



UNICAMP

CÍNTIA TEREZA PIMENTA DE ARAÚJO

**“USE OF FLUORESCENCE IN THE PERFORMANCE EVALUATION OF
ADHESIVE SYSTEMS”**

**“USO DA FLUORESCÊNCIA NA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE
SISTEMAS ADESIVOS”**

PIRACICABA
2013



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CÍNTIA TEREZA PIMENTA DE ARAÚJO

**“USE OF FLUORESCENCE IN THE PERFORMANCE EVALUATION OF
ADHESIVE SYSTEMS”**

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Maffei Sartini Paulilo

**“USO DA FLUORESCÊNCIA NA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE
SISTEMAS ADESIVOS”**

Doctorate thesis presented to the Piracicaba School of Dentistry of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Dental Clinic in the Operative Dentistry area.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de doutora em Clínica Odontológica na área de Dentística.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. LUIS ALEXANDRE
MAFFEI SARITNI PAULILLO.

Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Ar15u	<p>Araújo, Cíntia Tereza Pimenta de, 1968- Uso da fluorescência na avaliação do comportamento de sistemas adesivos / Cíntia Tereza Pimenta de Araújo. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Luis Alexandre Maffei Sartinni Paulillo. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Corantes fluorescentes. 2. Microscopia confocal. 3. Propriedades físicas. 4. Resistência à tração. I. Paulillo, Luis Alexandre Maffei Sartini, 1962- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p>
-------	--

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Use of fluorescence in the performance evaluation of adhesive systems

Palavras-chave em Inglês:

Fluorescent dyes

Microscopy confocal

Physical properties

Tensile strength

Área de concentração: Dentística

Titulação: Doutora em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Luis Alexandre Maffei Sartinni Paulillo [Orientador]

Andreza Dayrell Gomes da Costa

Adriana Maria Botelho

Altair Antoninha Del Bel Cury

Débora Alves Nunes Leite Lima

Data da defesa: 15-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 15 de Fevereiro de 2013, considerou a candidata CÍNTIA TEREZA PIMENTA DE ARAÚJO aprovada.


Prof. Dr. LUIS ALEXANDRE MAFFEI SARTINI PAULILLO


Profa. Dra. ANDREZA DAURELL GOMES DA COSTA


Profa. Dra. ADRIANA MARIA BOTELHO


Profa. Dra. ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY


Profa. Dra. DEBORA ALVES NUNES LEITE LIMA

DEDICATÓRIA

Com muita fé e amor, dedico esta tese à Deus, por ter me proporcionado a oportunidade de chegar aqui e estar sempre presente me amparando nos momentos difíceis, me dando sempre muita força interior para superar as dificuldades.

A Mamãe e Papai, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhasse sem medo e cheios de esperanças.

Dedico esta conquista a vocês!
Expresso toda a minha gratidão pela longa espera e compreensão do meu retorno para agora retribuí-los dedicando integralmente aos dois proporcionando-lhes uma vida de qualidade, tornando menos árduo os dissabores do envelhecimento.

À minha Gabriela, que por existir transforma os meus sonhos em realidade!
É você que me impulsiona a correr atrás dos meus objetivos, me inspira a evoluir, e que pra sempre vou viver.

Obrigada por colocar um sorriso no meu rosto em qualquer dificuldade.

Obrigada por não se acomodar diante das suas inquietudes e por isso ser tão complexa, quase completa...

Obrigada por ser uma heroína, um ícone de ser humano em minha vida.
A você que eu amo a cada segundo, o dia todo, todos os dias dedico não só esta vitória, dedico a minha vida, e minha alma.

DEDICATÓRIA

Ao meu companheiro e protetor José Marques que sempre se doou por inteiro fazendo de tudo para que minha vida seja regada de alegria, conforto e amor.

Sei que muitas vezes renunciou aos seus sonhos, para que, pudesse realizar os meus, mas está cada vez mais perto de juntarmos os nossos sonhos.

Você tem um papel crucial nesta minha conquista, esta vitória também é sua!

A minha Família: Luís, Soraiá, Patrícia, Karina, Maurílio, Carol, Camila, Luis Otávio, Luiz Henrique, Marco, Pietro, Guilherme, João Pedro e Luis Felipe, vocês são fonte de toda minha energia e paz, pois é na minha família que encontro os abraços mais quentes, o companheirismo, as amizades mais peraltas que me faz voltar à infância.

Vocês contribuíram muito para que eu pudesse chegar até aqui

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Alexandre Maffei Sartini Paulillo, destaco em especial, agradecimentos sinceros pela confiança e respeito que sempre demonstrou pelos meus propósitos e meu trabalho.

Obrigada pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que eu sou. Obrigada por me incentivar dia a dia, fortalecendo-me ora com suas sábias palavras no papel de orientador, ora com palavras encorajadoras e o carinho de suas mensagens sempre oportunas no papel de amigo.

Tenho por você um profundo respeito que suplantou a função de orientador, e passou a ser de um verdadeiro amigo. Pois entendo que aquele que está sempre pronto a apoiar-nos, que não hesita em expressar o seu ponto de vista, mesmo que em alguns momentos não concorde plenamente com o que estamos a pensar ou fazer, apenas com o intuito de iluminar um pouco mais o nosso caminho vai além de orientador!

Quero que saibas que tenho sempre pensamentos positivos em relação às tuas ações e desejo de coração que fique BEM e tenhas muito sucesso, sempre.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP - nas pessoas do Diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Junior e Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Diretor Associado, pela oportunidade de realizar este trabalho nesta Instituição.

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos cedidos através do programa Pro-doutoral.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, pelo apoio na minha liberação, sem o qual não poderia estar aqui neste momento.

Ao Departamento de Odontologia, em especial ao Prof Paulo César Lacerda, chefe do Departamento e Prof^a Luciara Leão Viana (Sub-chefe) pelo apoio irrestrito proporcionado sem nenhum óbice para manter-me afastada para finalizar o doutorado.

À Prof^a Dr^a Maria Helena por conduzir os assuntos correlatos a disciplina sob nossa responsabilidade, durante todo o período da minha ausência.

Aos professores da Área de Dentística da UNICAMP, por todos os seus ensinamentos, e acima de tudo, pela amizade, compreensão, incentivo e apoio que me deram por todos esses anos.

Aos professores Dr Wander José da Silva, Dr^a Roberta Caroline Alonso e Dr Anderson Catelan pelo carinho e competência com que avaliaram este trabalho no exame de qualificação.

Ao Prof Dr Carlos Tadeu, com sua parcela de contribuição, auxiliando na Estatística.

Ao Prof Dr Wander José da Silva, pelo apoio incondicional e de extremo profissionalismo para a utilização do microscópio confocal.
Obrigada pelo seu carinho e amizade!

À Mônica pela amizade e atenção prestadas sempre atendendo prontamente e carinhosamente aos meus pedidos.

Aos colegas de doutorado, Adriano, Anderson, Bruno, Gisele Giuliana, Maria, Marina, e Tayane, obrigada pelas experiências compartilhadas e crescimento científico.

À minha Família que adotei na Dentística (Carlos Eduardo, Dayane, Diogo, Eduardo, Erick, Giovana, Giuliana, Lucinha, Marina, Natália) onde a amizade e o companheirismo são o carro-chefe de tanta harmonia. A convivência com vocês me faz sentir em casa e torna minha estadia extremamente prazerosa. Obrigada por estarem na minha vida!

Aos meus meninos:

. Diogo, meu filho hiperativo, você foi um presente em minha vida! Nunca vou esquecer quando me trouxe alento naqueles momentos tão difíceis que passei e que você ficou firme do meu lado não me deixando cair. Talvez você não pense assim mas nas situações em que eu não encontro as saídas e em muitos momentos de dúvida e incerteza, é você que me impulsiona para frente! Sei que a nossa amizade é verdadeira, e para todas as amizades verdadeiras o tempo nunca passa, as distâncias nunca existem. Obrigada por permitir que eu faça parte da sua vida!

. Lucinha, minha filha protetora! Você é um anjo doce que Deus enviou para me proteger. Todo o bem que alguém poderia receber, recebi de ti, pois com o seu coração enorme sempre arranjou motivos para me fazer sorrir! Sinto-me honrada por isto, pois sei que você é assim com as pessoas que ama. Vou-me embora mas tenha a certeza de que mesmo de longe sempre estarei por perto, torcendo por você, vibrando com as coisas boas e amparando-a nos momentos ruins.

. Larissa, minha filha delicada, de lacinhos e rendinhas! A vida nos permitiu a oportunidade de encontrarmos e aprendermos muito uma com a outra. Tenho muito orgulho de ver você conduzir tudo que te passei com tanto zelo e organização. Peço a Deus todos os dias para ter orientadas como você! Obrigada por todas as vezes que você me remeteu a Deus nos momentos de angústia. Obrigada pelo carinho com a Gabi.

A Núbia, nos pequenos gestos é que sentimos quão valioso é a presença marcante e fortalecedora nos acontecimentos mais inesperados das nossas vidas. Serei eternamente grata por todo apoio e carinho dado! Conte comigo sempre linda!

À minha amiga Andreza, obrigada pelo companheirismo de sempre, e por estar do meu lado mesmo depois de ter voltado. Saiba que sempre quando preciso de equilíbrio e sensatez encontro em você!

Ao Danielson e família, que independente de estar próximo demonstram apoio superando a distância com gestos nobres de manifestações amigas e concretas. Obrigada pelo carinho constante. Amo vocês!

Aos amigos da Dentística: Alan, Bia, Ciça, Henrique, Juliana Públio, Kamila, Priscila, Thiago, Maria Jordão e Milena pela amizade e companheirismo, sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos distantes, pela compreensão dos vários momentos de ausência, sem deixar apagar a chama da nossa amizade. Vocês estão presentes no meu coração!

A todos aqueles, que de uma forma indireta ou diretamente estiveram envolvidos em todo o processo. Meus sinceros agradecimentos, rogando a Deus que os ilumine, para que possam sempre transmitir a todos a grandiosidade de seus apoios, o que seguramente refletirá na diminuição das distorções sociais, tornando uma sociedade mais fraterna, humana e menos desigual.

“O homem vê-se continuamente agitado por desejos e arrependimentos. Sua alma jamais se vê satisfeita, seu espírito é ávido de bens efêmeros, sua vida passa entre a ignorância e a ambição. Mas, se o homem se inicia mediante a boa vontade, sua alma torna-se livre e feliz, seu espírito percorre caminhos até então desconhecidos, sua vida aspira somente a uma posse, a do conhecimento.

(Jesus de Nazareth)

RESUMO

A microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) é um recurso de visualização microscópica que permite a análise de materiais ou estruturas com requisitos mínimos de preparação de amostras de modo não destrutivo. Assim, os objetivos deste estudo foram: avaliar a influência da incorporação do corante fluorescente Rodamina B (R) nas propriedades mecânicas resistência coesiva (RC), módulo de elasticidade (ME) e resistência à flexão (RF) de 2 sistemas adesivos, o autocondicionante Clearfil SE Bond e o convencional Scotchbond Multi-Purpose (estudo 1); validar o método modificado de microtração (μ TBS), em que micro-amostras de secção transversal de $0,09 \text{ mm}^2$ foram testadas e verificar a influência da R na resistência à união a dentina e integridade interfacial através de microscopia confocal (estudo 2). Para avaliar a influência do corante, $0,16 \text{ mg/ml}$ de R foi incorporado aos adesivos constituindo assim dois grupos para cada adesivo: grupos dos adesivos corados e não corados totalizando 4 grupos experimentais. Para a análise da RC, E e RF, os corpos de prova foram confeccionados a partir de uma matriz de silicone por adição. Sobre a matriz, foram dispensados $10 \mu\text{L}$ de adesivo variando de acordo com cada grupo de adesivos corados e não corados. RC ($n= 10$), E e RF ($n= 5$) foram avaliadas em máquina de ensaio universal a $0,5 \text{ mm/min}$, até a ruptura da amostra. Para visualização em microscopia confocal e análise da resistência à união os adesivos foram aplicados à superfície plana da dentina oclusal de 32 pré-molares humanos. Após a realização dos procedimentos adesivos, realizou-se as restaurações (blocos de 16 mm^2) com Charisma Opal (Kulzer - cor A3). Em seguida, para a realização do teste modificado de microtração, micro-amostras em forma de palito (secção transversal $0,09 \text{ mm}^2$) foram confeccionadas. Previamente ao ensaio mecânico, foi realizada através de MVCL a análise micromorfológica das micro-amostras dos grupos de adesivos corados. Posteriormente a resistência à união foi mensurada através do ensaio modificado de microtração a velocidade de $0,5 \text{ mm/min}$ em máquina de ensaio universal. Os dados de todos os testes avaliados

foram submetidos a análise de variância dois fatores. Os resultados mostraram que o comportamento dos sistemas adesivos investigados não se modificou, independente da presença do corante, pois não foram observadas diferenças significativas nas propriedades mecânicas estudadas: resistência à união, resistência coesiva, resistência flexural, módulo de elasticidade, bem como a integridade interfacial. A preparação de micro-amostras não comprometeu os resultados do ensaio de resistência adesiva. De acordo com os resultados obtidos e análise dos parâmetros: coeficiente de variação, porcentagem de padrão de fratura e incidência de falhas prematuras, concluiu-se que o teste modificado de microtração foi considerado um método confiável para a avaliação da resistência à união de sistemas adesivos. A técnica de visualização microscópica confocal produziu informações detalhadas da interface adesiva e pode ser bem indicada para a avaliação da efetividade de união de sistemas adesivos. Desta forma, é possível associar ambas metodologias obtendo-se uma avaliação mais realista e confiável dos materiais restauradores.

Palavras-chave: corantes fluorescentes, propriedades físicas, resistência à tração, microscopia confocal

ABSTRACT

The confocal laser scanning microscopic (CLSM) is a tool of visualization that allows microscopic analysis of materials or structures labeled with fluorescent dyes with minimal requirements of specimen's preparation nondestructively. The aims of this study were: to evaluate the influence of incorporation of fluorescent dye Rhodamine B (R) in the properties mechanical: cohesive strength (CS), elastic modulus (E) and flexural strength (FS) of the self-etching Clearfil SE Bond and etch-and-rinse Scotchbond Multi-Purpose (Study 1); validating the modified microtensile method using micro-specimens cross section of 0.09 mm^2 (μTBS) and evaluate the influence of R in bond strength in dentin and interfacial integrity by confocal microscopy (study 2). To evaluate the influence of the dye, 0.16 mg/ml of R were incorporated into adhesives thus forming two groups for each adhesive: groups of labeled adhesives and no-labeled totaling 4 experimental groups. For the analysis of CS, E and FS the specimens were made from a silicone matrix. About the matrix were 10 μL dispensed adhesive varying according to each group of adhesives stained or not. CS (n = 10), E and FS (n = 5) were evaluated in a universal testing machine at 0.5 mm/min until failure of the specimen. For visualization in confocal microscopy and bond strength analysis (n = 8), the adhesives were applied to the occlusal dentine surface 32 of human premolars. After procedures adhesives, composite crowns approximately (16 mm^2) were built up with Charisma Opal (Kulzer - color A3). Then for testing modified microtensile, micro-specimens beam-shaped were prepared. Prior to mechanical testing micromorphological analysis of micro-sticks of the groups of labeled adhesives was performed using CLSM. Subsequently bond strength was measured using the modified microtensile test in a universal testing machine speed of 0.5 mm/min. The results showed that the behavior of the adhesive systems investigated did not change regardless of the presence of the dye, as there were no significant differences in mechanical properties studied: bond strength, tensile strength, flexural strength, modulus of elasticity, as well as interfacial integrity. The

preparation of micro-specimens did not affect the results of the bond strength test. According to the analysis results and parameters: coefficient of variation percentage of fracture pattern and incidence of early failures, it is concluded that the modified microtensile test was considered a reliable method for evaluating the bond strength of adhesive systems. The confocal microscopic visualization technique yielded detailed information of the adhesive interface and can be well suited for evaluating the effectiveness of adhesive systems. Thus, it is possible to associate both methods give a more realistic and reliable adhesive restoration on the presence of fluorescent dye.

Keywords: fluorescent dyes, physical properties, tensile strength, confocal microscopy

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1: <i>Influence of the use of fluorescing dye on mechanical properties of adhesive systems</i>	5
CAPÍTULO 2: <i>Bonding effectiveness analysis by confocal microscopy and modified microtensile method (μTBS)</i>	21
CONSIDERAÇÕES GERAIS	37
CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO	43

INTRODUÇÃO GERAL

A microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) é um recurso de visualização microscópica amplamente utilizado em pesquisas biológicas. Na Odontologia Restauradora pode ser utilizada para várias aplicações revelando importantes informações sobre restaurações adesivas (D'Alpino *et al.*, 2006c). O microscópio confocal apresenta características que lhe conferem clara vantagem sobre outras técnicas de visualização microscópica, pois através da MCVL é possível visualizar não só a superfície da amostra, mas também da subsuperfície a uma profundidade de aproximadamente 100µm (Watson, 1997). Este recurso dá a microscopia confocal um potencial técnico para a visualização, pois é possível produzir imagens tridimensionais mais precisas e detalhadas das estruturas dentárias quando comparadas com as análises bidimensionais.

Adicionalmente, requisitos mínimos são necessários para a preparação das amostras pois estas são analisadas sem vácuo e em ambiente úmido. Como as amostras não necessitam de preparações tão complexas, exclui-se a ocorrência de artefatos decorrentes da desidratação e contração sob alto vácuo necessários para microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Estes artefatos podem levar a uma possível subestimação da espessura e morfologia da camada híbrida (Bitter *et al.*, 2009).

A microscopia confocal associa princípios da microscopia óptica com a fluorescência, produzindo a partir da emissão de lasers de hélio-neônio e argônio, imagens fluorescentes de alta resolução (Watson, 1989 e 1991). Assim, para visualização em MCVL são utilizados marcadores fluorescentes específicos, também chamados de fluoró cromos. Os fluoró cromos são compostos por cores variadas que após absorverem a luz em um comprimento de onda (excitação), a reemitem em um comprimento de onda mais longo, de menor energia (emissão), produzindo desta forma fortes sinais fluorescentes, indicando sua presença e destacando o material ou substrato que foi corado (Watson, 1989). Este processo conhecido como fluorescência ocorre apenas durante a excitação, diferindo de fosforescência, em que a luz continua a ser emitida depois da excitação ter

cessado (Johnson, 1998)

A maioria dos fluoróchromos são excelentes traçadores, pois são solúveis em água e facilmente detectáveis, mesmo em baixa concentração (D'Alpino *et al.*, 2006c), entretanto a literatura não apresenta nenhuma concordância quanto a concentração ou tipo de corante utilizado (Watson, 1989; Griffiths & Watson, 1995, Pioch *et al.*, 1997, Schupbach *et al.*, 1997; Yoshikawa *et al.*, 2004; D'Alpino *et al.*, 2006b). Dentre os corantes a Rodamina B é o fluoróchromo mais utilizado nas diferentes aplicações em pesquisas odontológicas.

A Rodamina B pode ser utilizada, por exemplo, como marcador em testes de microinfiltração (Brunton *et al.*, 2004 e Almeida *et al.*, 2003) ou pode ser misturada aos componentes do adesivo para avaliações da qualidade da união. Acredita-se que a avaliação das estruturas coradas pode ser altamente melhorada quando os fluoróchromos são incorporados nas formulações dos materiais adesivos (Watson, 1997), pois permite a visualização da distribuição dos adesivos no interior dos túbulos dentinários, bem como é possível analisar a micromorfologia da interface de união entre materiais restauradores e estrutura dental, além disto, o corante misturado ao adesivo, previamente aos procedimentos adesivos, possibilita a comparação dentro do mesmo grupo, e a utilização de uma solução homogênea para todas as amostras (Schupbach *et al.*, 1997). Entretanto, a marcação de materiais restauradores com agentes fluorescentes, dependendo da concentração em que são utilizados, podem impedir a luz de alcançar os fotoiniciadores, por absorver a luz, reduzindo a possibilidade da formação polimérica e, conseqüentemente, interferir nas propriedades e comportamento destes materiais (D'Alpino *et al.*, 2006b). Assim, torna-se importante avaliar a influência da incorporação da Rodamina B no comportamento dos sistemas adesivos com relação às propriedades mecânicas e qualidade da interface adesiva em substrato dental.

Como a microscopia confocal permite avaliar a superfície e a subsuperfície das amostras em até 100 μm , quanto menor a espessura da amostra, imagens tridimensionais mais precisas e com maiores informações da

integridade estrutural da interface adesiva são produzidas. Ding *et al.*, 2008 para avaliação, em microscopia confocal prepararam palitos cuja secção transversal foi limitado a 300 μm de altura e 300 μm de largura (área de 0,09 mm^2). Entretanto os autores avaliaram a resistência à união de amostras obtidas a partir de um único elemento dental, sendo este resultado relativo uma vez que o número de repetições não foi suficiente para uma análise estatística.

O preparo de amostras de secção transversal reduzida para avaliação da resistência à tração parece ser interessante, porque além de permitir a obtenção de inúmeras amostras por dente (Sano *et al.*, 1994; Valandro *et al.*, 2005) possibilita a avaliação de diferentes regiões do mesmo dente.

O teste de resistência à união por microtração tem sido aceito como um teste *in vitro* estático, versátil e confiável para quantificar a efetividade de união de biomateriais adesivos às estruturas do dente (Poitevin *et al.*, 2008). Um dos principais objetivos deste método foi evitar a ocorrência de fraturas coesivas da dentina sobre o carregamento. A ocorrência de falha no próprio substrato compromete o resultado do teste no sentido de expressar verdadeiramente a resistência à união interfacial e, portanto, a avaliação de desenvolvimentos nas formulações dos materiais. (Ferrari *et al.*, 2002). Para a realização de um adequado teste a área transversal não deve exceder 1,5 mm^2 (Pashley *et al.*, 1995 e 1999) e também não deve ser menor que 0,5 mm^2 (Pashley *et al.*, 1995, Bouillaguet *et al.*, 2001). Entretanto essas orientações somente se referem às amostras em forma de ampulheta e nenhuma indicação similar foi relatada com relação às micro-espécimes em forma de palito, sendo importante portanto se verificar a influência do preparo dos palitos com a área de união menor que 0,5 mm nos resultados do ensaio de microtração.

Assim, o objetivo deste trabalho *in vitro* composto por dois artigos científicos, foi avaliar o comportamento de dois sistemas adesivos, um autocondicionante, Clearfil SE Bond, e outro convencional, Scotchbond Multi-Purpose, após a incorporação do corante fluorescente Rodamina B em relação:

1) Às propriedades resistência coesiva, resistência flexural e módulo de elasticidade (capítulo 1);

2) À resistência à união através de método modificado de microtração e na integridade interfacial visualizada através da microscopia confocal e validar o método modificado de microtração utilizando micro-amostras de secção transversal de 0,09 mm².

CAPÍTULOS**CAPÍTULO 1****Influence of fluorescent dye on mechanical properties of adhesive systems****ABSTRACT**

The aim of the study was to evaluate the influence of fluorescent dye (rhodamine B) on the ultimate tensile strength (UTS), elastic modulus (E), and flexural strength (FS) of different adhesives, specifically Scotchbond Multi-Purpose (3M ESPE, St. Paul, USA) and Clearfil SE Bond (Kuraray Medical Inc., Okayama, Japan). The bond of adhesive systems were mixed or not with 0.16 mg/mL of rhodamine B. The UTS values of beam-shaped specimens were measured with a universal testing machine ($n = 10$). The FS and E values were evaluated with bar-shaped specimens ($n = 5$). Data were statistically analyzed by two-way analysis of variance. No significant differences in UTS, E, or FS were found among the groups. Thus, at the concentration tested, incorporation of rhodamine B did not affect the mechanical properties of the adhesives.

Keywords: adhesive, fluorescent dyes, mechanical properties

1. Introduction

The marginal seal of composite restorations must be of good quality to prevent postoperative sensitivity, marginal discoloration, secondary caries, and pulp inflammation [1]. Microleakage has been infrequently used to evaluate the interfacial integrity of adhesive restorations, but studies have shown that only a weak correlation exists between dye penetration and the occurrence of gaps and

marginal irregularities in vitro [2]. Confocal laser-scanning microscopy (CLSM) may be used to visualize bonding systems on the dentin surface and to localize the resin tags and the hybrid layer accurately [3]. CLSM may serve as a valuable technique for adhesion studies in dentistry, allowing nondestructive analyses to be performed without vacuum in a humid environment and producing high-resolution three-dimensional images [4,5].

Fluorescent dyes and CLSM have been applied to analyze interfacial integrity [4, 6] and nanoleakage [7,8]. Moreover, CLSM provided more detailed information of the penetration and distribution of resin cement and adhesive than scanning electron microscopy [9]. Micromorphological analyses of the bonding interfaces and visualization of the interfacial integrity by CLSM can be considerably enhanced by the incorporation of fluorescent dyes into the bonding systems [10]. Fluorochromes used for this purpose should be well mixed in advance of placement, to ensure total dissolution and homogeneity. They may be incorporated directly in the manufacturer-supplied bottle or during the manufacturing process [11,12].

However, the labeling of restorative materials with a fluorescent agent can influence the polymerization, properties, and performance of the adhesive [13]. Depending on the concentration, fluorochromes have the potential to reduce the monomer conversion of the bonding agent by absorbing light. This absorption might inhibit light from reaching the photoinitiators and, thereby, reduce polymer formation [14]. The degree of conversion of dental resins is highly correlated with their mechanical properties [15]. Adhesive resins typically have favorable

mechanical properties when sufficiently cured [16]. Mixing a dye with the adhesive components may affect their mechanical properties, resulting in changes in the hybrid layer properties [17].

When CLSM is used to assess the micromorphology of restorative-bonded interfaces, it is extremely important to evaluate the effects of adding fluorescent dyes on the mechanical properties of the adhesive, such as the ultimate tensile strength (UTS), flexural strength (FS), and elastic modulus (E). The present study examined whether the addition of the fluorescent dye rhodamine B interfered with the mechanical properties (UTS, FS, and E) of two “gold standard” adhesives, namely the etch-and-rinse Scotchbond Multi-Purpose and self-etching Clearfil SE Bond adhesive systems.

2. Materials and methods

2.1 Adhesives

The commercial adhesives investigated were the conventional three-step etch-and-rinse Scotchbond Multi-Purpose Plus system (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) and the two-step self-etching Clearfil SE Bond system (Kuraray Medical Inc., Okayama, Japan), both of which are considered "gold standard" adhesives for their class and have repeatedly shown excellent results in clinical and laboratory studies [18]. The commercial names, compositions, and manufacturers of the adhesives are described in Table 1.

Table 1- Commercial name, composition and manufactured of adhesives

Commercial name	Composition	Manufactured
Scotchbond Multi-Purpose 3 steps	Bond: Bisphenol A diglicidildimetacrylate (Bis-GMA), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), Triphenylantimony dimethacrylate Hydrophilic, tertiary amine, silanized colloidal silica	3M ESPE St Paul, MN, USA
Clearfil SE Bond 2 steps	Bond: Bisphenol A diglicidildimetacrylate (Bis-GMA), 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA), 10 Metacrilolioxidecil dihydrogen-phosphatase (MDP), Hydrophobic aliphatic methacrylate, Colloidal silica, DI-camphorquinone, Initiators, Accelerators.	Kuraray Medical Inc. Okayama, JP

2.2 Specimen preparation

Light-curing was performed with a holder coupled to the Optilux 501 light-curing device (Demetron LC; Sybron Kerr, Danbury, CT, USA). A 4-mm distance, simulating a medium cavity depth, was standardized between the light guide tip and the material. This process was controlled with an electronic digimatic micrometer (IP-65 Mitutoyo, Tokyo, Japan).

To examine the influence of the fluorescent dye on the mechanical properties, 0.16 mg/mL [7] of rhodamine B (Sigma, St. Louis, MO, USA) were mixed with the bonding agents of the adhesive systems. The mixture was kept in a continuous stirring device (AP22 Phoenix Luferco, Phoenix Ind and Com Equipos Scientific LTDA; Araraquara, SP, Brazil) for at least 2 h to ensure complete dissolution [3]. For each adhesive system, two groups of specimens (with and without fluorescent dye) were created.

For each adhesive, 10 μL of the bonding agent were placed in a silicon mold (Fig. 1B) obtained from a Teflon matrix (Fig. 1A) in a single layer by using a micropipette under constant stirring to prevent the formation of air bubbles (Fig. 2A) [19].

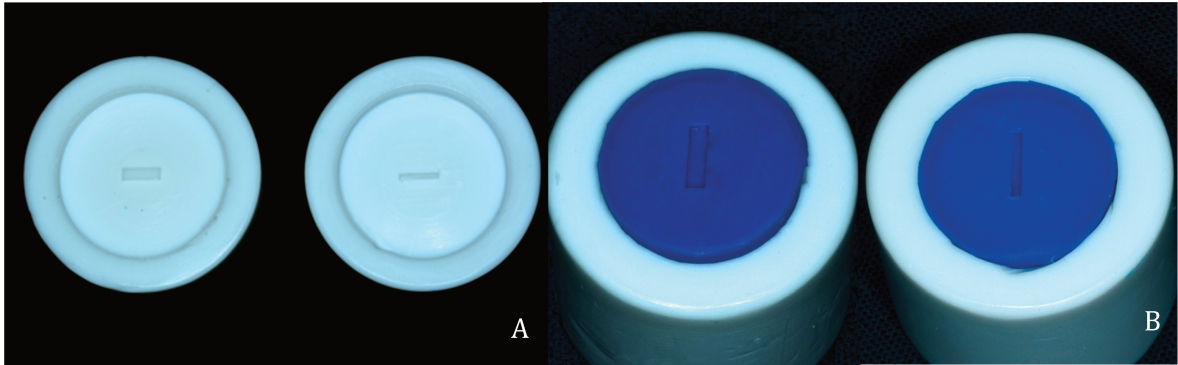


Fig. 1A - Teflon matrix, 1B – Silicon mold obtained of Teflon matrix.

Before light activation, a Mylar strip was placed over the mold to obtain a flat sample surface (Fig. 2B). The adhesives were irradiated for 60 s at 600 mW/cm^2 (Fig. 2C).

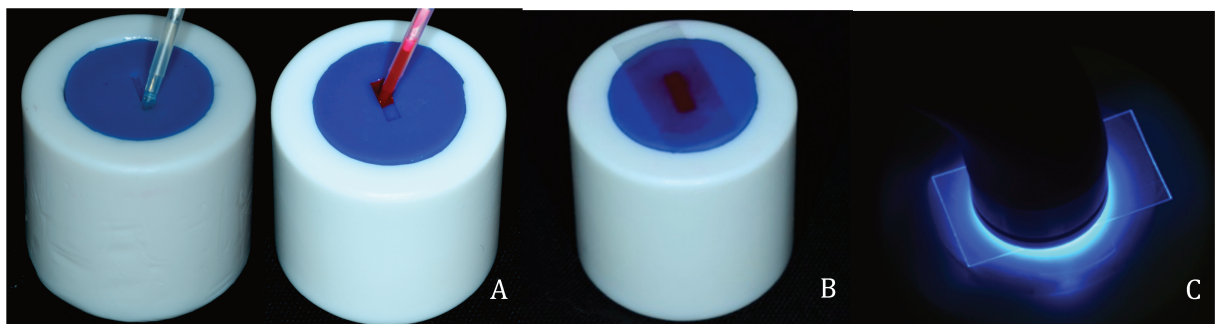


Fig. 2A - Prepare of specimens, 2B - Mylar strip with adhesive, 2C – Irradiated adhesive for 60 seconds.

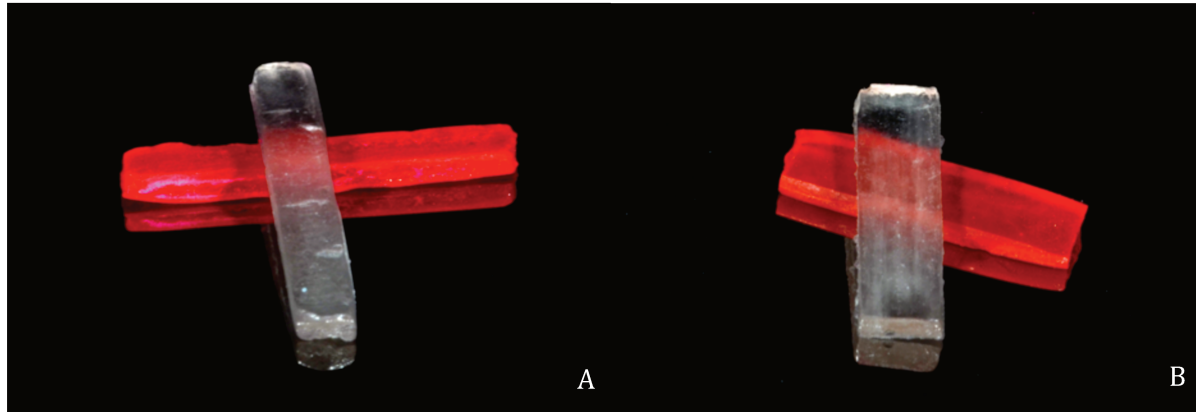


Fig. 3A-Beam-shaped and 3B-Bar-shaped specimens for elastic modulus, flexural test and cohesive strength.

Beam-shaped specimens (beam-specimens; 1 mm deep, 1 mm wide, 7 mm long) were prepared to test the UTS ($n = 10$) (Fig. 3A). Bar-shaped specimens (bar-specimens; 1 mm deep, 2 mm wide, 7 mm long) were prepared to test the E and FS (ISO 4049/2000)[20] ($n = 5$) (Fig. 3B). The specimens were removed from the silicon mold and stored dry in the dark for 24 h at 37 °C.

2.3. Mechanical properties

After storage, the beam-specimens were subjected to UTS testing by the microtensile bond strength test method [21]. They were attached to a universal testing machine (UTM) (EZ test, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) with a cyanoacrylate adhesive (Super Bonder Gel, Loctite, Henkel Corporation, Itapevi, SP, Brazil) and tested at a crosshead speed of 0.5 mm/min until failure. After failure, the cross-sectional area of the specimens was measured with an electronic digimatic

micrometer (IP-65 Mitutoyo). The UTS of the adhesives was calculated as $UTS = F/A$, where F is the tensile force at failure (N), and A is the cross-sectional area of the specimen (mm^2). The UTS (N/mm^2) was expressed in MPa.

The bar-specimens were subjected to FS testing at 3 points with a UTM (Instron model 4411, Instron Corp., Canton, MA, USA) (Fig. 4). Prior to testing, the dimensions of each specimen were recorded with Bluehill 2 software (Instron Corp.). The FS (MPa) was calculated as $FS = 3FI/2bd^2$, where F is the force, I is the distance between supports, and b and d are the width and thickness (mm), respectively, of the bar-specimen. The E (GPa) was measured from the steepest slope at the elastic region of the stress-strain curve. It was calculated assuming the configuration of a bar-shaped specimen by $E = (\Delta F/\Delta Y) \times (L^3/4WH^3)$, where $\Delta F/\Delta Y$ is the change in force (ΔF) per unit change in the center deflection function (ΔY), L is the distance between the supports and the surface tension, and W and H are the width (mm) and thickness (mm), respectively, of the bar-specimen.

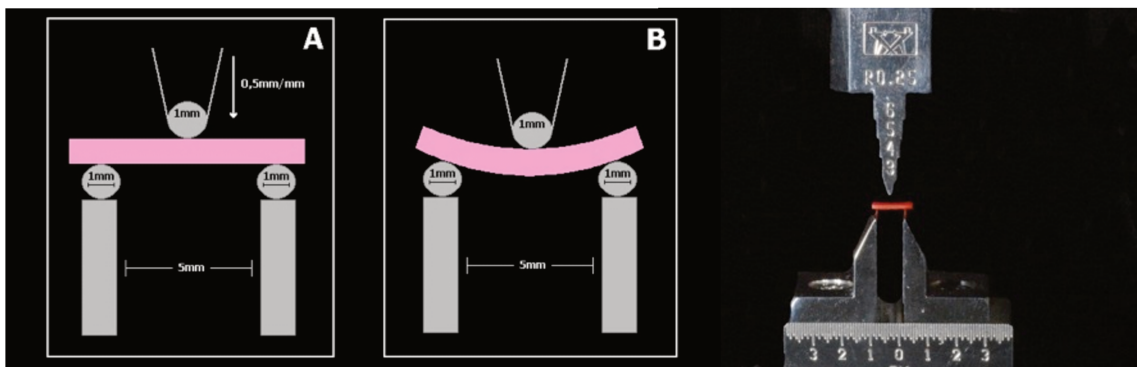


Fig. 4A and B Schematic representation of the flexural strength test. 4C - Flexural strength at three points test.

2.4. Statistical analysis

For each group, the UTS, E, and FS data were tabulated and analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) ($\alpha = 0.05$), with the factors “bonding agents” and “dye”.

3. Results

No statistical difference in UTS was observed among groups of adhesives with or without dye and to the interaction ($p = 0.0836$; Table 2).

Table 2

Means and standard deviations of ultimate tensile strength (MPa) obtained from the adhesive tested.

Adhesive System	Dye	
	Stained	Unstained
Scotchbond Multi- Purpose Plus	37.01 (11.47) Aa	39.29 (9.39) Aa
Clearfil SE Bond	29.80 (8.61) Aa	32.16 (5.54) Aa

Identical capital letters indicate that the values are not statistically significant difference in rows and Identical lowercase letters indicate that the values are not statistically significant difference in columns.

No differences in the values of FS (Table 3) or E (Table 4) were observed among adhesives with or without dye, regardless of the adhesive system.

Table 3

Means and standard deviations of flexural strength (MPa) obtained from the adhesive systems tested.

Adhesive System	Dye	
	Stained	No-Stained
Scotchbond Multi-purpose Plus	136.08 (6.60) Aa	137.96 (5.10) Aa
Clearfil SE Bond	130.59 (5.58) Aa	139.61 (5.21) Aa

Identical capital letters indicate that the values are not statistically significant difference in rows and Identical lowercase letters indicate that the values are not statistically significant difference in columns.

Table 4

Means and standard deviations of elastic modulus (MPa) obtained from the adhesive systems tested.

Adhesive System	Dye	
	Stained	Unstained
Scotchbond Multi-Purpose Plus	2.18 (0.096) Aa	2.21 (0.176) Aa
Clearfil SE Bond	1.87 (0.383) Aa	2.03 (0.376) Aa

Identical capital letters indicate that the values are not statistically significant difference in rows and Identical lowercase letters indicate that the values are not statistically significant difference in columns.

4. Discussion

CLSM is a potential visualization technique with advantages over conventional light microscopy and transmission/scanning electron microscopy in terms of not being destructive [8]. However, the use of fluorescent dyes, even as tracers, may significantly impact specimen analysis and data interpretation [13]. In the present study, use of rhodamine B at 0.16 mg/mL did not statistically affect the tested mechanical properties of the adhesives. Given the crucial relationship between the light-curing process and the structure and properties of dental resin-based materials [22], the results imply that rhodamine B at the concentration used did not interfere with the ability of the monomer conversion to ensure adequate polymerization and polymer formation. Insufficient monomer conversion may degrade the mechanical properties of the hybrid layer and increase the amount of uncured monomer [13].

Rhodamine B can only interfere with the behavior of adhesives by physically blocking the light from reaching the photoinitiators. The dyes do not bind chemically to the monomers, and the addition of the fluorochrome is based only on a mixing process. Thus, after the curing of the adhesive, the fluorochrome must remain entrapped in the polymer network [10, 12]. Even though there are no covalent linkages between the fluorescent molecules and the adhesive monomers, the arbitrary use of the dye should be avoided because the dye is more visible as its concentration increases, however, it may be possible to block drastically the resin's polymerization compromising the mechanical properties of the adhesive interface.

Researchers have used CLSM to study the interfacial integrity, evaluating the micropermeability of the hybrid layer through the addition of fluorochromes in the pulp chamber [23,24]. In this approach, the internal penetration of a fluorescent dye towards the bonded interface indicates the borderlines between hybrid layer and unaffected dentin [13]. However, the distribution of fluorescent dye might not correlate perfectly with the distribution of the adhesive monomers [12]. In particular, the dye must not be allowed to leach into the dentin, to ensure that the exact borders between the hybrid layer and unaffected dentin can be obtained [14]. Thus, by incorporating dyes into dentin-bonding agents, an accurate description of the restorative failure might be obtained.

In the present study, no significant differences were detected between any of the tested adhesives. Thus, the mechanical behaviors of the adhesive systems with and without dye were similar, regardless of their composition. The presence of rhodamine in the adhesive systems probably did not affect the action of these components.

The values of UTS, E, and FS observed in this study were within the range of values reported in the literature [25,26]. However, it is important to consider that the bar-specimens for the E and FS measurements were irradiated with 36 J/cm^2 of energy, to achieve the consistency needed for the subsequent 3-point flexural test. The specimen dimension (7 mm length, 2 mm width, 1 mm height) was adapted for the microflexural test to enable a single-step polymerization instead of several light-activation steps at different points, according to ISO 4049/2000 specifications [20]. It has been reported that the degree of polymerization of adhesive resin does

not change when the resin is irradiated at more than 36 J/cm² [26]. Therefore, the conditions used in this study permitted sufficient time for the maturation of the monomer conversion. The results corresponded to the mechanical properties, which may have contributed to any higher value.

Finally, this study demonstrated that is possible to incorporate a fluorescent dye, rhodamine B, with bonding resins to enable proper detection optics with minimal deleterious effects. Rhodamine B was selected as a dye because it is the most commonly used fluorochrome for fluorescence microscopy [8, 27]. Rhodamine B is stable under different pH conditions, soluble in water, and highly soluble in organic solutions [8]. However, other types of fluorochromes and other commercially available adhesive systems must be evaluated by a similar methodology to assess the effects of the dyes on the properties of the adhesive systems.

5. Conclusion

Based on the experimental results of this study, it can be concluded that the fluorescent agent at the concentration used did not affect the behavior of the adhesives or the UTS, E, and FS results.

References

- [1] S.D. Heintze, A. Cavalleri, A. Peschke, P. Schüpbach, Fluorescence microscopy for the evaluation of the margins of Class V restorations in vitro, J. Adhes. Dent. 7 (2005) 19-28.

- [2] T. Dietrich, M. Kraemer, G.M. Lösche, K.D. Wernecke, J.F. Roulet, Influence of dentin conditioning and contamination on the marginal integrity of sandwich Class II restorations, *Oper. Dent.* 25 (2000) 401-10.
- [3] C.A. Arrais, K. Miyake, F.A. Rueggeberg, D.H. Pashley, M. Giannini, Micromorphology of resin/dentin interfaces using 4th and 5th generation dual-curing adhesive/cement systems: a confocal laser scanning microscope analysis, *J. Adhes. Dent.* 11 (2009) 15-26.
- [4] T.F. Watson, A confocal optical microscope study of the morphology of the tooth/restoration interface using Scotchbond 2 dentin adhesive, *J. Dent. Res.* 68 (1989) 1124–31.
- [5] T.F. Watson, Applications of confocal scanning optical microscopy to dentistry, *Br. Dent. J.* 171 (1991) 287–91.
- [6] B.M. Griffiths, T.F. Watson, Resin-dentin interface of Scotch-bond Multi-Purpose dentin adhesive, *Am. J. Dent.* 8 (1995) 212–216.
- [7] P.H. D’Alpino, J.C. Pereira, N.R. Svizero, F.A. Rueggeberg, R. Carvalho, D.H. Pashley, A new technique for assessing hybrid layer interfacial micromorphology and integrity: two-photon laser microscopy, *J. Adhes. Dent.* 8 (2006) 279–284.
- [8] T. Pioch, S. Stotz, H.J. Staehle, H. Duschner, Applications of confocal laser scanning microscopy to dental bonding, *Adv. Dent. Res.* 11 (1997) 453–61.
- [9] K. Bitter, S. Paris, C. Pfuertner, K. Neumann, A.M. Kielbassa, Morphological and bond strength evaluation of different resin cements to root dentin, *Eur. J. Oral Sci.* 117 (2009) 326-33.

- [10] T.F. Watson, Fact and artefact in confocal microscopy, *Adv. Dent. Res.* 11 (1997) 433–41.
- [11] T.F. Watson, A. Boyde, Confocal light microscopic techniques for examining dental operative procedures and dental materials. A status report for the American Journal of Dentistry, *Am. J. Dent.* 4 (1991) 193–200.
- [12] P. Schupbach, I. Krejci, F. Lutz, Dentin bonding: effect of tubule orientation on hybrid-layer formation, *Eur. J. Oral Sci.* 105 (1997) 344–52.
- [13] P.H. D’Alpino, J.C. Pereira, N.R. Svizero, F.A. Rueggeberg, D.H. Pashley, Use of fluorescent compounds in assessing bonded resin-based restorations: A literature review, *J. Dent.* 34 (2006) 623–634.
- [14] P.H. D’Alpino, J.C. Pereira, N.R. Svizero, F.A. Rueggeberg, D.H. Pashley, Factors Affecting Use of Fluorescent Agents in Identification of Resin-based Polymers. *J. Adhes. Dent.* 8 (2006) 285-292.
- [15] M. Dewaele, E. Asmussen, A. Peutzfeldt et al., Influence of curing protocol on selected properties of light-curing polymers: degree of conversion, volume contraction, elastic modulus, and glass transition temperature, *Dent. Mater.* 25 (2009) 1576–1584.
- [16] E. Koliniotou-Kubia, P.H. Jacobsen, The effect of irradiation time on the physical properties of light-cured resins, *Clin. Mater.* 6 (1990) 21-8.
- [17] A. Takahashia, Y. Satoa, S. Unoa, et al., Effects of mechanical properties of adhesive resins on bond strength to dentin, *Dent. Mater.* 18 (2002) 263-268.

- [18] M Sarr, A.W. Kane, J. Vreven, et al., Microtensile Bond Strength and Interfacial Characterization of 11 Contemporary Adhesives Bonded to Bur-cut Dentin, *Oper. Dent.* 35 (2010) 94-104.
- [19] A.D. Loguercio, F. Loeblen, T. Cherobin, et al., Effects of solvent removal on adhesive properties of simplified etch- and- rinse systems and on bond strenghts to dry and wet dentin, *J. Adhes. Dent.* (2009) 213- 19.
- [20] ISO 4049:2000 (3.). Dentistry—polymer-based filling, restorative and luting materials; 7.10 Depth of cure, Class 2 materials. International Organization for Standardization; 2000.
- [21] H. Sano, B. Ciucchi, W.G. Matthews, D.H. Pashley, Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. *J. Dent. Res.* 73 (1994) 1205–11.
- [22] J.H. Bae, B.H. Cho, J.S. Kim, Adhesive layer properties as a determinant of dentin bond strength, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 74 (2005) 822–828.
- [23] P. A. Brunton, A. Kassir, M. Dashti, J.C. Setcos, Effect of different application and polymerization techniques on the microleakage of proximal resin composite restorations in vitro, *Oper. Dent.* 29 (2004) 54-59.
- [24] J. B. de Almeida, J.A. Platt, Y. Oshida, B.K. Moore et al, Three different methods to evaluate microleakage of packable composites in Class II restorations, *Oper. Dent.* 28 (2003) 453-460.
- [25] L.A. Gaglianone, A.F. Lima, L.S. Gonçalves, et al., Mechanical properties and degree of conversion of etch-and-rinse and self-etch adhesive systems cured by a

quartz tungsten halogen lamp and a light-emitting diode, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 12 (2012) 139–143.

[26] T. Yanagawa, W. J. Finger, Relationship between degree of polymerization of resin composite and bond strength to Gluma-treated dentin, Am. J. Dent. 7 (1994) 157-60.

[27] A. Diaspro, G. Chirico, F. Federici, F. Cannone, S. Beretta, M. Robello, Two-photon microscopy and spectroscopy based on a compact confocal scanning head, J. Biomed. 6 (2001) 300-310.

CAPÍTULO 2

Bonding effectiveness analysis by confocal microscopy and modified microtensile method (μ TBS)

Abstract

Objectives: The bond effectiveness of two adhesive systems, Clearfil SE Bond and Scotchbond Multi-Purpose was evaluated after addition or not of the dye Rhodamine B (R) using the modified microtensile method (μ TBS) and confocal laser microscopy (CLSM). *Methods:* After applying adhesive to flat occlusal surface of 32 human premolars, composite crowns (16 mm²) were built up with resin composite Charisma Opal (shade-A3). The restored teeth were sectioned to produce beam-shaped micro-specimens (cross-section of 0.09 mm² - modified μ TBS) by diamond saw. For display in CLSM and evaluate the influence of fluorescent dye in bond strength 0.16 mg/ml of R was incorporated into adhesives thus forming two groups for each adhesive (n=8) groups of teeth restored with adhesives stained and unstained. The presence of microporosities was recorded in CLSM before testing μ TBS, and bond strength was measured in universal testing machine (EZ-Test - Shimadzu) speed of 0.5 mm/min. The resultant failure patterns were analyzed using SEM. Data were submitted to two-way ANOVA. *Results:* The incorporation of R dye did not interfere in bond strength of adhesive systems investigated, as there were no significant differences between groups stained and unstained. The CLSM revealed fluorescent images with detailed information of the adhesive interface, showing low percentage of microporosities for both bonding agents. The modified μ TBS showed low coefficient of variation (20.25%), high percentage of adhesive failures (> 90 %) and low incidence of premature failures thus according to these results, can be considered a method valid. *Significance:* The use of fluorescent R dye into bonding agents and preparation of micro-specimens are indicated for in vitro evaluations of bond effectiveness.

Keywords: fluorescent dye, adhesive systems, integrity interfacial, micro-specimens, bond strength.

Introduction

The confocal laser scanning microscopy (CLSM) has been used in dentistry providing high-resolution images [29,30] with advantages over conventional microscopy SEM or TEM techniques, because it permits visualization not only a specimen surface, but also its subsurface [7, 31]. Thus more accurate and informative three-dimensional images are produced of dental structures when compared to two-dimensional analysis [7]. An additional advantage of the confocal include non-destructive examination since the extensive methodology of specimen drying indispensable for conventional SEM or TEM analysis, is not necessary for CLSM. This advantage leads to a decreased risk of shrinkage or desiccation artifacts [14]. This allows the same specimens to be subsequently studied using other test, e.g. additional mechanical test.

For display in CLSM fluorescent dyes are used, also called fluorochromes [5] in order to investigate distribution and penetration of bonding-laden dye in the dental substrates [11,29] and analyzes the quality of the hybrid layer [3, 8, 15,16]. For this, is necessary the incorporation of fluorescent dyes into components of materials prior to polymerization, because otherwise the images may indicate the distribution of dye, rather than the investigated material [31]. In order to obtain conditions for comparison within the same group, dyes have been mixed directly into supplied packaged bottle, so as to enable use in all specimens [26].

However, labeling restorative materials with a fluorochrome can influence the polymerization of the adhesive layer and thus properties and performance of these materials [5]. In previous studies no agreement of concentration or type of dye used for analysis of the interface of restorative materials and tooth structure is found [4,11,15, 29, 26]. Thereby it is important to evaluate the influence of the addition of Rhodamine B dye into different bonding agents, that is by far, most used in adhesion studies using confocal microscopy [5]. This compound is excited using green light (540 nm) and emits red in color (590

nm). Rhodamine B is easily detected microscopically with appropriate filters, stable under various pH conditions and fairly labile [27].

Incorporation of fluorescent compounds into bonding agents highlights the morphology and thickness of the hybrid layer formed in thin optical sections with improved resolution. These sections to be made below the surfaces of intact specimens without the normal problems of ultrathin sectioning for transmitted light microscopy [29]. So the specimen preparation with reduced thickness generates significant improvements in resolution and fluorescence images of structures within semi-transparent materials labeled because it is thinner [31].

Ding et al., [8], verified the relationship between bond strength and nanoleakage of the same specimen prepared micro-specimens limited to 300 μm in width and 300 μm depth, due to technical requirements of the CLSM. However, only a tooth was used to prepare all the specimens, and the bond strength values obtained in this study were only relative values and could not be validated because there were no repetitions sufficient for statistical analysis. The possibility of preparing micro-specimens with a reduced cross-section proposed by Ding et al., [8] seems to be interesting, but the number of repetitions of dental elements must be sufficient to meet statistical criteria. In addition to assess bond strength of contemporary bonding agent, important parameters as the coefficient of variation, analysis of fracture pattern and premature failures should be taken into consideration to determine the accuracy of this test.

So the purpose of this study was to evaluate the influence of the incorporation of Rhodamine B in bond strength and interfacial integrity of two adhesive systems considered the "gold standard" applied to dentin and validate the use of a modified method of microtensile through the performing of micro-specimens (cross section 0.09 mm^2).

Materials and Methods

Preparation of the micro-specimens

Thirty-two healthy human premolars freshly extracted were used

following a protocol approved by Review Board of Ethics under protocol number 075/2012. The selected teeth were stored for a week in 0,1% of saturated thymol solution at 5°C for disinfection and after cleaning were sectioned in Isomet saw (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) under constant irrigation, to remove the roots, leaving the coronal crown segment and to exposure flat mid-coronal dentin surface. The exposed dentin surfaces were wet-polished by polisher (PL02 Erios E) with 600-grit SiC paper for 1 minute to create a flat surface with standard smear layer formation before being bonded with the adhesive systems.

Two adhesive systems were selected for this study: the conventional three-step etch-and-rinse Scotchbond Multi-Purpose Plus (3M ESPE, St Paul, MN, USA) and the two steps system self-etching Clearfil SE Bond (Kuraray Medical Inc. Okayama, Japan). Because they have been demonstrating repeatedly good results in clinical and laboratory studies and both were considered “gold standard” adhesives for their class. [25]. To examine the influence of fluorescent dye in bond strength, two groups were formed for each adhesive system (n = 8) groups of adhesives with and without fluorescent dye. Prior to adhesives procedures, the fluorescent agent (Rhodamine B, Sigma; St Louis, MO, USA) was mixed with bond of each adhesive system directly in the supplied bottles. The dye was added in advance to allow complete dissolution resulting in a concentration of 0.16 mg/ml. This dye concentration was based on preliminary studies of D'Alpino et al, 2006b and was shown to not interfere with monomer conversion. The adhesives were used according to manufacturers' instructions light-cured (650 mW/cm²) for 10 s with a curing light (Optilux 501 – Kerr). Further, composite crowns of approximately 8 mm were built up with Charisma Opal (Heraeus Kulzer) composite resin by incremental technique. After storage for 1 week in relative humidity at 37°C, each restored tooth was glued to a perpendicular device acrylic to facilitate the attachment of to the water-cooled cutting machine (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). The specimens were then serially sectioned bucco-lingually and mesio-distally to obtain micro-sticks with a diameter of 300 µm X 300 µm and

cross-section of 0.09 mm². The micro-specimens were kept relative humidity for one week.

Evaluation ultramorphological of microporosities

The micro-sticks of the groups of adhesives stained were mounted into microscope slides (Knittel Glaser, Germany) and documented using a CLSM to microporosities analysis (Leica TSCSP5AOBS-Leica, Heidelberg, Germany). The images were recorded in CLSM fluorescent mode with an oil immersion objective (60 X, numerical aperture 1.3.) and argon laser at 543 nm PMT2 mean min: 605, max: 710. The images were obtained in the resolution of 1024 x 1024 pixels. One experienced examiner who was blind to the adhesive system tested recorded the images of micro-specimens. The regions within or around the hybrid layer that were not infiltrated with stained adhesive and remain unfilled were considered microporous (Fig. 3). The occurrence of microporositie was analyzed using the Image Tool 3.0 software (Periodontology Department, University of Texas, Health Science Center at San Antonio, TX, USA) to measure the adhesive interface length and to calculate the percentage of the microporous. In order, the interfacial integrity was scored on an arbitrary scale by the percentage of the microporous (arrows Fig.3) beneath the hybrid layer. The data were submitted to two-way ANOVA (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA – v.9.1.3, 2002-2003) ($\alpha=0.05$).

Modified microtensile bond strength test (μ TBS)

The interfacial integrity of the micro-specimens was examined nondestructively by CLSM. Thus, the same micro-specimens were used to the μ TBS test, except when observed air bubbles or artifacts near the hybrid layer by CLSM. Then, the micro-specimens were cautiously fixed to Geraldeli's device with cyanoacrylate glue (Super Bonder Gel, Loctite, Henkel Corporation, Itapevi, SP, Brazil) and stressed at a crosshead speed of 0.5 mm/min until failure in Universal Testing Machine EZ Test-L (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) using a load cell of 20 Kg. Statistical analysis was carried out using SAS Proc lab. The groups were analyzed using two-way ANOVA to verify statistical differences between the groups ($\alpha=0.05$).

Failure analysis

After modified microtensile bond strength test the failure pattern for each adhesive system was evaluated in SEM (JSM 5600 LV, JEOL, Tokyo, Japan) by the area fractions of the failure modes per total fractured surfaces (%) in the SEM photomicrographs by the image analyzer. Failure mode was classified into one of four types: Type 1, adhesive failure between adhesive resin and dentin; Type 2, partial adhesive failure between dentin and adhesive resin, and partial cohesive failure in the adhesive resin; Type 3, partial cohesive failure in dentin; Type 4, cohesive failure in adhesive resin [20].

Results

ANOVA revealed no statistically significant difference to the μ TBS data to parameters in study ($p= 0.0877$) (Table 1).

Table 1- Results ANOVA test: means in MPa (standard deviations) of modified microtensile bond strength test μ TBS

Adhesive Systems	Dye	
	Stained	Unstained
Scotchbond Multipurpose Three-step etch-and-rinse	43,63 (11,84) Aa	49,53 (11,16) Aa
Clearfil SE Bond Two-step self-etching	46,89 (6,58) Aa	56,49 (9,36) Aa

The comparison of coefficient of variation intra and inter-tooth are described in Table 2. Two analyzes of the inter-and intra-tooth showed a low percentage of coefficient of variation (CV).

Table 2- Comparison of the analysis variation of intra-and-intertooth variables to microtensile bond test (μ TBS)

Analysis Variation	R-Square	% Coefficient Variation (CV)	Root MSE	μ TBS Mean (MPa)
Intra-tooth	0,072	28,93	14,43	49,89
Inter-tooth	0,205	20,25	9,95	49,13

Analysis of the fracture pattern showed that all groups presented mainly adhesive failures (90-98%) of the resin composite bonding resin (Fig. 1).

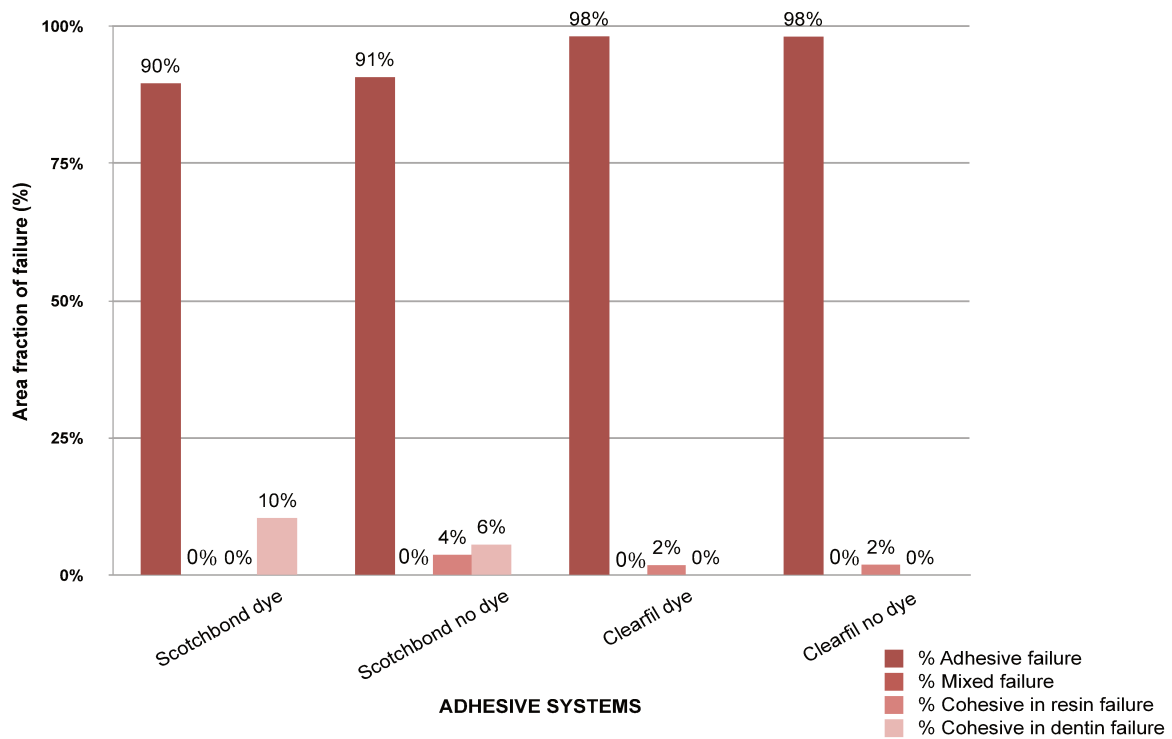


Fig. 1 - Failure modes on fractured surfaces for each group. Adhesive failure was shown as more representative percentage of interfacial failures for all groups (>90%).

SEM micrographs representing the failure types of the debonded specimens are presented in Fig. 2 A to D.

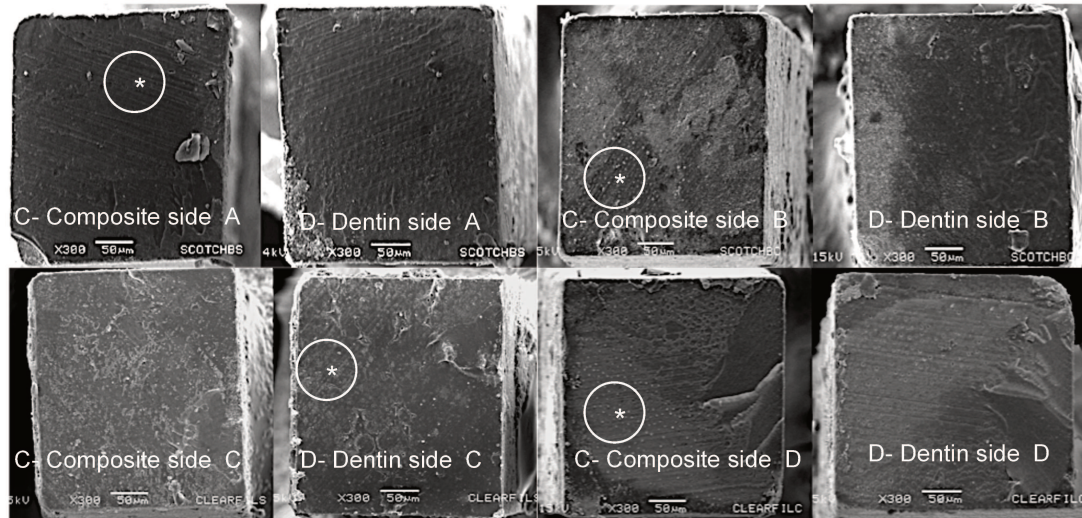
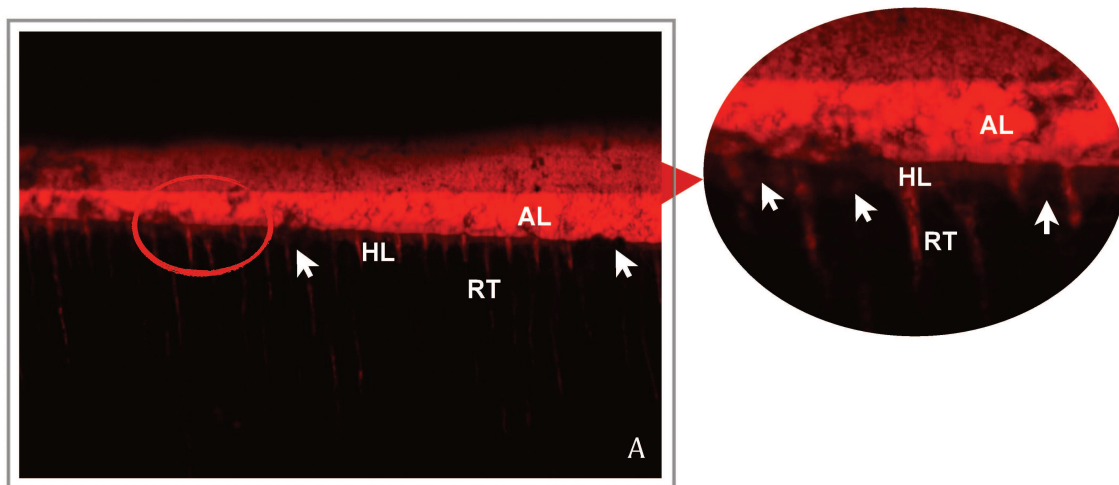


Fig. 2 - SEM photomicrograph of fractured adhesive-interface (300X) showing that the mixture fail on bond interface. Micro-specimen bonded with SBMP unstained (A), SBMP stained (B), CSE unstained (C) and CSE stained (D). Note the diagonal scratch lines creating the smear layer that indicates failure at the top of the hybrid layer (white circle*).

The microscopic visualization technique by CLSM revealed low percentage of microporous in both adhesive systems investigated (arrows - Figures 3A and 3B) and no significant differences of the infiltration of adhesive systems in substrate were observed for both adhesives (Table 3).



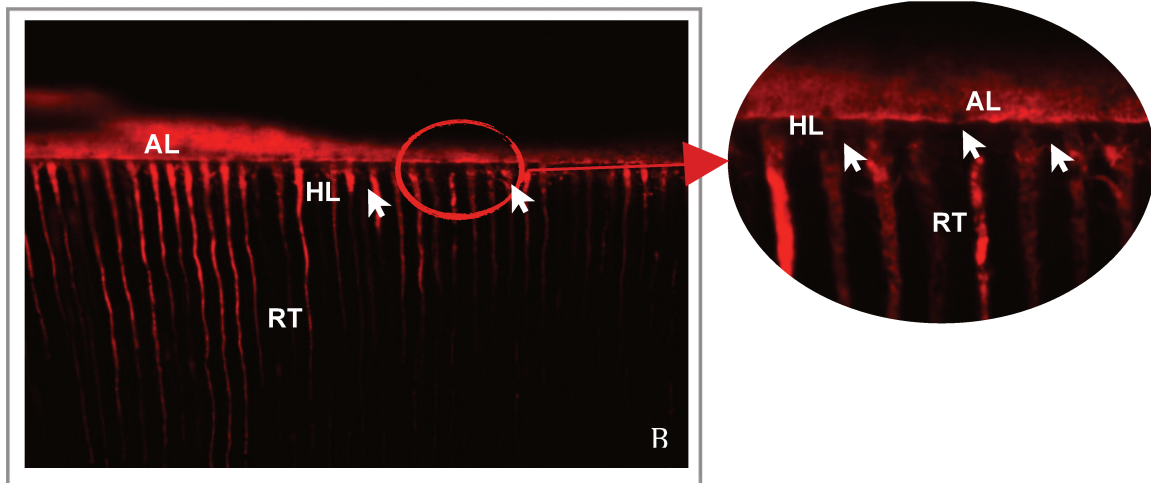


Fig. 3 - Representative CLSM images of the dentin-resin adhesive interfaces of CSE (A) and SBMP (B) at 60x Fluorescence image exhibiting a distinct resin-dentine interdiffusion zone and resin tags as described by Nakabayashi et al. 1982 [13], but to a lesser extent and with less number of resin tags-RT for the self-etch CSE adhesive systems. Accentuated window showing adhesive layer (AL), hybrid layer (HL) and adhesive penetration in dentin tubules (resin tags-RT). The occurrence of microporosities was observed by the presence of microporous (arrows) within bonded interface of both adhesives.

Table 3 - Results of the evaluation of average of percentage of microporosities (standard deviation)

Adhesive Systems	Percentage of microporosities
Scotchbond Multi- Purpose Three-step etch-and-rinse	29.78 (10.31) a
Clearfil SE Bond Two-step self-etching	29.55 (10.09) a

Discussion

The results of this study demonstrated that the addition of Rhodamine B at a concentration of 0.16 mg / ml to adhesives did not influence the bond strength since no statistically significant difference among adhesives with or without dye could be detected ($p = 0.0877$). The fluorescent dyes depending on the concentration, have the potential to absorb light, inhibiting their transmission to the photoinitiators, and may reduce bonding agent monomer conversion as well as the bond strength of restorations to their substrates [4]. The fact of Rhodamine B be easily detectable microscopically with appropriate filters at very low concentrations [27], allowed its addition in a concentration of 0.16 mg/ml, which probably did not affect the polymerization of adhesives for not diminished the bond strength. This concentration of Rhodamine B was defined based on the study of D'Alpino et al. 2006b [4] in which similar result was also observed.

Note that the interference of Rhodamine B in the behavior of adhesives consists only the physical block of light reaching the photoinitiators and the dyes do not bind chemically to the monomers, because the addition of the fluorochrome is based only on a mixing process, so that after curing the adhesive, the fluorochrome must remain entrapped in the polymer network formed [26, 31]. Thus the presence of Rhodamine in the formulations of adhesive systems investigated probably did not affect the action of these components.

As well as the amount of rhodamine was adequate for good visual detection. It was possible to detect fluorescent images of the entire resin-dentin interdiffusion zone, whereby there was a low percentage of microporosities of two adhesives investigated, showing similar results to those described in the literature [1]. Rhodamine B was selected for this study because it is the most fluorochrome used for fluorescence microscopy [7, 15,]. Probably, due to the characteristics of Rhodamine B which is stable under different conditions of pH, soluble in water and highly soluble in organic solvent [15]. However the use of other types of

fluorochromes, as well as other commercially available adhesive systems must be evaluated to assess the effect of the dye on the properties of the adhesive system.

For the ultramorphologic analysis in CLSM, beam-shaped micro-specimens of cross section of 0.09 mm² were prepared because the technical requirements, and a modified microtensile test was performed to evaluate the influence of the addition of fluorochromes in bond strength. Therefore another purpose of this study was verifying the influence of the preparation of micro-specimens on modified microtensile test. The results showed higher values of bond strength than those reported in previous studies [6, 12, 18, 22], regardless of the system used as adhesive bonding agent. This finding confirms the principle of the Law of Griffith [10], where smaller specimens produce higher bond strength, because they contain fewer internal defects ensuring a more uniform stress distribution. Similar results were also observed in previous studies that have evaluated specimens of varying sizes [17,19, 24].

The presence of few internal defects in micro-specimen besides increasing the bond strength also reduces the variation [2]. In microtensile studies, the coefficient of variation (CV) has been used as a measure of precision and repeatability of data [21]. Since producing micro-specimens allowed a larger mapping of different regions of dentin, it was expected a high variability of data, so there was also performed comparing the experimental results intra-tooth. Both the CV inter-tooth (20.25%) as intra-tooth (28.92%) reported in this study were less than 30% (Table 2), which is low for laboratory studies compared with the 50% CV considered by ISO 11405 as a high variation. Thus, according to these results were observed high homogeneity of the data emphasizing the accuracy and validity of the modified microtensile test.

Another parameter used to validate the microtensile testing was the classification of fracture pattern of micro-specimens. As the data obtained in microtensile test are highly related to stress during the test [28], to express the actual interfacial bond strength, it is expected that the stress distribution to be uniform at the interface [9]. Dentin cohesive fractures are related to non-uniform

distribution of mechanical stresses during the test, in which a high concentration of stress can induced the opening of gap formed leading to fracture the substrate. So a higher percentage of adhesive failure between dentin and bonding agent provides more accurate results for the validation of the 'potential of an adhesive material [23]. The accuracy of the modified microtensile test could be confirmed by result of fracture pattern, which produced a number considerably smaller of cohesive fractures and adhesive failure was observed at the fractured surfaces of more than 90% of micro-specimens (Figure 1).

Regarding the incidence of premature failures of modified resulting from the manufacturing process of micro-specimens, the number of sticks debonded during the serial sections was very low and evenly distributed among the experimental groups. Besides some sticks were lost due to fragility and difficulty of handling the sample size too small, which is a limitation of this modified microtensile test.

Comparisons of the mean values bond strength of self-etching Clearfil SE Bond and etch-and-rinse Scotchbond Multi-Purpose showed no difference in the efficacy of bond. This result was not surprising, and corroborates with the literature, because, bonding agents when tested on flat surfaces and short-term show no statistical differences due to bond strength originates the principle of micro-mechanical interlocking of the adhesive on the network collagen fibers [25].

In summary, since the use of 0.16 mg / ml of Rhodamine B did not affect the behavior of adhesive systems investigated is possible to evaluate the bond effectiveness by CLSM and modified microtensile bond strength The preparation of micro-sticks can be used to evaluate the microtensile bond strength and due to results of this study the modified method was considered valid.

Conclusion

In conclusion the incorporation of 0.16 mg / ml of Rhodamine B did not affect the behavior of etch-and-rinse Scotchbond Multi-Purpose Plus and self-etching Clearfil SE Bond adhesive systems. The preparation of micro-specimens

did not interfere with the bond strength results and microtensile modified method was considered a reliable based on the results of different test parameters.

References

- [1] Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008 24(1): 90-101. Epub 2007 Apr 17. Review.
- [2] Cardoso PEC, Braga RR, Carrilho MRO. Evaluation of micro-tensile, shear and tensile tests determining the bond strength of three adhesive systems. *Dent Mater* 1998; 14:394–398
- [3] D’Alpino PH, Pereira JC, Svizero NR, Rueggeberg FA, Carvalho R, Pashley DH. A new technique for assessing hybrid layer interfacial micromorphology and integrity: two-photon laser microscopy. *J Adhes Dent* 2006a; 8: 279–284.
- [4] D’Alpino PHP, Pereira JC, Svizeroc NR, Rueggeberg FA, Pashley DH. Factors Affecting Use of Fluorescent Agents in Identification of Resin-based Polymers. *J Adhes Dent* 2006b; 8: 285-292.
- [5] D’Alpino PH, Pereira JC, Svizero NR, Rueggeberg FA, Pashley DH. Use of fluorescent compounds in assessing bonded resin-based restorations: A literature review. *J Dent* 2006c; 34(9): 623 – 634.
- [6] De Goes MF, Giannini M, Di Hipólito V, Carrilho MR, Daronch M, Rueggeberg FA. Microtensile bond strength of adhesive systems to dentin with or without application of an intermediate flowable resin layer. *Braz Dent J*. 2008;19(1):51-6.
- [7] Diaspro A, Chirico G, Federici F, Cannone F, Beretta S, Robello M. Two-photon microscopy and spectroscopy based on a compact confocal scanning head. *J Biomed Opt* 2001; 6:300-310.
- [8] Ding PGF, Wolff D, Pioch T, Staehle HJ, Dannewitz B, Relationship between microtensile bond strength and nanoleakage at the composite–dentin interface *Dent Mater*. 2009; 25(1): 35-41.

- [9] Goracci C, Sadek F, Monticelli F, Cardoso PEC, Ferrari M. Influence of substrate, shape, and thickness on microtensile specimens' structural integrity and their measured bond strengths. *Dental Materials* 2004; 20: 643–654
- [10] Griffith AA (1920). The phenomena of rupture and flow in solids. *Phil Trans Roy Soc Lon (Series A)* A221:168- 198
- [11] Griffiths BM, Watson TF. Resin-dentin interface of Scotch- bond Multi-Purpose dentin adhesive. *Am J Dent* 1995 8: 212–216.
- [12] Mobarak EH, El-Badrawy W, Pashley DH, Jamjoom H. Effect of pretest storage conditions of extracted teeth on their dentin bond strengths. *J Prosthet Dent*. 2010 Aug; 104(2): 92-7.
- [13] Nakabayashi N. The hybrid layer: a resin-dentin composite. *Proc Finn Dent Soc*. 1992;88 Suppl 1:321-9. Review.
- [14] Pioch T, D'Souza PD, Staehle HJ, Duschner H Resin- dentin interface studied by SEM & CLSM. *Microsc Anal* 1996 (Iss 42): 15-16.
- [15] Pioch T, Stotz S, Staehle HJ, Duschner H. Applications of confocal laser scanning microscopy to dental bonding. *Adv Dent Res* 1997 11: 453–461.
- [16] Pioch T, Staehle HJ, Wurst M, Duschner H, Dörfer C. The nanoleakage phenomenon: influence of moist vs dry bonding. *J Adhes Dent*. 2002;4(1):23-30.
- [17] Poitevin A, De Munck J, Van Landuyt K, Coutinho E, Peumans M, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Critical Analysis of the Influence of Different Parameters on the Microtensile Bond Strength of Adhesives to Dentin *J Adhes Dent* 2008 10: 7-16.
- [18] Purk JH, Healy M, Dusevich V, Glaros A, Eick JD. In vitro microtensile bond strength of four adhesives tested at the gingival and pulpal walls of Class II restorations. *J Am Dent Assoc*. 2006; 137(10): 1414-8.
- [19] Phrukkanon S, Burrow MF, Tyas MJ. The influence of cross-sectional shape and surface area on the microtensile bond test. *Dent Mater*. 1998; 14: 212-21.
- [20] Reis A, Carrilho MRO, Schroeder M, Tancredo LLF, Loguercio AD. The influence of storage time and cutting speed on microtensile bond strength. *J Adhes*

Dent 2004 6:7-11

[21] Romano FL, Ambrosano GM, Magnani MB, Nouer DF. Analysis of the coefficient of variation in shear and tensile bond strength tests. *J Appl Oral Sci.* 2005 Sep; 13(3): 243-6.

[22] Sadek FT, Goracci C, Cardoso PE, Tay FR, Ferrari M. Microtensile bond strength of current dentin adhesives measured immediately and 24 hours after application. *J Adhes Dent.* 2005 7(4): 297-302.

[23] Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, Pashley DH. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater.* 1994; 10(4):236-40.

[24] Sano H, Shono Schupbach P, Krejci I, Lutz F. Dentin bonding: effect of tubule orientation on hybrid-layer formation. *European Journal of Oral Science* 1997 10:236-240.

[25] Sarr M, Kane AW, Vreven J, Mine A, Van Landuyt KL, Peumans M, Lambrechts P, Van Meerbeek B, De Munck J. Microtensile bond strength and interfacial characterization of 11 contemporary adhesives bonded to bur-cut dentin. *Oper Dent.* 2010; 35: 94-104.

[26] Schüpbach P, Krejci I, Lutz F. Dentin bonding: effect of tubule orientation on hybrid-layer formation. *Eur J Oral Sci* 1997; 105:344-352.

[27] Sidhu SK, Watson TF. Interfacial characteristics of resin- modified glass-ionomer materials: a study on fluid permeability using confocal fluorescence microscopy. *Journal of Dental Research* 1998; 77:1749–59.

[28] Van Noort R, Noroozi S, Howard LC, Cardew G A critique of bond strength measurements. *J Dent.* 1989; 17: 61-67

[29] Watson TF. A confocal optical microscope study of the morphology of the tooth/restoration interface using Scotchbond 2 dentin adhesive. *J Dent Res* 1989; 68:1124-1131

[30] Watson TF, Boyde A. Confocal light microscopic techniques for examining dental operative procedures and dental materials. A status report for the American Journal of Dentistry. *American Journal of Dentistry* 1991 68: 1124–1131.

[31] Watson TF. Fact and artefact in confocal microscopy. Adv Dent Res 1997 4:193–200.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A busca por agentes de união que proporcionem adequado selamento interfacial continua sendo um desafio para pesquisadores e fabricantes odontológicos. Portanto, a avaliação *in vitro* das propriedades dos monômeros resinosos, bem como a qualidade de infiltração dos mesmos nos substratos dentais são primordiais para a investigação das técnicas restauradoras adesivas.

Neste contexto, a visualização das interfaces adesivas em microscopia confocal de varredura a laser usada em associação com agentes fluorescentes constitui uma ferramenta valiosa para estudos de adesão com vantagens sobre as demais microscopias. Através da microscopia confocal, imagens tridimensionais fluorescentes de alta resolução podem ser feitas da superfície da amostra em até 100µm abaixo da superfície (Pióch *et al.*, 1997) de modo não destrutivo, pois as exigências para a preparação das amostras são mínimas prevenindo os riscos de artefatos como contração e rachaduras decorrentes do processamento indispensável para a MEV ou MET. (Duschner *et al.*, 1995 Pióch *et al.*, 1996). Entretanto, mesmo que não tenha necessidade de processamento extenso das amostras, dois requisitos são importantes para a visualização em MCVL: a marcação dos adesivos com um agente fluorescente e o preparo de amostras em espessura reduzida.

Quanto ao uso dos fluoró cromos preconiza-se que melhores imagens são obtidas quando estes compostos são incorporados às formulações dos adesivos pois permite a visualização da distribuição dos adesivos no interior dos túbulos dentinários e análise detalhada da micromorfologia da interface de união (Watson 1997). Entretanto o fato de se misturar o corante com os componentes dos adesivos pode representar um problema, pois como serão avaliados outros fatores de estudo e não o corante, a presença deste pode interferir no comportamento do adesivo avaliado e resultados obtidos. Assim uma das propostas deste trabalho foi avaliar a influência da incorporação de 0,16 mg/ml de Rodamina B no comportamento de dois sistemas adesivos, convencional Scotchbond Multi-

Purpose e autocondicionante Clearfil SE Bond por demonstrarem repetidamente excelentes resultados em estudos clínicos e laboratoriais (Sarr *et al.*, 2010).

O primeiro capítulo foi voltado para a avaliação da influência da presença Rodamina B nos adesivos com relação as propriedades físicas de resistência coesiva, resistência flexural e módulo de elasticidade, propriedades estas diretamente relacionadas com a adequada polimerização do adesivo (Dewaele *et al.*, 2009). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos investigados para todas as propriedades avaliadas. A presença da Rodamina também não interferiu na resistência à união dos sistemas adesivos investigados porque o resultado não demonstrou diferença estatística significativa entre os adesivos corados e não corados. Como o processo de mistura do corante não envolve nenhuma ligação química com o monômero (Watson, 1997 Schüpbach *et al.*, 2004), após a polimerização o polímero formado não se diferencia dos adesivos sem corante, ou seja, a interferência da Rodamina no comportamento dos adesivos consiste apenas no bloqueio físico da luz de excitar os fotoiniciadores.

A concentração de um agente fluorescente é extremamente importante no que diz respeito ao grau de conversão, e a resistência à união do adesivo ao qual o corante é adicionado. Esta concentração de Rodamina B foi definida com base no estudo de D'Alpino *et al.* 2006, no qual também foi observado resultado semelhante. Além disto, esta concentração permitiu boa detecção visual produzindo imagens fluorescentes nítidas, através das quais foi possível detectar a ocorrência de falhas na infiltração no substrato pelo corante com resultados semelhantes aos obtidos em estudos que avaliam a integridade da interface de união a curto prazo (Breschi *et al.*, 2008, Ito *et al.*, 2005; Brackett *et al.*, 2008). Portanto, de acordo com o resultado deste estudo a Rodamina B, na concentração de 0,16 mg/ml, pode ser empregada sem problemas de interferir no comportamento e selamento interfacial dos adesivos Clearfil SE Bond e Scotchbond Multi-Purpose.

O uso de outros tipos de fluorocromos, bem como outros sistemas adesivos

disponíveis comercialmente têm de ser avaliados para verificar a influência da presença do corante nas propriedades do sistema adesivo. Adicionalmente, estudos de marcações múltiplas utilizando corantes variados podem produzir imagens mais precisas, pois se cada componente do sistema adesivo for marcado com um fluoróculo específico é possível analisar a camada de adesivo e a camada híbrida separadamente fornecendo maiores detalhes da interface adesiva. Assim, o conhecimento do comportamento do fluoróculo é fundamental para fornecer imagens que permitam uma verdadeira representação das estruturas observadas (Pioch *et al.*, 1997).

Outra proposta deste estudo foi verificar a influência do preparo de micro-amostras no teste modificado de microtração (capítulo 2). As amostras foram preparadas com espessuras reduzidas, porque quanto mais fina, mais transparente a estrutura e melhor é a fluorescência produzida na superfície e subsuperfície da estrutura corada (Watson, 1997).

A confecção dos corpos-de-prova para execução do teste pôde ser realizada em cortadeira metalográfica de precisão (Isomet – Büelher), portanto sem a necessidade de nenhum procedimento diferente do que é feito no teste convencional de microtração, sendo que as dificuldades para realização dos cortes seriados foram as mesmas. Além disto, a incidência de fraturas prematuras durante os cortes seriados foi baixa e igualmente distribuída entre os grupos experimentais. A perda de palitos ocorreu devido à dificuldades de manuseio da amostra de tamanho reduzido e frágil, sendo esta uma limitação deste teste modificado de microtração.

Outro aspecto positivo é que foi possível se obter um número consideravelmente maior de espécimes por dente, o que possibilita o armazenamento de amostras em diferentes períodos de tempo quando se deseja avaliar a degradação de sistemas adesivos. Além disto, amostras menores produzem maior força de união pois contém menor número de defeitos internos garantindo uma distribuição de tensões mais homogênea (Griffith, 1920). Portanto a secção transversal menor da interface adesiva possibilitou a aplicação de força

puramente de tração e, conseqüentemente, distribuição de tensão mais uniforme na interface de união, diminuindo a variabilidade do ensaio, o que pôde ser confirmada pela baixa porcentagem do coeficiente de variação e alta porcentagem de falhas adesivas observadas neste estudo. Assim, o teste modificado de microtração foi considerado válido e o preparo de micro-amostras pode ser indicado para avaliação da efetividade de união.

CONCLUSÕES

Com os resultados deste estudo as seguintes conclusões foram obtidas:

1) A adição do corante Rodamina B não interferiu no comportamento dos sistemas adesivos investigados pois não foram observadas diferenças significativas nas propriedades mecânicas estudadas: resistência à união, resistência coesiva, resistência flexural e módulo de elasticidade, bem como na qualidade de infiltração dos sistemas adesivos no substrato dentinários.

2) O teste modificado de microtração através do preparo de micro-amostras foi considerado válido.

Referências

1. Bouillaguet S, Ciucchi B, Jacoby T, Wataha JC, Pashley D. Bonding characteristics to dentin walls of Class II cavities, in vitro. *Dent Mater* 20011; 7:316—21.
2. Brackett WW, Tay FR, Looney SW, Ito S, Haisch LD, Pashley DH. Microtensile dentin and enamel bond strengths of recent self-etching resins. *Oper Dent* 2008; 33:89-95.
3. Duschner H, Ernst CP, Gotz H, Rauscher M (1995). Advanced techniques of microanalysis and confocal microscopy: perspectives for studying chemical and structural changes at the interface between restorative materials and the cavity wall. *Adv Dent Res* 9:355-362.
4. Ito S, Tay FR, Hashimoto M, Yoshiyama M, Saito T, Brackett WW, Waller JL, Pashley DH. Effects of multiple coatings of two all-in-one adhesives on dentin bonding. *J Adhes Dent*. 2005; 7:133-41.
5. Johnson I. Fluorescent probes for living cells. *The Histochemical Journal* 1998; 30:123—40.
6. Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakajima M, Yoshiyama M, Shono Y, Fernandes CA, Tay F. The microtensile bond test: a review. *J. Adhes Dent* 1999, 1:299—309.
7. Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents. A review. *Dent Mater* 1995 11:117—25.
8. Valandro LF, Della Bona A, Bottino MA, Neisser MP. The effect of ceramic surface treatment on bonding to densely sintered alumina ceramic. *J. Prosthet Dent* 2005; 105:344—52.
9. Yoshikawa K, Pilecki P, Watson TF, Beighton D, Yamauchi J, Momoi Y, et al. Comparison of dentine bonding systems on permeability from pulp chamber. *Proceedings of the 82nd IADR/AADR/CADR*. 2004.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Comitee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

ANEXO



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Análise da efetividade de união através da microscopia confocal e um método modificado de microtração"**, protocolo nº 075/2012, dos pesquisadores Cíntia Tereza Pimenta de Araújo e Luis Alexandre Maffei Sartini Paulillo, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 17/09/2012.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Analyse the bonding effectiveness by confocal microscopy and a modified microtensile method (ITBS)"**, register number 075/2012, of Cíntia Tereza Pimenta de Araújo and Luis Alexandre Maffei Sartini Paulillo, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 09/17/2012.

Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
 Secretária
 CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.