneira para acentuar ou minimizar esse tipo de lesão⁸. O processo erosivo pode estar fortemente ligado às forças abrasivas⁹, sendo que a susceptibilidade à abrasão poderia aumentar à medida em que a dentina erodida é exposta aos ácidos causando um amolecimento de superfície, resultando em uma superfície erodida

com aspecto vitrificado. Nesse sentido a presença de substâncias abrasivas em dentifrícios assim como o diâmetro das cerdas de escovas dentais também poderia afetar esse processo^{10,11}.

A erosão promove uma desmineralização dentinária, com exposição das estruturas orgânicas, formada principalmente por colágeno, seu principal componente¹². Seu grau de degradação pode ser determinado pela análise de hidroxiprolina, principal aminoácido presente no colágeno⁶. Além disso, algumas enzimas proteolíticas, como a pepsina e tripsina, presentes no trato digestivo e muitas vezes integrante da microbiota oral, podem remover essa matriz orgânica através de processos bioquímicos, acentuando o processo erosivo dentinário¹³.

Diante do exposto, vários estudos *in vitro* têm sido realizados com o objetivo de simular e entender a dinâmica erosiva. Um método bastante comum é a utilização de ácido cítrico, presente em refrigerantes, no processo de dissolução do esmalte e dentina¹⁴, sendo um dos ácidos com maior potencial erosivo, justamente por sua capacidade em quelar o cálcio dos tecidos dentais e da saliva¹⁵. No entanto, Caneppele et al.⁷ mostraram maior susceptibilidade dos tecidos dentários à erosão quando suas concentrações de cálcio e fosfato eram baixas, tornando o pH crítico mais suscetível ao processo de erosão com diferentes bebidas ácidas como refrigerantes, vinhos e energéticos. Em adição, o baixo grau de saturação de hidroxiapatita e fluorapatita ocasionaria deficiências estruturais tornando-os mais propensos à erosão⁷. Outra maneira de se obter erosão *in vitro* seria a utilização de ácido clorídrico, pepsina e tripsina, presentes no trato gastrointestinal, simulando condições de vômitos constantes em pacientes com desordens alimentares, doença gastroesofágica, anorexia e bulimia sendo que a combinação de pepsina e tripsina acentuaria o desgaste erosivo^{6,16}.

A Odontologia contemporânea vem buscando procedimentos cada vez menos invasivos, especialmente quando se trata de preparos cavitários, tanto para restaurações diretas como

indiretas. Muitas vezes o processo de cimentação de restaurações indiretas é realizado sobre estrutura dentária sem nenhum tratamento ou preparo prévio, a qual pode estar hígida ou previamente erodida por um ou mais processos erosivos acima descritos^{17,18}.

O processo de cimentação de restaurações estéticas também tem evoluído nos últimos anos. A introdução no mercado de cimentos resinosos auto-adesivos, proporcionou uma melhor otimização do tempo e redução de passos clínicos¹⁹. Esses cimentos dispensam o prévio condicionamento ácido dos tecidos dentários bem como a aplicação de sistemas adesivos²⁰. Possuem em sua matriz orgânica monômeros resinosos de ácido fosfórico, que desmineralizam superficialmente esmalte e dentina, removendo parcialmente a *smear layer* formada por instrumentos rotatórios e/ou manuais, promovendo a retenção micromecânica e química à estrutura dental²¹ pela ligação dos monômeros do cimento com íons cálcio da hidroxiapatita do tecido dentário²². Entretanto, pela capacidade limitada desses monômeros em dissolver totalmente a *smear layer*, a interface cimento-dentina apresenta uma fraca ligação micromecânica devido a formação de tags resinosos curtos^{23,24}.

No sentido de investigar se a resistência de união destes materiais aos tecidos dentinários poderia ser otimizada ao longo do tempo, algumas substâncias têm sido estudadas. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), por possuir propriedades quelantes de cálcio, promoveria a exposição das fibras colágenas com maior penetração do cimento resinoso à dentina desmineralizada²⁴. No entanto, o uso dessa substância previamente à união com cimentos que dependem da presença de cálcio na superfície precisaria ser mais bem elucidado. O ácido poliacrílico, por sua vez, por ser considerado um ácido fraco, promoveria uma leve desmineralização da camada inorgânica, sendo utilizado como tratamento de superfície com objetivo de reforçar a união dos cimentos resinosos à dentina^{23,25}. A clorexidina, embora frequentemente utilizada na desinfecção de canais radiculares, tem sido empregada como alternativa aos tratamentos de superfície dentinária.

Di Hipólito et al.²⁶ demonstraram que o uso da clorexidina, tanto em concentrações de 0,2% como de 2%, diminuíram a resistência de união do cimento resinoso à dentina, podendo ser explicado pela sua capacidade em modificar a permeabilidade da *smear layer*.

Até o presente momento, diante da falta de pesquisas consistentes entre a adesividade de cimentos resinosos auto-adesivos à dentina previamente erodida, torna-se necessária uma investigação criteriosa, proporcionando um embasamento científico para sua melhor utilização na prática clínica.

2. Proposição

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a interface de união entre cimento resinoso auto-adesivo à dentina erodida *in vitro* submetida a diferentes tratamentos de superfície. As hipóteses nulas testadas foram: (1) não há diferença na resistência de união e morfologia da interface entre cimento resinoso auto-adesivo à dentina normal ou previamente erodida; (2) diferentes tratamentos de superfície não alteram a resistência de união e morfologia da interface entre esses materiais e o tecido dentinário normal ou previamente erodido e (3) não há diferença na resistência de união entre cimento resinoso auto-adesivo e dentina nos tempos de 24 horas e 8 meses após o procedimento de união.

Materiais e Método

3. Materiais e Método

Delineamento Experimental

Nesse projeto foram analisados os seguintes fatores: (1) dentina humana, em dois níveis (normal e erodida); (2) tratamentos de superfícies, em quatro níveis (controle (sem tratamento), clorexidina 2%, ácido poliacrílico 20%, e EDTA 0,1M) e (3) tempo de avaliação, em dois níveis (24 horas e 8 meses após o procedimento de união para o teste de resistência de união). Setenta e dois terceiros molares foram utilizados, sendo que em metade deles, a dentina foi submetida ao processo erosivo *in vitro*. Na sequência, todas as amostras tiveram sua superfície tratada com as seguintes substâncias: controle (sem tratamento), clorexidina 2%, ácido poliacrílico 20% ou EDTA 0,1M previamente ao processo de união utilizando cimento resinoso auto-adesivo. As variáveis respostas foram: resistência de união e qualidade da interface adesiva dentina/cimento. Os três princípios básicos da experimentação foram respeitados (repetição, aleatorização e blocagem). Além disso, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação do padrão de fratura obtido. Para análise da morfologia da interface adesiva foi utilizada a microscopia confocal (MC). O delineamento experimental deste estudo está ilustrado através da Fluxograma 1.

Seleção dos dentes e processo de erosão

O projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa da FOA – UNESP (Nº 32545114.1.0000.5420), e após sua aprovação, foram selecionados 72 dentes terceiros molares humanos recém-extraídos. Os espécimes foram limpos com curetas, e congelados a uma temperatura de -20°C, até o início da execução da pesquisa. Todos os dentes com evidência clínica de cárie, reabsorção radicular, trincas ou fraturas foram excluídos da pesquisa.

A superfície oclusal dos dentes foi removida em cortadeira de precisão Isomet 2000 (Buheler, Ltd, Lake Bluff, IL, EUA), sob refrigeração com água, para obtenção de uma superfície planificada de dentina. Após a exposição da superfície dentinária, todos os dentes foram abrasionados com lixa de granulação #600, sob refrigeração em água, em politriz automática Aropol E (Arotec Industria and Comercio Ltda, Cotia, SP, Brasil), por 30 segundos, para produção da *smear layer*. Os dentes foram divididos em 2 grupos (n=36), sendo que um dos grupos a dentina não foi submetida a nenhum tratamento (dentina normal) e o outro grupo foi submetido a um protocolo de erosão¹³. Este protocolo foi constituído pela imersão em solução HCl-pepsina 6 vezes por dia, com duração de 2 minutos cada, e após cada desafio erosivo, os espécimes foram imersos em tripsina por 10 minutos cada, por um total de 9 dias. Após o primeiro e o último tratamento com a solução remineralizante de tripsina, os espécimes foram escovados, por um tempo de 15 segundos cada, utilizando escova elétrica (Oral-B Plak Control Ultra; Braun, Frankfurt, Alemanha) sendo fixada em seu cabo uma massa de 200 gramas, a fim de simular a força exercida durante a escovação.

Preparo dos blocos de resina composta para a cimentação

Setenta e dois blocos de resina composta TPH na cor A3 (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) foram confeccionados em uma matriz pré-conformada (11mm de diâmetro e 4mm de profundidade). Para tanto, a resina composta foi inserida na matriz, utilizando uma espátula Thompson, e a cada 2 mm foi fotoativada com o equipamento de luz led Poly Wireless (Kavo, Joinville, SC, Brasil) pelo tempo recomendado de 40 segundos por cada face. Após a inserção do último incremento, uma tira de poliéster transparente e uma fina placa de vidro foram colocadas sobre o compósito na parte superior da matriz, a fim de nivelar o material, previamente à fotoativação. Todos os blocos de resina composta, após sua confecção, foram

abrasionados por uma lixa de granulação 600, sob refrigeração em água, utilizando uma politriz automática Aropol E (Arotec Industria & Comercio Ltda, Cotia, SP, Brasil), por 30 segundos.

Tratamentos de superfície da dentina previamente à cimentação

Tanto os dentes correspondentes à dentina normal quanto os dentes correspondentes à dentina previamente erodida foram submetidos a quatro tratamentos de superfície abaixo descritos.

Tratamento 1: controle (sem tratamento). Blocos de resina composta TPH foram cimentados diretamente sobre a superfície dentinária utilizando o cimento resinoso auto-adesivo RelyX U200 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA). Previamente a fotopolimerização, uma massa de 500 gramas foi posicionada sobre o conjunto por 3 minutos, para padronização da espessura do cimento resinoso. O conjunto foi então fotoativado por 40 segundos em todas as faces expostas. Após a cimentação as amostras foram armazenadas em uma estufa a 37°C por 24 horas.

Tratamento 2: Gluconato de clorexidina 2%. A solução de gluconato de clorexidina 2% (Riohex, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil) foi aplicada utilizando uma bolinha de algodão, friccionando-a a superfície dentinária por 60 segundos. A superfície então foi seca com papel absorvente. Previamente a fotopolimerização, uma massa de 500 gramas foi posicionada sobre o conjunto por 3 minutos, para padronização da espessura do cimento resinoso. O conjunto foi então fotoativado por 40 segundos em todas as faces expostas. Após a cimentação as amostras foram armazenadas em uma estufa a 37°C por 24 horas.

Tratamento 3: Ácido poliacrílico 20%. A superfície dentinária foi condicionada com ácido poliacrílico 20% (Cavity conditioner, GC Corporation, Tóquio, Japão). Utilizando um aplicador descartável KG Brush (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil), o ácido poliacrílico foi

espalhado friccionando-o sobre a superfície dentinária por 10 segundos, de acordo com as recomendações do fabricante. Toda a superfície foi lavada com água destilada por 20 segundos e seca com papel absorvente. Previamente a fotopolimerização, uma massa de 500 gramas foi posicionada sobre o conjunto por 3 minutos, para padronização da espessura do cimento resinoso. O conjunto foi então fotoativado por 40 segundos em todas as faces expostas. Após a cimentação as amostras foram armazenadas em uma estufa a 37°C por 24 horas.

Tratamento 4: EDTA. A superfície dentinária foi condicionada com EDTA 0,1M, pH 7,4 (Apothecário, Araçatuba, SP, Brasil) por 60 segundos. Toda a superfície foi lavada com água destilada por 20 segundos e seca com papel absorvente. Os blocos de resina composta foram cimentados como descrito anteriormente.

Corte e armazenamento das amostras:

Após o armazenamento em água destilada a 37°C por 24 horas, seis dentes por grupo foram seccionados em palitos medindo aproximadamente 1,0 x 1,0mm, com disco diamantado em cortadeira metalográfica Isomet 2000 (Buheler, Ltd, Lake Bluff, IL, EUA). Foram obtidos 8 palitos por grupo, sendo que metade (n=4) foi utilizada na avaliação da resistência de união 24 horas após o processo adesivo, enquanto a outra metade dos palitos foi armazenada por 8 meses em saliva artificial (Apothecário, Araçatuba, SP, Brasil), a 37°C, trocadas duas vezes semanalmente.

Avaliação de resistência de união pelo teste de microtração:

Os palitos foram levados individualmente à máquina de ensaio universal Odeme Microtensile OM 100 (Odeme Dental Research, Luzerna, SC, Brasil) a velocidade de 0,7mm por minuto para avaliação da resistência de união (MPa). Os palitos que apresentaram falha prematura foram incluídos nas médias dos respectivos grupos, atribuído o valor zero a este

palito. Para o teste de microtração, as extremidades dos palitos foram fixadas com uma cola adesiva à base de cianoacrilato (Super Bonder gel; Henkel Corp, Rocky Hill, Conn) na máquina de microtração. Os valores de resistência de união foram obtidos em MPa por meio da fórmula:

$$Ru = (F/A)$$

Onde RU = resistência de união, F = carga necessária para fraturar o espécime (N), A = área da interface de união em mm².

Avaliação do padrão de fratura

Após a ruptura dos espécimes, as interfaces foram analisadas em microscopia óptica utilizando o Estereomicroscópio (Leica MZ6), para identificar o tipo de fratura resultante de cada amostra, sendo que o tipo de fratura característico de cada grupo foi levado à microscopia eletrônica de varredura para a representação quanto ao padrão de fratura dos grupos. Os espécimes fraturados foram fixados com resina composta fotopolimerizável em *stubs* metálicos, mantendo as áreas envolvidas nas fraturas voltadas para cima. Em seguida, foram metalizados com ouro (Balzers SCD-050 sputter coater, OC Oerlikon Corporation AG, Pfäffikon, Suíça) e levados à microscopia eletrônica de varredura (EVO LS-15, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) para análise da interface de união. A classificação do padrão de fratura foi realizada em: coesiva na resina composta, coesiva na superfície dentinária, adesiva entre o cimento resinoso e o bloco de resina, adesiva entre o cimento resinoso e a superfície dentinária, coesiva no cimento resinoso ou mista.

Análise em Microscopia Confocal (MC)

Foram utilizados 24 terceiros molares hígidos, os quais foram divididos em três dentes por grupo. Para que as estruturas fossem visualizadas em microscopia confocal foi necessária

a adição de corante fluorescente rodamina 0,1% no cimento resinoso. Este corante na cor fúcsia foi adicionado ao cimento na proporção de 0,16 mg/g previamente ao processo de união²⁷. Em adição, de acordo com D'Alpino²⁷, um outro corante, a fluoresceína, foi inserida na câmara pulpar dos dentes 24h após o processo de união. Para tanto, os ápices radiculares foram removidos com disco dupla face fino (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) com refrigeração abundante. A câmara pulpar dos dentes foi aberta pelo lado radicular com uma broca carbide esférica nº 3 (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) e o tecido pulpar removido com auxílio de cureta para dentina e instrumento endodôntico. A seguir, os dentes tiveram a câmara pulpar irrigada com soro fisiológico, posicionada com a face oclusal voltada para baixo e fixados com cera pegajosa em um reservatório contendo água destilada, evitando sua desidratação, de modo que o nível da água não atingisse o interior da câmara pulpar onde a solução com o corante fosse aplicada. Essa solução aquosa era composta pelo corante fluorescente verde fluoresceína 0,1%, diluído em água destilada, e foi levada à câmara pulpar com auxílio de uma pipeta. Os dentes foram mantidos em reservatório com água destilada por, no mínimo, 4 horas para que a solução contendo o corante atingisse a interface adesiva²⁷. Após esse período, os dentes foram secos com papel absorvente e seccionados ao meio no sentido transversal, com disco diamantado em cortadeira de precisão (Isomet 2000, Buheler, Ltd, Lake Bluff, Ill, EUA), sendo obtidas três fatias de cada espécime.

As secções foram colocadas em ultra-som contendo água para remoção dos debris do procedimento de corte durante 10 minutos. Em seguida, foram examinadas em microscópio confocal (Leica TCS SP2, Leica, Mannheim, Alemanha). Um laser de gás misto foi usado como fonte de luz. A excitação da luz foi utilizada com um comprimento de onda máximo de 543nm. As imagens foram registradas no modo fluorescente.

Uma objetiva imersa em óleo foi utilizada (40x, abertura de 1,25). Uma área representativa de cada fatia foi escaneada em 11 secções de 2µm cada. A imagem obtida da média das 11 secções foi analisada por dois avaliadores previamente calibrados. A avaliação foi realizada pelo método duplo-cego. Nos casos em que houve divergência entre os dois examinadores, ambos avaliaram a imagem novamente até a obtenção de um consenso final.

Os seguintes critérios foram avaliados:

1) Qualidade da interface adesiva dentina/cimento²⁸:

Escore 0 - ausência de fendas, interface adesiva nítida, contínua;

Escore 1 - presença parcial de fendas, interface adesiva parcialmente contínua, presente em menos do que 50% da interface;

Escore 2 - presença de fendas com interface descontínua, presente em aproximadamente mais do que 50% da interface.

2) Formação de *tags* em dentina²⁸:

Escore 0 - não detectável;

Escore 1- poucos *tags* visíveis;

Escore 2- formação uniforme de *tags* com poucas ramificações laterais;

Escore 3- formação de longos *tags* com muitas ramificações laterais.

3) Profundidade de penetração dos *tags*²⁹:

Escore 0 - sem *tags*;

Escore 1 - *tags* $\leq 3\mu\text{m}$ em média;

Escore 2 - *tags* = 3 a 8,9 μm em média;

Escore 3 - *tags* = 9 a 15 μm em média;

Escore 4 - *tags* $\geq$ 15 μm em média.

4) Formação de camada híbrida²⁹:

Escore 0 = ausente;

Escore 1- formação parcial de camada híbrida até 50% da interface;

Escore 2- formação de camada híbrida maior que 50% da interface;

Escore 3- formação de camada híbrida em toda a interface.

Análise Estatística

Em relação aos dados obtidos no teste de resistência de união foi utilizada a ANOVA três fatores para medidas repetidas (substratos, grupos de tratamento e tempos de análise) e teste de Tukey para comparações entre as médias ($p < 0,05$). Ressalta-se que, para a análise estatística, a unidade experimental considerada foi o elemento dentário ($n=6$ por grupo) e não os palitos individualmente. Para as imagens obtidas através das análises de microscopia confocal, foi realizado o teste Kappa inter-examinadores para verificar o grau de concordância entre os avaliadores. Os dados foram submetidos aos testes Kruskal-Wallis e Dunnet para análise estatística ($p < 0,05$).

Resultados

4. Resultados

De acordo com a Tabela 1, na comparação entre os tipos de substrato, 24h após o processo de adesão, pode-se observar que para os grupos controle, ácido poliacrílico 20% e EDTA 0,1M, não houve diferença estatisticamente significativa entre as dentinas normal ou erodida ($p>0,05$). Entretanto, para o grupo clorexidina 2%, a dentina erodida apresentou maiores valores de resistência de união comparada à dentina normal ($p=0,03$). Quando se comparou os diferentes grupos de tratamentos na dentina normal, ainda no tempo de 24h (Tabela 1), os grupos ácido poliacrílico 20% e EDTA 0,1M obtiveram os maiores valores de resistência de união, sem diferença estatística entre eles ($p=0,20$). Em contrapartida, os grupos controle e clorexidina 2% obtiveram os menores valores de resistência de união, com diferença estatística para os grupos ácido poliacrílico 20% e EDTA 0,1M ($p<0,001$). Na dentina erodida, o grupo no qual se utilizou EDTA 0,1M apresentou os maiores valores de resistência de união, com diferença estatisticamente significativa apenas para o grupo controle ($p=0,002$), entretanto sem diferenças estatísticas para os grupos clorexidina 2% e ácido poliacrílico 20% ($p>0,05$).

Quando se analisou a resistência de união do cimento resinoso às dentinas normal e erodida após 8 meses de armazenamento (Tabela 2), os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois substratos estudados, independente do grupo experimental ($p>0,05$). Entretanto, quando se fez a comparação entre os diferentes grupos de tratamentos para a dentina normal, o grupo EDTA 0,1M obteve os maiores valores de resistência de união, com diferença estatisticamente significativa para os grupos controle e clorexidina 2% ($p<0,05$). O grupo ácido poliacrílico 20% não apresentou diferença significativa para os grupos EDTA 0,1M e clorexidina 2% ($p>0,05$). Já para os grupos analisados em dentina erodida, não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos estudados ($p>0,05$).

Na comparação entre os tempos, embora de maneira geral tenha havido diferença significativa entre os tempos de 24 horas e 8 meses de análises ($p=0,04$), com maiores valores apresentados no tempo de 24 horas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de resistência de união do cimento resinoso tanto para dentina normal quanto erodida entre os tempos de análise de 24 horas comparado aos valores obtidos após 8 meses de armazenamento em saliva artificial, para todos os grupos experimentais separadamente ($p>0,05$).

Em relação ao número de falhas prematuras, observou-se que a dentina erodida apresentou maior número de falhas prematuras dos palitos, quando comparado à dentina normal, especialmente na análise de 24 horas após o processo de união (Tabelas 1 e 2). Entre os diferentes tratamentos, os menores números de falhas prematuras foram observados para o EDTA 0,1M. Quanto aos modos de falhas ocorridas entre os grupos no tempo de 24 horas (Gráfico 1), tanto a dentina normal como a erodida apresentaram uma predominância de falhas do tipo mista, seguidas por um número menos expressivo de falha adesiva entre o cimento resinoso e dentina. No tempo de 8 meses (Gráfico 2), novamente observou-se para os dois tipos de substratos (dentinhas normal e erodida) um maior número de falhas mistas, com um reduzido número de falhas adesivas entre cimento resinoso e dentina, porém houve um número considerável de falhas coesivas em dentina, especialmente para os grupos ácido poliacrílico 20% e EDTA 0,1M tanto em dentina normal quanto em erodida.

Os resultados referentes à análise da interface de união em microscopia confocal estão apresentados na Tabela 3, Figura 3. Os valores de Kappa inter examinadores foi de 0,67, sendo considerado um valor substancial para este tipo de avaliação. Em relação à qualidade da interface adesiva, não houve diferença estatística entre os grupos, tanto para dentina normal como para dentina erodida ($p>0,05$), sendo que todos os grupos apresentaram predominância de escore 0, significando ausência de fendas na interface adesiva, sendo a mesma de aspecto

nítido e bem organizado. Em relação à formação de *tags* resinosos ao longo da interface adesiva para a dentina normal, os diferentes grupos apresentaram um maior número de escores 0 (sem formação de *tags*). Entretanto, para a dentina erodida, houve tendência de aumento na formação dos *tags* resinosos, principalmente para os grupos controle e EDTA 0,1M. Somente houve diferença estatística entre as dentinas normal e erodida para o grupo controle ($p < 0,05$). Em relação à profundidade dos *tags*, o mesmo fenômeno foi observado, com tendência de maior profundidade para a dentina erodida em comparação à dentina normal, sendo esta diferença estatisticamente significativa para os grupos controle e clorexidina 2% ($p < 0,05$).

Sobre a formação de camada híbrida para a dentina normal, os grupos controle e clorexidina 2% apresentaram os maiores escores em relação aos outros grupos, tendo a maior parte de sua pontuação no escore 3, o que significa a formação de camada híbrida em toda a interface adesiva. Considerando a presença de camada híbrida para a dentina erodida, houve formação de camada híbrida mais evidente no grupo previamente tratado com ácido poliacrílico 20%. Não houve diferença estatística entre as dentinas normal e erodida para todos os grupos ($p > 0,05$).

Discussão

5. Discussão

Diante do cenário atual em que a ocorrência das lesões cervicais não cariosas vem ganhando destaque, em especial as lesões erosivas^{3,30}, os procedimentos restauradores sobre esse tipo de substrato ganham importância na Odontologia adesiva. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a resistência de união de um cimento resinoso auto-adesivo às dentinas normal e previamente erodida, submetidas a diferentes tratamentos de superfície ao longo do tempo, e análise da interação micromecânica da interface adesiva, através da microscopia confocal.

O teste de microtração foi utilizado neste estudo, pois parece um método adequado quando se objetiva analisar a resistência de união da interface adesiva, uma vez que permite mensurar pequenas áreas de interface, obtendo vários espécimes de um mesmo dente^{48,49}. Além disso, é mais sensível a defeitos de superfície⁴⁹. No presente estudo, oito palitos foram obtidos por dente, sendo quatro palitos utilizados no teste de resistência após 24 horas do processo de união e os outros 4 palitos foram submetidos à microtração 8 meses após armazenamento em saliva artificial. Aos palitos que apresentaram fratura prematura (Tabelas 1 e 2) foram atribuídos o valor zero⁵⁰. Sendo assim, o dente foi utilizado como unidade experimental e não o palito isoladamente. Quanto ao padrão de fratura ocorrida na interface, as mistas foram as mais comuns entre os grupos, tanto para dentina normal, em ambos os tempos de análise, quanto para erodida, seguidas pelas falhas adesivas entre cimento e dentina e as falhas coesivas em dentina (Gráficos 1 e 2), corroborando com outro estudo⁵¹, no qual fez uma revisão sobre cimentos auto-adesivos e concluiu que os tipos de falhas mais comuns são as mistas e adesivas.

A análise da morfologia da interface adesiva foi realizada em microscopia confocal. Este método tem como objetivo avaliar a micropermeabilidade e a capacidade de selamento

dos *tags* resinosos sobre a interface adesiva, por meio da utilização de corantes fluorescentes sobre o substrato dentário e/ou material resinoso⁴⁵. Estes corantes, os quais são utilizados em baixas concentrações, não interferem nas propriedades dos materiais resinosos⁵², permitindo, assim, avaliar a subsuperfície do espécime. Constitui um método não-destrutivo, oferecendo mais detalhes com relação a identificação das diferentes estruturas que constituem a interface adesiva²⁸, com menos artefatos e menor formação de halos na imagem para essa finalidade, em comparação à microscopia eletrônica de varredura⁵²

Baseado nos resultados encontrados, houve diferença estatística na resistência de união entre as dentinas normal e erodida, para o grupo no qual se utilizou a clorexidina 2%, no tempo de 24 horas após o processo de união, rejeitando-se, assim, a primeira hipótese nula do estudo. A dentina naturalmente erodida geralmente apresenta uma dentina “reacionária”, que é uma deposição mineral capaz de ocluir os túbulos dentinários, assim como ocorre a formação de uma camada hipermineralizada nesta superfície³¹. Esses fatos poderiam contribuir para diminuição nos valores de resistência a esse tipo de substrato especialmente quando da utilização de materiais resinosos auto-adesivos, uma vez que estes materiais condicionam o substrato de maneira mais branda que os cimentos resinosos convencionais^{23,24}. Quando se compara a dentina naturalmente erodida à dentina erodida *in vitro*, acredita-se que esta última poderia apresentar uma desmineralização muito mais acentuada que as lesões *in vivo*, com maior exposição da malha colágena e possivelmente, maior embricamento mecânico com os monômeros resinosos, comparada à lesão natural³². No entanto, no presente estudo, utilizou-se um protocolo erosivo *in vitro* com a utilização das enzimas pepsina e tripsina, presentes no trato gastrointestinal, que entrariam em contato com os tecidos dentários durante a ocorrência de refluxos gastroesofágicos e/ou vômitos⁶. A pepsina parece atuar na degradação da matriz colágena da dentina, sem, contudo, acentuar sua perda mineral. Já a tripsina teria sua atividade colagenolítica favorecida pela desnaturação de

proteínas provocada pela pepsina, atuando muito mais na modificação da ultra-estrutura do colágeno, desestabilizando-o, de modo que a pepsina consiga se ligar de forma mais efetiva a essa molécula, aumentando a degradação da matriz orgânica⁶. Dessa maneira, essas enzimas parecem estar muito mais ligadas à modificação ou degradação parcial da matriz orgânica, do que na perda substancial de tecido mineral, e parecem não ter contribuído para alteração nos valores de resistência de união, comparado à dentina normal. A utilização dessas enzimas para simular um processo erosivo parece ser mais adequada quando se busca simular as características do substrato dentinário erodido *in vivo*.

Considerando que o presente estudo fez uso de um cimento resinoso auto-adesivo, que contém em sua formulação monômeros de ésteres ácidos com a função de desmineralizar a superfície dentinária e ao mesmo infiltrar-se sobre ela, por muitas vezes, a resistência de união poderia ser diminuída quando comparada aos cimentos resinosos convencionais com prévio condicionamento dentinário, pelo fato de que esses monômeros podem ser menos eficientes na desmineralização do substrato dentinário^{20,34}. Diante disso, muitas pesquisas em torno da utilização de diferentes tratamentos de superfície dentinária têm sido feitas^{20,34}. A intenção em se utilizar tratamentos prévios na superfície dentinária parece ser adequada, na medida em que algumas substâncias poderiam otimizar a penetração do cimento resinoso auto-adesivo à dentina^{20,34,35}. Baseado nos resultados encontrados neste estudo, os diferentes grupos de tratamento de superfície mostraram influência tanto da resistência de união quanto na morfologia da interface adesiva, rejeitando-se assim, a segunda hipótese nula deste estudo.

A clorexidina é um agente químico amplamente estudado em tratamentos de superfície dentinária. Possui efeito antibacteriano, assim como de inibidor das metaloproteinases (MMPs), especificamente as MMPs 2, 8 e 9^{36,37}, além de algumas proteínas como a cisteína catepsina³⁵. As MMPs são enzimas que atuam na degradação da rede colágena, fato esse que

interfere negativamente na resistência de união, à medida que essa interface é desintegrada²⁰. O fato de ser inibidor dessas collagenases faz com que a clorexidina promova a integridade estrutural da camada híbrida^{20,35,36,38}. Nas análises de microscopia confocal foi possível notar essa característica da clorexidina, à medida que houve maior formação ou preservação da camada híbrida para esse grupo, especialmente na dentina normal (Tabela 3, Figura 3C). Por outro lado, essa substância possui afinidade pelos grupamentos fosfatos presente na dentina, impedindo ou dificultando a união da apatita remanescente na matriz orgânica que poderia se unir quimicamente aos monômeros ácidos presentes no cimento²⁰. Além disso, a sua afinidade por íons cálcio também poderia diminuir a proporção mineral disponível para ligação com o cimento²⁶, sendo que estes fatos podem ter contribuído para os menores valores de resistência de união obtidos para esse grupo em dentina normal. Em contraste, foi notável o aumento na resistência à microtração com o uso da clorexidina em dentina erodida. Isso pode ser explicado pela alta afinidade da clorexidina à dentina desmineralizada, que pode ser até 80% maior que sua ligação à dentina mineralizada^{35,36}. Dessa forma, especula-se que a clorexidina possa ter favorecido a manutenção da rede colágena que foi infiltrada pelos monômeros resinosos com maior intensidade que a dentina normal, aumentando assim os valores de resistência de união para a dentina erodida (Tabela 1). Observou-se também, em microscopia eletrônica de varredura no tempo de 24 horas, que a aplicação da clorexidina, em dentina previamente erodida, promoveu maior exposição dos túbulos dentinários (Figura 1D), quando comparado ao grupo de dentina normal (Figura 1C).

Outro tipo de tratamento de superfície estudado foi o ácido poliacrílico. Baseado nos valores encontrados, a dentina normal, previamente condicionada com ácido poliacrílico, apresentou maiores valores de resistência de união nos tempos de 24 horas e 8 meses, comparado ao grupo controle (Tabelas 1 e 2). Alguns estudos utilizando o ácido poliacrílico a 25% como um dos tratamentos em dentina, também obtiveram valores de resistência de união

superiores em relação ao grupo sem tratamento^{25,39}. Em outro estudo, embora tenha se utilizado ácido poliacrílico a 10%, também foram encontrados valores de resistência de união superiores ao grupo controle³⁴. Esse aumento nos valores de resistência de união poderia ser atribuído à formação de camada híbrida⁴⁰, como pode ser visto em algumas imagens de microscopia confocal (Figuras 3E e 3F). O ácido poliacrílico pode ser considerado como um ácido polianiónico, ou seja, liga-se tanto à matriz colágena da dentina quanto às proteases endógenas (MMPs e catepsinas que atuam na degradação da rede colágena)⁴¹. Além disso, remove parcialmente a *smear layer*, sem, entretanto, remover a *smear plug* que está presente na entrada dos túbulos dentinários, como pode ser visto nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 1E), porém, faz com que íons cálcio e fosfato fiquem disponíveis na superfície dentinária para reagir com os monômeros ácidos do cimento resinoso e dessa forma, ocorrer a união química^{34,39}. Em adição, os íons carboxila presentes no ácido poliacrílico tem a capacidade de formar múltiplas ligações de ponte de hidrogênio com o substrato dentinário³⁹ o que poderia explicar um dos maiores valores de resistência de união obtidos dentre os grupos.

Outro agente químico utilizado foi o EDTA o qual apresenta propriedades quelantes de íons cálcio, que por sua vez tem ação inibitória sobre as MMPs³⁷. As MMPs estão presentes na constituição natural da dentina, e quando ocorre a diminuição do pH, por exemplo, com a aplicação dos monômeros ácidos contidos nos cimentos resinosos à dentina, ocorre a ativação dessas enzimas que atuam na degradação hidrolítica das fibras colágenas⁴². Dessa forma, a aplicação do EDTA poderia contribuir na preservação das propriedades mecânicas da interface adesiva, pois manteria o embricamento mecânico entre a matriz colágena e os monômeros resinosos, preservando-a^{35,43}. Além disso, o EDTA, considerado um ácido de ação moderada⁴⁴, atua dissolvendo a fase mineral da dentina, sem causar desproteinização das fibras colágenas, mantendo assim sua estrutura original^{34,44,45}. A remoção da *smear layer* e

smear plug feita pelo EDTA (Figuras 1G e 1H) reforçaria a retenção micro-mecânica, com a manutenção das fibrilas colágenas inalteradas envoltas de conteúdo mineral, possibilitando, dessa forma, a união química dos íons cálcio com os monômeros do material resinoso⁴⁵. No presente estudo, de uma maneira geral, os maiores valores de resistência de união foram obtidos para o grupo no qual se utilizou o EDTA como pré-tratamento dentinário (Tabelas 1 e 2), assim como observado em outros estudos^{34,43}.

Os resultados deste estudo mostraram que, de uma maneira geral, houve diferença estatisticamente significativa nos valores de resistência de união na comparação entre os tempos de 24 horas ou 8 meses de avaliação, com maiores valores apresentados no tempo de 24 horas de análise, rejeitando-se, assim, a terceira hipótese nula do estudo. No entanto, quando os grupos experimentais (dentina normal e erodida) foram analisados separadamente, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de resistência de união entre os diferentes tempos de análise para todos os grupos estudados. Apesar do tamanho reduzido dos espécimes (em torno de 1mm^2), que teoricamente seria mais suscetível à difusão de água ao longo da interface, acelerando a degradação hidrolítica da mesma⁴⁶, o armazenamento das amostras em saliva artificial ao longo de 8 meses parece não ter sido capaz de provocar degradações significativas na interface adesiva quando os grupos foram analisados separadamente, provavelmente pelo menor número de amostras analisadas dentro de cada grupo, comparado à análise geral. Aguiar et al.⁴⁶ notaram uma diminuição significativa nos valores de resistência de união de cimentos auto-adesivos apenas após 2 anos de envelhecimento, enquanto que Leme et al.⁴⁷ mostraram degradação da interface dentina-adesivo após 30 meses de armazenamento em saliva artificial. Blumer et al.⁴⁸ compararam alguns métodos de envelhecimento artificial em cimentos resinosos, e concluíram que a ciclagem térmica atuaria de forma mais substancial na degradação da interface adesiva, pois a mudança brusca de temperatura faria com que ocorressem mudanças dimensionais tanto na

matriz orgânica como nas partículas de carga do cimento, facilitando a entrada de água e acentuando a degradação da interface adesiva⁴⁸.

Através das imagens de microscopia confocal (Figura 3), pode-se observar que em relação à qualidade da interface adesiva, tanto para dentina normal quanto para erodida, houve um bom selamento da interface adesiva com a formação de poucas fendas e, em muitos espécimes não ocorreu a formação de fendas. Comparando-se a formação de *tags* resinosos entre dentina normal e erodida, observou-se um aumento tanto em densidade quanto em profundidade para a dentina erodida em todos os grupos (Tabela 3, Figura 3). Especula-se que o protocolo erosivo possa ter removido superficialmente a *smear layer* e *smear plug*, contribuindo, dessa forma para uma maior penetração do cimento. A profundidade de penetração dos *tags* também foi maior para a dentina erodida, uma vez que o processo erosivo parece ter contribuído para uma parcial dissolução mineral do substrato, possibilitando maior penetração do cimento na matriz orgânica. Em relação à formação da camada híbrida, destaca-se o grupo onde o ácido poliacrílico 20% foi aplicado, especialmente em dentina previamente erodida, onde ocorreu formação de camada híbrida nítida em grande parte dos espécimes, conforme ilustrado nas Figuras 3E e 3F.

Embora o presente estudo apresente algumas limitações, incluindo o pouco efeito do envelhecimento nos valores de resistência de união e a dificuldade de padronização da idade dos dentes obtidos para este estudo, uma vez que a dentina é um substrato passível de mudanças e idade-dependente, os resultados obtidos parecem contribuir no entendimento de como o processo adesivo ocorreria em um tecido dentinário previamente erodido. Outros estudos, com foco principal nas alterações bioquímicas que ocorreriam na superfície dentinária, são necessários para complementar tais achados.

Conclusão

6. Conclusão

A dentina previamente erodida apresentou significativo aumento na densidade e profundidade de *tags* resinosos em relação à dentina normal para os diferentes grupos, embora tenha apresentado pouca diferença nos valores de resistência de união para os dois substratos. Os diferentes tipos de tratamentos realizados em dentina, de uma forma geral, promoveram um aumento os valores de resistência de união em comparação ao grupo controle. O armazenamento das amostras em saliva artificial por 8 meses, parece não ter sido suficiente para causar uma significativa degradação da interface adesiva.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Scaramucci T, Hara AT, Zero DT, Ferreira SS, Aoki IV, & Sobral MA. Development of an orange juice surrogate for the study of dental erosion. *Braz Dent J.* 2011;22(6):473-8.
2. Barbosa CS, Kato MT, Buzalaf MA. Effect of supplementation of soft drinks tea extract on their erosive potential against dentine. *Aust Dent J.* 2011 Sep;56(3):317-21.
3. Hara AT, Livengood SV, Lippert F, Eckert GJ, Ungar PS. Dental Surface Texture Characterization Based on Erosive Tooth Wear Processes. *J Dent Res.* 2016; 95(5):537-42.
4. Moretto MJ, Magalhães AC, Sassaki KT, Delbem AC, Martinhon CC. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Caries Res.* 2010;44(2):135-40.
5. Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2012 Sep-Oct;20(5):493-502.
6. Schlueter N, Hardt M, Klimek J, Ganss C. Influence of the digestive enzymes trypsin and pepsin in vitro on the progression of erosion in dentine. *Arch Oral Biol.* 2010 Apr;55(4):294-9.
7. Caneppele TM, Jeronymo RD, Di Nicoló R, de Araújo MA, Soares LE. In Vitro assessment of dentin erosion after immersion in acidic beverages: surface profile analysis and energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry study. *Braz Dent J.* 2012;23(4):373-8.
8. Mulic A, Tveit AB, Songe D, Sivertsen H, Skaare AB. Dental erosive wear and salivary flow rate in physically active young adults. *BMC Oral Health.* 2012 Mar 23;12:8.
9. Passos VF, Melo MA, Vasconcellos AA, Rodrigues LK, Santiago SL. Comparison of methods for quantifying dental wear caused by erosion and abrasion. *Microsc Res Tech.* 2013 Feb;76(2):178-83.
10. Ganss C, Hardt M, Blazek D, Klimek J, Schlueter N. Effects of toothbrushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine. *Eur J Oral Sci.* 2009 Jun;117(3):255-60.
11. Wiegand A, Kuhn M, Sener B, Roos M, Attin T. Abrasion of dentin eroded caused by toothpaste slurries of different filament diameter. *J Dent.* 2009 Jun;37(6):480-4.

12. Ganss C, Klimek J, Schlueter N. Erosion/abrasion-preventing potential of NaF and F/Sn/chitosan toothpastes in dentine and impact of the organic matrix. *Caries Res.* 2014a;48(2):163-9.
13. Schlueter N, Glatzki J, Klimek J, Ganss C. Erosive-abrasive tissue loss in dentine under simulated bulimic conditions. *Arch Oral Biol.* 2012 Sep;57(9):1176-82.
14. Shellis RP, Barbour ME, Jones SB, Addy M. Effects of pH and acid concentration on erosive dissolution of enamel, dentine, and compressed hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci.* 2010 Oct;118(5):475-82.
15. Pinto SC, Bandeca MC, Silva CN, Cavassim R, Borges AH, Sampaio JE. Erosive potential of energy drinks on the dentine surface. *BMC Res Notes.* 2013 Feb 19;6:67.
16. Bartlett DW, Evans DF, Anggiansah A, Smith BG. A study of the association between gastro-oesophageal reflux and palatal dental erosion. *Br Dent J.* 1996 Aug 24;181(4):125-31.
17. Wood I, Jawad Z, Paisley C, Brunton P. Non-carious cervical tooth surface loss: a literature review. *J Dent.* 2008 Oct;36(10):759-66.
18. Murdoch-Kinch CA, McLean ME. Minimally invasive dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2003 Jan;134(1):87-95.
19. André CB, Aguiar TR, Ayres AP, Ambrosano GM, Giannini M. Bond strength of self-adhesive resin cements to dry and moist dentin. *Braz Oral Res.* 2013 Sep-Oct;27(5):389-95.
20. Santos MJ, Bapoo H, Rizkalla AS, Santos GC. Effect of dentin-cleaning techniques on the shear bond strength of self-adhesive resin luting cement to dentin. *Oper Dent.* 2011 Sep-Oct;36(5):512-20.
21. Radovic I, Monticelli F, Goracci C, Vulicevic ZR, Ferrari M. Self-adhesive resin cements: a literature review. *J Adhes Dent.* 2008 Aug;10(4):251-8.
22. Farrokh A, Mohsen M, Soheil S, Nazanin B. Shear bond strength of three self-adhesive resin cements to dentin. *Indian J Dent Res.* 2012 Mar-Apr;23(2):221-5.
23. Mazzitelli C, Monticelli F, Toledano M, Ferrari M, Osorio R. Dentine treatment effects on the bonding performance of self-adhesive resin cements. *Eur J Oral Sci.* 2010 Feb;118(1):80-6.

24. Kambara K, Nakajima M, Hosaka K, Takahashi M, Thanatvarakorn O, Ichinose S, Foxton RM, Tagami J. Effect of smear layer treatment on dentin bond of self-adhesive cements. *Dent Mater J*. 2012;31(6):980-7.
25. Pavan S, dos Santos PH, Berger S, Bedran-Russo AK. The effect of dentin pretreatment on the microtensile bond strength of self-adhesive resin cements. *J Prosthet Dent*. 2010 Oct;104(4):258-64.
26. Di Hipólito V, Rodrigues FP, Piveta FB, Azevedo Lda C, Bruschi Alonso RC, Silikas N, Carvalho RM, De Goes MF, Perlatti D'Alpino PH. Effectiveness of self-adhesive luting cements in bonding to chlorhexidine-treated dentin. *Dent Mater*. 2012 May;28(5):495-501.
27. D'Alpino PHP. Influência da fonte de luz fotoativadora na resistência de união e na micromorfologia da interface adesiva de restaurações de resina composta – um estudo in vitro com microscopia de fluorescência. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo. 2005.
28. Fagundes TC, Somensi DS, Dos Santos PH, Navarro MF. Confocal laser scanning microscopy investigation of Bond interfaces involved in fiber glass post cementation . *Braz Dent Sci* 2014 Apr/Jun;17(2)
29. Bitter K, Paris S, Pfuertner C, Neumann K, Kielbassa AM. Morphological and bond strength evaluation of different resin cements to root dentin. *Eur J Oral Sci*. 2009 Jun;117(3):326-33.
30. Ganss C, Lussi A, Schlueter N. Dental erosion as oral disease. Insights in etiological factors and pathomechanisms, and current strategies for prevention and therapy. *Am J Dent*. 2012 Dec;25(6):351-64.
31. Eliguzeloglu E, Omurlu H, Eskitascioglu G, Belli S. Effect of surface treatments and different adhesives on the hybrid layer thickness of non-carious cervical lesions. *Oper Dent*. 2008 May-Jun;33(3):338-45.
32. Ganss C, Lussi A, Schlueter N. The histological features and physical properties of eroded dental hard tissues. *Monogr Oral Sci*. 2014b;25:99-107.
33. Pancote LP, Manarelli MM, Danelon M, Delbem AC. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion: in vitro study. *Arch Oral Biol*. 2014 Mar;59(3):336-40.

34. Youm SH, Jung KH, Son SA, Kwon YH, Park JK. Effect of dentin pretreatment and curing mode on the microtensile bond strength of self-adhesive resin cements. *J Adv Prosthodont.* 2015 Aug;7(4):317-22.
35. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho M, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. *Dent Mater.* 2013 Oct;29(10):999-1011.
36. Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Cadenaro M. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability-A literature review. *Dent Mater.* 2016 Feb;32(2):e41-53
37. Ryou H, Turco G, Breschi L, Tay FR, Pashley DH, Arola D. On the stiffness of demineralized dentin matrices. *Dent Mater.* 2015 Dec 30. pii: S0109-5641(15)00487-X.
38. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, Ruggeri A Jr, Tay FR, Dorigo Ede S, Pashley DH. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater.* 2010 Apr;26(4):320-5.
39. Broyles AC, Pavan S, Bedran-Russo AK. Effect of dentin surface modification on the microtensile bond strength of self-adhesive resin cements. *J Prosthodont.* 2013 Jan;22(1):59-62.
40. Suzuki TY, Godas AG, Guedes AP, Catelan A, Pavan S, Briso AL, Dos Santos PH. Microtensile bond strength of resin cements to caries-affected dentin. *J Prosthet Dent.* 2013 Jul;110(1):47-55.
41. Ozcan S, Seseogullari-Dirihan R, Uctasli M, Tay FR, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Effect of polyacrylic acid on dentin protease activities. *Dent Mater.* 2015 Aug;31(8):901-6.
42. Staper TH, Menezes MS, Barreto BC, Aguiar FH, Martins LR, Quagliatto PS. Influence of matrix metalloproteinase synthetic inhibitors on dentin microtensile bond strength of resin cements. *Oper Dent.* 2012 Jul-Aug;37(4):386-96.
43. Toledano M, Aguilera FS, Yamauti M, Ruiz-Requena ME, Osorio R. In vitro load-induced dentin collagen-stabilization against MMPs degradation. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2013 Nov;27:10-8.
44. Sauro S, Mannocci F, Toledano M, Osorio R, Thompson I, Watson TF. Influence of the hydrostatic pulpal pressure on droplets formation in current etch-and-rinse and self-etch

adhesives: a video rate/TSM microscopy and fluid filtration study. *Dent Mater.* 2009 Nov;25(11):1392-402.

45. Fagundes TC, Toledano M, Navarro MF, Osorio R. Resistance to degradation of resin-modified glass-ionomer cements dentine bonds. *J Dent.* 2009 May;37(5):342-7.

46. Aguiar TR, André CB, Correr-Sobrinho L, Arrais CA, Ambrosano GM, Giannini M. Effect of storage times and mechanical load cycling on dentin bond strength of conventional and self-adhesive resin luting cements. *J Prosthet Dent.* 2014 May;111(5):404-10.

47. Leme AA, Vidal CM, Hassan LS, Bedran-Russo AK. Potential role of surface wettability on the long-term stability of dentin bonds after surface biomodification. *J Biomech.* 2015 Jul 16;48(10):2067-71.

48. Blumer L, Schmidli F, Weiger R, Fischer J. A systematic approach to standardize artificial aging of resin composite cements. *Dent Mater.* 2015 Jul;31(7):855-63.

49. Makishi P, André CB, Ayres A, Martins AL, Giannini M. Effect of storage time on bond strength and nanoleakage expression of universal adhesives bonded to dentin and etched enamel. *Oper Dent.* 2015 Dec 14.

50. Al-Harbi F, Kaisarly D, Michna A, ArRejaie A, Bader D, El Gezawi M. Cervical interfacial bonding effectiveness of class ii bulk versus incremental fill resin composite restorations. *Oper Dent.* 2015 Nov-Dec;40(6):622-35.

51. Ferracane JL, Stansbury JW, Burke FJ. Self-adhesive resin cements - chemistry, properties and clinical considerations. *J Oral Rehabil.* 2011 Apr;38(4):295-314.

52. Marigo L, Lajolo C, Castagnola R, Angerame D, Somma F. Morphological confocal laser scanning microscope evaluation of four different "etch and rinse" adhesives in post endodontic restoration. *Dent Mater J.* 2012;31(6):988-94.

TABELAS

Tabela 1. Valores de resistência à microtração, em MPa, 24 horas após adesão, dos diferentes tipos de tratamentos empregados em dentina (normal ou erodida), e ocorrência de falha prematura dos espécimes.

Grupo	Dentina normal	Ocorrência de falhas	Dentina erodida	Ocorrência de falhas
Controle	7,81 ± 4,51 Ba	0/24	8,47 ± 6,00 Ba	4/24
Clorexidina 2%	6,50 ± 3,3 Bb	0/24	12,43 ± 7,41 AB a	2/24
Ácido poliacrílico 20%	14,79 ± 6,91 A	0/24	16,33 ± 8,90 AB a	4/24
EDTA 0,1 M	17,92 ± 6,61 A	0/24	21,35 ± 11,85 A a	2/24

Letras distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Tabela2. Valores de resistência à microtração, em MPa, 8 meses após adesão, dos diferentes tipos de tratamentos empregados em dentina (normal ou erodida), e ocorrência de falha prematura dos espécimes.

Grupo	Dentina normal	Ocorrência de falhas	Dentina erodida	Ocorrência de falhas
Controle	5,24 ± 3,67 Ca	4/24	8,50 ± 3,43 Aa	4/24
Clorexidina 2%	7,15 ± 4,61BCa	1/24	13,90 ± 8,60 Aa	4/24
Ácido poliacrílico 20%	12,14 ± 8,94 ABa	3/24	11,57 ± 6,50 A a	2/24
EDTA 0,1 M	19,67 ± 5,98 Aa	0/24	16,97 ± 7,12 Aa	0/24

Letras distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Tabela 3. Análise qualitativa (escores) em microscopia confocal.

Grupos		Qualidade da interface adesiva dentina/cimento				Formação de tags em dentina					Profundidade de penetração dos tags						Formação de camada híbrida				
		0	1	2		0	1	2	3		0	1	2	3	4		0	1	2	3	
Controle	N	6	2	-	A	6	2	-	-	B	7	-	-	1	-	B	2	1	-	5	AB
	E	8	-	-	A	-	-	-	8	A	-	-	-	-	8	A	7	1	-	-	B
Cloroxidina 2%	N	6	2	-	A	6	2	-	-	B	6	-	2	-	-	B	1	-	2	5	A
	E	8	-	-	A	-	5	1	2	AB	-	-	2	-	6	A	4	2	2	-	AB
Ácido poliacrílico 20%	N	5	2	1	A	5	2	1	-	B	4	4	-	-	-	B	4	1	-	3	AB
	E	3	2	3	A	2	4	2	-	AB	2	4	1	1	-	A B	1	3	-	4	AB
EDTA 0,1 M	N	8	-	-	A	-	5	2	1	AB	-	-	1	2	5	A B	8	-	-	-	B
	E	8	-	-	A	-	1	-	7	A	-	1	-	-	7	A	4	2	1	1	AB

N= normal; E= erodida. **Qualidade da interface adesiva dentina/cimento.** Escore 0: ausência de fendas, interface adesiva bem organizada; 1: presença parcial de fendas, presente em aproximadamente menos do que 50% da interface; 2: presença de fendas com interface desorganizada, presente em aproximadamente mais do que 50% da interface. **Formação de tags em dentina.** Escore 0: não detectável; 1: poucos tags visíveis; 2: formação uniforme de tags com poucas ramificações laterais; 3: formação de longos tags com muitas ramificações laterais. **Profundidade de penetração dos tags.** Escore 0: sem tags; 1: tags $\leq 3\mu\text{m}$ em média; 2: tags = 3 a 8,9 μm em média; 3: tags = 9 a 15 μm em média; 4: tags $\geq 15\mu\text{m}$ em média. **Formação de camada híbrida.** Escore 0: ausente; 1: formação parcial de camada híbrida até 50% da interface; 2: formação de camada híbrida maior que 50% da interface; 3: formação de camada híbrida em toda a interface.

GRÁFICOS

Gráfico 1. Incidência (%) dos modos de falhas entre os grupos de tratamento, 24 horas após o processo de adesão.

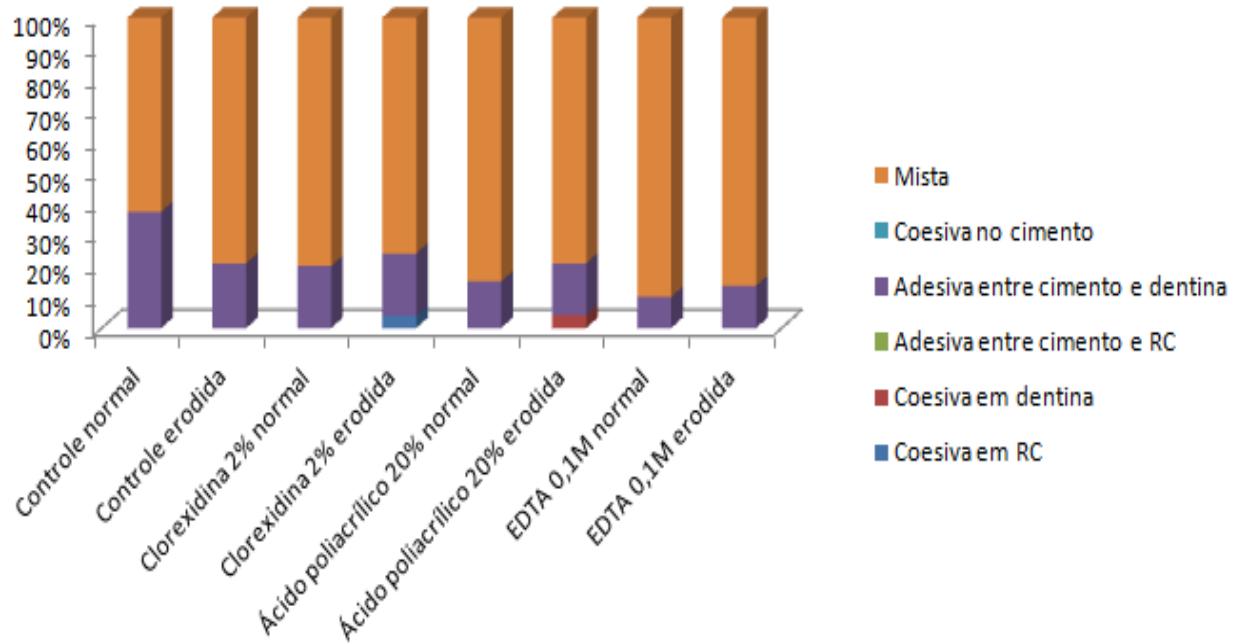
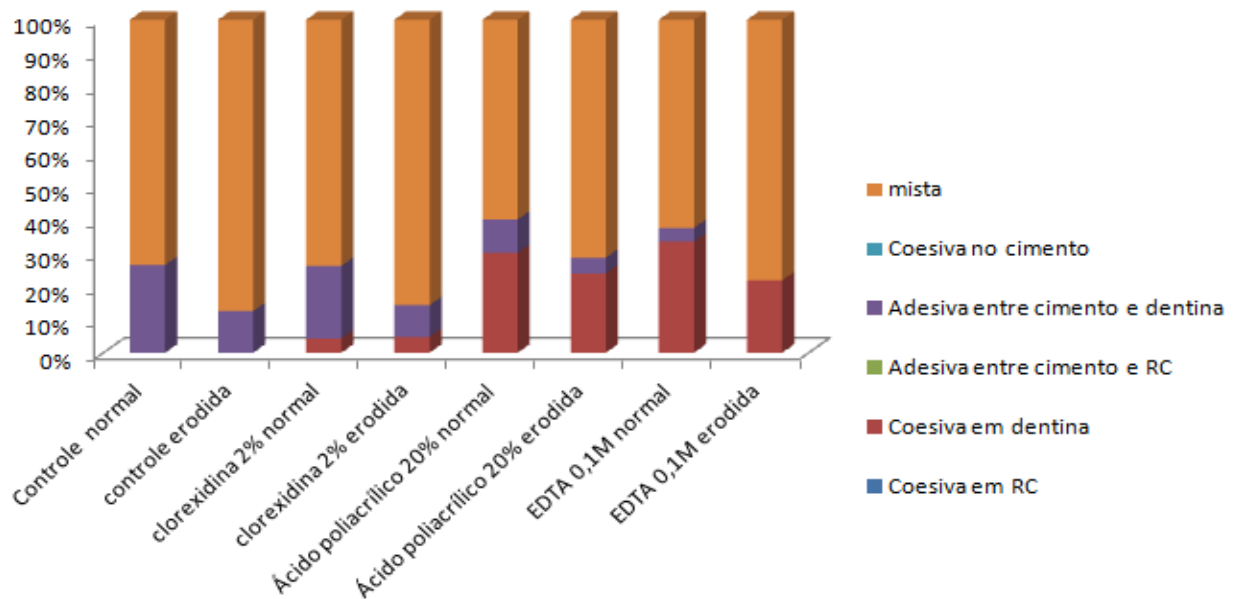
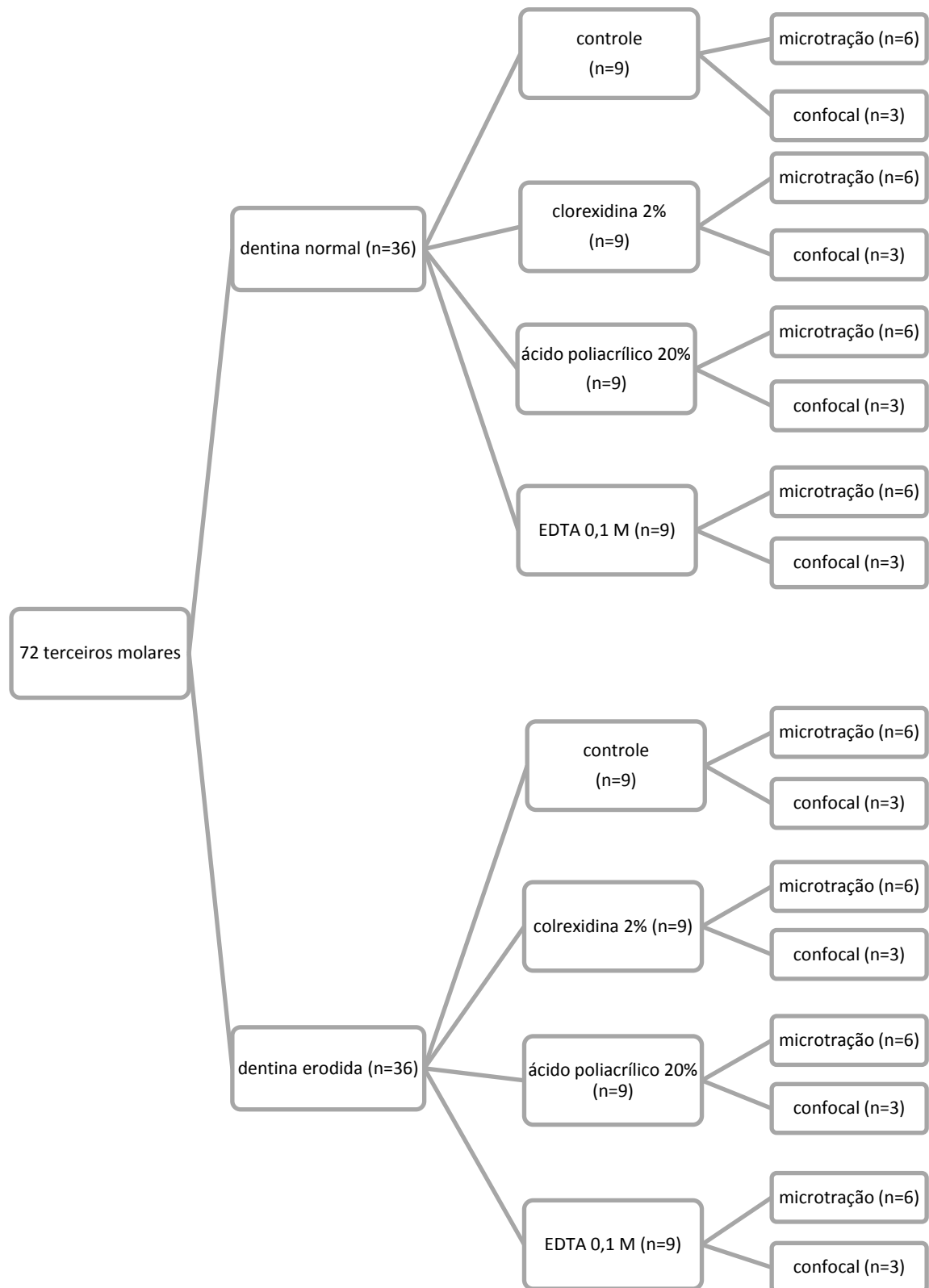


Gráfico 2. Incidência (%) dos modos de falhas entre os grupos de tratamento, 8 meses após o processo de adesão.



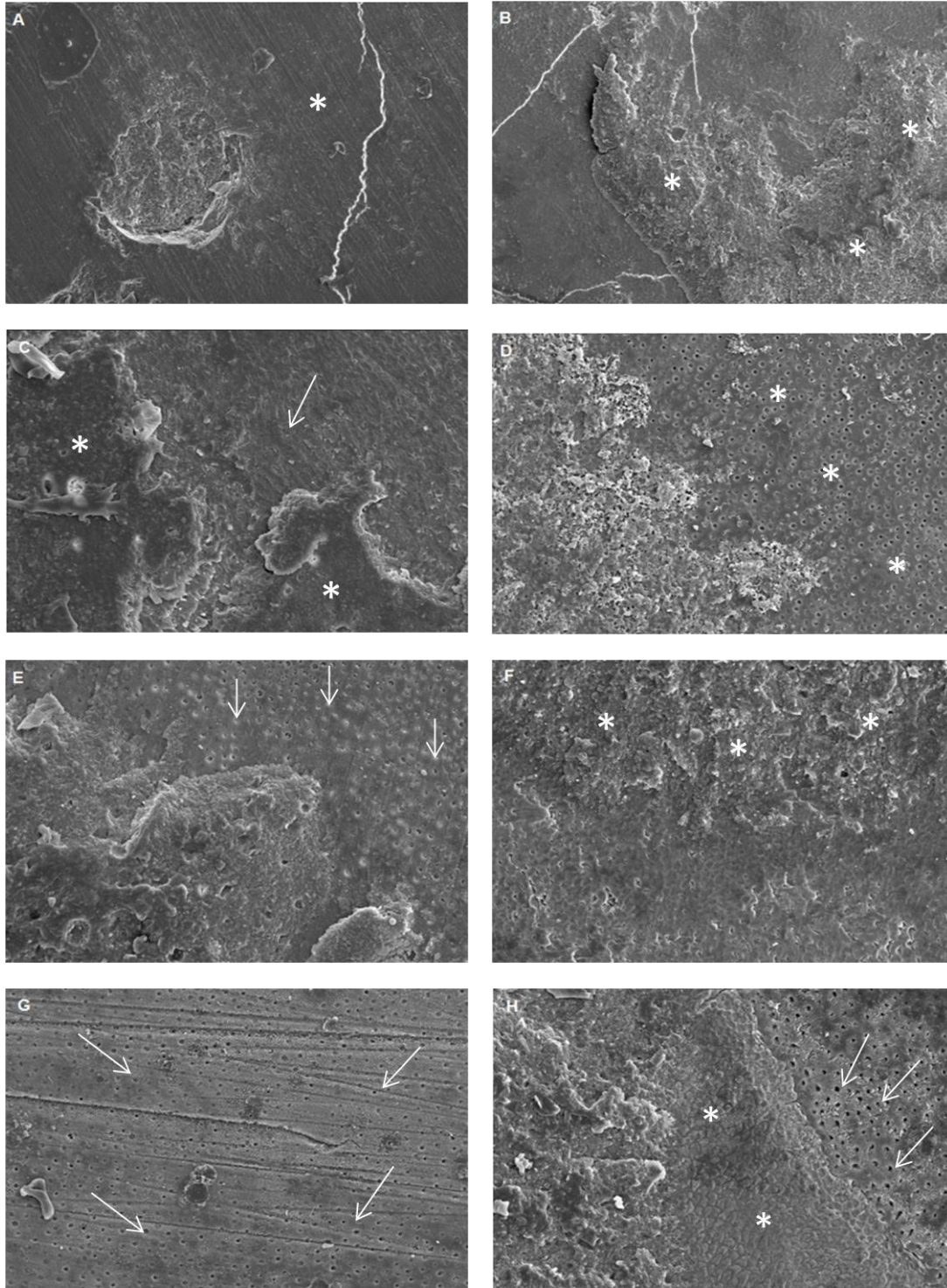
FLUXOGRAMA

Fluxograma 1. Delineamento experimental empregado neste estudo.



FIGURAS

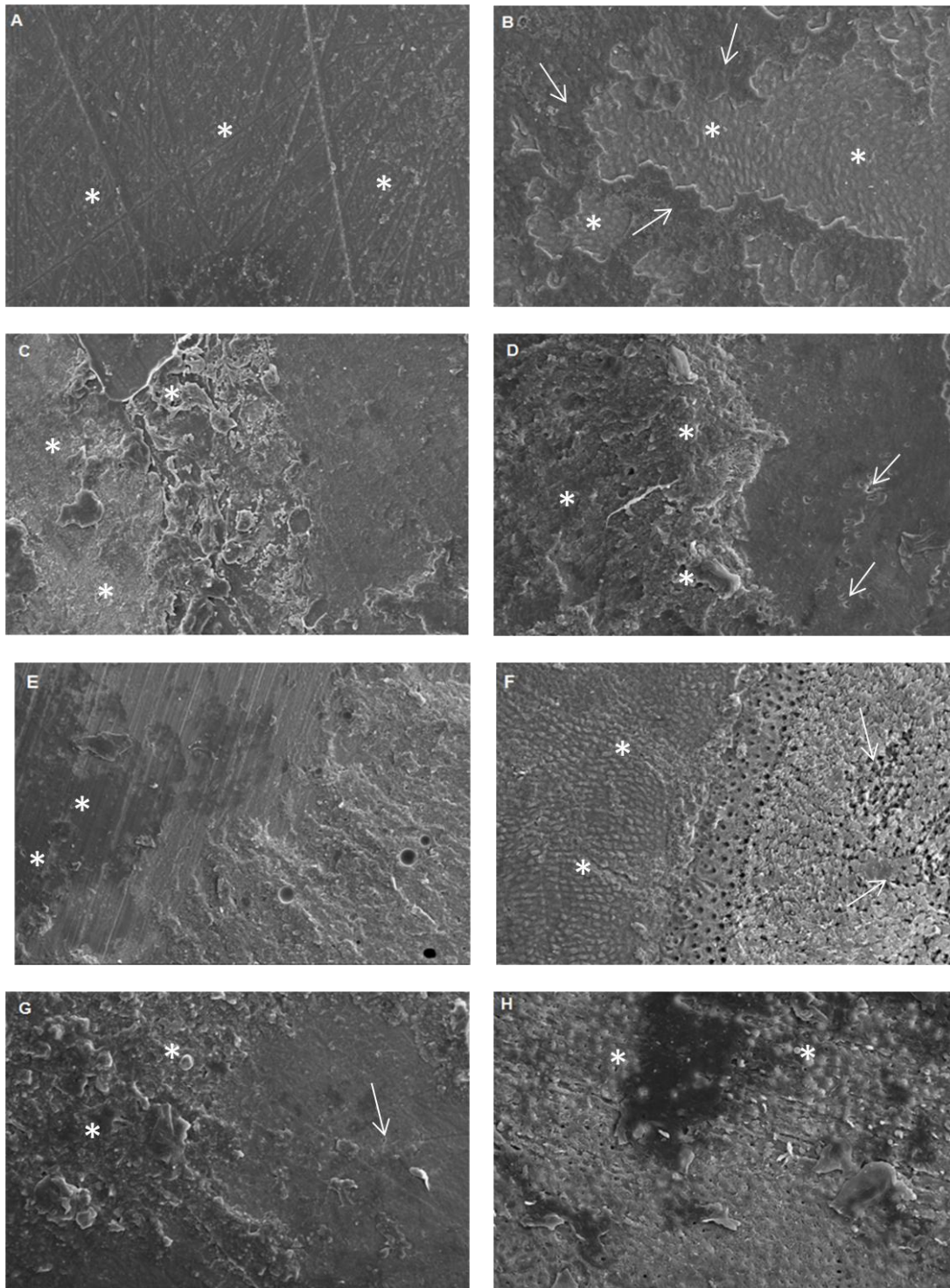
Figura 1. Análise em microscopia eletrônica de varredura dos diferentes grupos em dentina normal e erodida, 24 horas após o processo adesivo.



(A) Espécime representativo do grupo controle – dentina normal. A dentina subjacente sem exposição dos túbulos dentinários (asterisco). (B) Espécime representativo grupo controle – dentina erodida, onde nota-se

um maior embricamento do cimento ao substrato erodido(asteriscos). (C) Espécime representativo do grupo clorexidina 2% - dentina normal, pode-se notar a presença do cimento resinoso (asteriscos) sobre a *smear layer* (seta). (D) Espécime representativo do grupo clorexidina 2% - dentina erodida. Observa-se uma notável exposição dos túbulos dentinários comparado à dentina normal (setas). (E) Espécime representativo do grupo ácido poliacrílico 20% - dentina normal. Presença de túbulos dentinários parcialmente ocluídos pela *smear plug* (setas). (F) Espécime representativo do grupo ácido poliacrílico 20% - dentina erodida, evidenciando a presença de cimento sobre a dentina(asteriscos). (G) Espécime representativo do grupo EDTA 0,1M – dentina normal, nota-se que tanto a *smear layer* quanto a *smear plug* foram removidas, com grande exposição dos túbulos dentinários(setas). (H) Espécime representativo do grupo EDTA 0,1M – dentina erodida, nota-se a presença de cimento à esquerda com *smear layer* adjacente (asteriscos), e evidente aumento na abertura dos túbulos dentinários nas regiões de dentina exposta (setas), comparada a dentina normal do mesmo grupo. Aumento de 500x.

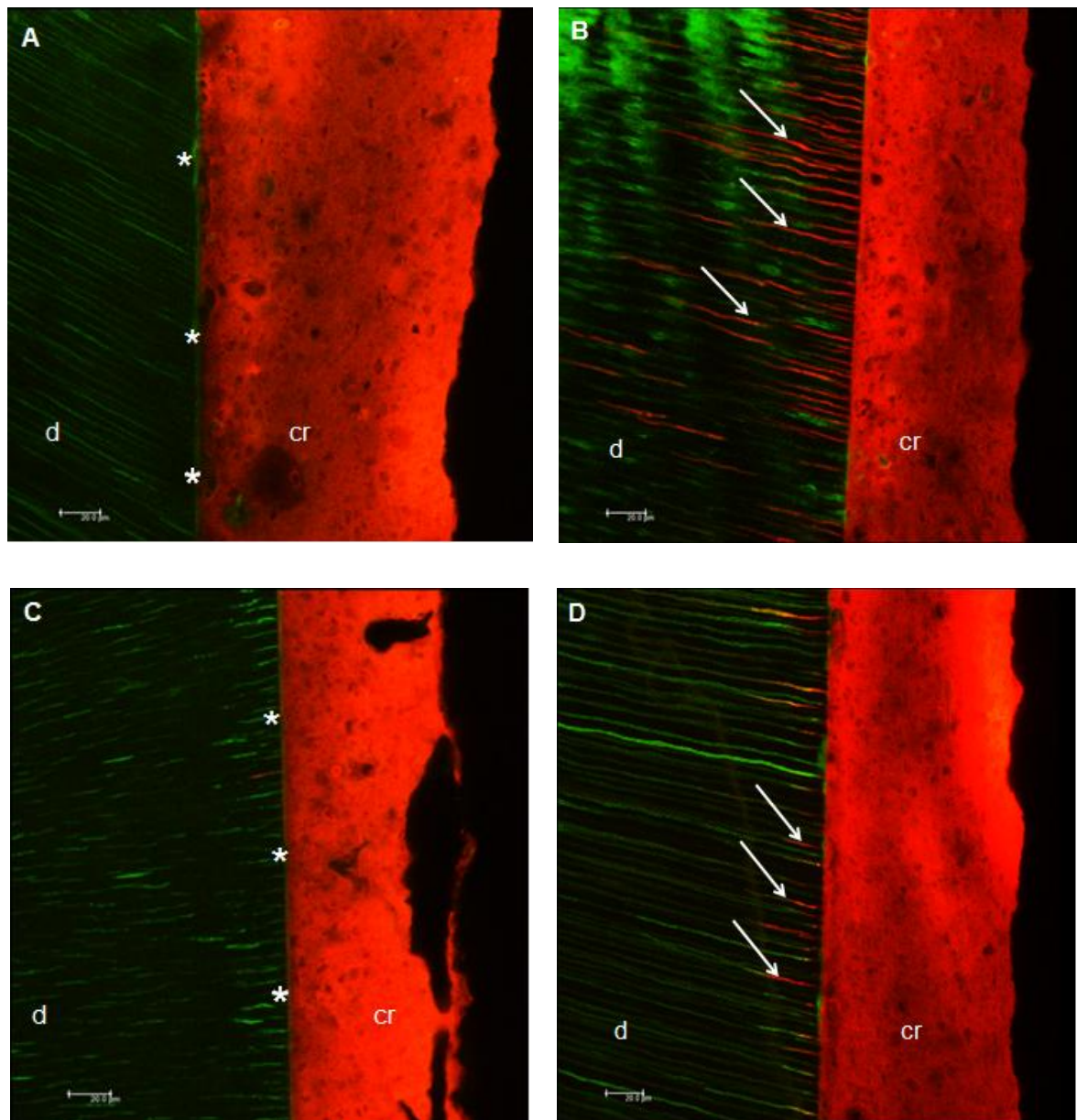
Figura 2. Análise em microscopia eletrônica de varredura dos diferentes grupos em dentina normal e erodida, 8 meses após o processo adesivo.

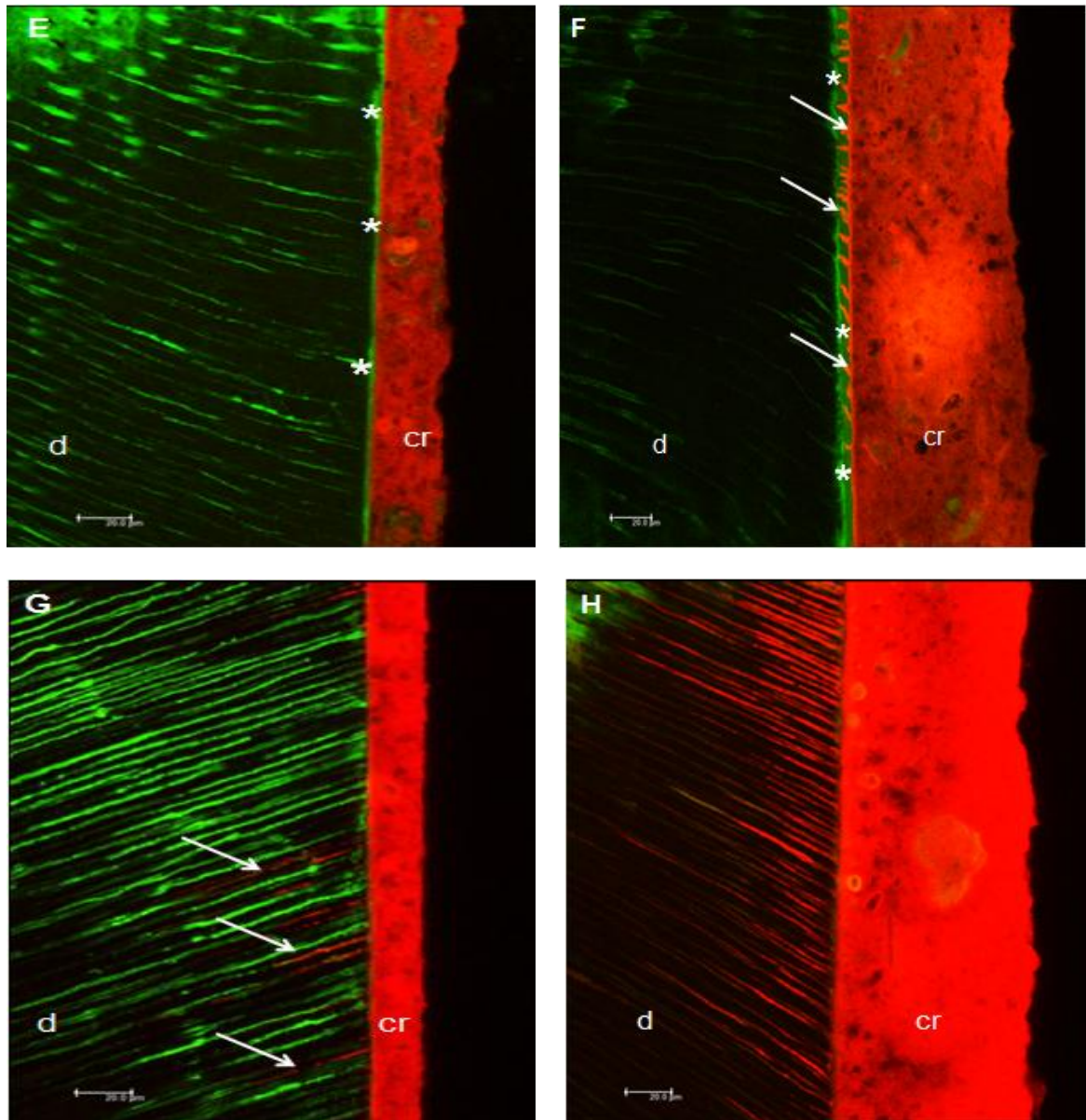


(A) Grupo controle – dentina normal. Pouca ou nenhuma presença de cimento sobre a dentina, sem exposição dos túbulos dentinários(asteriscos). (B) Grupo controle – dentina erodida, ilustrando a presença de falha mista, com áreas de *smear layer* (asteriscos) envoltas pelo cimento resinoso (setas). (C) Grupo clorexidina 2% - dentina

normal. Presença de cimento na superfície de dentina(asteriscos), sem exposição dos túbulos dentinários. (D) Grupo clorexidina 2% - dentina erodida. Presença de cimento na superfície de dentina (asteriscos), com pouca exposição dos túbulos dentinários (setas). (E) Grupo ácido poliacrílico 20% - dentina normal. Pouca exposição de túbulos dentinários (asteriscos). (F) Grupo ácido poliacrílico 20% - dentina erodida. Evidencia-se a presença de material resinoso sobre a *smear layer* (asteriscos) e muitos túbulos dentinários expostos na superfície, com exposição das fibras colágenas (setas). A maioria dos túbulos expostos encontra-se obliterada. (G) Grupo EDTA 0,1M – dentina normal, evidenciando a presença de cimento resinoso (asteriscos), com pouca exposição dos túbulos dentinários (seta). (H) Grupo EDTA 0,1M – dentina erodida, evidenciando a presença de poucos túbulos expostos na superfície e outros preenchidos pelo cimento resinoso (asteriscos). Aumento de 500x.

Figura 3. Análise em microscopia confocal das dentinas normal e erodida submetidas a diferentes tratamentos de superfície.





(A) Grupo controle (sem tratamento) – dentina normal. Pode-se observar uma interface nítida, contínua, sem formação de fendas (asteriscos) e sem a formação de *tags*. (B) Grupo controle (sem tratamento) – dentina erodida. A interface adesiva não apresenta formação de camada híbrida, porém notou-se uma intensa formação de *tags* resinosos (setas) em relação à dentina normal. (C) Grupo clorexidina 2% - dentina normal. Nota-se ausência de fendas na interface adesiva e formação de camada híbrida (asteriscos). (D) Grupo clorexidina 2% - Ausência de fendas na interface adesiva, com formação de alguns *tags* visíveis (setas). (E) Grupo ácido poliacrílico 20% - dentina normal. Nítida formação de camada híbrida em toda a interface adesiva (asteriscos). (F) Grupo ácido poliacrílico 20% - dentina erodida. Formação de camada híbrida em toda a interface adesiva, com espessura aumentada em comparação à dentina normal (asteriscos) e formação de *tags* $\leq 3 \mu\text{m}$ em quase toda a interface (setas). (G) Grupo EDTA 0,1 M - dentina normal. Sobre a qualidade da interface adesiva nota-se a ausência de fendas, com a formação de alguns *tags* resinosos medindo de 9 a 15 μm , (setas). (H) Grupo EDTA 0,1 M – dentina erodida. Ausência de fendas na interface adesiva, sem formação de cama híbrida, porém com a formação muito densa de *tags* resinosos, tanto em profundidade. *d = dentina / *cr = cimento resinoso. Asterisco = formação de camada híbrida; flechas = formação de *tags* resinosos.

ANEXO A

Parecer aprovado do Comitê de Ética e Pesquisa para a realização deste estudo

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA INTERFACE DE UNIÃO ENTRE CIMENTO RESINOSO AUTO-ADESIVO À DENTINA ERODIDA IN VITRO

Pesquisador: Paulo Henrique dos Santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 32545114.1.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 711.732

Data da Relatoria: 25/07/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto apresenta as características da população a estudar, incluindo o tamanho da amostra e metodologia a ser desenvolvida. A pesquisa tem como finalidade avaliar a interface de união entre cimento resinoso auto-adesivo à dentina submetida a erosão in vitro.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto apresenta objetivos definidos e está bem estruturado. Tem como objetivo analisar a interface de união entre cimento resinoso auto-adesivo à dentina normal e a erodida, para posterior comparação entre essas amostras.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá riscos para pacientes, uma vez que serão utilizados dentes obtidos do Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. A melhora na adesividade de materiais odontológicos, especificamente os cimentos resinosos, à dentina que apresente erosão, trará benefícios diretos para a aplicação clínica nos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A metodologia proposta é abrangente procurando responder o objetivo da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados, de modo adequado, os termos necessários para a apreciação do projeto.

Recomendações:

Nada a acrescentar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa apresenta objetivo definido em avaliar a interface de união entre cimento resinoso auto-adesivo à dentina submetida a erosão in vitro. Os antecedentes científicos e a bibliografia justificam a pesquisa, com uma amostragem de 64 dentes humanos. O pesquisador esclarece que não haverá risco por serem usados dentes do Banco de Dentes. Os documentos apresentados estão devidamente preenchidos. Por não haver pendências propõe-se a aprovação do referido projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto de pesquisa apresenta objetivo definido em avaliar a interface de união entre cimento resinoso auto-adesivo à dentina submetida a erosão in vitro. Os antecedentes científicos e a bibliografia justificam a pesquisa, com uma amostragem de 64 dentes humanos. O pesquisador esclarece que não haverá risco por serem usados dentes do Banco de Dentes. Os documentos apresentados estão devidamente preenchidos. Não havendo pendências, o CEP propõe a aprovação do projeto de pesquisa. Salientamos que, de acordo com a

Resolução 466 CNS, de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 07/01/2015.

ARACATUBA, 07 de Julho de 2014

Assinado por:
Ana Claudia de Melo Stevanato Nakamune
(Coordenador)

ANEXO B

Normas de submissão para a revista *Operative Dentistry*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Updated 15 August, 2014

Dear Authors,

Operative Dentistry, Inc. adheres to the ethical considerations of the International Committee of Medical Journal Editors (hereafter “ICMJE”) also known as the Vancouver Guidelines. If any conflict arises with a submitted manuscript, the Editor will contact the Corresponding Author of the manuscript in accordance with the ICMJE guidelines.

Due to increased submission costs we need to pass a 25.00USD portion of those costs on to our submitting authors. The 25.00 USD is a one-time cost per manuscript. If you are asked to submit revisions of your paper, only the original submission will be charged. This fee will be required for a manuscript to be considered in any way. Please understand that this fee is non-refundable. Paying the submission fee will have no bearing on whether or not your manuscript will be accepted either for review, or for publication. Should you have any questions about this new policy, please contact our offices at editor@jopdent.org.

PayPal has been chosen to help with this fee collection. We understand that not all countries participate with PayPal. If you are unable to submit the fee via PayPal, contact our offices at editor@jopdent.org for other options. Should you have any questions about this policy, please contact our offices at editor@jopdent.org.

We operate with very strict guidelines regarding human subjects. In order for a manuscript to be considered for review in our journal, evidence that appropriate use of human or animal subjects or tissues must be provided. The journal editorial board cannot make that decision, just as an individual investigator should not make that decision. It is recognized that some jurisdictions have different expectations and requirements. If your manuscript uses animal or human subject derived data (including survey forms) or specimens of any kind (including teeth, saliva, tissues), evidence of IRB or local oversight committee approval that was obtained prior to beginning the study must be provided **WITH** the submission. In cases where your country does not ever require "permission" to use, for example, extracted teeth, there should be a written policy from the local human research ethics committee that states that no permission of any sort is required. A copy of that policy meets the journal's need to adhere to international publishing standards as described by the ICMJE.

If the editorial staff determines that human or animal derived data was used to craft your manuscript, and no evidence of proper oversight is submitted, the journal will not accept the manuscript for review.

In addition, if the manuscript is a randomized, controlled clinical trial, registration of the trial with a public registry is required. A link to that registry must be provided **WITH** the submission.

All manuscripts are subject to plagiarism checks. Plagiarized article will be rejected without any option to resubmit. The decision of the Editor will be final in all cases – no appeals will be considered.

The Allentrack system will convert the files you submit into pdf files for the ease of electronic sharing. One of the steps of conversion is to merge all the files together, this step can take anywhere from 10 minutes to three hours depending upon the complexity of the paper. PLEASE allow the computer time to do this conversion before contacting our office reporting problems with the system; in almost all of the cases, patience will fix the problem.

All submitted manuscripts will be subject to the possibility of online only publication on our online journal site: www.jopdentonline.org. These e-pub articles will be paginated with an "e" prefix and will carry a fully citable DOI number. If you are not interested in the possibility of having your paper published online only, please do not submit your manuscript to us. Your authorization to allow us to e-publish will help us to publish manuscripts even faster than we have in the past. Our goal is to have a manuscript through the review process (submission to acceptance) in 2 months and from acceptance to publication within 6 months. Please feel free to send any questions about this policy to editor@jopdent.org.

We will need your text file (original word processing file in Word) in order to size your manuscript accurately. Our system will automatically merge the text file that you upload with the figure and table files, to make one article file PDF. This allows editors and reviewers to view and/or download your manuscript in one easy step. If any of your figures are illegible, or the figure sizes are too large or small (see below), your submission will be returned to you so that you can fix these problems. Your manuscript will only be considered officially submitted after it has been approved through our initial quality control check, and these problems (if any) have been fixed. You will have 6 days from when you start the process to submit and approve the manuscript. After the 6 day limit, if you have not finished the submission, your submission will be subject to removal from the server. You are still able to submit the manuscript, but you must start from the beginning. Please be sure that you have all items listed below before you start the submission process.

Authors, whose manuscripts are accepted for publication, will be awarded 10 continuing dental education (CDE) credits for the primary investigator and, if a different individual, for the corresponding author, and 2 CDE credits for each contributing author. Operative

Dentistry, Inc. is an ADA CERP authorized provider. ADA CERP is a service of the American Dental Association to assist dental professionals in identifying quality providers of continuing dental education. ADA CERP does not approve or endorse individual courses or instructors, nor does it imply acceptance of credit hours by boards of dentistry. Concerns or complaints about a CE provider may be directed to the provider or to ADA CERP at www.ada.org/cerp. At the conclusion of a successful manuscript submission process the authors will be able to: assess dental research outcomes, describe the processes used in the research, and effectively articulate their manuscripts information to the dental community. Upon receipt of final acceptance the corresponding author will receive the instruction for requesting these credits.

Before submitting a manuscript, please gather the following information:

- All Authors' First Names, Middle Names/Initials, Last Names
 - Author Degrees, and Current Institution information, Postal Addresses, Work Telephone Numbers
 - E-mail Addresses
- Title and Running Title (you can cut and paste this from your manuscript). Running title: This is simply a shorter version of the title used on following pages and in our database for reports, etc.
- Clinical Relevance Statement. This is required to submit and should appear in both the manuscript data field when entering initial info, as well as being part of the manuscript text document.
- Abstract (you can cut and paste this from your manuscript).
- Manuscript files and Tables in a .doc or .docx format. (Please include your abstract and figure captions in the text file.)
- References must be numbered (superscripted Arabic numerals...1, 2, 3 etc.) consecutively as they appear in the text and, where applicable, they should appear after punctuation. For examples, refer to the “Instructions to Authors” page at www.jopdent.org.
- For printing purposes, we require that your figure files be in TIFF, or JPG formats and be uploaded separately as source files, not PDF files. You may not embed the figures, graphs or tables in the manuscript

The manuscript text must not contain any author identifying information, no names and addresses, no acknowledgements, no ethics board information, etc. These items are entered separately during the process, and will be merged into the final document by the computer. Any manuscripts with identifying information in the main manuscript file will be sent back to the

author for correction. Remember, our peer review is double blind in order to provide our readers with the highest quality data possible.

Manuscript submission

General Requirements

Operative Dentistry requires electronic submission of all manuscripts. All submissions must be sent to Operative Dentistry using the Allen Track upload site. A mandatory and nonrefundable \$25.00 fee is required at submission. Your manuscript will only be considered officially submitted after it has been approved through our initial quality control check, and any quality problems have been resolved. You will have 6 days from when you start the process to submit and approve the manuscript. After the 6 day limit, if you have not finished the submission, your submission may be removed from the server. You are still able to submit the manuscript, but you must start from the beginning. Be prepared to submit the following manuscript files in your upload:

A Laboratory or Clinical Research Manuscript file must include:

a title

a running (short) title

a clinical relevance statement

a concise summary (abstract)

introduction, methods & materials, results, discussion and conclusion

references (see Below)

The manuscript body **MUST NOT** include any:

Author identifying information such as:

- Authors names or titles
- Acknowledgements
- Correspondence information
- Response to reviewer files should also **NOT** include any author identifying information, such as a signature at the end, etc.
- Figures
- Graphs
- Tables

An acknowledgement, disclaimer and/or recognition of support (if applicable) must in a separate file and uploaded as supplemental material.

All figures, illustrations, graphs and tables must also be provided as individual files. These should be high-resolution images, which are used by the editor in the actual typesetting of your manuscript. Please refer to the instructions below for acceptable formats and sizes.

All other manuscript types use this template, with the appropriate changes as listed below.

Complete the online form (which includes complete author information, copyright release and conflict of interest), and select the files you would like to send to Operative Dentistry. Manuscripts that do not meet our formatting and data requirements listed below will be sent back to the corresponding author for correction.

Important Information

- All materials submitted for publication must be submitted exclusively to Operative Dentistry. -The editor reserves the right to make literary corrections. 15 Current as of: 3-Sep-14 Currently, color will be provided at no cost to the author if the editor deems it essential to the manuscript. However, we reserve the right to convert to gray scale if color does not contribute significantly to the quality and/or information content of the paper.
- The author(s) retain(s) the right to formally withdraw the paper from consideration and/or publication if they disagree with editorial decisions.
- International authors whose native language is not English must have their work reviewed by a native English speaker prior to submission. o Manuscripts that are rejected before peer-review for English correction should be entered as a new manuscript upon resubmission. In the manuscript comments box the comment, “this is a resubmission of manuscript number XX-XXX” should be noted. o Manuscripts that are rejected after peer-review are not eligible for resubmission. o Manuscripts that have major revisions requested (i.e. For English correction) are entered as a resubmission of the original article.
- Spelling must conform to the American Heritage Dictionary of the English Language, and SI units for scientific measurement are preferred.
- While we do not currently have limitations on the length of manuscripts, we expect papers to be concise; authors are also encouraged to be selective in their use of figures and tables, using only those that contribute significantly to the understanding of the research.
- Acknowledgement of receipt is sent automatically upon acceptance through quality control. This may take up to 7 days. If you do not receive such an acknowledgement, please check your author homepage at <http://jopdent.allentrack.net> if the paper does not appear there please resend your paper. IMPORTANT: Please add our e-mail address to your address book on your server to prevent transmission problems from spam and other filters. Also make sure that your server will accept larger file sizes. This is particularly important since we send page-proofs for review and correction as .pdf and/or .doc(x) files.

Manuscript Type Requirements

All Manuscripts

CORRESPONDING AUTHOR must provide a WORKING / VALID e-mail address which will be used for all communication with the journal. NOTE: Corresponding authors MUST update their profile if their e-mail or postal address changes. If we cannot contact authors within seven days, their manuscript will be removed from our publication queue.

AUTHOR INFORMATION must include: • full name of all authors • complete mailing address for each author • valid email address for each author • degrees (e.g. DDS, DMD, PhD) • affiliation (e.g. Department of Dental Materials, School of Dentistry, University of Michigan)

MENTION OF COMMERCIAL PRODUCTS/EQUIPMENT must include: • full name of product • full name of manufacturer • city, state and country of manufacturer MANUSCRIPTS must be provided as Word for Windows files. Files with the .doc and .docx extensions are accepted. TABLES

may be submitted as either Word (.doc and .docx) or Excel (.xls and .xlsx) files. All tables must be legible, with fonts being no smaller than 7 points. Tables have the following size limitations: In profile view a table must be no larger than 7 x 9 inches; landscape tables should be no wider than 7 inches. It is the Editor's preference that tables not need to be rotated in order to be printed, as it interrupts the reader's flow.

ILLUSTRATIONS, GRAPHS AND FIGURES must be provided as TIFF or high resolution JPEG files with the following parameters: • line art (and tables that are submitted as a graphic) must be sized with the short edge being no shorter than 5 inches. It should have a minimum resolution of 600 dpi and a maximum resolution of 17 Current as of: 3-Sep-14 1200 dpi. This means the shortest side should be no smaller than 3000 pixels.

- gray scale/black & white figures must be sized with the short edge being no shorter than 5 inches. It should have a minimum resolution of 300 dpi and a maximum of 400 dpi. This means the shortest side should be no smaller than 1500 pixels.

- color figures and photographs must be sized with the short edge being no shorter than 3.5 inches. It should have a minimum resolution of 300 dpi and a maximum of 400 dpi. This means that the shortest side should be no smaller than 1050 pixels.

Other Manuscript Type – Additional Requirements

CLINICAL TECHNIQUE/CASE STUDY MANUSCRIPTS must include as part of the narrative: a running (short) title • purpose • description of technique • list of materials used • potential problems • summary of advantages and disadvantages • references (see below)

LITERATURE AND BOOK REVIEW MANUSCRIPTS must include as part of the narrative: • a running (short) title • a clinical relevance statement based on the conclusions of the review • conclusions based on the literature review...without this, the review is just an exercise and will not be published • references (see below).

References

REFERENCES must be numbered (superscripted numbers) consecutively as they appear in the text and, where applicable, they should appear after punctuation. The reference list should be arranged in numeric sequence at the end of the manuscript and should include:

1. Author(s) last name(s) and initial (ALL AUTHORS must be listed) followed by the date of publication in parentheses.
2. Full article title.
3. Full journal name in italics (no abbreviations), volume and issue numbers and first and last page numbers complete (i.e. 163-168 NOT attenuated 163-68).
4. Abstracts should be avoided when possible but, if used, must include the above plus the abstract number and page number.
5. Book chapters must include chapter title, book title in italics, editors' names (if appropriate), name of publisher and publishing address.
6. Websites may be used as references, but must include the date (day, month and year) accessed for the information.
7. Papers in the course of publication should only be entered in the references if they have been accepted for publication by a journal and then given in the standard manner with "In press" following the journal name.

8. DO NOT include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.

9. References that contain Crossref.org's DOIs (Digital Object Identifiers) should always be displayed at the end of the reference as permanent URLs. The prefix <http://dx.doi.org/> can be appended to the listed DOI to create this URL. i.e. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1995.0238>

Reference Style Guide

Journal article-two authors: Evans DB & Neme AM (1999) Shear bond strength of composite resin and amalgam adhesive systems to dentin American Journal of Dentistry 12(1) 19-25.

Journal article-multiple authors: Eick JD, Gwinnett AJ, Pashley DH & Robinson SJ (1997) Current concepts on adhesion to dentin Critical Review of Oral and Biological Medicine 8(3) 306-335. • Journal article: special issue/supplement: Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P & Vanherle G (2001) Adhesives and cements to promote preservation dentistry Operative Dentistry (Supplement 6) 119-144.

Abstract: Yoshida Y, Van Meerbeek B, Okazaki M, Shintani H & Suzuki K (2003) Comparative study on adhesive performance of functional monomers Journal of Dental Research 82(Special Issue B) Abstract #0051 p B-19.

Corporate publication: ISO-Standards (1997) ISO 4287 Geometrical Product Specifications Surface texture: Profile method – Terms, definitions and surface texture parameters Geneva: International Organization for Standardization 1st edition 1-25.

Book-single author: Mount GJ (1990) An Atlas of Glass-ionomer Cements Martin Duntz Ltd, London.

Book-two authors: Nakabayashi N & Pashley DH (1998) Hybridization of Dental Hard Tissues Quintessence Publishing, Tokyo.

Book-chapter: Hilton TJ (1996) Direct posterior composite restorations In: Schwartz RS, Summitt JB, Robbins JW (eds) Fundamentals of Operative Dentistry Quintessence, Chicago 207-228.

Website-single author: Carlson L (2003) Web site evolution; Retrieved online July 23, 2003 from: <http://www.d.umn.edu/~lcarlson/cms/evolution.html>

Website-corporate publication: National Association of Social Workers (2000) NASW Practice research survey 2000. NASW Practice Research Network, 1. 3. Retrieved online September 8, 2003 from: <http://www.socialworkers.org/naswprn/default>

Journal Article with DOI: SA Feierabend, J Matt & B Klaiber (2011) A Comparison of Conventional and New Rubber Dam Systems in Dental Practice. Operative Dentistry 36(3) 243-250, <http://dx.doi.org/10.2341/09-283-C>