

David Cardoso Sandes Farias

**AVALIAÇÃO DE SISTEMAS ADESIVOS UNIVERSAIS NA  
DENTINA SOB TESTES DE MICROTRAÇÃO E  
ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutor em Dentística.

Orientador:

Prof. Dr. Mauro Amaral Caldeira de Andrada

Co-orientadores:

Prof. Dr. Gilberto Müller Arcari

Prof. DDS. MS. Ricardo Walter

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Farias, David Cardoso Sandes  
Avaliação de sistemas adesivos universais na dentina sob  
testes de microtração e espectroscopia micro-raman / David  
Cardoso Sandes Farias ; orientador, Mauro Amaral Caldeira  
De Andrada ; coorientador, Gilberto Müller Arcari. -  
Florianópolis, SC, 2014.  
142 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Adesão à dentina. 3. Cargas mecânicas.  
4. Microtração. 5. Sistemas adesivos universais. I. De  
Andrada, Mauro Amaral Caldeira . II. Arcari, Gilberto  
Müller . III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

David Cardoso Sandes Farias

AVALIAÇÃO DE SISTEMAS ADESIVOS UNIVERSAIS NA  
DENTINA SOB TESTES DE MICROTRAÇÃO E  
ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Dentística, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 06 de Junho de 2014.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr.<sup>a</sup> Izabel Cristina Santos Almeida  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**Banca Examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mauro Amaral Caldeira de Andrada  
Orientador

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Clovis Cardoso Vieira  
Membro

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jussara Karina Bernardon  
Membro

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sheila Cristina Stolf  
Membro

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Xavier Silva Costa  
Membro

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leticia Brandão Durand  
Membro



Dedico esta tese à minha mãe  
*Márcia de Fátima Cardoso Sandes Farias*  
(para sempre em meu coração)



## AGRADECIMENTOS

Ao longo de anos de trabalho que resultaram nesta tese, pessoas ímpares e instituições renomadas me ofereceram apoio e condições de trabalho. Neste momento, não poderia deixar de agradecê-las individualmente.

Primeiramente, e não poderia ser diferente, gostaria de agradecer a Deus por tudo que fez em minha vida. Pela alegria de viver, pela família que possuo, pelos amigos que tenho e pelas oportunidades que me deu para que crescesse dia após dia.

À minha mãe **Márcia** (em memória). Obrigado por todos momentos dedicados a mim, pelas palavras, pelos ensinamentos, pelo amor incondicional, pela honestidade, pela amizade mesmo que por tão pouco tempo. Antecipaste a hora da partida, mas a vida me ensinou a dizer adeus às pessoas que amo, sem tirá-las do meu coração.

À minha irmã **Julianna**, a quem devo respeito e admiração. Depois de tudo que passamos juntos, olho para trás e vejo uma pessoa responsável, dedicada aos estudos e amiga. Torço muito por você, que durante toda sua vida se mostrou uma pessoa capaz de conseguir tudo o que quer.

Ao meu pai **Antônio**, que me deu a vida e me ensinou a vivê-la com dignidade. Obrigado por todo apoio nos momentos de sucesso mas também nos momentos de dificuldade. A segurança e o consolo eu sempre soube onde encontrar.

Aos meus avós paternos **Antônio** e **Maria Celeste** (em memória). Nunca terei palavras suficientes e nem mais tempo, para agradecer aos dois que me cercaram de tanto carinho e amor. Apesar de pouca convivência, sempre lembrarei dos ótimos momentos que passamos. Estarei sempre orando por vocês.

À minha avó **Nilde**, por ter me dado o melhor de todos os presentes: a **EDUCAÇÃO**. Você mudou a minha história. E fez o que ninguém podia imaginar. Você acreditou e isso é tudo para mim.

Ao meu avô *Sandes*, obviamente por ser duas vezes meu “pai”. Não poderia deixar de agradecê-lo pela amizade e carinho, sem mesmo ter obrigação.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina*, por ter me proporcionado conhecimento científico e por consequência, conhecer as pessoas mais fantásticas da minha vida.

Ao meu orientador e mais novo amigo, professor *Dr. Mauro Amaral Caldeira de Andrada*, pelo carinho, pela atenção e sem dúvidas, por ter confiado em mim durante toda a execução desta tese. Quando surgiu a oportunidade de realizar o doutorado “sanduíche” o seu incentivo me deu forças para que eu realizasse esse sonho. Além disso, enquanto estive na Universidade da Pensilvânia-EUA pude observar que, mesmo de longe, o senhor estava sempre torcendo para que tudo desse certo. Gostaria de exprimir os meus agradecimentos ao senhor pela orientação durante estes anos de doutoramento. Eu tenho uma imensa gratidão por você e no seu dia, quero que você seja muito feliz, sempre lutador e compreensivo. Aproveito para deixar registrado que, terá para sempre, um amigo fiél.

Ao meu co-orientador no exterior, e agora grande amigo, *Prof. Ricardo Walter*, por me receber tão bem nos Estados Unidos da América. Gostaria de agradecê-lo por inúmeras vezes me enxergar melhor do que realmente sou. Por me oferecer as melhores condições de trabalho e por confiar na minha pessoa. Por me deixar conhecer sua linda família: Patrícia, Violet e Penelope. Por me fazer sentir em casa durante um ano longe da minha família e amigos. Valeu a pena toda distância, toda dificuldade, todas as renúncias...Valeu a pena esperar... Seus ensinamentos serão levados comigo para sempre. Tenho orgulho de ter trabalhado com você. **OBRIGADO!!!**

Ao meu co-orientador, professor *Dr. Gilberto Müller Arcari*, pela sua colaboração no intuito de enriquecer esta tese, pelos seus ensinamentos e pelo prazeroso convívio durante todos os anos de pós-graduação.

Ao professor **Dr. Luiz Narciso Baratieri**, pela oportunidade de realizar o estágio de doutorado sanduíche no exterior. Obrigado pela confiança e pelos ensinamentos profissionais e de vida.

Ao professor **Dr. Sylvio Monteiro Junior**, pela grande ajuda dada no momento da aquisição da bolsa de estudos que me deu suporte financeiro para a realização do estágio de doutorado sanduíche no exterior. Além disso, obrigado por sua honestidade, sinceridade e pelos ensinamentos profissionais na especialização, mestrado e doutorado.

Ao professor **Dr. Luiz Clóvis Cardoso Vieira**, pelo constante apoio durante todos os anos de pós-graduação. Obrigado por me incentivar e acreditar que seria capaz de crescer profissionalmente.

À professora **Dr<sup>a</sup>. Jussara Karina Bernardon**, pelo seu carinho e amizade. Obrigado por aceitar participar desta banca avaliadora. Devo respeito e admiração à sua pessoa. Obrigado por tudo!!!

À professora **Dr<sup>a</sup>. Sheila Cristina Stolf**, por toda sua competência durante a avaliação desta tese. Agradeço também, por fazer parte desta banca avaliadora. Tenho profunda admiração por sua trajetória e pela forma educada que sempre me tratou.

Às professoras **Dr<sup>a</sup>. Simone Xavier Silva Costa** e **Dr<sup>a</sup>. Leticia Brandão Durand**, desejamos expressar nossa satisfação por aceitar participar como membro da banca examinadora desta tese de doutoramento.

A todos os professores da disciplina de Dentística - professor **Dr. Cléo Nunes de Sousa**, professor **Dr. Guilherme Carpena Lopes**, professor **Dr. Élito Araújo**, professor **Dr. Hamilton Pires Maia**, professora **Dr<sup>a</sup>. Renata Gondo Machado** – pela amizade, pelos valiosos ensinamentos e pelo ótimo convívio durante as atividades da Pós-Graduação.

À **Dona Léa**, pela forma atenciosa e educada que sempre me atendeu.  
Meu respeito e admiração.

Aos meus amigos da turma de doutoramento em Dentística – **Adriano Almeida, Cássio Neto, Daniel Baptista, Eduardo Daut, Greciana Bruzi e Luana Dutra** – pela ótima convivência e pelos excelentes momentos de descontração. *“Um dia a maioria de nós irá se separar. Sentiremos saudades de todas as conversas jogadas fora, as descobertas que fizemos, dos sonhos que tivemos, dos tantos risos e momentos que compartilhamos...”*

## RESUMO

Farias DCS. **Avaliação de sistemas adesivos universais na dentina sob testes de microtração e espectroscopia micro-raman.** 2014. Tese (Doutorado em Odontologia – área de concentração: Dentística) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Avaliar o efeito da aplicação de cargas mecânicas cíclicas sobre a resistência adesiva à microtração de sistemas adesivos universais à dentina quando aplicados com diferentes estratégias adesivas, convencional ou autocondicionante; e quantificar a interdifusão destes adesivos universais na dentina por meio da espectroscopia micro-Raman. Superfícies planas de dentina provenientes de oitenta e oito molares humanos foram distribuídas aleatoriamente em oito grupos de acordo com o tipo de sistema adesivo utilizado (n=10): Scotchbond Universal aplicado seguindo a estratégia adesiva convencional (SU-Er, 3M ESPE) ou seguindo a estratégia adesiva autocondicionante (SU-Se, 3M ESPE); All Bond Universal seguindo a estratégia adesiva convencional (AB-Er, Bisco) ou seguindo a estratégia adesiva autocondicionante (AB-Se, Bisco). Optibond FL (OFL, Kerr), Adper Single Bond Plus (SBP, 3M ESPE), Clearfil SE Bond (CSE, Kerr); e Adper Prompt L-Pop (PLP, 3M ESPE) foram utilizados para comparações. Após realização dos procedimentos adesivos, restaurações com a resina composta TPH<sup>3</sup> (Dentsply) foram construídas incrementalmente. Metade das amostras (n=5) foi seccionada para a obtenção de filetes 24 horas após aos procedimentos adesivos e imediatamente submetidas ao teste de resistência adesiva à microtração ( $\mu$ TBS). A outra metade das amostras foi seccionada em filetes após aplicação de cargas mecânicas cíclicas (50.000 ciclos, 50N) e testadas sob  $\mu$ TBS. Para quantificar a infiltração dos sistemas adesivos na interface adesivo/dentina, a análise micro-Raman foi realizada para cada sistema adesivo. Dentes adicionais (n = 8) foram preparados e tratados com os diferentes sistemas adesivos como anteriormente descrito para a avaliação da resistência adesiva à microtração. Cada amostra foi seccionada para obtenção de filetes com 2 mm<sup>2</sup>. Os filetes foram então polidos e limpos para expor a interface adesiva para a análise sob espectroscopia micro-Raman. Para a análise estatística dos dados, foi empregada a análise de variância de dois fatores (*two-way* ANOVA) e o teste de Tukey ao nível de 95% de confiança. O condicionamento ácido prévio da dentina produziu um aumento mínimo e não-significativo dos

valores de resistência adesiva quando o adesivo SU foi utilizado ( $p > 0.05$ ). Para o adesivo AB, as médias de resistência adesiva foram influenciadas pelo modo de aplicação (autocondicionante ou convencional) ( $p < 0.05$ ). Inicialmente, as médias mais altas de resistência adesiva foram obtidas com SU-Er (57,5 MPa), mas estatisticamente semelhantes às médias obtidas com OFL, SBP, CSE e AB-Er ( $p > 0.05$ ). PLP e AB-Se apresentaram desempenho adesivo semelhantes, que foram estatisticamente inferiores quando comparados aos outros grupos experimentais ( $p < 0.05$ ). A aplicação de cargas mecânicas cíclicas não afetou os valores de resistência adesiva para todos os grupos, exceto para PLP (de 35,2 para 12,7 MPa;  $p < 0.05$ ). A espessura da camada híbrida variou entre os diferentes sistemas adesivos avaliados, com espessura aproximada de 3.5, 3.5, 4.0, 5.0, 2.5, 5.0, 2.0, 4.0  $\mu\text{m}$  para OFL, SBP, CSE, PLP, SU-Se, SU-Er, AB-Se e AB-Er, respectivamente. O desempenho dos sistemas adesivos universais não foi afetado negativamente pelo modo de aplicação utilizado - autocondicionante ou convencional. A aplicação de cargas mecânicas cíclicas não influenciou os valores de resistência união de adesivos universais à dentina. Variações na profundidade de infiltração da resina e no grau de desmineralização da dentina na interface foram observadas sob espectroscopia micro-Raman.

**Palavras-chave.** Adesão à dentina. Cargas mecânicas. Microtração. Adesivos convencionais. Adesivos autocondicionantes. Sistemas adesivos universais.

## ABSTRACT

Farias DCS. **Evaluation of universal adhesive systems on dentin under microtensile and micro-Raman spectroscopy tests.** 2014. Thesis (P.h.D in Dentistry – Operative Dentistry) – Graduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

To evaluate the effect of mechanical cyclic loading on the dentin microtensile bond strengths ( $\mu$ TBS) of universal adhesive systems following either a self-etch or an etch-and-rinse bonding strategy and to quantify the diffusion of these single-bottle universal adhesives into dentin using micro-Raman spectroscopy. Flat dentin surfaces from eighty human molars were allocated to eight groups ( $n=10$ ) and bonded with Scotchbond Universal Adhesive applied using etch-and-rinse approach (SU-Er, 3M ESPE) or using self-etch approach (SU-Se, 3M ESPE); All Bond Universal Adhesive applied using etch-and-rinse approach (AB-Er, Bisco) or using self-etch approach (AB-Se, Bisco). Optibond FL (OFL, Kerr), Adper Single Bond Plus (SBP, 3M ESPE), Clearfil SE Bond (CSE, Kerr); and Adper Prompt L-Pop (PLP, 3M ESPE) were used for comparison. Composite build-ups were constructed incrementally with TPH<sup>3</sup> (Dentsply). Half of the specimens ( $n=5$ ) were sectioned into beams 24 h after the bonding procedures and immediately tested for microtensile bond strengths ( $\mu$ TBS). The other half of the specimens were sectioned into beams immediately after mechanical load cycling (50.000 cycles, 50N) and tested in  $\mu$ TBS. Micro-Raman analysis of adhesive infiltration across the dentin-adhesive interface was carried out for each adhesive. Additional teeth ( $n=8$ ) were prepared and bonded as previously described for  $\mu$ TBS evaluation. Each specimen was then cut to obtain 2 mm<sup>2</sup> slabs. Slabs were then polished and cleaned to expose the adhesive interface for micro-Raman analysis. Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's *post hoc* test at the 95% confidence level. The pre-etching treatment produced a minimal and non-significant increase in  $\mu$ TBS for SU adhesive ( $p > 0.05$ ). For AB, the mean  $\mu$ TBS was influenced by the mode of application (self-etch or etch-and-rinse) ( $p < 0.05$ ). Initially, the highest mean  $\mu$ TBS were obtained with SU-Er (57.5 MPa), but statistically similar to those of OFL, SBP, CSE and AB-Er ( $p > 0.05$ ). PLP and AB-Se performed equally, which were statistically lower than those of the other experimental groups ( $p < 0.05$ ). Mechanical cyclic loading did not affect the  $\mu$ TBS values for all groups except for PLP

(from 35.2 to 12.7 MPa;  $p < 0.05$ ). The widths of the hybrid layers varied, and was ~3.5, 3.0, 4.0, 5.0, 2.5, 5.0, 2.0, 4.0  $\mu\text{m}$  for OFL, SBP, CSE, PLP, SU-Se, SU-Er, AB-Se and AB-Er, respectively. The bonding performance of universal adhesives was not affected by application mode – namely self-etch and etch-and-rinse. Mechanical cyclic loading did not adversely affect the  $\mu\text{TBS}$  values of universal adhesives. Variations in the degree of resin infiltration and dentin demineralization on the resin-dentin interface were noticed with micro-Raman spectroscopy.

**Keywords:** Dentin bonding. Cyclic loading. Microtensile bond strength. Etch-and-rinse. Self-etch. Universal adhesive systems.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Molares humanos extraídos envolvidos na pesquisa.....	29
Figura 2 Dispositivo utilizado para inclusão dos dentes em resina epóxi. .....	30
Figura 3 (A) Preenchimento dos cilindros com resina epóxi. (B) Dente incluído. ....	30
Figura 4 Corpo de prova fixado à máquina de corte. Note que a superfície oclusal encontra-se paralela ao disco de corte. ....	31
Figura 5 Superfície plana, expondo dentina média e circundada por esmalte. ....	32
Figura 6 (A) Aplicação do sistema adesivo*. (B) Fotopolimerização*. (C) Inserção do primeiro incremento com ~ 2mm de espessura. (D) Fotopolimerização*. (E) Restauração finalizada. (F) Vista oclusal do corpo de prova. Note que parte do esmalte remanescente não foi envolvido na restauração. ....	35
Figura 7 Equipamento utilizado para simular as forças mastigatórias sobre os corpos de prova aleatoriamente selecionados.....	36
Figura 8 Suporte utilizado para fixar o corpo de prova à máquina de teste. ....	37
Figura 9 Corpo de prova mantido no interior do suporte. Note que após presa, o material de moldagem foi capaz de simular a presença do ligamento periodontal com ~1 mm de espessura. ....	37
Figura 10 Durante a aplicação das cargas mecânicas cíclicas, todos os corpos de prova foram imersos em água destilada à temperatura ambiente. ....	38
Figura 11 Corpo de prova fixado à máquina de cortes Isomet. ....	39
Figura 12 As coroas foram seccionadas automaticamente com um disco diamantado de corte, sob irrigação com água constante nas direções X e Y, para obtenção de filetes com secção transversal de $0.8 \pm 0.2 \text{ mm}^2$ . Cortes iniciais (eixo X) para eliminar as superfícies vestibular e lingual/palatal.....	40
Figura 13 Cortes adicionais (eixo Y) para eliminar as superfícies mesial e distal. ....	40

Figura 14 Cortes sequenciais nos eixos X e Y, distantes 1.2 mm entre si, para obtenção de filetes com dimensão $\sim 0.9 \text{ mm}^2$ .	41
Figura 15 Fixação do filete ao dispositivo de microtração <i>Ciucchi</i> adaptado à máquina universal de ensaios.	41
Figura 16 Filete submetido á carga de tração até o momento da fratura.	42
Figura 17 Amostra retangular obtida para avaliação sob espectroscopia micro-Raman com 10 mm de comprimento / 2 mm de altura / 2 mm de comprimento.	43
Figura 18 Matriz utilizada para inclusão das amostras.	44
Figura 19 Todas as amostras foram depositadas em uma cuba de ultra-som e deixadas durante um período de 15 minutos para a limpeza da superfície.	45
Figura 20 Após realização dos procedimentos de polimento e limpeza, as amostras foram armazenadas em um recipiente com sílica gel afim de garantir um ambiente livre de umidade.	45
Figura 22 Imagem da interface adesiva obtida por microscópio óptico. Há suficiente contraste para distinguir o adesivo, a camada híbrida, os <i>tags</i> de resina e a dentina, permitindo a identificação da região onde cada espectro Raman será obtido. Notar a demarcação da área a ser analisada sob micro-espectroscopia Raman.	49
Figura 23 Representação em cores da distribuição dos componentes da interface adesiva: <b>resina composta</b> , <b>adesivo</b> e <b>dentina</b> . Notar que o escaneamento em linha da interface adesiva foi realizado exclusivamente na região intertubular.	50

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 OBTENÇÃO, SELEÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS DENTES .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 INCLUSÃO DOS DENTES.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 PREPARO DENTAL INICIAL .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 DIVISÃO DOS GRUPOS .....</b>	<b>32</b>
<b>3.5 PROCEDIMENTOS RESTAURADORES E PREPARO DOS CORPOS DE PROVA.....</b>	<b>33</b>
<b>3.6 TESTE DE RESISTÊNCIA ADESIVA À MICROTRAÇÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>3.7 ANÁLISE DO PADRÃO DE FRATURA .....</b>	<b>42</b>
<b>3.8 ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN .....</b>	<b>43</b>
3.8.1 Preparo das amostras.....	43
3.8.2 Análise da interface adesiva.....	46
<b>3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>51</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>53</b>
<b>4 ARTIGO .....</b>	<b>87</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>87</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>91</b>
Preparo dos espécimes .....	91
Aplicação de cargas mecânicas cíclicas.....	91
Teste de microtração ( $\mu$ TBS).....	92
Espectroscopia micro-Raman .....	93
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>95</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>105</b>
<b>5 PAPER.....</b>	<b>113</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>113</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>115</b>
<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>117</b>
Specimen preparation.....	117
Cycling mechanical loading.....	117
$\mu$ TBS testing .....	117

Micro-Raman spectroscopy .....	118
<b>RESULTS</b> .....	<b>121</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>123</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>127</b>
<i>Acknowledgements</i> .....	<b>127</b>
<b>TABLES</b> .....	<b>129</b>
<b>FIGURES</b> .....	<b>133</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>137</b>

## 1 APRESENTAÇÃO

Nas últimas décadas, a Odontologia adesiva avançou de forma efetiva a partir da introdução de algumas abordagens que favoreceram à adesão aos tecidos dentais duros. O conhecimento profundo sobre o mecanismo de adesão ao esmalte e à dentina leva à resultados clínicos mais favoráveis, aumentando a durabilidade dos procedimentos preventivos e restauradores. A união de materiais resinosos à superfície do esmalte tornou-se possível desde que a técnica de condicionamento ácido introduzida por Buonocore<sup>2</sup> em 1955 foi concebida. O condicionamento do esmalte com ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) cria microporosidades, aumenta a área de superfície disponível para a adesão e, conseqüentemente, viabiliza melhor difusão e penetração dos agentes adesivos neste substrato.<sup>3</sup> Após fotopolimerização do agente adesivo, uma união durável à superfície do esmalte é obtida pela formação de prolongamentos resinosos (*resin tags*) no interior de tal superfície morfológicamente alterada.<sup>2, 3</sup> Investigações laboratoriais enfatizam a retenção micromecânica como mecanismo de adesão predominante entre resinas compostas e o esmalte pré-condicionado com ácido fosfórico.<sup>2,4</sup>

Mesmo com o avanço da tecnologia adesiva, o principal desafio para os sistemas adesivos é fornecer uma união igualmente eficaz para os tecidos dentais duros (esmalte/dentina) que apresentam composições diferentes. A adesão ao esmalte tem sido considerada fácil e durável<sup>5</sup> enquanto a adesão à dentina é considerada desafiadora,<sup>6, 7</sup> devido à sua grande variação física e morfológica (estrutura tubular variável, alto teor orgânico e movimentação de fluidos).<sup>8</sup> O esmalte é homogêneo e é composto principalmente por hidroxiapatita. Em comparação, a dentina é heterogênea e composta principalmente por hidroxiapatita e colágeno. Tem sido relatado na literatura que o elevado teor de água inerente à dentina representa o principal desafio para a união adesiva.<sup>9</sup>

A adesão ao substrato dental implica um processo de “troca”, em que o conteúdo inorgânico da estrutura dental é substituído por resinas sintéticas.<sup>6, 10</sup> Este processo consiste em duas fases: na primeira fase, os fosfatos de cálcio são removidos, expondo microporosidades tanto na superfície de esmalte quanto em dentina; já a segunda fase é caracterizada pela infiltração seguida pela polimerização do adesivo dentro das microporosidades criadas na superfície.<sup>6</sup> A infiltração dos monômeros resinosos na dentina desmineralizada permite a formação de *Tags* e da camada híbrida que sobremaneira favorecem à retenção

micromecânica do adesivo à dentina previamente condicionada.<sup>11, 12</sup> Mesmo que a formação dos prolongamentos resinosos exerçam papel fundamental na efetividade adesiva<sup>13</sup>, um mecanismo de dupla-ligação (micromecânica e química) tem sido relatado vantajoso em termos de durabilidade da união adesiva. Enquanto que a união micromecânica promove resistência ao estresse de deslocamento, a interação química pode resultar numa união que melhor resiste à decomposição hidrolítica e, assim, manter as restaurações por um período mais longo.<sup>7</sup>

Os sistemas adesivos disponíveis atualmente são classificados de acordo com a forma que interagem com a camada de esfregaço (*smear layer*) em: sistemas adesivos convencionais e sistemas adesivos autocondicionantes. Os sistemas adesivos convencionais removem a *smear layer* em consequência do condicionamento ácido, enquanto que os sistemas adesivos autocondicionantes tornam a *smear layer* permeável sem removê-la completamente.<sup>6</sup> Considerando que adesivos convencionais com múltiplos frascos (três passos) envolvem um passo adicional de condicionamento e enxágue seguido pela aplicação do *primer* e adesivo hidrofóbico (*bond*) separadamente, os sistemas adesivos convencionais de dois passos combinam as soluções do *primer* e adesivo em uma única solução ou em único frasco. Com relação ao desempenho laboratorial e clínico no que diz respeito à durabilidade da interface adesiva, os sistemas adesivos convencionais de três passos apresentam melhor desempenho se as margens das cavidades estiverem localizadas em esmalte quando comparados aos sistemas de dois passos da mesma categoria.<sup>10, 14</sup> A redução do número de passos clínicos tem sido relacionada à uma degradação mais pronunciada por hidrólise da interface adesiva, uma vez que a aplicação de um adesivo hidrofóbico é omitida.<sup>15</sup> Por outro lado, se uma camada adicional de adesivo for aplicada sobre a dentina condicionada é possível obter satisfatória união micromecânica quando sistemas adesivos convencionais de dois passos são utilizados.<sup>16</sup>

Sistemas adesivos autocondicionantes apresentam uma forma prática e simples de aplicação, visto que as etapas de condicionamento ácido e enxágue são omitidas. Os adesivos autocondicionantes tornaram-se bastante populares na Odontologia adesiva, não somente por reduzir o tempo de aplicação durante os procedimentos restauradores, mas também pelo fato de reduzir significativamente a sensibilidade na técnica ou o risco de cometer erros durante a aplicação. As etapas de condicionamento ácido e aplicação do *primer* são consideradas procedimentos de aplicação tecnicamente sensíveis.<sup>6, 17</sup> Os sistemas adesivos autocondicionantes são apresentados na forma de dois

passos ou em passo único, dependendo se um *primer* autocondicionante e um agente adesivo são fornecidos separadamente ou combinados em única solução. Por não incluir um agente adesivo aplicado separadamente em seu sistema, os adesivos autocondicionantes de passo único são considerados menos efetivos em estudos *in vitro* e apresentam desempenho inferior em avaliações clínicas.<sup>18-20</sup> Além da forma de apresentação dos sistemas adesivos autocondicionantes (2 passos ou passo único), estes sistemas podem ainda ser categorizados de acordo com seu potencial ácido: ultra-suaves ( $\text{pH} \geq 2.5$ ), suaves ( $\text{pH} \approx 2$ ), moderados ( $\text{pH} \approx 1.5$ ) ou agressivos ( $\text{pH} \leq 1$ ).<sup>21</sup> Adesivos autocondicionantes “agressivos” tem um pH relativamente baixo e apresentam mecanismo de união (baseado na difusão) e morfologia interfacial em dentina semelhante à produzida por sistemas adesivos convencionais. Já os adesivos autocondicionantes “moderados” somente dissolvem parcialmente a superfície de dentina, deixando uma quantidade substancial de hidroxiapatita dentro da camada híbrida. Dessa maneira, a adesão à estrutura dental é essencialmente obtida micro-mecanicamente por meio de uma hibridização superficial e por uma interação química adicional fornecida por grupos específicos de monômeros funcionais (e.g., 10-MDP, 4-MET, phenyl-P) com a hidroxiapatita residual.<sup>22</sup>

O desempenho adesivo obtido por sistemas autocondicionantes varia expressivamente, dependendo não somente da sua classe (dois passos ou passo único de aplicação), mas certamente também na sua composição e mais especificamente é dependente do tipo de monômero funcional incluído na formulação do adesivo.<sup>17</sup> A formulação dos adesivos ultra-simplificados (passo único de aplicação) é composta por misturas complexas de componentes hidrofílicos e hidrofóbicos que apresentam várias deficiências. Geralmente, reduzida resistência adesiva imediata tem sido relatada na literatura quando sistemas adesivos autocondicionantes de passo único são comparados com sistemas adesivos convencionais.<sup>18</sup> Além disso, vários estudos relataram baixa resistência adesiva à longo prazo quando métodos de envelhecimento da interface adesiva são empregados (seja por termociclagem ou por armazenamento em água)<sup>18</sup>, elevada nano-infiltração interfacial<sup>23</sup> e elevada sorção de água proveniente da dentina.<sup>24</sup>

Uma desvantagem relevante ao uso dos sistemas adesivos autocondicionantes é a redução da efetividade adesiva quando aplicados ao esmalte.<sup>21</sup> Adesivos autocondicionantes não possuem a capacidade de condicionar em profundidade a estrutura de esmalte da mesma forma que o condicionamento com ácido fosfórico proporciona, resultando em

baixa resistência adesiva e presença frequente de alterações marginais quando observada em estudos clínicos.<sup>25, 26</sup> Para superar essa limitação, a execução adicional da etapa de condicionamento ácido das margens em esmalte é recomendada previamente à aplicação dos adesivos autocondicionantes.<sup>27, 28</sup> Entretanto, este procedimento deve ser evitado pois um condicionamento acidental da dentina pode ocorrer durante o condicionamento do esmalte, especialmente quando condicionadores ácidos de baixa viscosidade são utilizados.<sup>29, 30</sup> Para alguns adesivos autocondicionantes, o condicionamento ácido prévio da dentina pode reduzir os valores de resistência adesiva quando comparados com o mesmo adesivo aplicado no modo autocondicionante.<sup>29-32</sup>

Apesar da literatura disponível mostrar desempenho clínico e laboratorial comprometido quando comparados à adesivos com múltiplos passos, sistemas adesivos ultra-simplificados continuam sendo desenvolvidos e comercializados, com o intuito de simplificar e encurtar o tempo de trabalho, tornando o procedimento clínico facilmente executado. Recentemente, sistemas adesivos que podem ser utilizados com ou sem as etapas de condicionamento ácido e enxágue adicionais, foram desenvolvidos e lançados no mercado odontológico. Dessa maneira, um adesivo que pode ser aplicado com diferentes abordagens adesivas e propicia ao profissional decidir um protocolo adesivo específico para determinada situação clínica, tornou a procura por estes materiais de extremo interesse. Estes novos materiais são de chamados de Adesivos Universais, Adesivo Multiuso ou ainda Adesivo com múltiplo modo de aplicação.<sup>33-35</sup> Estes materiais são relativamente novos e somente algumas investigações clínicas<sup>36, 37</sup> e laboratoriais<sup>33-35</sup> foram executadas.

Apesar do constante avanço na tecnologia adesiva desde a introdução do condicionamento ácido do esmalte proposto por Buonocore<sup>2</sup>, a interface adesiva entre o material restaurador e a estrutura dental continua sendo o "Calcanhar de Aquiles" das restaurações adesivas. Sistemas adesivos recentemente introduzidos, frequentemente carecem de evidência clínica que suporte o seu desempenho antes de serem introduzidos no mercado. Para avaliar o desempenho de novos materiais, ensaios clínicos a longo prazo são considerados o método ideal para validar a qualidade e desempenho de novos sistemas adesivos. No entanto, uma vez clinicamente comprovada sua eficácia, o material sob investigação pode não estar mais disponível no mercado. Portanto, estudos pré-clínicos são desejáveis para avaliar o desempenho de novos materiais restauradores.

Neste contexto, é necessário simular as condições da cavidade oral. A simulação das condições orais em estudos laboratoriais é geralmente utilizada para prever o comportamento clínico de um determinado material. Os efeitos de variações na temperatura e os fenômenos de fadiga mecânica são observados em diversos estudos *in vitro*<sup>38-42</sup> e indicam que as interfaces adesivas podem falhar e, conseqüentemente, reduzir o desempenho adesivo após termociclagem ou após aplicação de cargas mecânicas cíclicas. Esta última, reflete a capacidade de simular as forças aplicadas sobre as restaurações durante a mastigação.<sup>38-42</sup>

Clinicamente, a interface adesiva não somente está sujeita aos estresses imediatos, o que podem levar ao rompimento da união adesiva, mas também é influenciada por cargas cíclicas durante a mastigação, que irão induzir ao surgimento de falhas adesivas e subsequente propagação, o que põe em risco a manutenção a longo prazo da união ao substrato dental.<sup>43</sup> Tem sido demonstrado que as alterações na interface adesiva podem ocorrer sob tensões oclusais, resultando na degradação mecânica da união entre a restauração e a dentina.<sup>44</sup>

Tradicionalmente, a adesão ao substrato dental é mensurada estaticamente por meio de testes de resistência adesiva à microtração ou resistência ao cisalhamento. Clinicamente, no entanto, raramente a interface adesiva é submetida à tais estresses de tração/cisalhamento, mas estão sujeitas à cargas oclusais cíclicas durante a função. Testes de resistência adesiva estáticos podem não demonstrar adequadamente os potenciais efeitos prejudiciais que as porosidades ou outros defeitos internos da camada adesiva podem ter sobre a durabilidade da adesão. Após aplicação de cargas cíclicas, o efeito destes defeitos interfaciais sobre a adesão a longo prazo podem ser facilmente identificados.<sup>7</sup> Vale ressaltar que a associação entre aplicação de cargas cíclicas previamente ao uso do teste de resistência adesiva à microtração ( $\mu$ TBS) permite a avaliação *in vitro* da durabilidade de união entre sistemas adesivos e dentina sob condições clinicamente mais relevantes.

**Considerando que vários sistemas adesivos são lançados constantemente no mercado odontológico, muitas das vezes sem nenhuma evidencia clinica que suporte seu desempenho, a execução de avaliações *in vitro* são extremamente necessárias e seus resultados serão informativos e esclarecedores para ambos pesquisadores e clínicos. Portanto, este estudo *in vitro* tem como primeiro objetivo avaliar o efeito do condicionamento ácido prévio e da aplicação de cargas mecânicas cíclicas sobre a resistência de união à microtração de sistemas adesivos universais à dentina**

**humana. Em comparação, Optibond FL (OFL, Kerr); Adper Single Bond Plus (SBP, 3M ESPE); Clearfil SE Bond (CSE, Kerr); Adper Prompt L-Pop (PLP, 3M ESPE) foram também avaliados como grupos controles.**

Com o intuito de compreender e definir os fatores que contribuem para a formação e que podem afetar a união entre agentes adesivos e a dentina, diversos estudos tem correlacionado os resultados de resistência adesiva com as observações obtidas em avaliações micro-morfológicas.<sup>12, 45-51</sup> Estas avaliações morfológicas são conduzidas por meio da utilização da microscopia eletrônica de varredura (SEM) e da microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para mensurar a espessura da camada híbrida, a aparência, o tamanho e a continuidade dos prolongamentos resinosos, a qualidade da hibridização na zona de interdifusão e o grau de penetração dos agentes adesivos. Apesar de oferecerem uma visão da camada híbrida com resolução aproximada de 1 micrometro ( $\mu\text{m}$ ), as limitações destas técnicas devem ser mencionadas, pois podem afetar significativamente os resultados.<sup>51</sup> Previamente à execução da SEM, as amostras são tratadas com ácido clorídrico, hipoclorito de sódio ou hidróxido de sódio para exposição da camada híbrida e dos prolongamentos resinosos. No entanto, estes tratamentos químicos bem como a secagem em alto vácuo podem introduzir “artefatos” em alguma região da camada híbrida que só é parcialmente infiltrada por adesivo. Já durante a execução da TEM, o preparo de secções ultrafinas podem resultar em amostras distorcidas, rasgadas ou rompidas resultando em micrografias que não espelham as características reais da zona de interdifusão.<sup>50</sup>

Embora os métodos de avaliação morfológica permitam comparações entre diferentes materiais resinosos, somente uma avaliação indireta da qualidade da camada híbrida pode ser acessada e pouca informação sobre a composição química desta camada é obtida. Dessa forma, parece nítida a falta de informações referentes à capacidade de molhamento das fibras colágenas por monômeros resinosos e quão profundo estes monômeros podem penetrar na zona de dentina desmineralizada. Para esta finalidade, pesquisadores tem utilizado com sucesso a espectroscopia micro-Raman. Por meio da espectroscopia micro-Raman, a profundidade de desmineralização da dentina, o grau de polimerização e a extensão de penetração de sistemas adesivos na interface adesivo/dentina podem ser mensuradas.<sup>52-59</sup> Para compreender o mecanismo de adesão à dentina via formação da camada híbrida, é imprescindível verificar a relação entre a profundidade de desmineralização e a extensão de penetração dos monômeros adesivos.

A micro-espectroscopia Raman é um método analítico empregado para avaliar a composição química e estrutural de sistemas adesivos bem como sua interação com o substrato dentinário. Uma vez que o espectro adquirido é atribuído às moléculas em vez de elementos individuais, e o feixe de laser pode ser focalizado em um local diminuto (0.5-0.8  $\mu\text{m}$ ), uma resolução espacial elevada sobre a superfície da amostra pode ser alcançada. Nesta técnica, a resolução espacial é definida pelo perfil de laser usado para excitar uma parte específica da amostra. A partir de então, os grupos funcionais são identificados por suas posições específicas (números de onda) no espectro Raman, e os números relativos destes grupos são determinados pela magnitude da intensidade em cada número de onda. As amostras podem ser analisadas diretamente, no ar ou na água, à temperatura ambiente ou sob pressão (húmido ou seco), sem destruir a amostra.

**A penetração de monômeros resinosos na dentina desmineralizada tem sido avaliada com sucesso por meio da espectroscopia micro-Raman<sup>52-56</sup>, todavia a capacidade de penetração por parte de diferentes sistemas adesivos ainda não foi totalmente caracterizada. Portanto, o segundo objetivo do presente estudo *in vitro* foi comparar o potencial de desmineralização da dentina, bem como o potencial de infiltração de sistemas adesivos universais, utilizando a espectroscopia micro-Raman, com sistemas adesivos convencionais (três ou dois passos) e autocondicionantes (dois ou um passo) como controle.**



## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar os efeitos do condicionamento ácido adicional e da aplicação de cargas mecânicas cíclicas sobre os valores de resistência adesiva à microtração de sistemas adesivos universais à dentina. Além disso, a extensão de penetração na dentina destes sistemas adesivos universais foram avaliadas por meio da espectroscopia micro-Raman. As hipóteses testadas neste estudo foram:

- 1) O condicionamento ácido prévio não influencia os valores de resistência adesiva à dentina quando o mesmo sistema adesivo universal é aplicado com abordagens adesivas diferentes;
- 2) O condicionamento ácido prévio não promove maior grau de infiltração de sistemas adesivos universais na dentina;
- 3) Não existem diferenças entre os valores de resistência adesiva à dentina quando sistemas adesivos universais são comparados com os respectivos sistemas adesivos controles;
- 4) A aplicação de cargas mecânicas cíclicas não exercem alguma influência sobre a efetividade de diferentes sistemas adesivos à dentina.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta investigação *in vitro* foi desenvolvida na *University of Pennsylvania, School of Dental Medicine, Department of Preventive and Restorative Sciences, USA*, após aprovação do projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da CAPES com o intuito de reforçar as relações entre pesquisadores dos Estados Unidos da América e do Brasil.

#### 3.1 OBTENÇÃO, SELEÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS DENTES

Para a presente pesquisa, foram selecionados oitenta e oito terceiros molares humanos hígidos, livres de trincas e com dimensões coronais semelhantes. Os dentes foram limpos, armazenados em solução aquosa com 0.5% de cloramina T a 4 °C até o início dos procedimentos laboratoriais (Fig. 1).



Figura 1 Molares humanos extraídos envolvidos na pesquisa.

#### 3.2 INCLUSÃO DOS DENTES

Primeiramente, todos os dentes foram individualmente fixados em um dispositivo contendo 15 perfurações cilíndricas com 25.4 mm de diâmetro interno e 25.4 mm de altura (Fig. 2). Após fixação dos dentes de forma centralizada e perpendicular ao dispositivo de inclusão com auxílio de bastões de cera utilidade, cada cilindro foi preenchido com resina epóxi (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) até a distância de 3 mm aquém do limite amelo-cementário (Fig. 3). A inclusão de cada dente facilitou a apreensão e manipulação durante todas as etapas experimentais realizadas nesta avaliação laboratorial. Todos os corpos de prova foram então imersos em água destilada e mantidos em uma

estufa a 37 °C afim de simular o ambiente úmido e a temperatura da cavidade oral.



Figura 2 Dispositivo utilizado para inclusão dos dentes em resina epóxi.

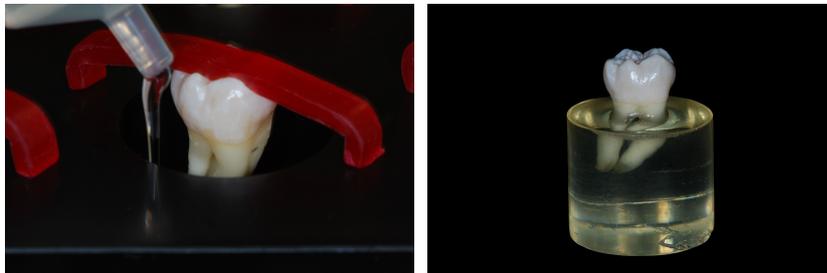


Figura 3 (A) Preenchimento dos cilindros com resina epóxi. (B) Dente incluído.

### 3.3 PREPARO DENTAL INICIAL

Após a etapa de inclusão, o preparo dos espécimes iniciou-se pela remoção do esmalte oclusal de forma padronizada. Primeiramente, uma demarcação foi realizada sobre a superfície vestibular dos dentes para identificar o ponto exato de corte. O ponto de corte foi localizado a 2 mm da superfície oclusal (a partir do fundo de sulco principal) no sentido cervical. Realizadas as demarcações, os corpos de prova foram precisamente fixados ao braço da máquina de corte (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) por meio de um dispositivo metálico.

Isso permitia posicionar a superfície oclusal paralela à lamina de corte (disco diamantado com dimensões de 102 mm de diâmetro x 3 mm de espessura, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) (Fig. 4). O corte foi então realizado sobre a demarcação realizada, perpendicularmente ao longo eixo do dente, sob refrigeração com água a uma velocidade de 250 rpm e com pressão de 50g. Ao fim do processo de corte, as superfícies de dentina média foram expostas e posteriormente polidas com lixas de Carbetto de Silício (SiC, granulação #600) por 60 segundos para assegurar uma superfície livre de esmalte e garantir a formação de uma camada de *smear layer* padronizada (Fig. 5).

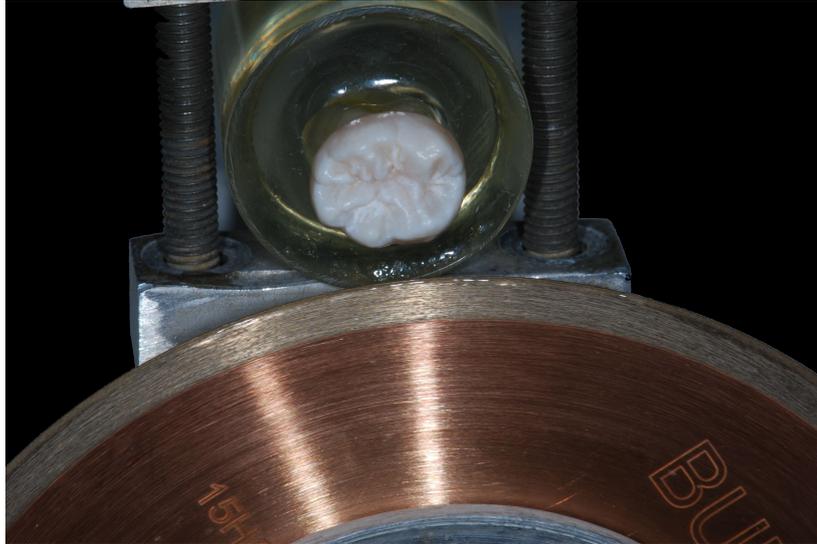


Figura 4 Corpo de prova fixado à máquina de corte. Note que a superfície oclusal encontra-se paralela ao disco de corte.

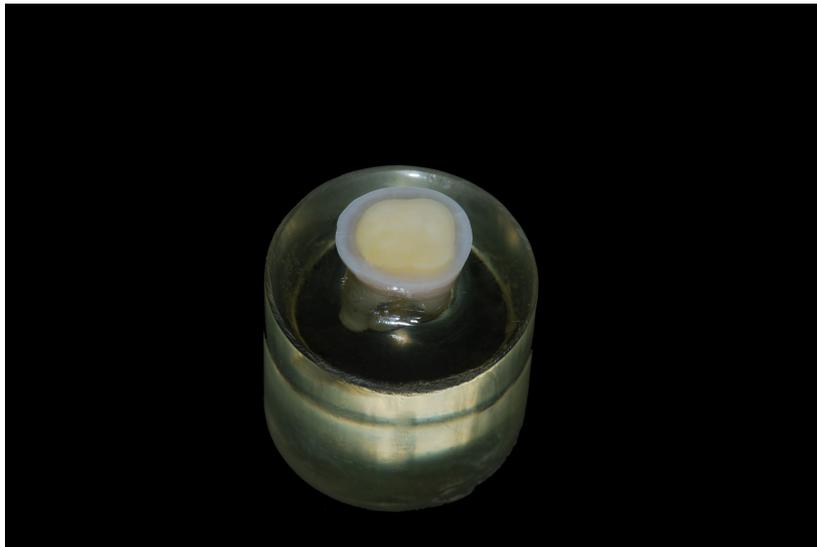


Figura 5 Superfície plana, expondo dentina média e circundada por esmalte.

### 3.4 DIVISÃO DOS GRUPOS

Inicialmente, os dentes foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos (n=10) de acordo com a forma de aplicação dos diferentes sistemas adesivos selecionados. Dessa forma, 4 grupos controles e 4 grupos experimentais foram gerados. Nos grupos controles, os seguintes sistemas adesivos foram utilizados: um adesivo convencional de três passos, Optibond FL (OFL, Kerr Corporation, Orange, CA, EUA); um adesivo convencional de dois passos, Adper Single Bond Plus (SBP, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA); um adesivo autocondicionante de dois passos, Clearfil SE Bond (CSE, Kuraray, Okayama, Japão); e um adesivo autocondicionante de um passo, Adper Prompt L-Pop (PLP, 3M ESPE St. Paul, MN, EUA). Já nos grupos experimentais, os seguintes sistemas adesivos universais foram utilizados: Scotchbond Universal Adhesive (SU, 3M ESPE St. Paul, MN, EUA), aplicado após condicionamento ácido da dentina (SU-Er) ou aplicado no seu modo autocondicionante (SU-Se); e All Bond Universal Adhesive (AB, Bisco Inc., Schaumburg, IL, EUA), aplicado após condicionamento ácido da dentina (AB-Er, Bisco) ou aplicado no seu modo autocondicionante.

### 3.5 PROCEDIMENTOS RESTAURADORES E PREPARO DOS CORPOS DE PROVA

Previamente à confecção das restaurações, os sistemas adesivos anteriormente mencionados, foram aplicados seguindo estritamente as recomendações do fabricante.



1 Grupo OEL (controle)- Condicionamento ácido da dentina por 15s; Enxágue abundante por 15s; Secagem da superfície com papel absorvente; Aplicação do *primer* por 15s com leve agitação; Jato de ar por 5s; Aplicação do agente adesivo com leve agitação por 15s; Jato de ar por 3s; Fotopolimerização por 20s.



2 Grupo SBP (controle)- Condicionamento ácido da dentina por 15s; Enxágue abundante por 10s; Secagem da superfície com papel absorvente; Aplicação de 2-3 camadas consecutivas do agente adesivo com leve agitação por 15s; Jato de ar por 5s; Fotopolimerização por 10s.



3 Grupo CSE (controle)- Aplicação do *primer* e deixar agir por 20s; Secagem com jato de ar para evaporação dos ingredientes voláteis; Aplicação do agente adesivo sobre a dentina; Aplicação suave do jato de ar para formação de uma fina película de adesivo; Fotopolimerização por 10s.



4 Grupo PLP (controle)- Ativação dos componentes adesivos dentro do *blister* por 5s; Aplicação do agente adesivo sobre a dentina com leve agitação por 15s; Aplicação suave do jato de ar; Fotopolimerização por 10s.



5-6 Grupo SU- Estratégia adesiva convencional (**5 SU-Er**): Condicionamento ácido da dentina por 15s; Enxágue abundante por 10s; Secagem da superfície com papel absorvente; Aplicação do agente adesivo com leve agitação por 20s; Jato de ar por 5s; Fotopolimerização por 10s.

Estratégia adesiva autocondicionante (**6 SU-Se**): Aplicação do sistema adesivo semelhante à estratégia adesiva convencional. Exclusão das etapas de condicionamento ácido e enxágue adicionais.



7-8 Grupo AB- Estratégia adesiva convencional (**7 AB-Er**): Condicionamento ácido da dentina por 15s; Enxágue abundante por 10s; Secagem da superfície com papel absorvente; Aplicação de 2 camadas do agente adesivo com leve agitação de 10-15s por camada; Jato de ar por 10s; Fotopolimerização por 10s.

Estratégia adesiva autocondicionante (**8 AB-Se**): Aplicação do sistema adesivo semelhante à estratégia adesiva convencional. Exclusão das etapas de condicionamento ácido e enxágue adicionais.

Após polimerização dos sistemas adesivos com uma unidade de fotopolimerização (LED, Smartlite IQ2, Dentsply Caulk, Milford, DE, EUA), restaurações foram confeccionadas incrementalmente com uma resina composta híbrida (TPH<sup>3</sup>, cor A2, Dentsply), em três incrementos com 2 mm cada. Cada incremento foi individualmente fotopolimerizado por 10s (Fig. 6A-6F).

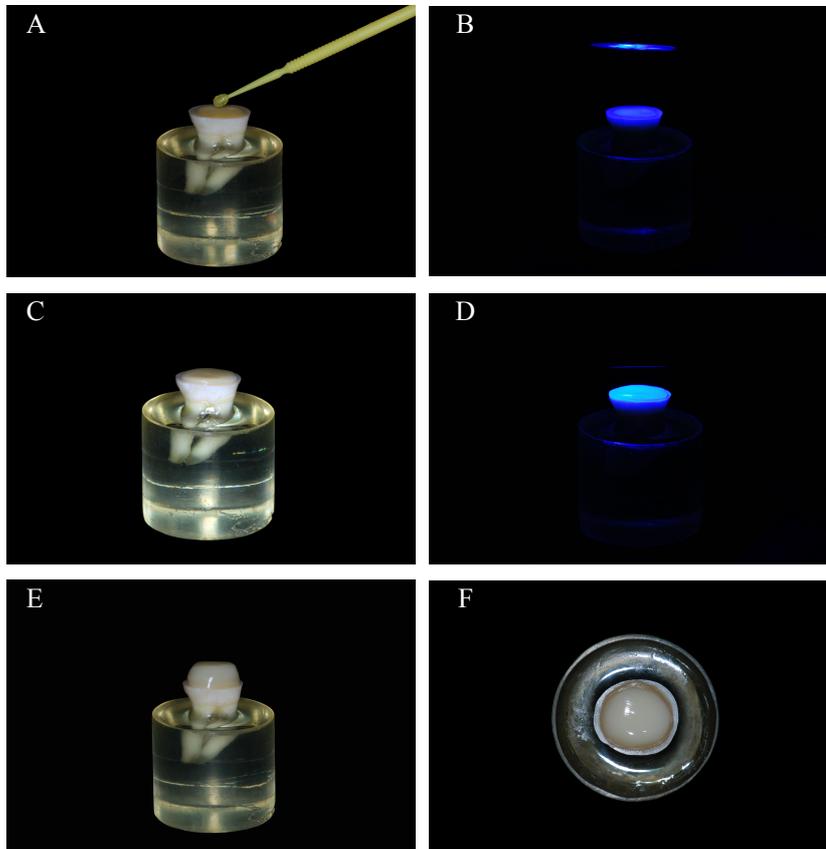


Figura 6 (A) Aplicação do sistema adesivo\*. (B) Fotopolimerização\*. (C) Inserção do primeiro incremento com ~ 2mm de espessura. (D) Fotopolimerização\*. (E) Restauração finalizada. (F) Vista oclusal do corpo de prova. Note que parte do esmalte remanescente não foi envolvido na restauração.

\* Passos executados seguindo as recomendações do fabricante.

Concluída a etapa restauradora, todos os corpos de prova foram armazenados novamente em água destilada a 37 °C por 24 horas. Na sequência, cinco corpos de prova de cada grupo foram aleatoriamente selecionados e submetidos à aplicação de cargas mecânicas cíclicas. Um equipamento de mastigação artificial (SD Mechatronik GmbH, Feldkirchen Westerham, Alemanha) foi utilizado para simular as cargas compressivas que ocorrem durante a mastigação. O equipamento consistia em 2 pistões de aço inoxidável, e na extremidade de cada pistão, uma ponteira esférica em aço inoxidável (5mm de diâmetro) foi fixada, servindo então como antagonista (Fig. 7).

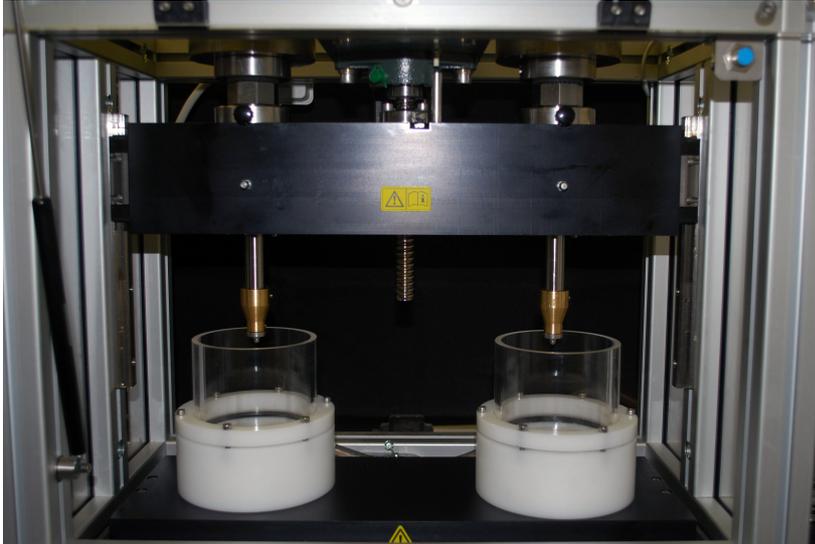


Figura 7 Equipamento utilizado para simular as forças mastigatórias sobre os corpos de prova aleatoriamente selecionados.

Para que o equipamento em questão exercesse a sua função, os corpos de prova necessitavam ser fixados ao mesmo. Dessa forma, cada corpo de prova foi montado individualmente em um suporte, colocado no interior da câmara de carga e fixado ao eixo inferior do equipamento (Fig. 8). Para simular o ligamento periodontal, o suporte foi previamente preenchido por um material de moldagem à base de polivinilsiloxano com alta viscosidade (Virtual, Ivoclar Vivadent, Schan, Liechtenstein) o que gerou uma película de aproximadamente 1 mm de espessura (Fig. 9).



Figura 8 Suporte utilizado para fixar o corpo de prova à máquina de teste.



Figura 9 Corpo de prova mantido no interior do suporte. Note que após presa, o material de moldagem foi capaz de simular a presença do ligamento periodontal com ~1 mm de espessura.

Após fixação do conjunto corpo de prova/suporte ao simulador, a câmara de carga foi preenchida com água destilada. Cada corpo de prova recebeu uma carga axial intermitente de 50 N, centralizada em um ponto médio de cada restauração, totalizando 50.000 ciclos (2 ciclos/segundo) (Fig. 10).

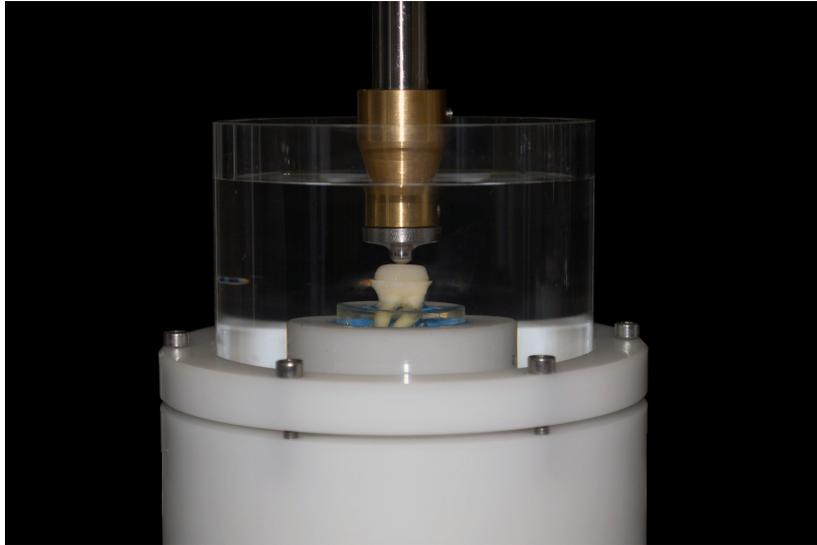


Figura 10 Durante a aplicação das cargas mecânicas cíclicas, todos os corpos de prova foram imersos em água destilada à temperatura ambiente.

### 3.6 TESTE DE RESISTÊNCIA ADESIVA À MICROTRAÇÃO

De acordo a metodologia empregada, o primeiro objetivo avaliado neste estudo *in vitro* foi comparar os valores de resistência adesiva imediatos com os valores de resistência adesiva após aplicação de cargas mecânicas cíclicas, por meio do teste de resistência adesiva à microtração. Dessa maneira, os corpos de prova não submetidos à aplicação de cargas mecânicas foram seccionados em filetes 24 horas após a realização dos procedimentos adesivos e imediatamente submetidos ao teste de microtração. Já os corpos de prova submetidos à aplicação de cargas mecânicas, foram seccionados em filetes imediatamente após à ciclagem mecânica e submetidos ao teste de microtração.

Para propiciar a obtenção das amostras para o teste de microtração, cada corpo de prova foi fixado novamente ao braço da

máquina de cortes e então seccionados perpendicularmente à interface adesiva utilizando um disco diamantado (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), sob refrigeração com água constante a uma velocidade de 250 rpm e com pressão de 50g para obtenção de filetes com uma área de secção transversal de  $0,9 \text{ mm}^2$ , seguindo o método descrito por Shono e colaboradores (1999).<sup>60</sup> Isto resultou na obtenção de 12-15 filetes para cada grupo experimental. Entretanto, somente 9 filetes por grupo (antes e após ciclagem mecânica) foram selecionados, de modo a reduzir a variabilidade regional do substrato.<sup>61</sup> Cada filete foi individualmente mensurado com um paquímetro eletrônico digital (Mitutoyo, Tokyo, Japão) para obtenção da largura e espessura.

Após obtenção, os filetes foram então fixados pelas suas extremidades com um adesivo em gel à base de cianocrilato a um dispositivo especial de microtração (*Ciucchi jig*) adaptado a uma máquina de ensaios universal (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão). Os filetes foram testados em tração até obtenção da fratura a uma velocidade de cruzeta de 1mm/min (Figs. 11-16). Os valores de resistência adesiva à microtração ( $\mu\text{TBS}$ ) foram determinados pelo cálculo do quociente entre o pico da força (N) aplicada até a falha pela área de seção transversal da interface adesiva previamente mensurada para cada filete, e foram expressos em Mpa (Megapascal).



Figura 11 Corpo de prova fixado à máquina de cortes Isomet.



Figura 12 As coroas foram seccionadas automaticamente com um disco diamantado de corte, sob irrigação com água constante nas direções X e Y, para obtenção de filetes com secção transversal de  $0.8 \pm 0.2 \text{ mm}^2$ . Cortes iniciais (eixo X) para eliminar as superfícies vestibular e lingual/palatal.

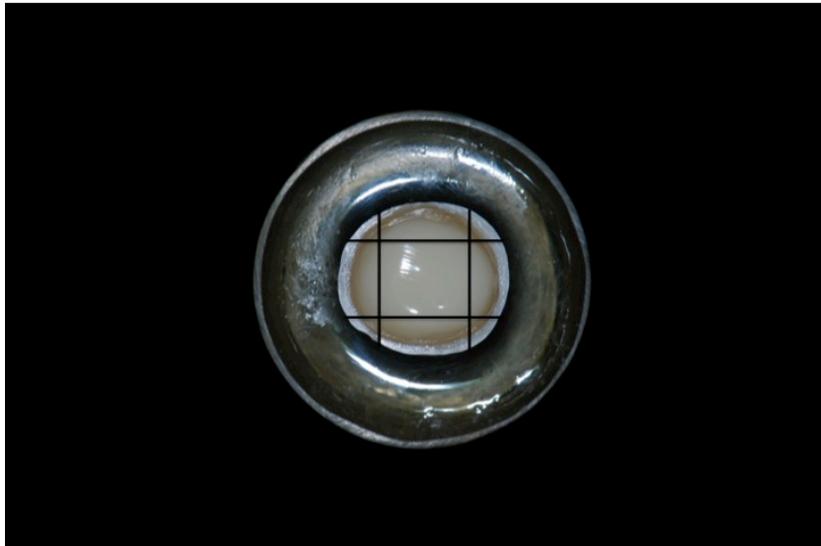


Figura 13 Cortes adicionais (eixo Y) para eliminar as superfícies mesial e distal.



Figura 14 Cortes sequenciais nos eixos X e Y, distantes 1.2 mm entre si, para obtenção de filetes com dimensão  $\sim 0.9 \text{ mm}^2$ .

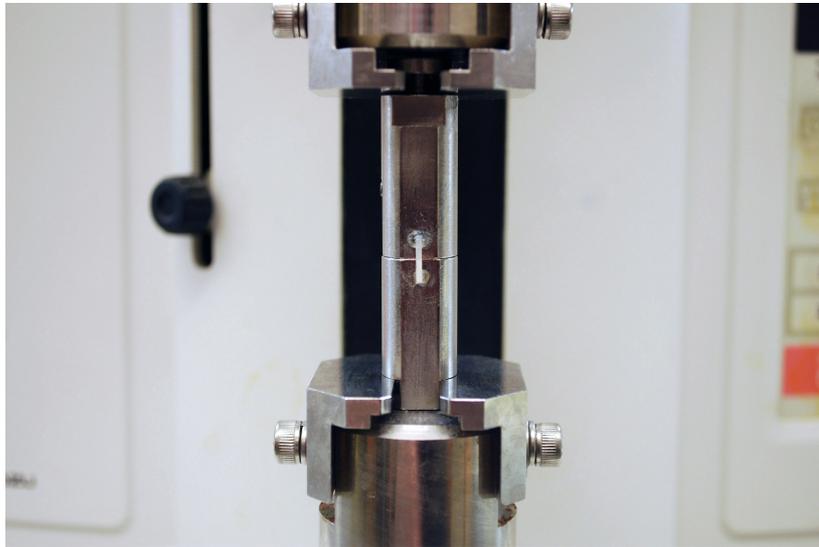


Figura 15 Fixação do filete ao dispositivo de microtração *Ciucchi* adaptado à máquina universal de ensaios.

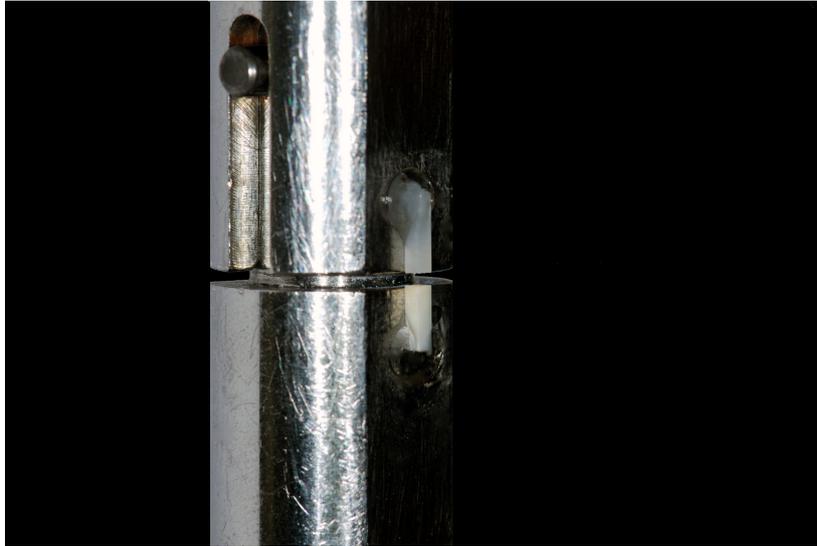


Figura 16 Filete submetido à carga de tração até o momento da fratura.

### 3.7 ANÁLISE DO PADRÃO DE FRATURA

As fraturas foram analisadas por dois observadores com o auxílio de um estereomicroscópio (Leica EZ4 HD, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) com ampliação de 40X. O tipo de fratura foi classificado como adesiva, mista ou coesiva. Considerou-se fratura adesiva (AD) quando a falha ocorreu na interface adesivo/dentina; fratura coesiva quando a falha ocorreu na dentina (CD) ou no compósito (CC); e mista (M) quando havia remanescentes de compósito e dentina na interface.

Espécimes fraturados (partes homólogas de compósito e dentina), apresentando valores de resistência adesiva ( $\mu$ TBS) mais próximos das médias obtidas em cada grupo, foram considerados representativos e processados para análise sob microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM). Três espécimes por grupo foram avaliados e fotomicrografias FESEM foram coletadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss Supra 25 FE-SEM), operando a 5 kV, com 10 mm abertura, e à uma distância de trabalho de 10 mm (Carl Zeiss SMT, Inc., Peabody, MA, USA). As fotomicrografias FESEM obtidas foram analisadas qualitativamente.

### 3.8 ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN

#### 3.8.1 Preparo das amostras

Foram confeccionadas amostras para a avaliação da interface adesiva quanto a extensão de penetração dos sistemas adesivos na dentina. Oito molares humanos hígidos foram selecionados, incluídos em resina epóxi e preparados de modo semelhante ao executado anteriormente para o teste de resistência adesiva à microtração, entretanto, com dimensões diferentes. Um dente por grupo (controle/experimental) foi utilizado para cada sistema adesivo; e após confecção das restaurações, foram armazenados em água destilada a 37 °C por no mínimo 24 horas.

Amostras transversais da interface adesivo/dentina, com aproximadamente 10 mm de comprimento x 2 mm de espessura x 2 mm de largura, foram obtidas após cortes sequenciais (nos eixos X e Y) do conjunto dente/restauração. Uma secção foi obtida a partir de cada dente; assim 1 amostra foi analisada para cada sistema adesivo (Fig. 17).

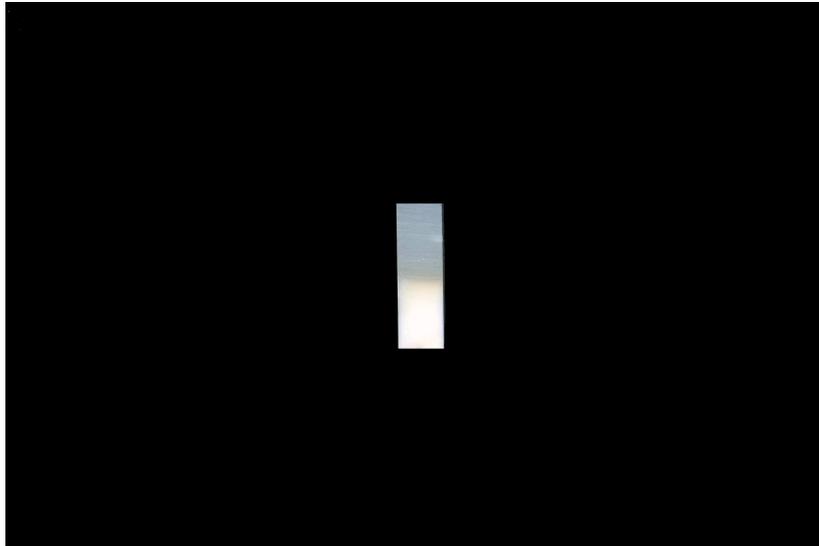


Figura 17 Amostra retangular obtida para avaliação sob espectroscopia micro-Raman com 10 mm de comprimento / 2 mm de altura / 2 mm de comprimento.

Após as etapas anteriormente citadas, passou-se à execução do procedimento de inclusão das amostras. Empregando-se uma matriz adaptada para esta finalidade (Fig. 18), todas as amostras foram incluídas em resina epóxi (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA).

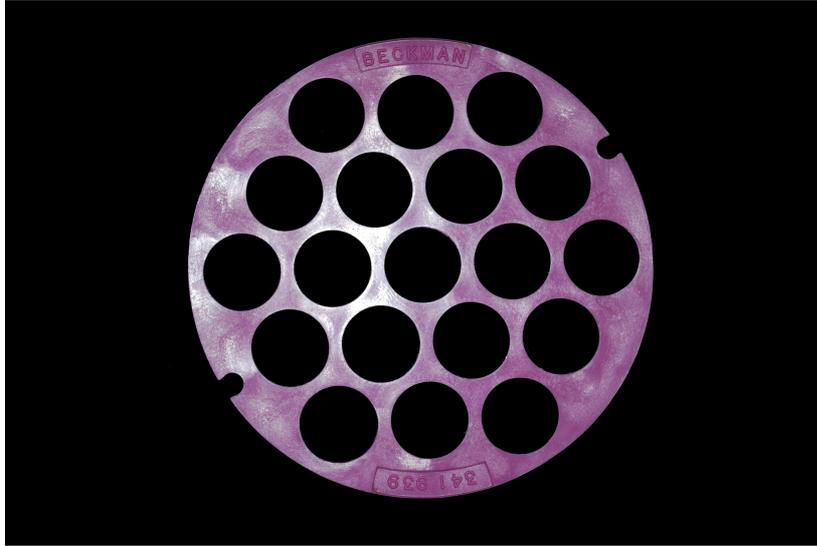


Figura 18 Matriz utilizada para inclusão das amostras.

Na sequência, a superfície das amostras foi polida com a finalidade de remover as marcas residuais deixadas pelo disco diamantado de corte. O polimento foi realizado de acordo com Spencer e colaboradores<sup>56</sup> da seguinte maneira:

- 1º Uso de lixas de Carbetto de Silício (SiC) com granulações de #600, #800, #1200 fina e #1200 extrafina (30s cada, com leve pressão);
- 2º Uso de discos de feltro (Lecloth, LECO) impregnados com partículas de diamante com granulações de 6  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  e 0.25  $\mu\text{m}$  (Premium Grade Spray, Heavy Concentration, LECO).

Realizado o polimento, todas as amostras foram limpas por ultrasons em água destilada por 15 minutos (Fig.19), esfregadas com cotonete saturado com 5% de hipoclorito de sódio para remover eventuais manchas derivadas do polimento e em seguida, armazenadas em ambiente seco e livre de luz durante 24 horas (Fig. 20).



Figura 19 Todas as amostras foram depositadas em uma cuba de ultra-som e deixadas durante um período de 15 minutos para a limpeza da superfície.

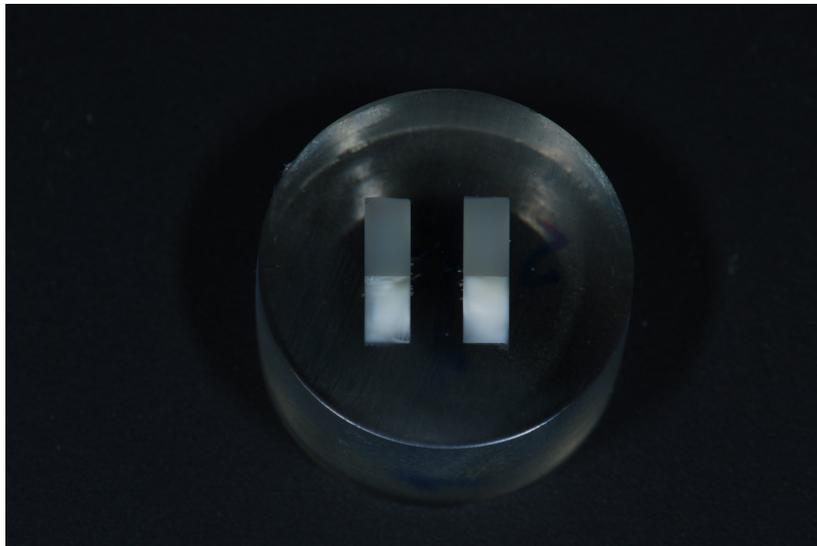


Figura 20 Após realização dos procedimentos de polimento e limpeza, as amostras foram armazenadas em um recipiente com sílica gel afim de garantir um ambiente livre de umidade.

### 3.8.2 Análise da interface adesiva

Espectros micro-Raman das amostras da interface adesivo/dentina obtidas a partir de cada sistema adesivo, foram registradas por um espectrômetro Raman Horiba (LabRam HR Raman microprobe, HORIBA Jobin Yvon). O equipamento utilizado é equipado com uma objetiva Olympus e um CCD detector. Um feixe monocromático de laser de argônio ajustado à um comprimento de onda de 663 nm com nível de saída de 20 mW foi utilizado como fonte de excitação. O laser proveniente do espectrômetro Raman foi focalizado sobre as amostras através de uma objetiva com magnificação de 100X para permitir a análise de áreas com até 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Para quantificar a extensão de penetração dos sistemas adesivos na dentina, os dados espectrais da interface adesiva (adesivo/dentina) foram comparados com espectros obtidos nas áreas de referência, dentina mineralizada e adesivo puro. Inicialmente, foram identificadas as intensidades relativas às bandas associadas aos componentes minerais da dentina. O pico principal a  $959\text{ cm}^{-1}$  está associado com o componente mineral ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), enquanto que os picos a  $1248$  (amida III),  $1451$  ( $\text{CH}_2$ ), e  $1670\text{ cm}^{-1}$  (amida I) estão associadas com os componentes orgânicos da dentina. De forma semelhante, espectros Raman sobre a região de adesivo puro também foram coletados para identificar os picos de referência necessários para calcular o grau de penetração de cada tipo de sistema adesivo na dentina (Fig. 21). A semelhança entre os espectros de referência para todos os adesivos reflete sua idêntica formulação à base de componentes hidrofílicos (bisfenol glicidil metacrilato, Bis-GMA) e hidrofóbicos (hidroxietil metacrilato, HEMA). Os picos intensos associados com os monômeros de metacrilato ocorrem a  $1113\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C),  $1453\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ),  $1608\text{ cm}^{-1}$  (fenil C=C) e  $1719\text{ cm}^{-1}$  (carbonilo). Particularmente, as bandas a  $1113$  e  $1608\text{ cm}^{-1}$  estão associadas ao Bis-GMA, enquanto que a banda a  $1453\text{ cm}^{-1}$  é associada ao HEMA.

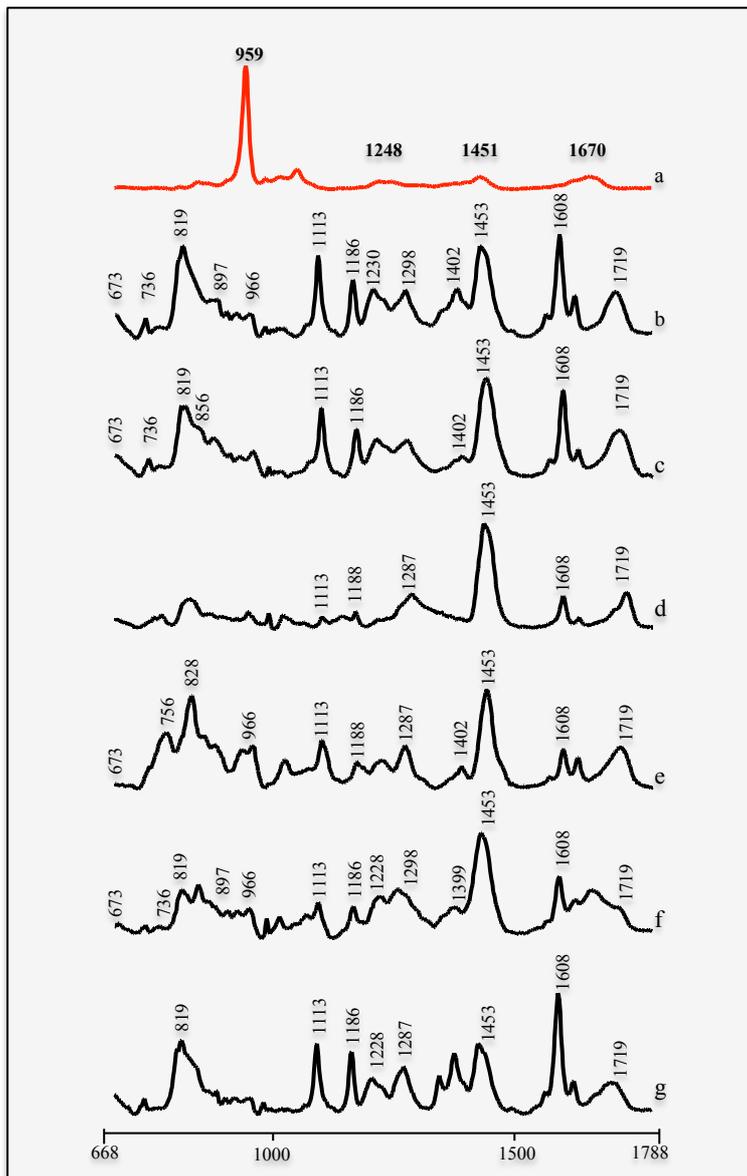


Figura 21 Espectros Raman utilizados como referência para a dentina (a), Optibond FL (b), Adper Single Bond Plus (c), Clearfil SE Bond (d), Adper Prompt L-Pop (e), Scotchbond Universal (f) e All Bond Universal (g).

Após obtenção dos espectros Raman a partir das áreas de dentina e adesivo puro, espectros Raman foram registrados sucessivamente sobre as amostras contendo as interfaces adesivas (dentina/adesivo). Para analisar a interface adesiva, espectros lineares foram tomados em intervalos de 0.5  $\mu\text{m}$  ao longo de uma área de 20  $\mu\text{m}$  perpendicular à interface dentina/adesivo. Primeiramente, o feixe de laser foi focalizado sobre a amostra através de uma objetiva com aumento de 100X o que determinou um ponto focal com cerca de  $\sim 1 \mu\text{m}$  de diâmetro. Cada amostra foi deslocada em relação à posição do ponto de laser por passos de 0.5  $\mu\text{m}$  sobre uma mesa controlada por computador com movimentos precisos em ambos eixos X-Y-Z. A superfície a ser analisada foi cuidadosamente demarcada por meio do microscópio óptico adaptado ao espectrômetro Raman (Fig. 22). Durante a análise, especial atenção foi dada para evitar a leitura sobre os *tags* de resina, que eram visíveis na superfície e poderiam interferir nas mensurações. Dessa maneira, somente áreas intertubulares foram incluídas durante a leitura das interfaces adesivas.

Os dados espectrais da interface adesiva foram analisados por meio da aquisição de espectros por múltiplos escaneamentos lineares em diferentes regiões de cada amostra, começando sobre a camada adesiva seguindo em direção à dentina mineralizada (Fig. 23). Um espectro Raman foi coletado a cada intervalo de 0.5  $\mu\text{m}$  através da interface dentina-adesivo, na região intertubular, com um tempo de exposição de 0.5 segundos por pixel e uma fonte de laser sobre a amostra com potência de  $\sim 4 \text{ mW}$  sobre a região espectral de 668-1788  $\text{cm}^{-1}$ .

Os espectros obtidos em cada região de interesse foram analisados utilizando o *software* LABSPEC 5.78 (HORIBA Jobin Yvon, Stanmore, Middlesex, UK). LABSPEC 5.78 é um *software* utilizado para aquisição e análise de dados e foi especificamente desenvolvido pelo fabricante do equipamento utilizado. Por meio do uso de uma ferramenta de ajuste de curva, é possível determinar a posição exata e a intensidade de cada pico. A partir do espectro Raman adquirido sobre as áreas de referência e sobre as amostras da interface adesiva obtida por cada sistema adesivo, as quantidades relativas de hidroxiapatita, adesivo e componentes orgânicos da interface adesiva foram calculadas. Os picos Raman em 959, 1113, 1453 e 1670  $\text{cm}^{-1}$ , foram utilizados para revelar as distribuições do conteúdo mineral, do adesivo (ambos Bis-GMA e HEMA) e do colágeno na interface adesivo/dentina, respectivamente. Portanto, variações nas intensidades de cada pico serviram como parâmetros durante o cálculo do grau de desmineralização da dentina bem como a extensão de penetração do

adesivo na zona de dentina desmineralizada. Além disso, uma representação quantitativa da percentagem de adesivo em função de determinada posição ao longo da interface adesivo/dentina pôde ser obtida.

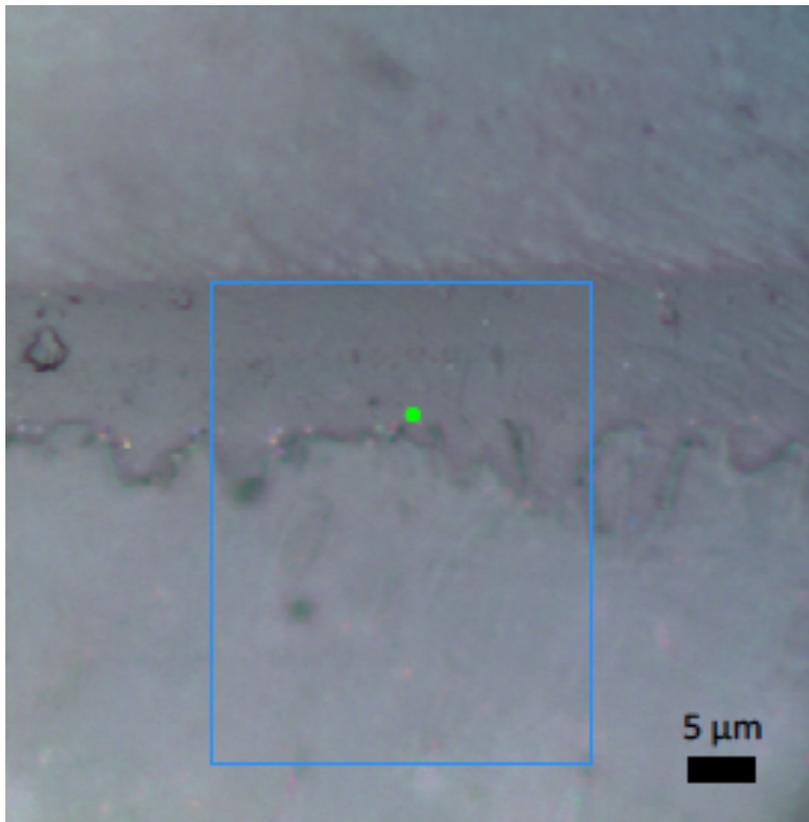


Figura 22 Imagem da interface adesiva obtida por microscópio óptico. Há suficiente contraste para distinguir o adesivo, a camada híbrida, os *tags* de resina e a dentina, permitindo a identificação da região onde cada espectro Raman será obtido. Notar a demarcação da área a ser analisada sob micro-espectroscopia Raman.

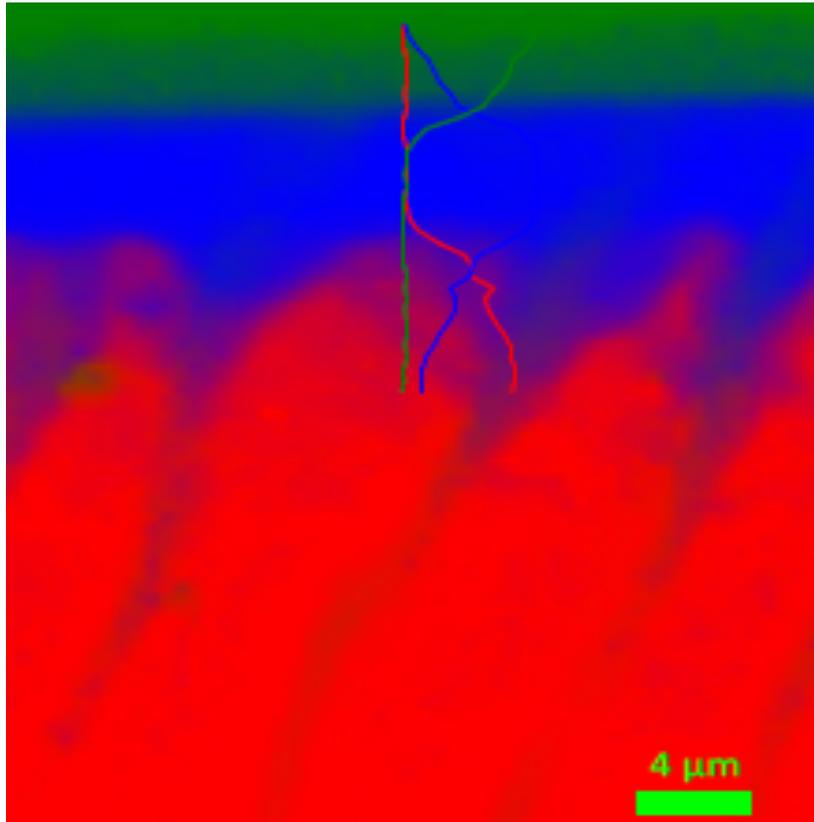


Figura 23 Representação em cores da distribuição dos componentes da interface adesiva: resina composta, adesivo e dentina. Notar que o escaneamento em linha da interface adesiva foi realizado exclusivamente na região intertubular.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a variável dependente quantitativa “resistência adesiva”, foi levado em consideração dois fatores: tipo de sistema adesivo e o tempo. A resistência adesiva à dentina por meio do teste de microtração foi avaliado imediatamente (24 horas) e após aplicação de cargas mecânicas cíclicas (50.000 ciclos). Os valores obtidos após o teste de resistência adesiva em Mpa foram submetidos à avaliação estatística por meio dos testes de análise de variância (ANOVA-dois fatores) e Tukey’s post-hoc. Todos os testes estatísticos foram realizados ao nível de confiança de 95%. As imagens obtidas por FESEM foram qualitativamente analisadas. Todos os cálculos estatísticos foram realizados com o programa SPSS versão 14.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).



## BIBLIOGRAFIA

1. Manhart J, Chen H, Hamm G, Hickel R. Buonocore Memorial Lecture. Review of the clinical survival of direct and indirect restorations in posterior teeth of the permanent dentition. *Oper Dent*. 2004;29(5):481-508.
2. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res*. 1955;34(6):849-53.
3. Buonocore MG, Matsui A, Gwinnett AJ. Penetration of resin dental materials into enamel surfaces with reference to bonding. *Arch Oral Biol*. 1968;13(1):61-70.
4. Gwinnett AJ, Matsui A. A study of enamel adhesives. The physical relationship between enamel and adhesive. *Arch Oral Biol*. 1967;12(12):1615-20.
5. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011;27(1):1-16.
6. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent*. 2003;28(3):215-35.
7. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*. 2005;84(2):118-32.
8. Perdigao J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater*. 2010;26(2):e24-37.
9. Pashley DH. Dentin: a dynamic substrate--a review. *Scanning Microsc*. 1989;3(1):161-74; discussion 74-6.
10. Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials. *Dent Mater*. 2005;21(9):864-81.
11. Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion

- zone with different dentin adhesive systems. *J Dent Res.* 1992;71(8):1530-40.
12. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982;16(3):265-73.
  13. Dagostin A, Ferrari M. In vivo bonding mechanism of an experimental dual-cure enamel-dentin bonding system. *Am J Dent.* 2001;14(2):105-8.
  14. Armstrong SR, Vargas MA, Fang Q, Laffoon JE. Microtensile bond strength of a total-etch 3-step, total-etch 2-step, self-etch 2-step, and a self-etch 1-step dentin bonding system through 15-month water storage. *J Adhes Dent.* 2003;5(1):47-56.
  15. Tay FR, Frankenberger R, Krejci I, Bouillaguet S, Pashley DH, Carvalho RM, et al. Single-bottle adhesives behave as permeable membranes after polymerization. I. In vivo evidence. *J Dent.* 2004;32(8):611-21.
  16. Platt JA, Almeida J, Gonzalez-Cabezas C, Rhodes B, Moore BK. The effect of double adhesive application on the shear bond strength to dentin of compomers using three one-bottle adhesive systems. *Oper Dent.* 2001;26(3):313-7.
  17. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, M Jd, K LV. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater.* 2011;27(1):17-28.
  18. Van Landuyt KL, Mine A, De Munck J, Jaecques S, Peumans M, Lambrechts P, et al. Are one-step adhesives easier to use and better performing? Multifactorial assessment of contemporary one-step self-etching adhesives. *J Adhes Dent.* 2009;11(3):175-90.
  19. Reis A, Albuquerque M, Pegoraro M, Mattei G, Bauer JR, Grande RH, et al. Can the durability of one-step self-etch adhesives be improved by double application or by an extra layer of hydrophobic resin? *J Dent.* 2008;36(5):309-15.
  20. Reis A, Leite TM, Matte K, Michels R, Amaral RC, Geraldini S, et al. Improving clinical retention of one-step self-etching adhesive systems with an additional hydrophobic adhesive layer. *J Am Dent Assoc.* 2009;140(7):877-85.

21. Pashley DH, Tay FR. Aggressiveness of contemporary self-etching adhesives. Part II: etching effects on unground enamel. *Dent Mater.* 2001;17(5):430-44.
22. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res.* 2004;83(6):454-8.
23. Tay FR, King NM, Chan KM, Pashley DH. How can nanoleakage occur in self-etching adhesive systems that demineralize and infiltrate simultaneously? *J Adhes Dent.* 2002;4(4):255-69.
24. Tay FR, Pashley DH, Suh B, Carvalho R, Miller M. Single-step, self-etch adhesives behave as permeable membranes after polymerization. Part I. Bond strength and morphologic evidence. *Am J Dent.* 2004;17(4):271-8.
25. Peumans M, De Munck J, Van Landuyt KL, Poitevin A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Eight-year clinical evaluation of a 2-step self-etch adhesive with and without selective enamel etching. *Dent Mater.* 2010;26(12):1176-84.
26. Perdigao J, Carmo AR, Anauate-Netto C, Amore R, Lewgoy HR, Cordeiro HJ, et al. Clinical performance of a self-etching adhesive at 18 months. *Am J Dent.* 2005;18(2):135-40.
27. Frankenberger R, Lohbauer U, Roggendorf MJ, Naumann M, Taschner M. Selective enamel etching reconsidered: better than etch-and-rinse and self-etch? *J Adhes Dent.* 2008;10(5):339-44.
28. Erickson RL, Barkmeier WW, Latta MA. The role of etching in bonding to enamel: a comparison of self-etching and etch-and-rinse adhesive systems. *Dent Mater.* 2009;25(11):1459-67.
29. Van Landuyt KL, Peumans M, De Munck J, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Extension of a one-step self-etch adhesive into a multi-step adhesive. *Dent Mater.* 2006;22(6):533-44.
30. Van Landuyt KL, Kanumilli P, De Munck J, Peumans M, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Bond strength of a mild self-etch adhesive with and without prior acid-etching. *J Dent.* 2006;34(1):77-85.
31. Proenca JP, Polido M, Osorio E, Erhardt MC, Aguilera FS, Garcia-Godoy F, et al. Dentin regional bond strength of self-etch and total-etch adhesive systems. *Dent Mater.* 2007;23(12):1542-8.

32. Torii Y, Itou K, Nishitani Y, Ishikawa K, Suzuki K. Effect of phosphoric acid etching prior to self-etching primer application on adhesion of resin composite to enamel and dentin. *Am J Dent.* 2002;15(5):305-8.
33. Hanabusa M, Mine A, Kuboki T, Momoi Y, Van Ende A, Van Meerbeek B, et al. Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. *J Dent.* 2012;40(6):475-84.
34. Perdigao J, Sezinando A, Monteiro PC. Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. *Am J Dent.* 2012;25(3):153-8.
35. Munoz MA, Luque I, Hass V, Reis A, Loguercio AD, Bombarda NH. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent.* 2013;41(5):404-11.
36. Mena-Serrano A, Kose C, De Paula EA, Tay LY, Reis A, Loguercio AD, et al. A new universal simplified adhesive: 6-month clinical evaluation. *J Esthet Restor Dent.* 2013;25(1):55-69.
37. Perdigao J, Kose C, Mena-Serrano A, De Paula E, Tay L, Reis A, et al. A New Universal Simplified Adhesive: 18-Month Clinical Evaluation. *Oper Dent.* 2013.
38. Nikaido T, Kunzelmann KH, Chen H, Ogata M, Harada N, Yamaguchi S, et al. Evaluation of thermal cycling and mechanical loading on bond strength of a self-etching primer system to dentin. *Dent Mater.* 2002;18(3):269-75.
39. Bedran-de-Castro AK, Cardoso PE, Ambrosano GM, Pimenta LA. Thermal and mechanical load cycling on microleakage and shear bond strength to dentin. *Oper Dent.* 2004;29(1):42-8.
40. Bedran-de-Castro AK, Pereira PN, Pimenta LA, Thompson JY. Effect of thermal and mechanical load cycling on microtensile bond strength of a total-etch adhesive system. *Oper Dent.* 2004;29(2):150-6.
41. Mitsui FH, Peris AR, Cavalcanti AN, Marchi GM, Pimenta LA. Influence of thermal and mechanical load cycling on microtensile bond strengths of total and self-etching adhesive systems. *Oper Dent.* 2006;31(2):240-7.
42. Belli S, Ozcopur B, Yesilyurt C, Bulut G, Ding X, Dorsman G. The effect of loading on microTBS of four all-in-one adhesives on

- bonding to dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;91(2):948-56.
43. Toledano M, Osorio R, Albaladejo A, Aguilera FS, Tay FR, Ferrari M. Effect of cyclic loading on the microtensile bond strengths of total-etch and self-etch adhesives. *Oper Dent.* 2006;31(1):25-32.
  44. Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, et al. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res.* 1999;78(4):906-11.
  45. Perdigao J, Denehy GE, Swift EJ, Jr. Silica contamination of etched dentin and enamel surfaces: a scanning electron microscopic and bond strength study. *Quintessence Int.* 1994;25(5):327-33.
  46. Chappell RP, Eick JD, Mixson JM, Theisen FC. Shear bond strength and scanning electron microscopic observation of four dentinal adhesives. *Quintessence Int.* 1990;21(4):303-10.
  47. Tam LE, Pilliar RM. Fracture surface characterization of dentin-bonded interfacial fracture toughness specimens. *J Dent Res.* 1994;73(3):607-19.
  48. Gwinnett AJ, Tay FR, Pang KM, Wei SH. Quantitative contribution of the collagen network in dentin hybridization. *Am J Dent.* 1996;9(4):140-4.
  49. Gwinnett AJ. Dentin bond strength after air drying and rewetting. *Am J Dent.* 1994;7(3):144-8.
  50. Nakabayashi N, Pashley DH. Hybridization of dental hard tissues. Tokyo: Quintessence; 1998.
  51. Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Perdigao J, Lambrechts P, et al. Microscopy investigations. Techniques, results, limitations. *Am J Dent.* 2000;13(Spec No):3D-18D.
  52. Suzuki M, Kato H, Wakumoto S. Vibrational analysis by Raman spectroscopy of the interface between dental adhesive resin and dentin. *J Dent Res.* 1991;70(7):1092-7.
  53. Ozaki M, Suzuki M, Itoh K, Wakumoto S, Hisamitsu H. Laser-Raman spectroscopic study of the adhesive interface; analysis between 4-META/MMA-TBB resin and bovine or human dentin. *Dent Mater J.* 1992;11(1):70-6.

54. Van Meerbeek B, Mohrbacher H, Celis JP, Roos JR, Braem M, Lambrechts P, et al. Chemical characterization of the resin-dentin interface by micro-Raman spectroscopy. *J Dent Res.* 1993;72(10):1423-8.
55. Lemor RM, Kruger MB, Wieliczka DM, Swafford JR, Spencer P. Spectroscopic and morphologic characterization of the dentin/adhesive interface. *Journal of biomedical optics.* 1999;4(1):22-7.
56. Spencer P, Wang Y, Walker MP, Wieliczka DM, Swafford JR. Interfacial chemistry of the dentin/adhesive bond. *J Dent Res.* 2000;79(7):1458-63.
57. Miyazaki M, Onose H, Moore BK. Analysis of the dentin-resin interface by use of laser Raman spectroscopy. *Dent Mater.* 2002;18(8):576-80.
58. Liu J, Wang Y, Szalay AA, Escher A. Visualizing and quantifying protein secretion using a Renilla luciferase-GFP fusion protein. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence.* 2000;15(1):45-9.
59. Santini A, Miletic V. Quantitative micro-Raman assessment of dentine demineralization, adhesive penetration, and degree of conversion of three dentine bonding systems. *Eur J Oral Sci.* 2008;116(2):177-83.
60. Shono Y, Ogawa T, Terashita M, Carvalho RM, Pashley EL, Pashley DH. Regional measurement of resin-dentin bonding as an array. *J Dent Res.* 1999;78(2):699-705.
61. Phrukkanon S, Burrow MF, Tyas MJ. The effect of dentine location and tubule orientation on the bond strengths between resin and dentine. *J Dent.* 1999;27(4):265-74.
62. Perdigao J, Lopes L, Lambrechts P, Leitao J, Van Meerbeek B, Vanherle G. Effects of a self-etching primer on enamel shear bond strengths and SEM morphology. *Am J Dent.* 1997;10(3):141-6.



ARTIGO

---

Este artigo será submetido para publicação no Journal of Dentistry. O Journal of Dentistry é considerada a principal revista de Odontologia internacional no campo da Odontologia Restauradora e possui um fator de impacto de 3.2. O artigo gerado a partir desta investigação laboratorial está escrito nos idiomas português e inglês. Os requisitos para submissão foram seguidos durante a escrita deste artigo e estão disponíveis para consulta no seguinte website:

<http://www.elsevier.com/journals/journal-of-dentistry/0300-5712/guide-for-authors>

#### 4 ARTIGO

Efeitos da infiltração de adesivos dentais na dentina sobre a adesão

##### RESUMO

**Objetivos.** Avaliar o efeito da aplicação de cargas mecânicas cíclicas sobre a resistência adesiva à microtração ( $\mu$ TBS) de sistemas adesivos universais à dentina e quantificar sua infiltração na dentina por meio da espectroscopia micro-Raman.

**Métodos.** Oitenta e oito molares humanos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos (n=10) de acordo com o tipo de sistema adesivo utilizado: Scotchbond Universal (SU) e All Bond Universal (AB) aplicados seguindo a estratégia adesiva convencional (Er) ou autocondicionante (Se), Optibond FL (OFL), Adper Single Bond Plus (SBP), Clearfil SE Bond (CSE), e Adper Prompt L-Pop (PLP). Restaurações com a resina composta TPH<sup>3</sup> foram construídas incrementalmente. As amostras foram seccionadas em filetes e submetidas ao teste de  $\mu$ TBS após armazenamento em água ou após aplicação de cargas mecânicas cíclicas (50.000 ciclos, 50N). Oito dentes adicionais foram preparados como anteriormente descrito, seccionados em filetes, polidos para expor a interface adesiva, e em seguida a infiltração dos adesivos na dentina foi analisada sob espectroscopia micro-Raman. Para a análise estatística dos dados, foram utilizados os testes de análise de variância de dois fatores (*two-way* ANOVA) e Tukey (P<0.05).

**Resultados.** O condicionamento ácido prévio da dentina (modo Er) resultou em médias de resistência adesiva estatisticamente superiores em comparação ao modo autocondicionante (Se) para o adesivo AB. Para o adesivo SU, esta diferença estatística não foi observada. O adesivo SU utilizado no modo convencional (Er) apresentou inicialmente as médias mais altas de resistência adesiva (57,5 MPa), mas estatisticamente semelhantes às médias obtidas por OFL, SBP, CSE e AB-Er. Os grupos PLP e AB-Se apresentaram as médias mais baixas de resistência adesiva. A aplicação de cargas mecânicas cíclicas afetaram somente os valores de resistência união do adesivo PLP (de 35,2 para 12,7 MPa). A espessura da camada híbrida variou entre os diferentes sistemas adesivos avaliados de 2.0 a 5.0  $\mu$ m.

**Conclusões.** Os efeitos do modo de aplicação dos adesivos universais sobre a resistência de união foi dependente do tipo de adesivo utilizado. Os valores de resistência adesiva à microtração de adesivos universais à dentina não foram afetados após aplicação de cargas mecânicas. Variações na profundidade de infiltração dos agentes adesivos e no grau de desmineralização da dentina foram observadas por meio da espectroscopia micro-Raman.

**Palavras-chave.** Adesão à dentina. Cargas mecânicas. Microtração. Sistemas adesivos universais.

## INTRODUÇÃO

Recentemente introduzidos, adesivos dentais “universais” ou “multiuso”, podem ser utilizados seguindo ambas abordagens adesivas: autocondicionante ou convencional.<sup>1-6</sup> Estes materiais apresentam bom desempenho quando avaliados sob testes de resistência adesiva à dentina independentemente do modo de aplicação empregado,<sup>2</sup> entretanto, implicações potenciais do duplo condicionamento ácido da dentina são desconhecidos, uma vez que estudos a longo prazo não estão disponíveis. Estudos *in vitro* a curto prazo tem demonstrado diminuição da resistência adesiva à dentina,<sup>7,8</sup> visto que adesivos autocondicionantes podem reagir de modo diferente sobre a dentina previamente condicionada com ácido fosfórico.<sup>9</sup>

Componentes em adesivos universais – denominados MDP (10-metacriloxidecil dihidrogênio fosfato), PENTA (ácido ésterfosfórico dipentaeritrol pentacrilato) ou Vitrebond Copolymer (copolímero de ácido polialcenólico) – podem melhorar a adesão à estrutura dental e tem sido parte da composição de diferentes materiais ao longo de décadas. Embora dados limitados sobre as interações entre estes monômeros e o substrato dental estão documentados na literatura,<sup>10</sup> adesivos que possuem em sua formulação MDP e PENTA apresentam bom desempenho em avaliações clínicas a longo prazo.<sup>11-13</sup> Entretanto, são escassos na literatura estudos que envolveram adesivos universais com tais monômeros. O adesivo Scotchbond Universal (SU, 3M ESPE St. Paul, MN, EUA) que possui em sua formulação MDP, por exemplo, tem apresentado resultados promissores em ambos modos autocondicionante (Se) e convencional (Er) de aplicação,<sup>2,6</sup> enquanto que outro adesivo que possui o mesmo monômero – nomeadamente All-Bond Universal (AB, Bisco, Inc., Schaumburg, IL, EUA) – não obteve desempenho satisfatório no modo (Se) de aplicação.<sup>4</sup> Os resultados positivos para SU foram confirmados em um estudo clínico, onde SU mostrou taxa de retenção de 100% e 94% nos modos (Er) e (Se), respectivamente.<sup>5</sup> SU também contém o copolímero Vitrebond.

Diversas metodologias tem sido utilizadas para avaliar a interface adesiva em laboratório. Os espécimes no presente estudo foram submetidos à aplicação de cargas mecânicas para simular, de certa forma, as condições clínicas. Inúmeras investigações laboratoriais relataram que o envelhecimento acelerado por meio da aplicação de cargas mecânicas podem desafiar a estabilidade da interface dentina / adesivo.<sup>14-19</sup> Avaliações *in vitro* sobre o desempenho de adesivos universais com simulação das condições orais podem aumentar

significativamente o conhecimento atual. Uma avaliação detalhada das interfaces adesivas mecanicamente desafiadas foi realizada por meio da microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM) e por espectroscopia micro-Raman. Enquanto que FESEM pode ser útil para avaliar a interface atual, a análise sob espectroscopia micro-Raman pode ajudar a determinar a extensão de infiltração da resina.<sup>20-26</sup> No entanto, ainda não foram realizados estudos com o intuito de investigar a interação interfacial entre sistemas adesivos universais e dentina por meio da espectroscopia micro-Raman.

Os grupos controle consistiam em adesivos representantes de todas as categorias disponíveis, ou seja, adesivos convencionais de três e dois passos de aplicação, e adesivos autocondicionantes de dois e um passo de aplicação. Os materiais escolhidos para comparação foram os adesivos convencionais de três passos Optibond FL (Kerr, Orange, CA, EUA), de dois passos Single Bond Plus (3M ESPE), e o adesivo autocondicionante de dois passos Clearfil SE Bond (Kuraray, Osaka, Japão) com eficácia clinicamente comprovada.<sup>13,27-31</sup> A fim de ter um adesivo de cada categoria para comparação, o adesivo autocondicionante de um passo, Adper Prompt L-Pop (3M ESPE), foi selecionado. Este material é muito ácido (pH ~0.7) e sensível à hidrólise, fatores que podem influenciar seu desempenho adesivo.<sup>32</sup>

O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos da aplicação de cargas mecânicas sobre a resistência de união de sistemas adesivos universais à dentina e quantificar a infiltração destes adesivos na dentina por meio da espectroscopia micro-Raman. A hipótese testada foi a de que há diferença nos valores de resistência adesiva entre os diferentes modos de aplicação dos sistemas adesivos universais após envelhecimento artificial.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Preparo dos espécimes**

Oitenta e oito terceiros molares humanos, livres de cárie, foram coletados e armazenados em solução de cloramina T (0,5%) a 4 °C até o início dos procedimentos laboratoriais. Todos os dentes foram incluídos em resina epóxi (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e na sequência, o terço oclusal das coroas dentais foi removido utilizando um disco diamantado de corte em baixa velocidade (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) sob constante irrigação com água. As superfícies expostas de dentina média foram então polidas com lixas de Carbetto de Silício (SiC, granulção #600) por 60 segundos para garantir a formação da smear layer de forma padronizada. Em seguida, os dentes foram divididos aleatoriamente em oito grupos (n = 10) e tratados com os diferentes sistemas adesivos de acordo com as instruções do fabricante. As Tabelas 1 e 2 apresentam o fabricante, a composição e o protocolo de aplicação dos sistemas adesivos envolvidos neste estudo. Para garantir uma variação mínima na profundidade de desmineralização da dentina, o mesmo condicionador ácido foi utilizado em todos os grupos de adesivos convencionais (Scotchbond ETCHANT, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA).<sup>33</sup>

Após realização dos procedimentos adesivos, restaurações foram construídas com a resina composta TPH<sup>3</sup> (Dentsply Caulk, Milford, DE, EUA), sendo aplicada em três incrementos com aproximadamente 2 mm de espessura cada. O procedimento de fotoativação foi realizado por meio de uma unidade a LED de fotopolimerização SmartLite IQ2 LED (Dentsply Caulk). A intensidade de luz utilizada ao longo dos procedimentos foi de 1.400 mW/cm<sup>2</sup>.

### **Aplicação de cargas mecânicas cíclicas**

Após armazenamento em água destilada a 37 °C por 24 horas, metade das amostras de cada grupo adesivo (N=5) foi aleatoriamente designada a receber cargas mecânicas cíclicas. As amostras foram montadas em um suporte, posicionadas no interior da câmara carga e fixadas ao eixo inferior do simulador de mastigação (SD Mechatronik GmbH, Feldkirchen Westerham, Alemanha). Para simular o ligamento periodontal, as amostras (incluídas em resina epóxi) foram montadas em um suporte previamente preenchido por um material de moldagem à base de polivinilsiloxano com alta viscosidade (Virtual, Ivoclar

Vivadent, Schan, Liechtenstein), gerando assim, uma película com aproximadamente 1 mm de espessura. As amostras foram então submetidas à cargas mecânicas cíclicas com 50N com a força aplicada de forma centralizada em cada uma das restaurações. A carga foi aplicada verticalmente utilizando uma ponta de aço inoxidável esférica (5 mm de diâmetro) por 50.000 ciclos, imersas em água destilada e à temperatura ambiente.

### **Teste de microtração ( $\mu$ TBS)**

As amostras foram seccionadas em filetes 24 h após os procedimentos restauradores ou imediatamente após à ciclagem mecânica e submetidas ao teste de microtração.<sup>34</sup> A secção das amostras foi realizada sob constante irrigação com água por meio do uso de um disco diamantado de corte em baixa velocidade, para obter filetes com uma área de secção transversal de 0,9 mm<sup>2</sup>.<sup>35</sup> Para cada dente, apenas 9 filetes centrais foram selecionados afim de reduzir a variabilidade regional do substrato dentinário.<sup>36</sup>

Cada filete foi individualmente fixado à um dispositivo especial de microtração (*Ciucchi jig*)<sup>34</sup> com uma cola à base de cianoacrilato (Super Glue Gel, Loctite, Westlake, OH, EUA) e testados sob resistência adesiva à microtração ( $\mu$ TBS) em uma máquina universal de ensaios (EZ-Test, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão) a uma velocidade de 1 mm/min. Os valores de resistência adesiva foram expressos em MPa, obtidos pelo cálculo do quociente entre o pico da força aplicada (N) pela área de secção transversal da interface adesiva. As dimensões dos filetes foram individualmente mensuradas com um paquímetro digital (Mitutoyo, Tokyo, Japão). A análise estatística foi realizada por meio do *software* SPSS 14.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA). Os dados de resistência adesiva foram examinados estatisticamente pelos testes: análise de variância (ANOVA *two-way*) e Tukey's *post-hoc*. Todos os testes estatísticos foram realizados ao nível de confiança de 95%.

Os espécimes fraturados foram examinados com um estereomicroscópio (Leica EZ4 HD, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) com uma ampliação de 40X. Os modos de falha foram classificados como adesiva (AD), mista (M) e coesiva em resina ou dentina (CC / CD). Espécimes fraturados (partes homólogas de compósito e de dentina) que obtiveram valores de resistência adesiva mais próximos da média respectiva ao seu grupo, foram considerados representativos e examinados detalhadamente sob microscopia

eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM). Um operador independente que não foi envolvido com o estudo e “cego” para com a designação dos grupos, realizou a análise sob FESEM. Três espécimes de cada grupo adesivo foram processados de acordo com o método descrito por Perdigão et al. e colaboradores<sup>37</sup>, e fotomicrografias FESEM foram coletadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss Supra 25 FE-SEM), operando a 5 kV, com 10 mm abertura, e à uma distância de trabalho de 10 mm (Carl Zeiss SMT, Inc., Peabody, MA, USA). As fotomicrografias FESEM obtidas foram analisadas qualitativamente.

### **Espectroscopia micro-Raman**

A espectroscopia micro-Raman foi utilizada para investigar a extensão de infiltração promovida por cada sistema adesivo na dentina. Um dente adicional foi preparado para cada grupo como previamente descrito. Os espécimes foram então armazenados em água destilada por 24 h a 37 °C até o momento em que o procedimento de corte ao longo da interface adesiva fosse executado para obtenção de filetes retangulares (10 mm de comprimento x 2 mm de espessura x 2 mm de largura).

Filetes contendo a interface adesivo/dentina foram polidos com lixas de Carbetto de Silício com granulações de 600 -, 800 -, 1200 - fina e 1200 ultrafina em uma máquina designada para esta finalidade. Após polimento inicial, as interfaces adesivas expostas receberam um polimento final com discos de feltro (Leclot, LECO) impregnados com partículas de diamante com granulações de 6 µm, 1 µm e 0.25 µm (Premium Grade Spray, Heavy Concentration, LECO). Posteriormente, todos os espécimes foram limpos por ultra-sons em água destilada durante 15 minutos e, em seguida, armazenados por 24 h em ambiente seco e livre de luz.

Os dados espectrais obtidos sobre as interfaces adesivo/dentina foram comparados com espectros de referência coletados a partir das amostras do adesivo puro e da dentina inalterada. Os espectros adquiridos nas regiões de interesse foram analisados por meio de um programa de ajuste de curva (LABSPEC 5.78, HORIBA, Jobin Yvon, Stanmore, Middlesex, UK), e as quantidades relativas de hidroxiapatita, de adesivo e da substância orgânica presente na interface dentina-adesivo foram calculadas. Cada espécime contendo a interface adesiva foi mapeado começando na camada adesiva em direção à dentina mineralizada e a espessura da camada de dentina impregnada com resina, o grau de desmineralização e a percentagem de resina em função

da posição ao longo da interface de dentina foram determinadas. Um espectro Raman foi coletado a cada 0.5  $\mu\text{m}$ .

Espectros micro-Raman foram registrados usando um espectrômetro Horiba Labram HR Raman (HORIBA Jobin Yvon). O instrumento utiliza um monocromador com 800 mm equipado com um filtro de 600 gr/mm. O instrumento é acoplado a um microscópio óptico série Olympus BX equipado com uma objetiva de 100X para visualização da amostra e coleta dos dados espectrais. Um laser de HeNe com 663 nm foi usado para a excitação da amostra. A potência do laser sobre a amostra foi de 4 mW. As amostras foram mapeadas usando uma base com movimentos nos eixos x-y-z. O tempo de acumulação para todos os mapas foi ajustado para 0,5 s por pixel com duas acumulações por pixel. A abertura do monocromador foi ajustado para 150  $\mu\text{m}$ . Os espectros foram coletados por meio de um detector CCD Horiba Synapse (resolução de 1024 x 256 pixel) sobre a região espectral de 668-1788  $\text{cm}^{-1}$ .

Os dados obtidos foram analisados através do cálculo da média e do desvio padrão para cada sistema adesivo. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA *one-way*) seguido pelo teste de Tukey's *post hoc*.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos pelo teste de resistência adesiva estão descritos na Tabela 3 e os respectivos modos de falha estão resumidos na Tabela 4. Os resultados de resistência adesiva foram analisados estatisticamente por meio do teste ANOVA *two-way*, e as interações entre o tipo de sistema adesivo e o envelhecimento artificial foram indicadas ( $p = 0,000$ ). A resistência de união à dentina foi afetada pelo tipo de sistema adesivo ( $p = 0,000$ ), mas não foi afetada pela aplicação de cargas mecânicas cíclicas ( $p = 0,61$ ). O tratamento de pré-condicionamento foi significativo para os grupos AB ( $p < 0,05$ ). A média de resistência de união variou de 35,2 MPa (grupo PLP) para 57,5 MPa (grupo SU-Er) no momento inicial e de 12,7 MPa (grupo PLP) para 65,2 MPa (grupo SU-Er) após aplicação de cargas mecânicas cíclicas. As comparações entre os grupos estão detalhadas na Tabela 3.

Espectros Raman obtidos sobre a dentina inalterada bem como sobre todos os adesivos avaliados, estão apresentados na Figura 4. O pico mais intenso observado a  $959\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) é associado ao componente mineral da dentina (hidroxiapatita), enquanto que as principais bandas associadas com componentes orgânicos da dentina (matriz de colágeno) ocorrem a  $1248\text{ cm}^{-1}$  (amida III),  $1451\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) e  $1670\text{ cm}^{-1}$  (amida I). A semelhança entre os espectros de referência de todos os sistemas adesivos reflete sua idêntica formulação à base de componentes hidrofílicos (bisfenol glicidil metacrilato, Bis-GMA) e hidrofóbicos (hidroxietil metacrilato, HEMA). As bandas intensas associadas com monômeros de metacrilato ocorrem a  $1113\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C),  $1453\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ),  $1608\text{ cm}^{-1}$  (fenil C=C) e  $1719\text{ cm}^{-1}$  (carbonilo). Particularmente, as bandas a  $1113$  e  $1608\text{ cm}^{-1}$  estão associadas com o Bis-GMA, enquanto que a banda a  $1453\text{ cm}^{-1}$  é associada com o HEMA. Os picos Raman em  $959$ ,  $1113$ ,  $1453$  e  $1670\text{ cm}^{-1}$ , foram utilizados para revelar as distribuições do conteúdo mineral, do adesivo (ambos Bis-GMA e HEMA) e do colágeno na interface adesivo / dentina, respectivamente.

A intensidade das bandas Raman atribuídas ao adesivo diminuiu em função da profundidade, o que indica a diminuição progressiva da infiltração de resina na dentina desmineralizada. As comparações entre a profundidade de desmineralização da dentina e a extensão de penetração para cada sistema adesivo encontram-se resumidas na Tabela 5. Uma comparação referente à infiltração dos adesivos universais e adesivos controle na dentina em função da posição

ao longo da interface adesivo/dentina é apresentada nas Figuras 2 e 3. Os valores médios (%) correspondentes à infiltração dos diferentes sistemas adesivos diminuíram dramaticamente a partir do topo da camada híbrida em direção a zona mais profunda de dentina desmineralizada: SU-Se (45-10%), SU-Er (84-18%), AB-Se (66-4%), AB-Er (76-24%), OFL (52-30%), SBP (56-10%), CSE (56-8%) e PLP (68-10%).

Com base na análise do modo de falha, aproximadamente 54% das falhas foram predominantemente adesivas, distribuídas igualmente entre os grupos (Fig. 4). Após ciclagem mecânica, alta incidência de falhas coesivas em dentina (CD) foram observadas nos grupos SU-Se (31%), Su-Er (40%) e AB-Er (24%) (Fig. 5). Todas as falhas foram consideradas adesivas para o grupo PLP (100%) (Fig. 6).

## DISCUSSÃO

Este estudo *in vitro* avaliou o desempenho adesivo de dois novos sistemas adesivos universais por meio da combinação dos seguintes experimentos laboratoriais: aplicação de cargas mecânicas, teste de resistência adesiva à microtração ( $\mu$ TBS) e espectroscopia micro-Raman. Os resultados revelaram valores inferiores de resistência de união para o adesivo AB no modo autocondicionante quando comparados aos valores obtidos pelo mesmo adesivo no seu modo convencional de aplicação. Por consequência, a hipótese proposta foi parcialmente rejeitada.

Clinicamente, as restaurações adesivas são submetidas à cargas cíclicas durante a mastigação o que pode resultar na formação de trincas na interface adesiva, desafiando a manutenção da restauração a longo prazo. Diversas investigações laboratoriais relataram que o envelhecimento acelerado por meio da aplicação de cargas mecânicas cíclicas podem desafiar a durabilidade da interface adesivo/dentina.<sup>14,16-19,38</sup> No presente estudo, as restaurações com resina composta foram submetidas à 50.000 ciclos com 50 N de carga. Esta força com 50 N de carga foi aplicada em um ponto médio da superfície oclusal da restauração e a frequência com que a carga mecânica foi aplicada foi ajustada para 0.5 Hz, valores estes que são comparáveis àqueles encontrados em situações clínicas.<sup>39-42</sup> No entanto, os resultados do presente estudo não mostraram efeito significativo sobre a resistência de união entre os diferentes grupos, com exceção do grupo PLP, que apresentou uma redução de 36% nos valores de resistência adesiva após aplicação de cargas mecânicas. De forma semelhante, reduções na resistência adesiva de 63% após 2 anos<sup>43</sup> e 36% após três anos<sup>44</sup> de envelhecimento artificial (armazenamento em água) foram observadas em estudos prévios. Várias razões têm sido apresentadas para explicar o desempenho abaixo do ideal para este adesivo, tais como: (1) incapacidade de polimerizar totalmente; (2) molhamento insuficiente; (3) potencial separação de fase entre os componentes hidrofóbicos e hidrofílicos; (4) baixa estabilidade hidrolítica; e (5) ausência de estável interação química com o colágeno exposto.<sup>32,45-49</sup> Por outro lado, nenhum relato sobre os efeitos da aplicação de cargas mecânicas sobre a durabilidade da adesão foi encontrado na literatura para o adesivo PLP. Da mesma forma, até o momento nenhum estudo relatou os efeitos da aplicação de cargas mecânicas sobre a resistência de união de adesivos convencionais de três passos à dentina. No entanto, um estudo *in vitro*

demonstrou que o adesivo OFL apresentou resistência adesiva estável mesmo após envelhecimento artificial.<sup>50</sup>

O efeito da aplicação de cargas mecânicas sobre a resistência de união à dentina promovida por um adesivo convencional de dois passos (SBP) e um adesivo autocondicionante de 2 passos (CSE), foi investigado anteriormente em estudos laboratoriais. Foi relatado que quando restaurações com resina composta foram aderidas utilizando o adesivo SBP e posteriormente sujeitas à ciclagem mecânica, uma redução significativa na resistência adesiva à dentina foi encontrada na faixa de 43,3-28,2 MPa após 5.000 ciclos com 90 N de carga<sup>18</sup>, na qual nossos resultados estão em desacordo com as observações daquele estudo. Tais observações estão em oposição aos resultados obtidos no presente estudo devido à variações nas condições experimentais, ao preparo das amostras e às diferentes condições de aplicação das cargas mecânicas. Assim, uma possível explicação para uma estável união adesiva obtida por SBP no presente estudo é que este adesivo possui em sua formulação o copolímero de ácido polialcenóico. Tal componente tem sido relatado na literatura aumentar a eficácia de união deste sistema adesivo.<sup>11,50,51</sup> De forma semelhante, o sistema adesivo autocondicionante de dois passos Clearfil SE Bond não apresentou redução na resistência adesiva após a ciclagem mecânica no presente estudo. CSE resultou em aumento da média de resistência adesiva após ciclagem mecânica. Esta superior eficácia de união pode ser atribuída à interação química entre o monômero 10-MDP com a hidroxiapatita residual.<sup>10,52</sup> Outro estudo avaliando um sistema adesivo autocondicionante (Clearfil Linerbond, Kuraray) com composições similares ao CSE, relatou que a aplicação de cargas mecânicas não resultou em redução da resistência de união à dentina.<sup>14</sup> Tal estudo relatou que a restauração adesiva funcionou como um amortecedor de tensões distribuindo as forças igualmente durante a ciclagem mecânica.

Os adesivos autocondicionantes que contém 10-MDP em sua composição receberam especial atenção na presente investigação laboratorial. Preocupações a respeito do condicionamento ácido da dentina previamente à aplicação de sistemas adesivos autocondicionantes foram levantadas,<sup>7-9</sup> uma vez que incompleta infiltração de resina na rede de colágeno profundamente desmineralizada pode comprometer a resistência de união. No entanto, e de acordo com estudos anteriores,<sup>1,2,4</sup> nosso estudo revela que o condicionamento ácido fosfórico realizado previamente ao uso de adesivos universais não apresenta efeitos adversos sobre a resistência de união à dentina. De fato, usando o sistema adesivo All-Bond universal

no modo convencional de aplicação, houve um aumento na resistência de união à dentina, assim como demonstrado por Munoz e colaboradores.<sup>4</sup> De acordo com o nosso estudo, a ausência de diferenças nos valores de resistência de união entre os modos de aplicação para o adesivo SU, foram constatadas.<sup>2</sup>

Os resultados do presente estudo também revelaram que a aplicação de 50.000 ciclos de cargas mecânicas não afetaram a resistência adesiva à dentina de ambos sistemas adesivos universais. Em contraste, outro estudo *in vitro* relatou diminuição na resistência adesiva para o adesivo SU (independentemente do modo de aplicação) após 1 ano de envelhecimento em saliva artificial.<sup>6</sup> Mais recentemente, outro grupo de pesquisadores relatou uma incidência de falhas das restaurações adesivas não maior que 10% após 18 meses de observação clínica, independentemente da abordagem adesiva utilizada.<sup>5</sup> Foi relatado que a eficácia de união deste adesivo é resultante de um mecanismo duplo de adesão: embricamento micromecânico na superfície da dentina e união química entre o monômero funcional 10-MDP e a apatita residual sobre as fibras de colágeno.<sup>8,13,53,54</sup> Além da capacidade de condicionamento e de união química do monômero 10-MDP, o bom desempenho deste adesivo pode ser atribuído à afinidade do copolímero de ácido polialcenoico para com o cálcio presente na hidroxiapatita, o que resulta numa ligação química adicional, que pode contribuir para a estabilidade e longevidade da união adesiva.<sup>11-13,18</sup>

Na tentativa de justificar os dados de resistência de união, a análise de micro-Raman das interfaces adesivo/dentina foi realizada. No presente estudo, espectros Raman foram registados sucessivamente ao longo de varrimentos em linhas perpendiculares à interface de união gerada por todos os adesivos investigados. Além disso, foi dada especial atenção à prevenção dos *tags* de resina. A discrepância entre a profundidade de desmineralização e a extensão da infiltração de monômeros resinosos nas regiões intertubulares das interfaces adesivo/dentina, foram claramente observadas para os adesivos convencionais selecionados como controle. Os resultados do presente estudo confirmam que a infiltração de adesivos convencionais é sempre menor do que a extensão de desmineralização da dentina, como relatado em estudos anteriores.<sup>22,23,55</sup> A ausência de uma infiltração completa em toda a zona de dentina desmineralizada por sistemas adesivos convencionais pode ser atribuída à uma variedade de fatores, incluindo a separação de fase adesiva. Com a abordagem "úmida de adesão", os espaços entre as fibras de colágeno desmineralizadas são preenchidos por água.<sup>56</sup> Conforme relatado no estudo anteriormente citado, o adesivo

pode separar-se em fase hidrofílica rica em HEMA e fase hidrofóbica rica em Bis-GMA a medida que interage com a água remanescente. Dessa maneira, o monômero hidrofóbico Bis-GMA resistiria à difusão nesses locais ricos em água.<sup>56,57</sup> Além disso, a separação de fase adesiva propiciaria a formação de uma camada híbrida porosa caracterizada por uma quantidade mínima de Bis-GMA distribuída em uma matriz hidrofílica rica em HEMA. Tem sido relatado que HEMA é instável em meio aquoso, e deste modo, pode degradar-se quando expostos à fluidos orais a longo prazo.<sup>32,50</sup> Em contraste, a profundidade de penetração dos sistemas adesivos autocondicionantes, CSE (4,0 µm) e PLP (5,0 µm), foi idêntica à extensão de desmineralização da dentina. Nossos dados estão de acordo com os resultados obtidos em investigações anteriores que utilizaram a espectroscopia micro-Raman.<sup>22,24,25</sup>

Quando os resultados de resistência adesiva e micro-Raman foram interpretados em conjunto, não foi observada relação entre a infiltração adesiva e resistência de união. Além disso, o "duplo condicionamento" da dentina (pelo condicionamento com ácido fosfórico e pelo autocondicionamento por monômeros funcionais) não influenciou negativamente a resistência de união. Por exemplo, quando o adesivo SU foi utilizado no modo autocondicionante ou convencional de aplicação, independentemente da extensão da infiltração de resina, exibiu valores de resistência adesiva semelhantes, o que pode ser um resultado da capacidade de união química do monômero 10-MDP e do copolímero de ácido polialcenóico à dentina.<sup>2</sup> Por outro lado, o adesivo AB apresentou maiores valores de resistência de união no modo convencional quando comparado ao modo autocondicionante de aplicação. Dessa forma, a efetividade adesiva superior obtida por AB no modo de aplicação convencional é atribuída à etapa de condicionamento ácido que garante um padrão de condicionamento mais profundo e maior extensão de penetração da resina. Apesar da diferente espessura da camada híbrida observada para os grupos do adesivo AB, uma correlação entre a resistência de união à dentina e infiltração adesiva foi encontrada. Quando o adesivo AB foi utilizado seguindo ambas abordagens adesivas – autocondicionante e convencional, infiltrou 2,0 µm e 4 µm na dentina desmineralizada, respectivamente. Uma maior percentagem de adesivo na parte inferior (base) da camada híbrida foi detectada para o adesivo AB no modo convencional de aplicação (24%) e menor percentagem em seu modo autocondicionante (4%). Foi relatado que a magnitude da força de união à dentina dependem da extensão de infiltração da resina na rede de colágeno pré-tratada com

monômeros acídicos ou com condicionadores à base de ácido fosfórico.<sup>23-25, 58</sup>

Em relação aos padrões de falha, todos os grupos mostraram principalmente falhas adesivas após ciclagem mecânica, as quais indicam que a tensão de carga é concentrada na interface entre o adesivo e a parte inferior ou superior da camada híbrida.<sup>14</sup> Falhas coesivas em dentina e falhas mistas foram classificadas como o segundo maior tipo de falhas que ocorreram para todos os adesivos. Como observado após teste de microtração, alta resistência adesiva foi obtida para os adesivos SU e AB aplicados seguindo a abordagem convencional, e dessa forma, os espécimes apresentaram falhas coesivas em dentina. Portanto, esta observação indica que a resistência de união de ambos adesivos universais não foi avaliada, visto que a força de coesão da própria dentina foi menor do que a força de ligação interfacial. Isto significa que o "duplo condicionamento" provocou uma desmineralização mais profunda da dentina, que por sua vez significa que esta zona profunda de dentina desmineralizada não foi completamente infiltrada por monômeros resinosos. Alguns estudos sugerem que a falha é susceptível de ser iniciada nesta zona fragilizada, levando à diminuição da resistência de união.<sup>59,60</sup> Portanto, esta afirmação não está de acordo com os resultados do presente estudo. A presença de uma zona de dentina desmineralizada exerceram pouco ou nenhum efeito sobre a resistência de união à dentina.



## CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que a resistência de união obtida por adesivos universais pode ser melhorada por meio do pré-condicionamento da superfície da dentina com ácido fosfórico, técnica que não mostrou afetar negativamente a adesão. A infiltração de monômeros resinosos na dentina desmineralizada pode produzir uma infiltração adesiva gradual, com uma concentração mais elevada na superfície do adesivo, baixa concentração no meio da camada híbrida, e pouco adesivo na porção mais profunda da zona de dentina desmineralizada.



## REFERÊNCIAS

1. Hanabusa M, Mine A, Kuboki T, Momoi Y, Van Ende A, Van Meerbeek B, et al. Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. *J Dent* 2012;**40**:475-84.
2. Perdigao J, Sezinando A, Monteiro PC. Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. *Am J Dent* 2012;**25**:153-8.
3. Mena-Serrano A, Kose C, De Paula EA, Tay LY, Reis A, Loguercio AD, et al. A new universal simplified adhesive: 6-month clinical evaluation. *J Esthet Restor Dent* 2013;**25**:55-69.
4. Munoz MA, Luque I, Hass V, Reis A, Loguercio AD, Bombarda NH. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent* 2013;**41**:404-11.
5. Perdigao J, Kose C, Mena-Serrano A, De Paula E, Tay L, Reis A, et al. A New Universal Simplified Adhesive: 18-Month Clinical Evaluation. *Oper Dent* 2013.
6. Marchesi G, Frassetto A, Mazzoni A, Apolonio F, Diolosa M, Cadenaro M, et al. Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-Year in vitro study. *J Dent* 2013.
7. Torii Y, Itou K, Nishitani Y, Ishikawa K, Suzuki K. Effect of phosphoric acid etching prior to self-etching primer application on adhesion of resin composite to enamel and dentin. *Am J Dent* 2002;**15**:305-8.
8. Van Landuyt KL, Kanumilli P, De Munck J, Peumans M, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Bond strength of a mild self-etch adhesive with and without prior acid-etching. *J Dent* 2006;**34**:77-85.
9. Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater* 2001;**17**:296-308.
10. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res* 2004;**83**:454-8.
11. Loguercio AD, Bittencourt DD, Baratieri LN, Reis A. A 36-month evaluation of self-etch and etch-and-rinse adhesives in noncarious cervical lesions. *J Am Dent Assoc* 2007;**138**:507-14; quiz 35-7.

12. Ritter AV, Swift EJ, Jr., Heymann HO, Sturdevant JR, Wilder AD, Jr. An eight-year clinical evaluation of filled and unfilled one-bottle dental adhesives. *J Am Dent Assoc* 2009;**140**:28-37; quiz 111-2.
13. Peumans M, De Munck J, Van Landuyt KL, Poitevin A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Eight-year clinical evaluation of a 2-step self-etch adhesive with and without selective enamel etching. *Dent Mater* 2010;**26**:1176-84.
14. Nikaido T, Kunzelmann KH, Chen H, Ogata M, Harada N, Yamaguchi S, et al. Evaluation of thermal cycling and mechanical loading on bond strength of a self-etching primer system to dentin. *Dent Mater* 2002;**18**:269-75.
15. Bedran-de-Castro AK, Cardoso PE, Ambrosano GM, Pimenta LA. Thermal and mechanical load cycling on microleakage and shear bond strength to dentin. *Oper Dent* 2004;**29**:42-8.
16. Frankenberger R, Pashley DH, Reich SM, Lohbauer U, Petschelt A, Tay FR. Characterisation of resin-dentine interfaces by compressive cyclic loading. *Biomaterials* 2005;**26**:2043-52.
17. Osorio R, Toledano M, Osorio E, Aguilera FS, Tay FR. Effect of load cycling and in vitro degradation on resin-dentin bonds using a self-etching primer. *J Biomed Mater Res A* 2005;**72**:399-408.
18. Toledano M, Osorio R, Albaladejo A, Aguilera FS, Tay FR, Ferrari M. Effect of cyclic loading on the microtensile bond strengths of total-etch and self-etch adhesives. *Oper Dent* 2006;**31**:25-32.
19. Belli S, Ozcopur B, Yesilyurt C, Bulut G, Ding X, Dorsman G. The effect of loading on microTBS of four all-in-one adhesives on bonding to dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;**91**:948-56.
20. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982;**16**:265-73.
21. Van Meerbeek B, Dhem A, Goret-Nicaise M, Braem M, Lambrechts P, VanHerle G. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. *J Dent Res* 1993;**72**:495-501.
22. Santini A, Miletic V. Quantitative micro-Raman assessment of dentine demineralization, adhesive penetration, and degree of conversion of three dentine bonding systems. *Eur J Oral Sci* 2008;**116**:177-83.
23. Spencer P, Wang Y, Walker MP, Wieliczka DM, Swafford JR. Interfacial chemistry of the dentin/adhesive bond. *J Dent Res* 2000;**79**:1458-63.

24. Wang Y, Spencer P. Physiochemical interactions at the interfaces between self-etch adhesive systems and dentine. *J Dent* 2004;**32**:567-79.
25. Sato M, Miyazaki M. Comparison of depth of dentin etching and resin infiltration with single-step adhesive systems. *J Dent* 2005;**33**:475-84.
26. Miyazaki M, Onose H, Moore BK. Analysis of the dentin-resin interface by use of laser Raman spectroscopy. *Dent Mater* 2002;**18**:576-80.
27. Van Meerbeek B, Van Landuyt K, De Munck J, Hashimoto M, Peumans M, Lambrechts P, et al. Technique-sensitivity of contemporary adhesives. *Dent Mater J* 2005;**24**:1-13.
28. Kubo S, Kawasaki K, Yokota H, Hayashi Y. Five-year clinical evaluation of two adhesive systems in non-cariou cervical lesions. *J Dent* 2006;**34**:97-105.
29. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater* 2011;**27**:1-16.
30. Perdigao J, Dutra-Correa M, Saraceni CH, Ciaramicoli MT, Kiyan VH, Queiroz CS. Randomized clinical trial of four adhesion strategies: 18-month results. *Oper Dent* 2012;**37**:3-11.
31. Peumans M, De Munck J, Van Landuyt KL, Poitevin A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. A 13-year clinical evaluation of two three-step etch-and-rinse adhesives in non-cariou class-V lesions. *Clin Oral Investig* 2012;**16**:129-37.
32. Shirai K, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Lambrechts P, Suzuki K, et al. Effect of cavity configuration and aging on the bonding effectiveness of six adhesives to dentin. *Dent Mater* 2005;**21**:110-24.
33. Perdigao J, Lambrechts P, van Meerbeek B, Tome AR, Vanherle G, Lopes AB. Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. *Dent Mater* 1996;**12**:262-71.
34. Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, et al. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater* 1994;**10**:236-40.
35. Shono Y, Ogawa T, Terashita M, Carvalho RM, Pashley EL, Pashley DH. Regional measurement of resin-dentin bonding as an array. *J Dent Res* 1999;**78**:699-705.
36. De Munck J, Mine A, Vivan Cardoso M, De Almeida Neves A, Van Landuyt KL, Poitevin A, et al. Effect of dentin location and long-term water storage on bonding effectiveness of dentin adhesives. *Dent Mater J* 2011;**30**:7-13.

37. Perdigao J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G, Lopes AL. Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. *J Biomed Mater Res* 1995;**29**:1111-20.
38. Bedran-de-Castro AK, Pereira PN, Pimenta LA, Thompson JY. Effect of thermal and mechanical load cycling on microtensile bond strength of a total-etch adhesive system. *Oper Dent* 2004;**29**:150-6.
39. De Boever JA, McCall WD, Jr., Holden S, Ash MM, Jr. Functional occlusal forces: an investigation by telemetry. *J Prosthet Dent* 1978;**40**:326-33.
40. Bates JF, Stafford GD, Harrison A. Masticatory function - a review of the literature. III. Masticatory performance and efficiency. *J Oral Rehabil* 1976;**3**:57-67.
41. Schindler HJ, Stengel E, Spiess WE. Feedback control during mastication of solid food textures--a clinical-experimental study. *J Prosthet Dent* 1998;**80**:330-6.
42. Bates JF, Stafford GD, Harrison A. Masticatory function-a review of the literature: (II) Speed of movement of the mandible, rate of chewing and forces developed in chewing. *J Oral Rehabil* 1975;**2**:349-61.
43. Walter R, Swift EJ, Jr., Nagaoka H, Chung Y, Bartholomew W, Braswell KM, et al. Two-year bond strengths of "all-in-one" adhesives to dentine. *J Dent* 2012;**40**:549-55.
44. Loguercio AD, Stanislawczuk R, Mena-Serrano A, Reis A. Effect of 3-year water storage on the performance of one-step self-etch adhesives applied actively on dentine. *J Dent* 2011;**39**:578-87.
45. Wang Y, Spencer P. Continuing etching of an all-in-one adhesive in wet dentin tubules. *J Dent Res* 2005;**84**:350-4.
46. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent* 2003;**28**:215-35.
47. Van Landuyt KL, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, et al. Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. *J Dent Res* 2005;**84**:183-8.
48. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent* 2002;**30**:371-82.
49. Yoshioka M, Yoshida Y, Inoue S, Lambrechts P, Vanherle G, Nomura Y, et al. Adhesion/decalcification mechanisms of acid interactions with human hard tissues. *J Biomed Mater Res* 2002;**59**:56-62.

50. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003;**82**:136-40.
51. Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, Snauwaert J, Hellems L, Lambrechts P, et al. Evidence of chemical bonding at biomaterial-hard tissue interfaces. *J Dent Res* 2000;**79**:709-14.
52. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, M Jd, K LV. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater* 2011;**27**:17-28.
53. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res* 2005;**84**:118-32.
54. Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, et al. Self-assembled Nano-layering at the Adhesive interface. *J Dent Res* 2012;**91**:376-81.
55. Van Meerbeek B, Mohrbacher H, Celis JP, Roos JR, Braem M, Lambrechts P, et al. Chemical characterization of the resin-dentin interface by micro-Raman spectroscopy. *J Dent Res* 1993;**72**:1423-8.
56. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res* 2002;**62**:447-56.
57. Wang Y, Spencer P, Yao X. Micro-Raman imaging analysis of monomer/mineral distribution in intertubular region of adhesive/dentin interfaces. *J Biomed Opt* 2006;**11**:024005.
58. Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int* 1993;**24**:618-31.
59. Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H, Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater* 2000;**16**:406-11.
60. Tay FR, Carvalho RM, Yiu CK, King NM, Zhang Y, Agee K, et al. Mechanical disruption of dentin collagen fibrils during resin-dentin bond testing. *J Adhes Dent* 2000;**2**:175-92.





PAPER

---



## 5 PAPER

The effects of infiltration of dental adhesives into dentin on bonding

### ABSTRACT

**Objectives.** To evaluate the effect of mechanical loading on microtensile bond strengths ( $\mu$ TBS) of universal adhesives to dentin and to quantify their penetration into dentin using micro-Raman spectroscopy.

**Methods.** Eighty-eight human molars were allocated into eight groups (n=10) and bonded with Scotchbond Universal (SU) and All-Bond Universal (AB) adhesives applied using etch-and-rinse (Er) or self-etch approach (Se), Optibond FL (OFL), Adper Single Bond Plus (SBP), Clearfil SE Bond (CSE), and Adper Prompt L-Pop (PLP). Composite build-ups were placed with TPH<sup>3</sup>. Specimens were either stored in water or mechanical loaded (50,000 cycles, 50 N) prior to being sectioned for  $\mu$ TBS. Eight additional teeth were prepared as previously described, sectioned, polished, and the adhesive penetration was assessed with micro-Raman spectroscopy. Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's *post hoc* test (P<0.05).

**Results.** Pre-etching (etch-and-rinse approach) resulted in statistically significant higher mean  $\mu$ TBS compared to self-etch approach for AB. No difference was noticed for SU. SU/etch-and-rinse presented the highest baseline  $\mu$ TBS (57.5 MPa), which was statistically similar to those of OFL, SBP, CSE and AB/etch-and-rinse. PLP and AB/self-etch showed the lowest mean baseline  $\mu$ TBS. Mechanical loading only affected the mean  $\mu$ TBS values for PLP (35.2 to 12.7 MPa). The widths of the hybrid layers ranged from 2.0 to 5.0  $\mu$ m.

**Conclusions.** The effect of application mode on  $\mu$ TBS of universal adhesives was material-dependent. Their  $\mu$ TBS was not affected by mechanical loading. Variations in the degree of resin infiltration and dentin demineralization were noticed with micro-Raman spectroscopy.

**Keywords:** Dentin bonding, mechanical loading, microtensile bond strength, universal adhesive systems.



## INTRODUCTION

Recently introduced “universal” or “multi-mode” dental adhesives may be applied following self-etch or etch-and-rinse approaches.<sup>1-6</sup> These materials have performed well in immediate dentin bond strength tests regardless of the application mode,<sup>2</sup> however, potential long-term implications of “double etching” of dentin are unknown as data on aged specimens is not available. Short-term *in vitro* studies where other self-etch adhesives have been used after phosphoric acid etching of dentin have shown decrease in bond strengths<sup>7,8</sup> as self-etch adhesives might react differently with that substrate.<sup>9</sup>

Components in universal adhesives – namely phosphorus-containing monomers 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate (MDP) and dipentaerythritol pentaacrylate phosphoric acid ester (PENTA), or polyalkenoic acid copolymer (Vitrebond Copolymer, 3M ESPE, St.Paul, MN, USA) – may enhance adhesion to tooth structures and have been part of the composition of different materials for decades. While limited literature studying the interactions between those monomers and dental structures is available,<sup>10</sup> adhesives containing MDP and PENTA have performed well in long-term clinical trials.<sup>11-13</sup> Yet, scarce literature is available on universal adhesives using such monomers. The MDP-containing adhesive Scotchbond Universal (SU, 3M ESPE), for instance, has shown promising results in the self-etch (Se) and etch-and-rinse (Er) application modes<sup>2,6</sup> while another MDP-containing adhesive – namely All-Bond Universal (AB, Bisco, Inc., Schaumburg, IL, USA) – may not perform as well in the self-etch mode.<sup>4</sup> The positive results for SU have been corroborated in a clinical study where SU showed a retention rate of 100% and 94% in the etch-and-rinse and self-etch modes, respectively.<sup>5</sup> SU also contains the Vitrebond Copolymer.

Different methodologies have been used to study bonded interfaces in the laboratory. Specimens in the present study were subjected to mechanical loading to somewhat mimic clinical conditions. Several laboratory investigations have reported that accelerated aging through mechanical loading can challenge the dentin/adhesive interface.<sup>14-19</sup> *In vitro* evaluation of the performance of universal adhesives with simulation of the oral conditions may significantly add to the current knowledge. Further evaluation of the adhesive interfaces was accomplished through field-emission scanning electron microscopy (FESEM) of the mechanically challenged specimens and micro-Raman spectroscopy. While FESEM may be helpful evaluating the actual

interface, micro-Raman may help determining the extent of adhesive infiltration.<sup>20-26</sup> No micro-Raman studies have been carried out to investigate the interaction between universal adhesives and dentin.

Control groups consisted of etch-and-rinse and self-etch adhesives in all available categories, namely three- and two-step etch-and-rinse, and two- and one-step self-etch adhesives. Materials chosen for comparison were the clinically proven three-step etch-and-rinse adhesive Optibond FL (OFL, Kerr, Orange, CA, USA), two-step etch-and-rinse adhesive Adper Single Bond Plus (SBP, 3M ESPE), and two-step self-etch adhesive Clearfil SE Bond (CSE, Kuraray, Osaka, Japan).<sup>13, 27-31</sup> In order to have one adhesive from each category for comparison, the one-step self-etch adhesive Adper Prompt L-Pop (PLP, 3M ESPE) was selected. This material is very acidic (pH ~0.7) and sensitive to hydrolysis, factors that may influence its bonding performance.<sup>32</sup>

The purpose of this study was to evaluate the effects of mechanical loading on microtensile bond strengths ( $\mu$ TBS) of universal adhesives to dentin and to quantify their penetration into dentin using micro-Raman spectroscopy. The hypothesis tested was that there is difference in  $\mu$ TBS between different application modes of universal adhesives after artificial aging.

## MATERIALS AND METHODS

### **Specimen preparation**

Eighty-eight caries-free human third molars were collected and stored in 0.5% Chloramine T solution at 4 °C until use. All teeth were embedded in epoxy resin (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) and the occlusal third of the crowns were removed using a low-speed diamond saw (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) under running water. The exposed mid-coronal dentin surfaces were polished with #600-grit silicon-carbide-paper (SiC) for 60 s to ensure a standardized smear layer. The teeth were randomly assigned into eight groups and treated according to the manufacturers' instructions. Table 1 and 2 shows the manufacturer, composition and application protocol of the adhesives. To ensure minimal variation in depth of dentin demineralization, the same etchant was used in all (etch-and-rinse) groups (Scotchbond Etchant, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) was used.<sup>33</sup>

After adhesive application, composite build-ups were placed using the composite resin TPH3 (Dentsply Caulk, Milford, DE, USA) applied in three increments of approximately 2 mm each. Light-curing procedures were performed using a Smartlite IQ2 LED (Dentsply Caulk). The light-power intensity throughout the procedures was 1,400 mW/cm<sup>2</sup>.

### **Cycling mechanical loading**

Half of the bonded specimens for each adhesive group (n=5) were randomly assigned for cyclic loading after storage in distilled water at 37 °C for 24 h. Specimens were mounted in a holder, positioned within the chamber, and fixed to the chewing simulator (SD Mechatronik GmbH, Feldkirchen Westerham, Germany). To simulate the periodontal ligament, specimens (embedded in epoxy resin) were mounted in a holder lined with a ~1 mm layer of high-viscosity polyvinyl siloxane (Virtual, heavy body, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein). Teeth were then loaded under 50 N with the force centered on the composite build-up. The load was vertically delivered using a spherical stainless steel tip (5 mm diameter) for 50,000 cycles, under immersion in distilled water, and at room temperature.

### **μTBS testing**

Specimens were sectioned into beams either after 24 h of water storage following the bonding procedures or immediately after mechanical loading, and tested in μTBS.<sup>34</sup> The specimens were

sectioned under water irrigation with a low-speed diamond saw to obtain beams with a cross section area of  $\sim 0.9 \text{ mm}^2$ .<sup>35</sup> Nine beams from the central area of each specimen were used to reduce substrate-regional variability.<sup>36</sup>

Beams were attached to a Ciucchi jig<sup>34</sup> with cyanoacrylate glue (Super Glue Gel, Loctite, Westlake, OH, USA) and tested in  $\mu\text{TBS}$  using an EZ-Test machine (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) at a crosshead speed of 1 mm/min. The  $\mu\text{TBS}$  values were expressed in MPa by dividing the peak break force by the cross-sectional area of the bonded interface. The dimensions of the specimens were recorded using a digital caliper (Mitutoyo, Tokyo, Japan). Statistical analysis was carried out with SPSS 14.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Data from  $\mu\text{TBS}$  were examined with two-way ANOVA and Tukey's post hoc test. Statistical significance was set at a 95% confidence level.

Fractured specimens were examined with a stereomicroscope (Leica EZ4 HD, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Switzerland) at a magnification of 40 X. Failure modes were classified as adhesive (AD), mixed (M), and cohesive in composite (CC) or dentin (CD). Fractured specimens (both composite and dentin counterparts) with bond strength values closer to the mean of their respective groups were considered representative and further examined using FESEM. An independent operator that was not involved with the remaining of the study and blinded to the group assignment performed the FESEM analysis. Three specimens from each group were processed as described by Perdigão and colleagues,<sup>37</sup> and FESEM micrographs were collected using a Zeiss Supra 25 FESEM, operating at 5 kV, 10 mm aperture, and at a working distance of 10 mm (Carl Zeiss SMT, Inc., Peabody, MA, USA). FESEM micrographs were qualitatively analyzed.

### **Micro-Raman spectroscopy**

Micro-Raman spectroscopy was used to investigate the extent of resin infiltration into dentin. One additional tooth was prepared for each group, as previously described. Specimens were stored in distilled water at 37 °C for 24 h until being cut across the adhesive interface to obtain rectangular slabs (10 mm long x 2 mm thick x 2 mm wide).

Bonded specimens were wet polished with 600-, 800-, 1200-fine, and 1200-ultrafine grit SiC abrasive papers and then mirror polished with 6  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ , and 0.25  $\mu\text{m}$  diamond spray (Premium Grade Spray, Heavy Concentration, LECO) using a polishing cloth (Lecloth, LECO). All specimens were ultrasonically cleaned in distilled water for 15 min and then stored in a dry and light-free environment until use.

Spectral data from the adhesive/dentin interfaces were compared with reference spectra recorded from the pure adhesive and sound dentin. Raman spectra of sound dentin and adhesive were recorded as references for each obtained spectra. The acquired spectra in the region of interest were analyzed using a curve-fitting program (LabSpec 5.78, HORIBA Jobin Yvon, Stanmore, Middlesex, UK), and the relative amounts of hydroxyapatite, adhesive resin, and organic substance in the dentin-resin interface were calculated. Adhesive specimens were mapped starting in the adhesive resin layer towards the sound mineralized dentin and the widths of resin-impregnated dentin layer, depth of demineralization, and percentage of adhesive as a function of spatial position across the dentin interface were determined. One Raman spectrum was collected every 0.5  $\mu\text{m}$ -interval.

Micro-Raman spectra were recorded using a Horiba LabRam HR Raman microprobe (HORIBA Jobin Yvon). The instrument uses an 800 mm monochromator equipped with a 600-gr/mm grating. The instrument is coupled to an Olympus BX series microscope equipped with a 100 X objective for sample viewing and spectral collection. A 663 nm HeNe laser was used for excitation. The measured laser power at the sample was 4 mW. The samples were mapped using a motorized x-y-z stage. The accumulation time for all maps was set to 0.5 s per pixel with two accumulations per pixel. The monochromator slit width was set to 150  $\mu\text{m}$ . Spectra were collected using a Horiba Synapse 1024 x 256 pixel CCD detector over the spectral region of 668-1788  $\text{cm}^{-1}$ .

The results were analyzed by calculating the mean and standard deviation for each adhesive system. The data were subjected to one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.



## RESULTS

The  $\mu$ TBS results are presented in Table 3 and the respective failure modes are summarized in Table 4. Two-way ANOVA indicated statistical significance in the interaction adhesive-aging ( $p = 0.0000$ ). Bond strengths were affected by adhesive ( $p = 0.0000$ ) but not affected by mechanical loading ( $p = 0.6188$ ). The pre-etching (etch-and-rinse approach) treatment was significant for AB ( $p < 0.05$ ). Mean bond strengths ranged from 35.2 (PLP) to 57.5 (SU, etch-and-rinse mode [Er]) at baseline to 12.7 (PLP) to 65.2 (SU-Er) after mechanical loading. Comparisons among groups are detailed in Table 3.

The Raman spectra for dentin as well as for all adhesives are presented in Fig. 1. The intense peak at  $959\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) is associated with the mineral apatite component of dentin, and major bands associated with organic components of dentin (collagen matrix) occur at  $1248\text{ cm}^{-1}$  (amide III),  $1451\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ), and  $1670\text{ cm}^{-1}$  (amide I). The similarity between the reference spectra of the adhesives reflects their identical hydrophilic diglycidyl methacrylate (Bis-GMA) and hydrophobic hydroxyethyl methacrylate (HEMA) components. The intense bands associated with the methacrylate monomers occur at  $1113\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C),  $1453\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ),  $1608\text{ cm}^{-1}$  (Phenyl C=C), and  $1719\text{ cm}^{-1}$  (carbonyl). Particularly, the bands at  $1113$  and  $1608\text{ cm}^{-1}$  are associated with the Bis-GMA monomer, while the band at  $1453\text{ cm}^{-1}$  is associated to HEMA. The Raman intensities at  $959$ ,  $1113$ ,  $1453$  and  $1670\text{ cm}^{-1}$ , were used to display the distributions of the phosphate mineral, adhesive (both Bis-GMA and HEMA) and collagen across the adhesive/dentin interface, respectively.

The intensity of Raman bands attributed to the adhesive decreased as a function of depth, indicating the gradual decrease of adhesive infiltration into demineralized dentin. Comparisons of the depth of dentin demineralization and adhesive infiltration in each adhesive group are summarized in Table 5. A comparison of relative infiltration of the universal and control adhesives as a function of position across the a/d interface is presented in Figures 2 and 3. The mean values of the infiltration ratio of the adhesive systems decreased dramatically from the top to the bottom of the hybrid layer: SU-Se (45 to 10%), SU-Er (84 to 18%), AB-Se (66 to 4%), AB-Er (76 to 24%), OFL (52 to 30%), SBP (56 to 10%), CSE (56 to 8%) and PLP (68 to 10%).

Failure mode analysis showed over 54% of the failures as AD

and that was equally distributed among groups (Fig.4). After mechanical loading, the highest incidence of CD was observed in the SU-Er (40%), SU-Se (self-etch mode, 31%), and AB-Er (24%) groups (Fig.5). All failures were adhesive for PLP (100%) (Fig.6).

## DISCUSSION

This study assessed the *in vitro* bonding performance of two recently launched universal dental adhesives by combining mechanical loading,  $\mu$ TBS, and micro-Raman experiments. Results showed reduced  $\mu$ TBS for AB in the self-etch mode compared to etch-and-rinse mode, both at 24 h and after artificial aging. Therefore, the hypothesis has been partially rejected.

Clinically, adhesive restorations are subjected to mechanical loading during mastication and that may result in crack formation at the interface, which challenges the long-term survival of the restoration. Several laboratory investigations have reported that accelerated aging through mechanical loading can challenge the dentin/adhesive interface.<sup>14, 16-19, 38</sup> In the present study, composite build-ups were subjected to 50,000 cycles of 50 N-load. A force of 50 N was applied to the mid-point of the occlusal surface of the restoration and the frequency of mechanical loading was set to 0.5 Hz, which is within the range of those encountered under clinical situations.<sup>39-42</sup> Yet, results showed no effect on  $\mu$ TBS with the exception of PLP, which presented a decrease of 36% in  $\mu$ TBS after mechanical loading. Studies where PLP was subjected to artificial (water) aging have shown reductions in  $\mu$ TBS of 63% after 2 years<sup>43</sup> and 36% after three years.<sup>44</sup> Reasons for its poor performance may be: (1) inability to fully polymerize; (2) deficient wetting of the tooth surface; (3) potential phase separation; (4) low hydrolytic stability; and (5) lack of stable chemical interaction with exposed collagen.<sup>32, 45-49</sup> No report on the effects of mechanical loading on bonding durability of PLP could be found. Likewise, no studies have reported the effects of mechanical loading on dentin  $\mu$ TBS of three-step etch-and-rinse adhesives. Nevertheless, at least one study has shown OFL to be stable after artificial aging.<sup>50</sup>

Mechanical loading has been applied for evaluation of the two-step etch-and-rinse SBP and the two-step self-etch CSE. A significant reduction in dentin  $\mu$ TBS for SBP was found (43.3 to 28.2 MPa) after loading for 5,000 cycles under 90 N,<sup>18</sup> which is not in agreement with findings of the current study. Variations in experimental conditions, specimen preparation, and loading conditions may have affected the results. A potential explanation for the stable  $\mu$ TBS of SBP in our study is the presence of polyalkenoic acid copolymer in the adhesive, which has been shown to improve its bonding efficacy.<sup>11, 50, 51</sup> Similarly, the two-step self-etch CSE did not have a reduction in  $\mu$ TBS after mechanical loading in our study. CSE presented increased mean  $\mu$ TBS

after aging, which may be at least partially attributed to the chemical interaction of 10-MDP in its composition with residual hydroxyapatite.<sup>10, 52</sup> Another study with a self-etch adhesive (Clearfil Linerbond, Kuraray) with similar composition has shown that no reduction in bond strengths after mechanical loading.<sup>14</sup> That study suggested that the composite build-up might function as stress absorber distributing forces during the mechanical loading.

The adhesives of focus in the present study were self-etch adhesives that contain 10-MDP in their compositions. Concerns regarding pre-etching of dentin prior to self-etch adhesive application have been raised<sup>7-9</sup> as incomplete infiltration of the deeply demineralized collagen network by the bonding resin may compromise bond strengths. Yet, and in agreement with previous studies,<sup>1, 2, 4</sup> our study shows that phosphoric acid etching of dentin prior to usage of universal adhesives does not lower bond strengths of the test adhesives. In fact, using the adhesive in the etch-and-rinse mode increased bond strengths of All-Bond Universal, as has been shown by Munoz and colleagues.<sup>4</sup> In agreement with our study is the lack of difference between application modes of SU.<sup>2</sup>

The results of the present study also showed no effect of mechanical loading on  $\mu$ TBS of both universal adhesives. Another publication has shown decrease in  $\mu$ TBS of SU after 1 year of aging in artificial saliva, irrespective of application mode.<sup>6</sup> More recently, another research group reported incidence of clinical failures no greater than 10% after 18 months of clinical observation, irrespective of the bonding approach used.<sup>5</sup> The bonding effectiveness of this adhesive may thus be the result of a twofold mechanism: micro-mechanical interlocking at the dentin surface and chemical bonding between the functional monomer 10-MDP and residual apatite on the collagen fibrils.<sup>8, 13, 53, 54</sup> Apart from the etching ability<sup>10</sup> and chemical bonding of 10-MDP, the good performance of this adhesive may be ascribed to the affinity of polyalkenoic acid copolymer for calcium in hydroxyapatite. That results in additional chemical bonding, which may contribute to the stability and longevity of the bond.<sup>11-13, 18</sup>

In an attempt to explain the bond strength data, micro-Raman analysis of the bonded interfaces was carried out. Raman spectra were recorded along line scans perpendicular to the bonded interface, avoiding resin tags. The discrepancy between the depth of demineralization and that of resin monomer infiltration in the intertubular regions of the adhesive/dentin interfaces were clearly observed for etch-and-rinse control adhesives. Results have confirmed

that adhesive penetration for etch-and-rinse systems is always less than the extent of dentin demineralization.<sup>22, 23, 55</sup> The lack of complete infiltration throughout demineralized dentin with etch-and-rinse adhesive systems can be attributed to a variety of factors, including adhesive phase separation. With “wet-bonding” approach, the spaces between the demineralized collagen fibrils are filled with water and the adhesive may separate into hydrophobic Bis-GMA-rich and hydrophilic HEMA-rich phases as it interacts with water.<sup>56</sup> Therefore, the hydrophobic Bis-GMA monomer would resist diffusing into water-rich sites<sup>56, 57</sup> and lead to a porous hybrid layer characterized by a minimal amount of the Bis-GMA distributed in a hydrophilic HEMA-rich matrix. HEMA is unstable in aqueous environment, and thus, may degrade when exposed to oral fluids over the long term.<sup>32, 50</sup> In contrast, the extent of adhesive penetration with self-etch systems, CSE (4.0  $\mu\text{m}$ ) and PLP (5.0  $\mu\text{m}$ ), was identical to the extent of dentin demineralization. This is in agreement with the findings of previous micro-Raman investigations.<sup>22, 24, 25</sup>

When  $\mu\text{TBS}$  and micro-Raman results are interpreted together, no relationship was observed between adhesive penetration and bond strength. Also, the “double etching” of dentin (by phosphoric-acid etching and self-etching by functional monomers) did not influence bond strength adversely. For instance, SU used in self-etch or in etch-and-rinse mode, irrespective of the extent of adhesive infiltration, exhibited similar bond strength values, which may be a result of the chemical bonding ability of 10-MDP monomer and polyalkenoic acid copolymer to dentin.<sup>2</sup> On the other hand, AB adhesive in etch-and-rinse mode showed improved bond strength in comparison with the self-etch mode. The superior bonding effectiveness of AB in etch-and-rinse mode is attributed to a deeper etching pattern produced by additional phosphoric acid etching step that assures a better resin infiltration. Though different hybrid layer thickness was observed for AB adhesive groups, a correlation between dentin bond strength and adhesive infiltration was found. When AB was applied following self-etch or etch-and-rinse protocol, diffused  $\sim 2.0 \mu\text{m}$  and  $\sim 4.0 \mu\text{m}$  into the demineralized dentin, respectively. A relative higher percentage of adhesive was detected for AB in Er mode (24%) and lower for AB in Se mode (4%) at the bottom of the hybrid layer. It was reported that the magnitude of dentin bond strengths rely on the extent of resin infiltration into the collagen pretreated with an acidic monomers or with phosphoric acid conditioner.<sup>23-25, 58</sup>

With regard to failure patterns, all groups showed mostly adhesive

failures after loading, which indicate the loading stress is concentrated at the interface between the adhesive and the top or bottom of the hybrid layer.<sup>14</sup> The ratio of cohesive failure in dentin and mixed failure ranked the second highest failure pattern for all adhesives. When a relatively high  $\mu$ TBS was measured for SU and AB applied following etch-and-rinse approach, the specimens tended to fail cohesively in dentin. Therefore, this observation indicates that actual bonding effectiveness of both universal adhesives was not assessed because the cohesive strength of the dentin itself was lower than the interfacial bond strength. This means that “double etching” causes deeper demineralization of dentin, which in turn meant that they were not capable of being completely infiltrated by resin monomers. Some studies suggested that the failure was likely to be initiated in this weakest zone, leading to decreased bond strength.<sup>59, 60</sup> Therefore, this finding does not agree with the results of the present study. The presence of a demineralized dentin zone has little adverse effect on the bond strength.

## CONCLUSIONS

With the limitations of this study the bonding effectiveness of universal adhesives may be improved by pre-etching the dentin surface with phosphoric acid, which should not negatively affect adhesion. The infiltration of resin monomers into demineralized dentin may produce a gradual adhesive infiltration with the highest concentration at the adhesive surface, lower concentration in the middle of the hybrid layer, and little adhesive in the deepest portion of the demineralized zone.

### *Acknowledgements*

The authors report no conflict of interest and wish to thank Dr. Mark Sparrow for micro-Raman spectroscopy assistance and also, to thank Dr. Lee Boushell for Fe-SEM assistance. The study was partially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ID: 9859/11-0.



TABLES

Table 1 - Materials, batch numbers and compositions of adhesives tested.	
Adhesive system	Composition
Scotchbond Universal <i>Universal adhesive</i> <i>Lot.41453, pH: 2.7</i> 3M ESPE, St Paul, MN, USA	MDP phosphate monomer, dimethacrylate resins, HEMA, vitrebond copolymer (acrylic and itaconic acid), filler, ethanol, water, initiators, silane
All Bond Universal <i>Universal adhesive</i> <i>Lot.1200004676, pH &gt; 3</i> Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA	MDP phosphate monomer, Bis-GMA, HEMA, ethanol, water, initiators
Optibond FL <i>Three-step etch-and-rinse</i> <i>Primer: Lot.35265, pH:1.8</i> <i>Bond: Lot.35266</i> Kerr, Orange, CA, USA	<i>Primer:</i> HEMA, GPDM, ethanol, water, photoinitiator, BHT <i>Bond:</i> TEGDMA, UDMA, GPDM, GDMA, HEMA, Bis-GMA, filler, photoinitiator (CQ)
Adper Single Bond Plus <i>Two-step etch and rinse</i> <i>Lot. 322895, pH: 4.3</i> 3M ESPE St Paul, MN, USA	<i>Adhesive:</i> HEMA, water, ethanol, Bis-GMA, methacrylate functional copolymer of polyacrylic and poly(itaconic) acids, dimethacrylates, photoinitiator (CQ)
Clearfil SE Bond <i>Two-step self-etch</i> <i>Primer: Lot.01048A, pH: 2.0</i> <i>Bond: Lot.01567A</i> Kuraray, Osaka, Japan	<i>Primer:</i> 10-MDP, HEMA, dimethacrylate monomer, photoinitiator (CQ), water <i>Bond:</i> 10-MDP, HEMA, Bis-GMA, dimethacrylate monomer, microfiller, photoinitiator (CQ)
Adper Prompt L-Pop <i>One-step self-etch</i> <i>Lot.465223, pH: 0.7</i> 3M ESPE, St Paul, MN, USA	<i>Red blister:</i> Methacrylate, phosphoric esters, Bis-GMA, photoinitiator (CQ), stabilizers <i>Yellow blister:</i> Water, HEMA, polyalkenoic acid, stabilizers
Abbreviations: 10-MDP = 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate, HEMA = 2-hydroxyethyl methacrylate, Bis-GMA = bisphenol glycidyl methacrylate, GPDM = glycerol phosphate dimethacrylate, BHT = butylhydroxytoluene, GDMA = glycerol dimethacrylate, CQ = camphorquinone.	

**Table 2 - Application mode of the adhesives tested.**

<b>Adhesive system</b>	<b>Application mode</b>
Scotchbond Universal	<p><i>Self-etch mode (Se):</i> Adhesive rubbed with disposable applicator for 20 s. Solvents evaporated with water-free and oil-free air for about 5 s until no further adhesive movement noticed. Light cured for 10 s.</p> <p><i>Etch-and-rinse mode (Er):</i> Etchant applied for 15 s and rinsed thoroughly for 10 s. Surface left moist by blotting the dentin with a absorbent paper. Adhesive applied as for the self-etch mode.</p>
All Bond Universal	<p><i>Self-etch mode (Se):</i> Adhesive scrubbed in two separate coats with disposable applicator for 10-15 s per coat. Light-curing was not performed between coats. Solvents evaporated with water-free and oil-free air for about 10 s until no further adhesive movement noticed. Light cured for 10 s.</p> <p><i>Etch-and-rinse mode (Er):</i> Etchant applied for 15 s and rinsed thoroughly. Surface left moist by blotting the dentin with a absorbent paper. Adhesive applied as for the self-etch mode.</p>
Optibond FL	<p>Etchant applied for 15 s and rinsed for 15 s. Surface left moist by blotting the dentin with a absorbent paper; Primer rubbed for 15 s. After air-dried for 5 s, bond agent was applied for 15 s using the same applicator. Air-thinned for 3 s and light cured for 20 s.</p>
Adper Single Bond Plus	<p>Etchant applied for 15 s and rinsed for 10 s. Surface left moist by blotting the dentin with a absorbent paper. Adhesive applied in 2-3 consecutive coats with disposable applicator using light brush motion for 15 s. Air-dried for 5 s and light cured for 10 s.</p>
Clearfil SE Bond	<p>Primer applied with disposable applicator and left in place for 20 s. Solvents evaporated with water-free and oil-free air. Bond agent applied and air-thinned. Light cured for 20 s.</p>
Adper Prompt L-Pop	<p>Solution A and solution B mixed for 5 s. Adhesive rubbed with finger pressure using disposable applicator for 15 s and air-thinned. Light cured for 10 s.</p>

**Table 3 - Microtensile bond strength ( $\mu$ TBS) values (means  $\pm$  SD) and number of pre-testing failures (ptf). n=45.**

Groups	Baseline		After cyclic loading	
	$\mu$ TBS (Mpa)	ptf/n	$\mu$ TBS (Mpa)	ptf/n
Scotchbond Universal-Se	46.9 $\pm$ 7.9 <sup>A,a,b,c</sup>	1/45	52.6 $\pm$ 10.1 <sup>A,a,b</sup>	1/45
Scotchbond Universal-Er	57.5 $\pm$ 2.7 <sup>A,a</sup>	0/45	65.2 $\pm$ 5.0 <sup>B,a</sup>	0/45
All Bond-Se	37.5 $\pm$ 8.7 <sup>A,b,c</sup>	1/45	41.0 $\pm$ 9.8 <sup>A,b</sup>	3/45
All Bond-Er	57.3 $\pm$ 4.4 <sup>A,a</sup>	0/45	59.6 $\pm$ 10.2 <sup>A,a</sup>	1/45
Optibond FL	43.7 $\pm$ 7.2 <sup>A,a,b,c</sup>	0/45	49.7 $\pm$ 14.9 <sup>A,a,b</sup>	0/45
Adper Single Bond Plus	56.2 $\pm$ 7.8 <sup>A,a</sup>	0/45	51.0 $\pm$ 4.4 <sup>A,a,b</sup>	0/45
Clearfil SE Bond	53.2 $\pm$ 4.2 <sup>A,a,c</sup>	0/45	64.2 $\pm$ 4.1 <sup>B,a</sup>	0/45
Adper Prompt L-Pop	35.2 $\pm$ 13.6 <sup>A,b</sup>	1/45	12.7 $\pm$ 5.0 <sup>B,c</sup>	5/45

Same capital letters indicate similar means within rows ( $p < 0.05$ ).  
Same lowercase letters indicate similar means within columns ( $p < 0.05$ ).

**Table 4 - Failure mode analysis.**

Groups	Baseline				After cyclic loading			
	AD	CD	CC	M	AD	CD	CC	M
Scotchbond Universal-Se	26	0	8	11	27	14	0	4
Scotchbond Universal-Er	29	0	10	6	23	18	0	4
All Bond-Se	28	3	5	9	27	5	2	11
All Bond-Er	25	3	10	7	24	11	1	9
Optibond FL	21	7	8	9	20	10	1	14
Adper Single Bond Plus	23	11	5	6	28	9	3	5
Clearfil SE Bond	26	3	10	6	15	18	9	3
Adper Prompt L-Pop	30	0	3	12	45	0	0	0

AD: failure at adhesive interface; CD: cohesive failure in dentin; CC: cohesive failure in composite; and M: failure at adhesive interface including dentin and/or composite.

**Table 5 - The depth of adhesive infiltration, dentin demineralization and dentin not infiltrated in  $\mu$ m.**

Adhesive group	Adhesive infiltration	Dentin demineralization	Dentin not infiltrated
SU-Se	2.5	3.5	1.0
SU-Er	5.0	8.5	3.5
AB-Se	2.0	2.0	0.0
AB-Er	4.0	6.5	2.5
OFL	3.5	5.0	2.5
SBP	3.5	4.5	1.0
CSE	4.0	4.0	0.0
PLP	5.0	5.0	0.0



FIGURES

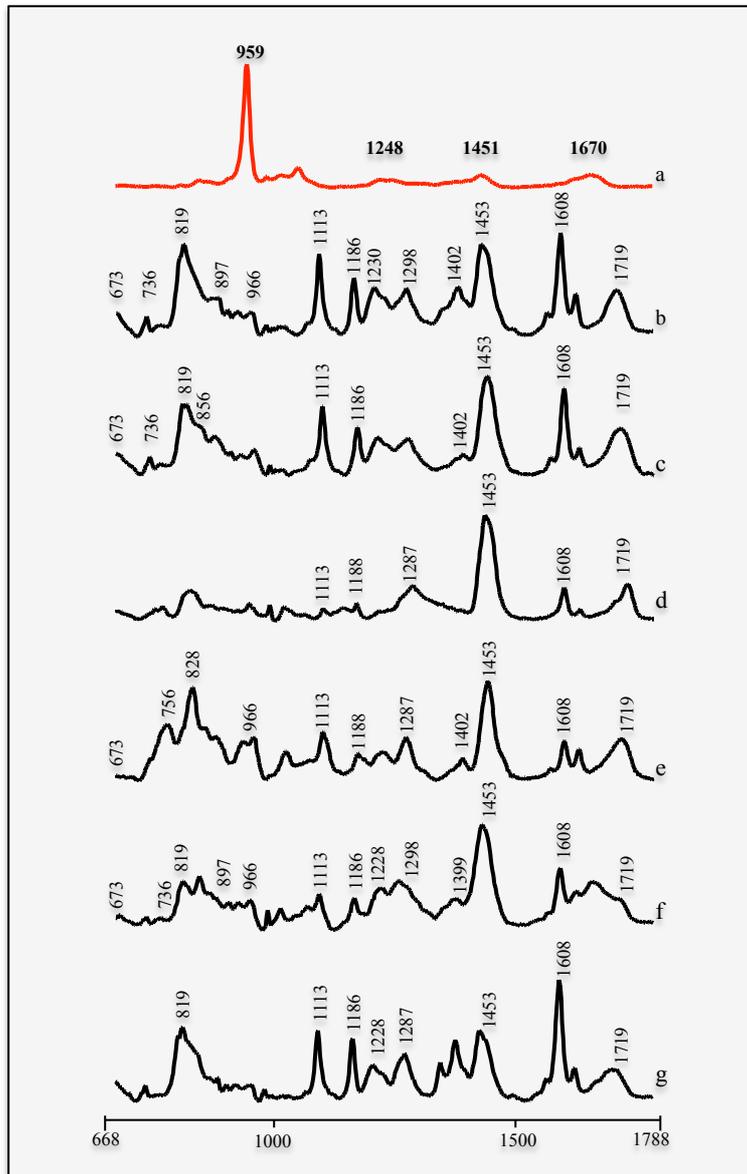


Figure 1 – Raman reference spectra for dentin (a), Optibond FL (b), Adper Single Bond Plus (c), Clearfil SE Bond (d), Adper Prompt L-Pop (e), Scotchbond Universal (f) and All Bond Universal (g).

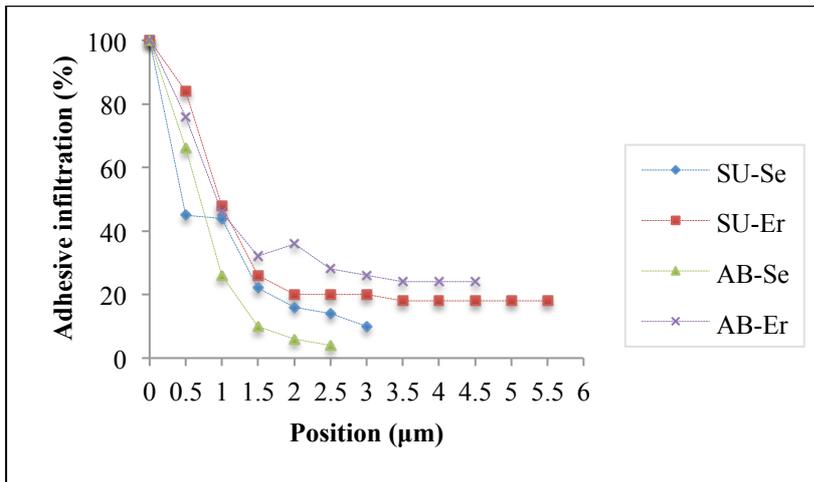


Figure 2 – Percent of universal adhesives as a function of spatial position across the adhesive/dentin interface. The position at 0.5 µm represents the start of the hybrid layer, while the last position to the right represents the beginning of mineralized dentin.

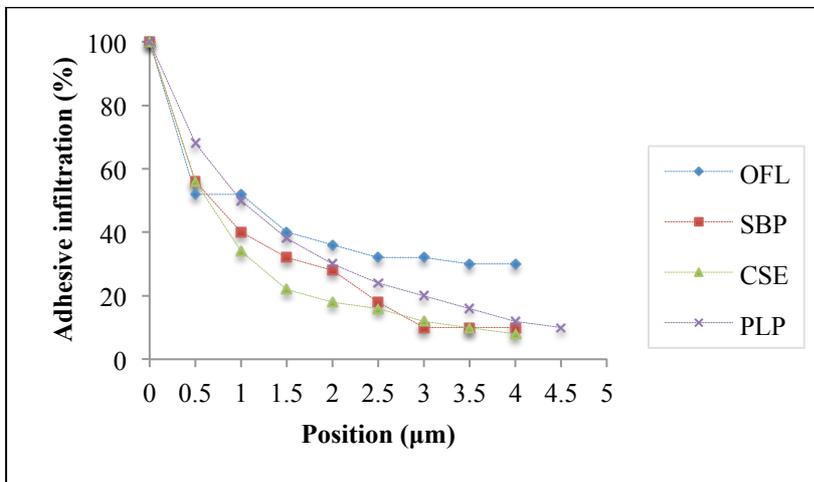


Figure 3 – Percent of control adhesives as a function of spatial position across the adhesive/dentin interface. The position at 0.5 µm represents the start of the hybrid layer, while the last position to the right represents the beginning of mineralized dentin.

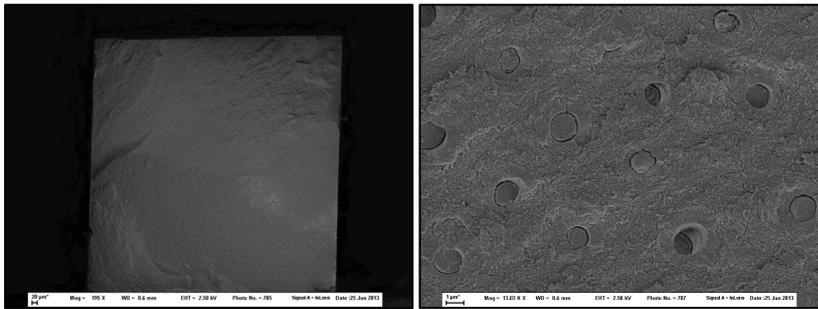


Figure 4 – Representative FESEM micrographs of debonded dentin surface of a specimen bonded with SBP after load cycling. (A) An adhesive failure is more evident. (B) High magnification showing fractured resin tags; the failure occurred at the top of the hybrid layer.

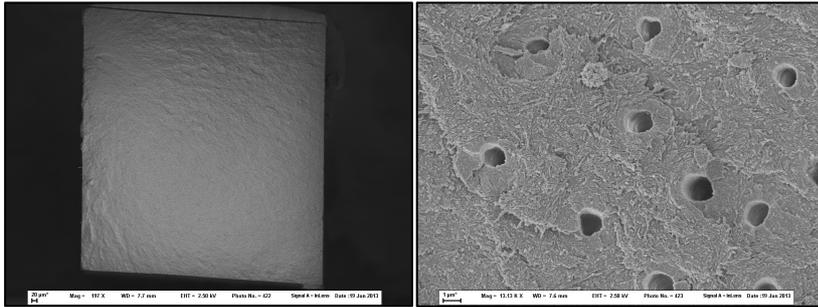


Figure 5 – Representative FESEM micrographs of debonded specimen bonded with SU-Er after load cycling. (A) A cohesive failure in dentin may be observed below the hybrid layer. (B) High magnification showing non-infiltrated dentin.

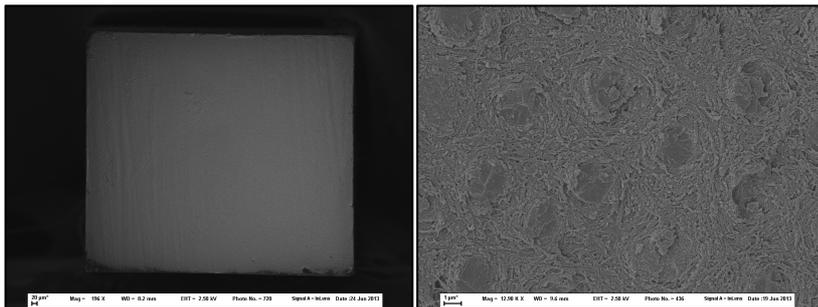


Figure 6 – Representative FESEM micrographs of debonded specimen bonded with PLP after load cycling. (A) Typical adhesive failure; the failure of the top of the hybrid layer occurred over the entire debonded surface. (B) High magnification showing resin-filled dentinal tubules.



## REFERENCES

1. Hanabusa M, Mine A, Kuboki T, Momoi Y, Van Ende A, Van Meerbeek B, et al. Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. *J Dent* 2012;**40**:475-84.
2. Perdigao J, Sezinando A, Monteiro PC. Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. *Am J Dent* 2012;**25**:153-8.
3. Mena-Serrano A, Kose C, De Paula EA, Tay LY, Reis A, Loguercio AD, et al. A new universal simplified adhesive: 6-month clinical evaluation. *J Esthet Restor Dent* 2013;**25**:55-69.
4. Munoz MA, Luque I, Hass V, Reis A, Loguercio AD, Bombarda NH. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent* 2013;**41**:404-11.
5. Perdigao J, Kose C, Mena-Serrano A, De Paula E, Tay L, Reis A, et al. A New Universal Simplified Adhesive: 18-Month Clinical Evaluation. *Oper Dent* 2013.
6. Marchesi G, Frassetto A, Mazzoni A, Apolonio F, Diolosa M, Cadenaro M, et al. Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-Year in vitro study. *J Dent* 2013.
7. Torii Y, Itou K, Nishitani Y, Ishikawa K, Suzuki K. Effect of phosphoric acid etching prior to self-etching primer application on adhesion of resin composite to enamel and dentin. *Am J Dent* 2002;**15**:305-8.
8. Van Landuyt KL, Kanumilli P, De Munck J, Peumans M, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Bond strength of a mild self-etch adhesive with and without prior acid-etching. *J Dent* 2006;**34**:77-85.
9. Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater* 2001;**17**:296-308.
10. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res* 2004;**83**:454-8.
11. Loguercio AD, Bittencourt DD, Baratieri LN, Reis A. A 36-month evaluation of self-etch and etch-and-rinse adhesives in noncarious cervical lesions. *J Am Dent Assoc* 2007;**138**:507-14; quiz 35-7.

12. Ritter AV, Swift EJ, Jr., Heymann HO, Sturdevant JR, Wilder AD, Jr. An eight-year clinical evaluation of filled and unfilled one-bottle dental adhesives. *J Am Dent Assoc* 2009;**140**:28-37; quiz 111-2.
13. Peumans M, De Munck J, Van Landuyt KL, Poitevin A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Eight-year clinical evaluation of a 2-step self-etch adhesive with and without selective enamel etching. *Dent Mater* 2010;**26**:1176-84.
14. Nikaido T, Kunzelmann KH, Chen H, Ogata M, Harada N, Yamaguchi S, et al. Evaluation of thermal cycling and mechanical loading on bond strength of a self-etching primer system to dentin. *Dent Mater* 2002;**18**:269-75.
15. Bedran-de-Castro AK, Cardoso PE, Ambrosano GM, Pimenta LA. Thermal and mechanical load cycling on microleakage and shear bond strength to dentin. *Oper Dent* 2004;**29**:42-8.
16. Frankenberger R, Pashley DH, Reich SM, Lohbauer U, Petschelt A, Tay FR. Characterisation of resin-dentine interfaces by compressive cyclic loading. *Biomaterials* 2005;**26**:2043-52.
17. Osorio R, Toledano M, Osorio E, Aguilera FS, Tay FR. Effect of load cycling and in vitro degradation on resin-dentin bonds using a self-etching primer. *J Biomed Mater Res A* 2005;**72**:399-408.
18. Toledano M, Osorio R, Albaladejo A, Aguilera FS, Tay FR, Ferrari M. Effect of cyclic loading on the microtensile bond strengths of total-etch and self-etch adhesives. *Oper Dent* 2006;**31**:25-32.
19. Belli S, Ozcopur B, Yesilyurt C, Bulut G, Ding X, Dorsman G. The effect of loading on microTBS of four all-in-one adhesives on bonding to dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;**91**:948-56.
20. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982;**16**:265-73.
21. Van Meerbeek B, Dhem A, Goret-Nicaise M, Braem M, Lambrechts P, VanHerle G. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. *J Dent Res* 1993;**72**:495-501.
22. Santini A, Miletic V. Quantitative micro-Raman assessment of dentine demineralization, adhesive penetration, and degree of conversion of three dentine bonding systems. *Eur J Oral Sci* 2008;**116**:177-83.
23. Spencer P, Wang Y, Walker MP, Wieliczka DM, Swafford JR. Interfacial chemistry of the dentin/adhesive bond. *J Dent Res* 2000;**79**:1458-63.

24. Wang Y, Spencer P. Physiochemical interactions at the interfaces between self-etch adhesive systems and dentine. *J Dent* 2004;**32**:567-79.
25. Sato M, Miyazaki M. Comparison of depth of dentin etching and resin infiltration with single-step adhesive systems. *J Dent* 2005;**33**:475-84.
26. Miyazaki M, Onose H, Moore BK. Analysis of the dentin-resin interface by use of laser Raman spectroscopy. *Dent Mater* 2002;**18**:576-80.
27. Van Meerbeek B, Van Landuyt K, De Munck J, Hashimoto M, Peumans M, Lambrechts P, et al. Technique-sensitivity of contemporary adhesives. *Dent Mater J* 2005;**24**:1-13.
28. Kubo S, Kawasaki K, Yokota H, Hayashi Y. Five-year clinical evaluation of two adhesive systems in non-carious cervical lesions. *J Dent* 2006;**34**:97-105.
29. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater* 2011;**27**:1-16.
30. Perdigao J, Dutra-Correa M, Saraceni CH, Ciaramicoli MT, Kiyan VH, Queiroz CS. Randomized clinical trial of four adhesion strategies: 18-month results. *Oper Dent* 2012;**37**:3-11.
31. Peumans M, De Munck J, Van Landuyt KL, Poitevin A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. A 13-year clinical evaluation of two three-step etch-and-rinse adhesives in non-carious class-V lesions. *Clin Oral Investig* 2012;**16**:129-37.
32. Shirai K, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Lambrechts P, Suzuki K, et al. Effect of cavity configuration and aging on the bonding effectiveness of six adhesives to dentin. *Dent Mater* 2005;**21**:110-24.
33. Perdigao J, Lambrechts P, van Meerbeek B, Tome AR, Vanherle G, Lopes AB. Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. *Dent Mater* 1996;**12**:262-71.
34. Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, et al. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater* 1994;**10**:236-40.
35. Shono Y, Ogawa T, Terashita M, Carvalho RM, Pashley EL, Pashley DH. Regional measurement of resin-dentin bonding as an array. *J Dent Res* 1999;**78**:699-705.
36. De Munck J, Mine A, Vivan Cardoso M, De Almeida Neves A, Van Landuyt KL, Poitevin A, et al. Effect of dentin location and long-term water storage on bonding effectiveness of dentin adhesives. *Dent Mater J* 2011;**30**:7-13.

37. Perdigao J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G, Lopes AL. Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. *J Biomed Mater Res* 1995;**29**:1111-20.
38. Bedran-de-Castro AK, Pereira PN, Pimenta LA, Thompson JY. Effect of thermal and mechanical load cycling on microtensile bond strength of a total-etch adhesive system. *Oper Dent* 2004;**29**:150-6.
39. De Boever JA, McCall WD, Jr., Holden S, Ash MM, Jr. Functional occlusal forces: an investigation by telemetry. *J Prosthet Dent* 1978;**40**:326-33.
40. Bates JF, Stafford GD, Harrison A. Masticatory function - a review of the literature. III. Masticatory performance and efficiency. *J Oral Rehabil* 1976;**3**:57-67.
41. Schindler HJ, Stengel E, Spiess WE. Feedback control during mastication of solid food textures--a clinical-experimental study. *J Prosthet Dent* 1998;**80**:330-6.
42. Bates JF, Stafford GD, Harrison A. Masticatory function-a review of the literature: (II) Speed of movement of the mandible, rate of chewing and forces developed in chewing. *J Oral Rehabil* 1975;**2**:349-61.
43. Walter R, Swift EJ, Jr., Nagaoka H, Chung Y, Bartholomew W, Braswell KM, et al. Two-year bond strengths of "all-in-one" adhesives to dentine. *J Dent* 2012;**40**:549-55.
44. Loguercio AD, Stanislawczuk R, Mena-Serrano A, Reis A. Effect of 3-year water storage on the performance of one-step self-etch adhesives applied actively on dentine. *J Dent* 2011;**39**:578-87.
45. Wang Y, Spencer P. Continuing etching of an all-in-one adhesive in wet dentin tubules. *J Dent Res* 2005;**84**:350-4.
46. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent* 2003;**28**:215-35.
47. Van Landuyt KL, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, et al. Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. *J Dent Res* 2005;**84**:183-8.
48. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent* 2002;**30**:371-82.
49. Yoshioka M, Yoshida Y, Inoue S, Lambrechts P, Vanherle G, Nomura Y, et al. Adhesion/decalcification mechanisms of acid interactions with human hard tissues. *J Biomed Mater Res* 2002;**59**:56-62.

50. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003;**82**:136-40.
51. Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, Snauwaert J, Hellems L, Lambrechts P, et al. Evidence of chemical bonding at biomaterial-hard tissue interfaces. *J Dent Res* 2000;**79**:709-14.
52. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, M Jd, K LV. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater* 2011;**27**:17-28.
53. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res* 2005;**84**:118-32.
54. Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, et al. Self-assembled Nano-layering at the Adhesive interface. *J Dent Res* 2012;**91**:376-81.
55. Van Meerbeek B, Mohrbacher H, Celis JP, Roos JR, Braem M, Lambrechts P, et al. Chemical characterization of the resin-dentin interface by micro-Raman spectroscopy. *J Dent Res* 1993;**72**:1423-8.
56. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res* 2002;**62**:447-56.
57. Wang Y, Spencer P, Yao X. Micro-Raman imaging analysis of monomer/mineral distribution in intertubular region of adhesive/dentin interfaces. *J Biomed Opt* 2006;**11**:024005.
58. Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int* 1993;**24**:618-31.
59. Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H, Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater* 2000;**16**:406-11.
60. Tay FR, Carvalho RM, Yiu CK, King NM, Zhang Y, Agee K, et al. Mechanical disruption of dentin collagen fibrils during resin-dentin bond testing. *J Adhes Dent* 2000;**2**:175-92.