



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**Enrico Angelo**

**Avaliação da efetividade da aplicação de etanol previamente ao adesivo universal sob os  
diferentes terços dentinários**

**Evaluation of the effectiveness of the ethanol application prior to the universal adhesive  
under different dentinal locations**

**Piracicaba**  
**2021**

Enrico Angelo

**Avaliação da efetividade da aplicação de etanol previamente ao adesivo universal sob os diferentes terços dentinários**

**Evaluation of the effectiveness of the ethanol application prior to the universal adhesive under different dentinal locations**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica, na Área de Dentística.

Thesis presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Clinic Dentistry, in Restorative Dentistry area.

**Orientador:** Prof. Dr. Luís Roberto Marcondes Martins.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO ENRICO ANGELO E ORIENTADA PELO PROF. DR. LUIS ROBERTO MARCONDES MARTINS.

**Piracicaba**

**2021**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

An43a Angelo, Enrico, 1993-  
Avaliação da efetividade da aplicação de etanol previamente ao adesivo universal sob os diferentes terços dentinários / Enrico Angelo. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Luís Roberto Marcondes Martins.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Dentina. 2. Etanol. 3. Resistencia a tração. 4. Infiltração dentária. I. Martins, Luís Roberto Marcondes, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of the effectiveness of the ethanol application prior to the universal adhesive under different dentinal locations

**Palavras-chave em inglês:**

Dentin

Ethanol

Tensile strength

Dental leakage

**Área de concentração:** Dentística

**Titulação:** Doutor em Clínica Odontológica

**Banca examinadora:**

Luís Roberto Marcondes Martins [Orientador]

Cristiane Rumi Fujiwara Yanikian

Rodrigo Barros Esteves Lins

Lourenço Correr Sobrinho

Flavio Henrique Baggio Aguiar

**Data de defesa:** 23-07-2021

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Odontológica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-7183-4318>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.onpq.br/7278404071718747>



**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 23 de julho de 2021, considerou o candidato ENRICO ANGELO aprovado.

PROF. DR. LUÍS ROBERTO MARCONDES MARTINS

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. CRISTIANE RUMI FUJIWARA YANIKIAN

PROF. DR. RODRIGO BARROS ESTEVES LINS

PROF. DR. LOURENÇO CORRER SOBRINHO

PROF. DR. FLAVIO HENRIQUE BAGGIO AGUIAR

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais Edmilson e Elaine, meu irmão Eric e à toda a minha família. Também dedico a minha namorada Sophia aos meus amigos , que sempre me apoiaram em todos os meus objetivos e desejos.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Luis Roberto Marcondes Martins, pela orientação durante toda a pesquisa desenvolvida, por todo ensinamento e orientação.

Ao Prof. Dr. Rafael Pino Vitti, pela orientação e ajuda com a estatística durante toda a pesquisa desenvolvida e por todo ensinamento.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor Prof. Dr. Francisco Heiter.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na pessoa do Reitor Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles.

À Coordenadoria de pós-graduação, ao programa de pós-graduação em clínica odontológica, com área de concentração em dentística.

A todas as pessoas que participaram, de alguma forma durante a pesquisa, em especial a Marina Santi e Amanda Guerra.

Aos técnicos de laboratórios da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

A minha família e a minha namorada, por me apoiar e sempre me dar forças para superar cada obstáculo.

## Resumo

O objetivo deste estudo é avaliar o uso de etanol previamente ao uso do adesivo universal em relação aos testes de microinfiltração e resistência de união à microtração ( $\mu$ TBS) da resina composta bulk-fill em diferentes localizações dentinárias. Molares humanos hígidos foram divididos em grupos quanto ao protocolo de aplicação e localização da dentina como segue: adesivo universal (C, controle; Scotchbond™ Universal Adhesive, 3M ESPE), ácido fosfórico + etanol antes do adesivo universal (PA + E), e etanol antes adesivo universal. Todos os protocolos de adesão foram aplicados em diferentes localizações dentinárias (superficial, média e profunda). A resina composta bulk-fill (Tetric N-Ceram Bulk Fill, Ivoclar Vivadent) foi usada para a reconstrução. Metade das amostras de cada grupo foram termocicladas (10.000 ciclos; 5 ° C e 55 ° C). Todas as amostras (n = 10) foram submetidas aos testes de microinfiltração (microscópio eletrônico de varredura e avaliadas com o software ImageJ) e  $\mu$ TBS (máquina de teste universal). Os dados foram submetidos à correlação de Spearman (microinfiltração x  $\mu$ TBS) e ANOVA de três vias (protocolo de aplicação do adesivo, envelhecimento e localização da dentina) para comparações múltiplas seguido do teste post hoc de Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ). Os grupos sob protocolo PA + E apresentaram os maiores  $\mu$ TBS e os menores valores de microinfiltração em 24h, porém foram os grupos com pior resultado após termociclagem. Todos os grupos apresentaram diminuição dos valores de  $\mu$ TBS após a termociclagem. Os grupos C e E não diferiram em avaliação imediata. Houve diferença estatística entre os grupos C e E após termociclagem em dentina média e profunda. O grupo E apresentou maior estabilidade de união após termociclagem em dentina média e profunda. Em relação ao padrão de fratura as duas falhas mais observadas foram adesiva e mista em avaliação imediata e após termociclagem. A correlação de Spearman (superficial  $\rho = -0,609$ ; média  $\rho = -0,598$ ; profunda  $\rho = -0,814$ ; com  $\rho < 0,001$ ) mostrou uma correlação negativa e forte entre microinfiltração e  $\mu$ TBS para toda a profundidade dentinária ( $\rho > -0,5$ ). O condicionamento ácido fosfórico + etanol melhorou a adesão imediata porém de forma não estável, sendo observado uma queda significativa dos resultados após termociclagem. O uso do etanol associado ao modo autocondicionante do adesivo universal melhorou a estabilidade de união do adesivo universal apenas em dentina média e profunda. Quanto maior a profundidade dentinária, menor a estabilidade de união. O envelhecimento da amostra mostrou que para todos os protocolos houve uma diminuição significativa dos valores, indicando uma menor estabilidade da camada híbrida independente do protocolo adesivo aplicado.

**Palavras-chave:** dentina; etanol; resistência à tração; infiltração dentinária.

## **Abstract**

This study aims to evaluate the use of ethanol prior to universal adhesive on microleakage and microtensile bond strength ( $\mu$ TBS) of bulk-fill resin composite to different dentin locations. Human molar teeth were divided into groups regarding the application protocol and dentin location as follow: universal adhesive (C, control; Scotchbond™ Universal Adhesive, 3M ESPE), phosphoric acid etch + ethanol before universal adhesive (PA+E), and ethanol before universal adhesive. All protocols of adhesion were applied to different dentinal locations (superficial, middle and deep). Resin composite bulk-fill (Tetric N-Ceram Bulk Fill, Ivoclar Vivadent) were used for reconstruction. Half of the samples of each group was thermocycled (10,000 cycles; 5°C and 55°C). All samples (n = 10) were submitted to microleakage (scanning electron microscope and evaluated with software ImageJ) and  $\mu$ TBS (universal testing machine) tests. Data were submitted to Spearman correlation (microleakage x  $\mu$ TBS) and three-way ANOVA (adhesive application protocol, aging and dentin location) for multiple comparisons followed by Bonferroni post hoc test ( $\alpha=0.05$ ). The groups under the PA + E protocol had the highest  $\mu$ TBS and the lowest microleakage values in 24h, but they were the groups with the worst result after aging. All groups showed decreased  $\mu$ TBS values after thermocycling. Groups C and E did not differ in immediate evaluation. There was a statistical difference between groups C and E after thermocycling in middle and deep dentin. Group E showed greater bond stability after thermocycling in middle and deep dentin. Regarding the fracture pattern, the two most observed failure types were adhesive and mixed in immediate evaluation and after thermocycling. Spearman's correlation (superficial  $\rho = -0.609$ ; mean  $\rho = -0.598$ ; deep  $\rho = -0.814$ ; with  $\rho < 0.001$ ) showed a strong negative correlation between microleakage and  $\mu$ TBS for the entire dentinal depth ( $\rho > -0.5$ ). Phosphoric acid + ethanol etching improved immediate adhesion, but not stable, with a significant drop in results after aging. The use of ethanol combined with the self-etching mode of the universal adhesive improved the bonding stability of the universal adhesive only in middle and deep dentin. The greater the dentin depth, the less stable the bond. The aging of the sample showed that for all protocols there was a significant decrease in values, indicating a lower stability of the hybrid layer regardless of the adhesive protocol applied.

**Keywords:** dentin; ethanol; tensile strength; dental leakage.

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Artigo - Evaluation of Microleakage and Microtensile Bond Strength of Ethanol Wet-bonding Technique With Universal Adhesive.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Conclusão.....</b>	<b>31</b>
<b>Referências *.....</b>	<b>32</b>
<b>Apêndice 1 – Metodologia Detalhada.....</b>	<b>35</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>42</b>
<b>Anexo 1 – Parecer do comitê de ética em Pesquisa.....</b>	<b>42</b>
<b>Anexo 2 – Teste anti-plágio (Turnitin).....</b>	<b>53</b>
<b>Anexo 3 – Comprovante de Submissão do artigo.....</b>	<b>54</b>

## 1. Introdução

A demanda do clínico por materiais simplificados, acarretou no desenvolvimento dos adesivos universais, que visam a redução dos passos da técnica operatória, tanto quanto a redução da sensibilidade operatória da mesma (Cuevas et al., 2019). O desenvolvimento dos adesivos universais permite ao clínico uma menor sensibilidade operatória relacionada a escolha da técnica a ser utilizada, sendo possível sua aplicação por ambas as técnicas, sendo de maneira tradicional, com a realização de ataque ácido, ou no modo autocondicionante, sem a realização do condicionamento prévio com ácido fosfórico a 37% (Makishi P et al., 2016). No entanto, essa versatilidade dos adesivos universais (adesão em diferentes substratos) defendida pelos fabricantes é ainda discutida na literatura, e ainda não se chegou a um consenso da melhor técnica de aplicação de modo unificado para todo tipo de substrato (Tay FR et.al, 2000/2001; Mazzoni A et.al, 2013; Tjäderhane L et.al, 2013; Ayar, 2016; Makishi P et al., 2016; Cuevas et al., 2019).

Embora várias melhorias significativas ocorreram nos sistemas adesivos, a camada híbrida é ainda a parte que apresenta maiores desafios nas restaurações diretas (Ayar, 2016). E quando se trata da dentina como substrato de união, diferentemente do esmalte, ainda é um desafio para a odontologia, devido à complexidade de sua composição orgânica/inorgânica e a maior quantidade de água presente (Spencer P et.al, 2014). Estudos anteriores mostraram que as principais causas de falhas na interface de ligação são a hidrólise da camada híbrida, bem como a hidrólise enzimática das fibras de colágeno (Breschi et al., 2018; Stewart et al., 2019).

Na técnica de adesão convencional, preconiza-se que o adesivo seja aplicado à dentina úmida, pois a água é um fator importante para reexpandir as matrizes de dentina desmineralizadas e colapsadas pelo condicionamento com ácido fosfórico (Pashley DH et.al, 2007; Cuevas et al., 2019). Entretanto, o excesso de água remanescente na cavidade acarreta alterações no grau de conversão de polimerização dos monômeros; acarretando numa formação de camada híbrida mais hidrofílica, logo, sendo mais susceptível ao processo de hidrólise por sequência infiltrações (Spencer P et al., 2002; Cuevas et al., 2019). A literatura mostra que adesão em dentina superficial é maior do que na dentina cervical/profunda, devido ao número de túbulos e o fluído tubular, e conseqüentemente um maior quantidade de fluído tubular se faz presente, aumentando a probabilidade de incorporação de água durante o processo de hibridização (Perdigão J, 2007/2010). Devido a este fato, faz-se necessário avaliar o comportamento dos protocolos adesivos em relação a diferentes profundidades cavitárias (superficial, média ou profunda).

Ao se aplicar o condicionamento com ácido fosfórico remove a smear layer e desmineraliza a dentina inter e peritubular aumentando a permeabilidade da dentina, enquanto na técnica autocondicionante a aplicação é realizada na dentina intacta e coberta por smear layer (Tay FR et.al, 2000/2001). Há na literatura estudos que apontam que o condicionamento ácido pode induzir a degradação da matriz de colágeno da dentina, devido a acidez, que é capaz de ativar enzimas colagenolíticas endógenas, chamadas metaloproteínas e cateínas (Vermelho PM et.al, 2017). Isso tem sido descrito como uma desvantagem nos adesivos etch-and-rinse, embora o mesmo fenômeno também ocorra com sistemas autocondicionantes, porém em níveis mais baixos de agressividade (Mazzoni A et.al, 2013; Tjäderhane L et.al, 2013).

Com isso, o processo de degradação da camada híbrida, através do processo de hidrólise, pode ocorrer de forma enzimática ou por meio da água (Hosaka K et al., 2009; Carvalho AA et al., 2019). O conceito de hidrólise pode ser apresentado como um processo químico no qual moléculas de substâncias são quebradas em unidades menores pela ação de íons provenientes da ionização da água (Souza MY et al., 2018). Tal degradação irá levar a complicações clínicas como cáries secundárias, perda de retenção até a falha da restauração (Hosaka K et al., 2009; Souza MY et al., 2018; Carvalho AA et al., 2019).

Além disso, a importância da interação de solventes com os monômeros resinosos na matriz da dentina desmineralizada é um fator importante relacionado ao desempenho do adesivo (Ayar MK, 2016). Tay et al. em 2007, demonstrando que a aplicação de etanol, em concentrações crescentes na dentina desmineralizada melhorou o desempenho do sistema adesivo. O objetivo do etanol é infiltrar os espaços interfibrilares e túbulos dentinários, se ligando à água para auxiliar na evaporação/ remoção dos excessos da mesma; promovendo uma melhor interação/infiltração dos monômeros do adesivo (Shin TP et.al, 2009).

Levando em conta os fatores abordados previamente, ainda a literatura apresenta falta de estudos e consenso relacionado as estratégias para melhorar o desempenho adesivo em dentina, principalmente quando relacionado aos adesivos universais, principalmente relacionado a técnica de associação ao etanol (Carvalho AA et al.,2019). Além disso, a maioria dos estudos tem avaliado a adesão de materiais resinosos à dentina como um todo, sem considerar a influência da morfologia dentinária (profundidade em relação à câmara pulpar), que se torna mais complexa conforme sua profundidade na cavidade (Tay et al., 2001; Sadek et al., 2008; Breschi et al., 2019; Yi L et al., 2019; Comba et al., 2020; Kewlani et al., 2020; Giacomini MC et al., 2020)

Outro fator importante a ser considerado ao avaliar os sistemas adesivos está relacionado ao envelhecimento/longevidade. É importante avaliar o sistema adesivo a longo prazo (> 1 ano ou mais de uso, simulado com armazenamento de 1 ano em água / saliva ou termociclado, por exemplo) (Comba et al., 2020). Isso pode fornecer uma melhor avaliação da estabilidade do material, e por consequência promovendo uma melhor previsibilidade da técnica e durabilidade da restauração (Al-Ammar et al., 2009; Yi L et al., 2019; Comba et al., 2020).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da aplicação de etanol antes do adesivo universal na microinfiltração e resistência de união à microtração ( $\mu$ TBS) da resina composta à profundidade da dentina na adesão imediata e após o envelhecimento. As hipóteses testadas no presente estudos são: (i) a aplicação de etanol influencia a adesão do adesivo universal, (ii) a profundidade da dentina influencia a adesão do adesivo universal e (iii) o envelhecimento afeta a estabilidade de adesão do adesivo universal.

## 2. Artigo

**Title: Evaluation of Microleakage and Microtensile Bond Strength of Ethanol Wet-bonding Technique With Universal Adhesive**

**Short Title: Ethanol Wet-bonding with Universal Adhesive**

Enrico Angelo<sup>1</sup>; Amanda Guerra Cavalcante de Souza<sup>1</sup>; Rafael Pino Vitti<sup>2</sup>; Luis Roberto Marcondes Martins<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Restorative Dentistry, [Piracicaba Dental School](#), University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup> School of Dentistry - Herminio Ometto University Center (FHO-Uniararas), Brazil.

### **Corresponding Author:**

Enrico Angelo

Department of Restorative Dentistry, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, São Paulo, Brazil. Phone: + 55 19 2101-5340 Email: [e\\_angelo10@hotmail.com](mailto:e_angelo10@hotmail.com).

**Keywords:** dentin; ethanol; tensile strength; dental leakage.

## ABSTRACT

### Objective

The objective of this study was to evaluate the application of ethanol before universal adhesive on microleakage and microtensile bond strength ( $\mu$ TBS) of resin composite to different dentin deep.

### Methods

Human molar teeth were distributed into groups according to application protocol and dentin deep as follow: universal adhesive in self etching mode (C, control; Scotchbond™ Universal Adhesive, 3M ESPE), phosphoric acid etch + ethanol before universal adhesive (PA+E), and ethanol before universal adhesive (E). All protocols were applied to different dentin deep (superficial, middle and deep). A bulk-fill resin composite (Tetric N-Ceram Bulk Fill, Ivoclar Vivadent) was used to restore each dentin deep. Half of the samples of each group was thermocycled (10,000 cycles; 5°C and 55°C). All samples (n = 10) were submitted to microleakage (scanning electron microscope and ImageJ) and  $\mu$ TBS (universal testing machine) tests. Data were submitted to Spearman correlation (microleakage x  $\mu$ TBS) and three-way ANOVA (adhesive application protocol, aging and dentin deep) for multiple comparisons followed by Bonferroni post hoc test ( $\alpha=0.05$ ).

### Results

In general, PA+E group showed the highest  $\mu$ TBS and the lowest microleakage values in 24h. All groups presented similar  $\mu$ TBS values after thermocycling. PA+E group presented the highest microleakage values after thermocycling. The microleakage increased and  $\mu$ TBS values decreased after thermocycling for all groups. Spearman's correlation (superficial  $\rho=-0.609$ ; middle  $\rho=-0.598$ ; deep  $\rho=-0.814$ ; with  $\rho<0.001$ ) showed a negative and strong correlation between microleakage and  $\mu$ TBS for all dentin depth ( $\rho>-0.5$ ).

### Conclusions

Phosphoric acid + ethanol (PA+E) improved the immediate adhesion and the ethanol (E) promoted a more stable  $\mu$ TBS values in the long-term adhesion of universal adhesive on dentin. The deep dentin showed less stable  $\mu$ TBS. The aging for all protocols jeopardized the stability of the hybrid layer.

Clinical Significance: Ethanol wet-bonding technique can boost the bonding durability of universal adhesive.

## INTRODUCTION

The development of minimally invasive and faster treatments has led to a more preventive and preservative Dentistry.<sup>1,2</sup> One of these approaches, adhesive restoration, is one of the most common techniques applied in Dentistry.<sup>2</sup> Using dentin as a bonding substrate is an enormous challenge because of its complex composition.<sup>3</sup> The weakness of the adhesive bond to dentin causes several issues, such as restoration debonding, secondary caries, and microleakage.<sup>2</sup> Previous studies have shown that the main causes of failures at the adhesive interface are hydrolysis of resin bond, and enzymatic hydrolysis of collagen fibers.<sup>2,4</sup>

Some alternative agents are used to improve durability of the bond to dentin, such as chlorhexidine and glutaraldehyde.<sup>5</sup> These agents act in different ways; the former functions as an inhibitor of matrix metalloproteinases (MMPs), and the latter operates as a cross-linking agent. However, the literature has shown some concerns about their cytotoxicity.<sup>2</sup> To overcome the question of cytotoxicity, other techniques such as ethanol wet-bonding, have been developed as alternatives to boost the adhesive bonding strength to dentin. The proposal of ethanol wet-bonding technique is that it enables better penetration of the adhesive (hydrophobic monomers) into the collagen fiber network, thereby improving formation of the hydrophobic hybrid layer.<sup>6</sup> Furthermore, the ethanol use reduce the water content on the hybrid layer, and as consequence, leads to a less hydrophilic hybrid layer, reducing the probability of hydrolysis of the adhesive interface.<sup>7,8</sup>

With the increasing simplification of the number of materials used for adherence to different substrates, and less sensitive procedures, universal adhesives have been widely used in Dentistry.<sup>12</sup> Universal adhesives can be applied on enamel and dentin in conventional mode (etch-and-rinse on dentin/enamel), selective etching mode (phosphoric acid on enamel and self-etch on dentin) and self-etch mode on both dentin and enamel.<sup>2,12,13</sup> Some universal adhesives have 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate (10-MDP) in their composition. This phosphate monomer can chemically bond to dentin by calcium chelation, creating a stable bond to dental substrates.<sup>12,13</sup>

Moreover, it is important to understand the play of water in the adhesive process. Water is responsible for the long-term hydrolysis of the bonded interface (leakage). The resin monomers are broken down into smaller molecules by the action of ions arising from the ionization of water.<sup>11-15</sup> The universal adhesives have a higher number of hydrophilic monomers, thus creating a hybrid layer that is more susceptible to hydrolysis.<sup>11-15</sup>

Although there are studies which evaluate the effectiveness of alternative strategies to improve adhesion long-term, their effects on the long-term adhesion of universal adhesives, specifically the ethanol wet-bonding technique, remains unclear. Manufacturers and studies often recommend application of universal adhesives by self-etching or conventional modes.<sup>11,14,15</sup> However, the etch-and-rinse application and/or the pH of the adhesive system can result in the activation of MMPs.<sup>11,14,15</sup> Furthermore, the majority of studies have evaluated the adhesion of resin materials to dentin as a whole, without considering the influence of dentinal morphology (dentin depth), which becomes more complex according to its location (deep) in the cavity.<sup>2,3,6,9-11</sup>

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effectiveness of applying ethanol to the substrate, before application of the universal adhesive in both modes (etching and rinse; self-etching), on the immediate and long-term microleakage and microtensile bond strength ( $\mu$ TBS) of resin composite to different dentin depths. The hypotheses tested were (i) the application of ethanol and (ii) dentin depth would have an influence on the adhesion of the universal adhesive, and (iii) in the long-term, would affect the stability of the bond.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sample Preparation**

Sixty molars, with complete root formation and no presence of caries or restorations, extracted for therapeutic reasons, were stored in distilled water at 4°C for use within six months after obtaining approval from the Ethics Committee. The project was sent to, and approved by the Research Ethics Committee (Protocol: 29522820.4.0000.5418.).

For all the teeth in the sample, the superficial enamel was removed, and the root was sectioned 2.0mm below the cement-enamel junction using a low-speed water-cooled diamond saw (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA). The superficial dentin surface was ground with wet 600-grit sandpaper using a polishing machine (APL-4; Arotec, Cotia, SP, Brazil) for 10s to create a standardized smear layer.

A class I cavity (4mm high x 3mm long x 3mm wide, measured with a digital caliper - Mitutoyo Corporation, Tokyo, Japan) was prepared by the same, previously calibrated operator, using diamond tips of different granulations (1090, 1090F, 1090F; KG Sorensen, São Paulo, Brazil).

Application of the restorative system (Figure 1).

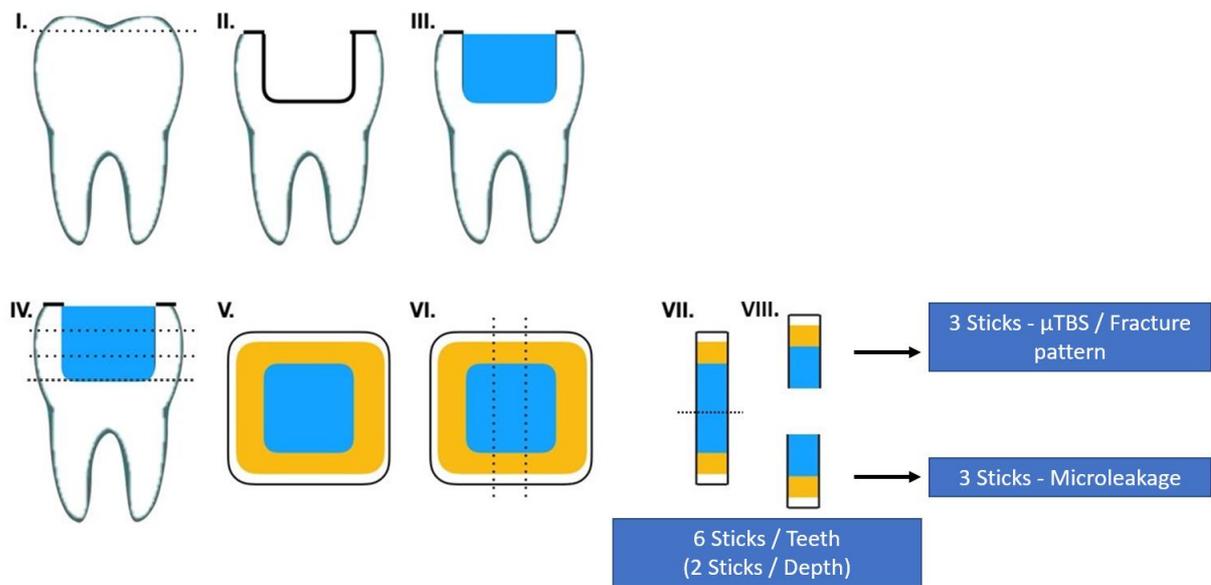


Figure 1. Sample preparation. I - dentin exposure. II - CLI cavity. III - application of the restorative technique according to protocol of each group. IV - division into deep (superficial; middle; cervical). V - superficial view after horizontal cut. VI - longitudinal cut. VII - Two sticks were removed from each detinal deep. VIII - Final aspect of the sample (stick). Blue – resin composite; yellow – dentin; white – enamel.

### Thermal cycling

The samples of each group ( $n = 10$ ) were submitted to 10,000 cycles of thermal cycling (MSCT-3e, ElQuip; São Carlos, São Paulo, Brazil) between water baths at  $5^{\circ}\text{C}$  and  $55^{\circ}\text{C}$  (dwell time 30s) for 250h (simulating 1 year in an intraoral environment ) [5]. After thermal cycling, the teeth were sectioned into three portions (superficial, middle, deep) of 1mm (Figures 1-IV and V), along the longitudinal axis, with use of a diamond saw (Buehler Ltd.). After aging in distilled water for 24h and thermal cycling, each dentin depth portion was sectioned to obtain the sticks for use as the final sample (Figure 1-VII), measuring  $\sim 1\text{mm}^2$ . The bond area was measured by using a digital caliper (model 727-150, Starret, Itu, SP, Brazil). Each stick was submitted to a microleakage and  $\mu\text{TBS}$  test.<sup>13</sup>

### Microtensile Bond Strength ( $\mu\text{TBS}$ )

The sticks (area of  $1\text{mm}^2$ ) were tested until failure in a universal testing machine (Ez Test, Shimadzu, Kyoto, Japan) at a crosshead speed of 1 mm/min until failure.<sup>13</sup> The sticks were fixed with cyanoacrylate adhesive (Zapit, DVA, Anaheim, CA). The **bond** area was measured ( $\text{mm}^2$ ) with a digital caliper (model 727-150, Starret). The  $\mu\text{TBS}$  was expressed in

MPa calculated by using the equation:  $\mu\text{TBS} = F/A$  in which F is the force applied during the test (N) and A the sample bonded area ( $\text{mm}^2$ ).

### **Fracture pattern analysis**

The samples were mounted on aluminum stubs, sputter coated with gold (BalTec SCD 050-SputterCoater) for 2 minutes. Then, the specimens were analyzed by scanning electron microscopy (SEM; JSM-5600LV, JEOL, Tokyo, Japan) operated at 15kV, at different magnifications. The failure mode was classified as adhesive, cohesive in dentin, cohesive in resin composite or mixed.<sup>13</sup>

### **Microleakage test**

The samples (sticks) were immersed in silver nitrate solution (10g of nitrate crystals in 10mL deionized water to which 28% ammonium hydroxide was added in dropwise manner) at 37°C, for 24h, in a dark environment. Sequentially, the samples were washed in running water for 2 min and immersed in developing solution (10.9g developer powder in 100mL distilled water) under a fluorescent lamp for 8h. After this, the samples were washed with distilled water and immersed in polystyrene resin.

After inclusion, the samples were polished with 600-, 1200-, and 2000-grit abrasive papers, then felt discs and diamond pastes in decreasing granulations of 3.0-, 0.5-, and 0.25- $\mu\text{m}$ . Between polishing with each abrasive paper and paste granulation, the samples were placed in an ultrasonic vessel/bath/ for 10min to remove debris. The samples were dried with absorbent paper and treated with 85% phosphoric acid for 10s (demineralization), followed by rinsing with distilled water. Samples were deproteinized by using a 2% sodium hypochlorite solution for 10min. The samples were washed with distilled water and dried at room temperature. Subsequently, the samples were dehydrated in ethyl alcohol at increasing concentrations of 50%, 75%, 90%, and 100% for 10 minutes per concentration.

The samples were mounted on aluminum stubs and sputter-coated with a thin layer of carbon (BalTec SCD 050-SputterCoater) for observation by SEM under high vacuum at a power of 20kV. The images were captured by backscattered electrons, and recorded for evaluation of the infiltrated area, by using ImageJ software. For each sample, the total area and infiltrated area was calculated, and the percentage of infiltration was determined.

### **Statistical Analysis**

The  $\mu$ TBS and microleakage data were assessed by tests for normality (Kolmogorov-Smirnov) and homoscedasticity (Levene) respectively. The results were submitted to Spearman correlation (microleakage x  $\mu$ TBS) and three-way ANOVA (adhesive application protocol, aging and dentin depth) for multiple comparisons followed by Bonferroni post hoc test at the significance level of  $\alpha=0.05$ .

## RESULTS

The statistical analysis revealed that PA+E in immediate aging showed the highest  $\mu$ TBS between adhesive application protocols for middle and deep dentin ( $p<0.05$ ). On the other hand, all adhesive application protocols in long-term aging showed no statistical difference in  $\mu$ TBS values in all dentin depths ( $p<0.05$ ). Deep dentin showed the lowest  $\mu$ TBS between dentin depths for all adhesive application protocols in immediate aging ( $p<0.05$ ). The long-term significantly decreased the  $\mu$ TBS in all dentin deep and adhesive application protocols ( $p<0.05$ ) (Table 1).

Table 1. Microtensile bond strength mean ( $\pm$ SD) values (MPa) for all evaluated groups.

		C	PA+E	E
Immediate	Superficial	40.64 (8.57)* A, a	45,75 (9.66)* AB, a	38.33 (9.75)* A, a
	Middle	33.33 (13.62)* AB, b	49,22 (11.50)* A, a	33.80 (7.56) AB, b
	Deep	27.60 (4.20)* B, b	40,89 (5.94)* B, a	31.22 (3.92)* B, b
Long-term	Superficial	28.16 (5.00) A, a	20.69 (3.63) A, a	24.70 (3.17) A, a
	Middle	24.46 (4.96) AB, a	19.16 (1.60) A, a	26.80 (3.41) A, a
	Deep	21.80 (1.97) B, ab	18.02 (1.88) A, b	23.06 (2.46) A, a

Different letters indicate statistically significant difference: lowercase letters for comparison between adhesion protocols for the same depth and aging (rows) and capital letters for comparison between depth for the same adhesion protocol and aging (column). Asteric indicates difference in aging for each depth within each adhesion protocol ( $p<0.05$ ).

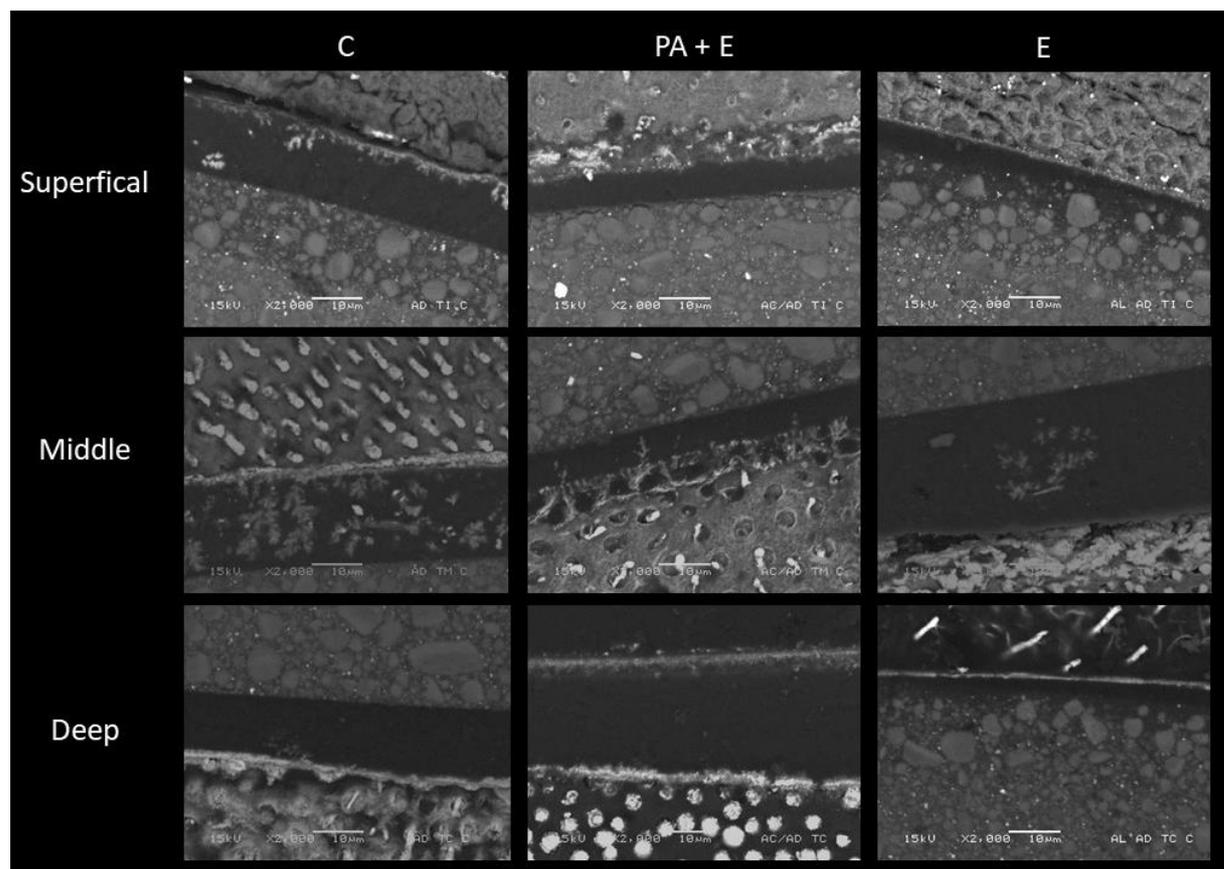
The Table 2 showed that C and PA+E groups presented the highest microleakage in immediate and long-term aging (Figure 2), respectively, for all dentin depth ( $p<0.05$ ). Generally, deep dentin showed the highest microleakage between dentin depth for all adhesive application protocols in immediate as well as long-term aging ( $p<0.05$ ). The long-term significantly increased the microleakage in all dentin depths and adhesive application protocols ( $p<0.05$ ).

Table 2. Microleakage mean ( $\pm$ SD) values (%) for all evaluated groups.

		C	PA+E	E
Immediate	Superficial	31,90 (11,08) B, a	25,44 (3,97)* B, b	24,61 (3,12)* B, b
	Middle	34,26 (2,00)* AB, a	30,17 (2,08)* A, b	27,83 (1,06)* AB, b
	Deep	36,13 (2,25)* A, a	31,27 (2,60)* A, b	29,53 (2,07)* A, b
Long-term	Superficial	35,39 (3,12) B, b	42,20 (1,79) A, a	31,05 (1,65) B, b
	Middle	37,86 (2,80) B, b	43,50 (1,93) A, a	33,85 (3,09) B, c
	Deep	41,06 (3,55) A, b	45,25 (1,13) A, a	38,86 (1,66) A, b

Different letters indicate statistically significant difference: lowercase letters for comparison between adhesion protocols for the same deep and aging (rows) and capital letters for comparison between deep for the same adhesion protocol and aging (column). Asteric indicates difference in aging for each deep within each adhesion protocol ( $p < 0.05$ ).

Figure 2. Representative MEV images of microleakage from groups.



Spearman's correlation showed a strong negative correlation between microleakage and  $\mu$ TBS for the dentin deeps: superficial ( $\rho = -0,609$ ;  $p < 0,001$ ), middle ( $\rho = -0,598$ ;  $p < 0,001$ ) and deep ( $\rho = -0,814$ ;  $p < 0,001$ ).

Fracture pattern analysis predominantly presented adhesive failures for all groups (Figures 3 and 4). Representative fracture patterns are presented in SEM images (Figure 5).

Figure 3. Fracture pattern analysis of debonded specimens (%) after  $\mu$ TBS test (immediate aging).

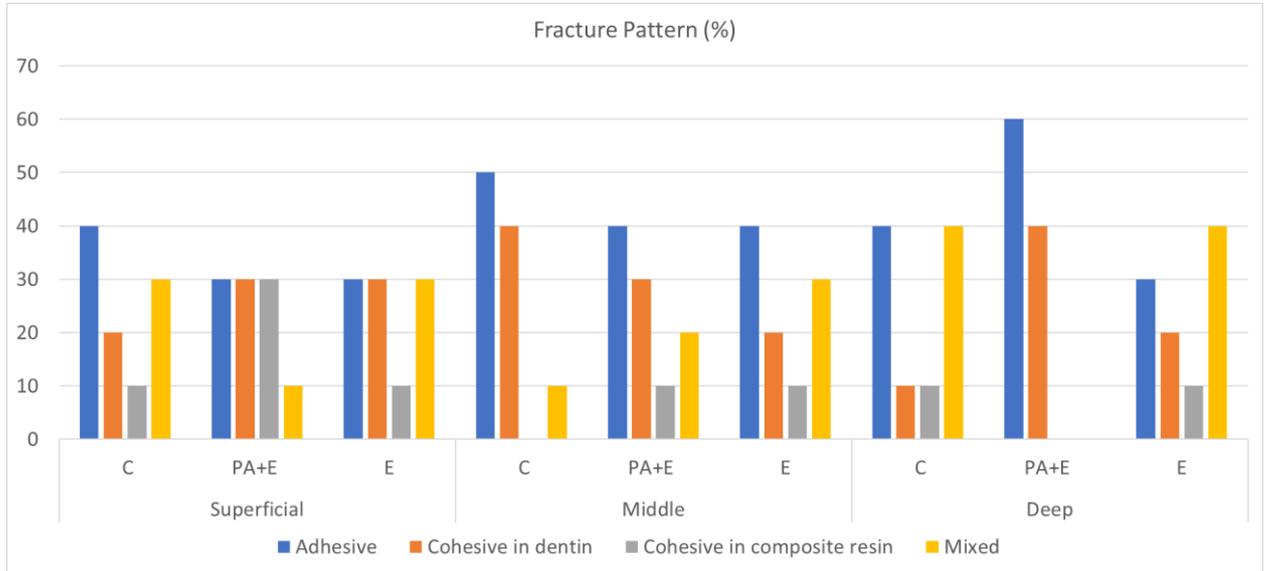


Figure 4. Fracture pattern analysis of debonded specimens (%) after  $\mu$ TBS test (long-term aging).

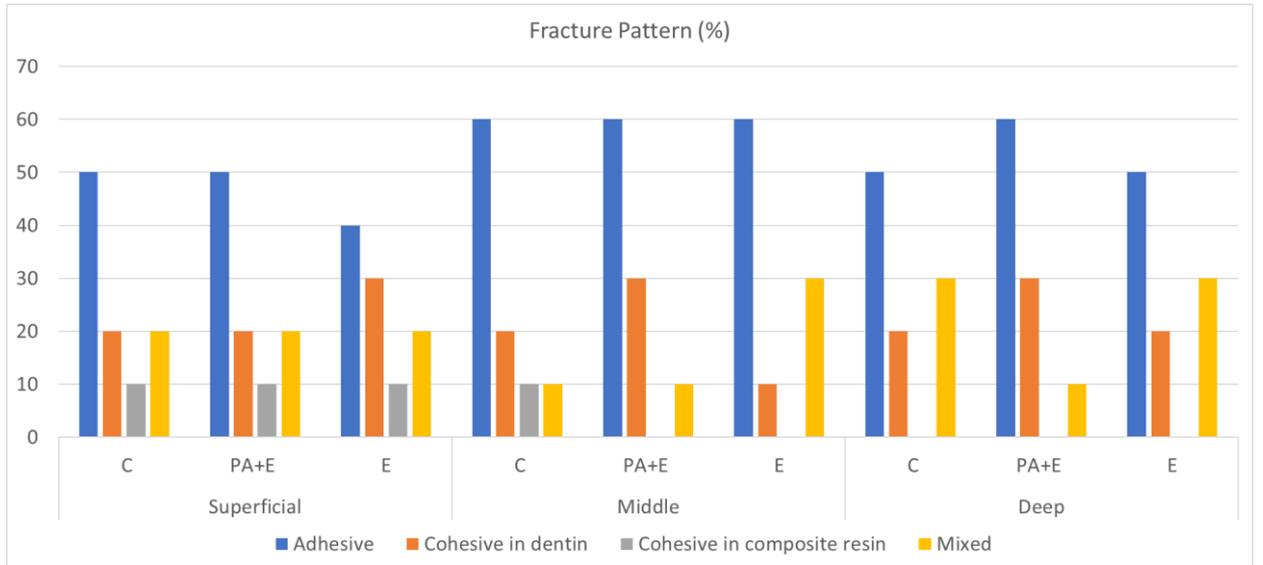
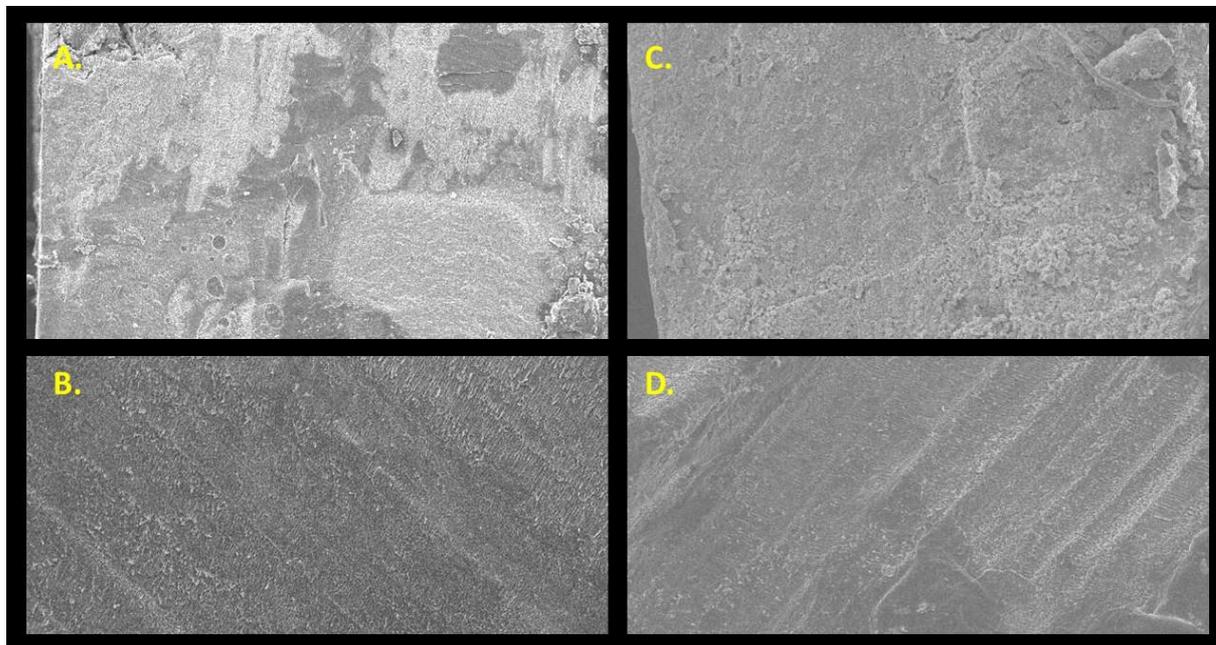


Figure 5. SEM images depicting the fracture pattern analysis. A - Adhesive failure, at adhesive interface. B - Cohesive failure within the dentin. C - Cohesive failure within the resin composite. D - Mixed failure.



## DISCUSSION

The results present statistical differences between groups, regarding different ageings, location and protocols, in both microleakage and  $\mu$ TBS tests. Therefore, the proposed hypotheses can be accepted, that the ethanol wet-bonding technique, dentin morphology and aging can influence the bonding process of universal adhesives.

There are two conflicting factors related to the smear layer presented from Pashley previously, which remain in discussion until present day.<sup>13,14</sup> Firstly, the smear layer could play an important role in the adhesion process, acting as a natural cavity protector; by obliterating the dentinal tubules and reducing dentin permeability.<sup>13</sup> On the other hand, this may represent a challenge to be overcome for the diffusion of monomers in the substrate.<sup>13</sup> Due to this, choosing between adhesive systems that remove or dissolve the smear layer is still one of the main topics of discussion in the literature.<sup>14</sup> All surface and subsurface mineral content is solubilized from dentin, and is removed and replaced with water after being etched with phosphoric acid.<sup>13,14</sup> When adding this water to the previous volume that it is originally present in its composition, the result observed is that about 70% of the total dentin volume is composed of water, literally leaving a collagen structure suspended in water.<sup>14</sup> This collagen, once exposed, acts as a network with nanometer-sized porosities (10-40 nm), which must have the ability to mechanically retain the fluid resin after in situ polymerization.<sup>13-15</sup> Moreover, the

process of water absorption leads to a dimensional alteration of the polymer, therefore, for its plasticization. This would explain why the groups PA + E and E present better results than the group C in 24h evaluation. This process will lead to the breakage of polymer chains, by division, breaking the ester bonds of the complex.<sup>15</sup> Thus, the deterioration of the polymer structure, continuous over the time, determines a change on its microstructure, due to the formation of pores; through which the degradation products are released, leading to a reduction in the polymer mass, starting the infiltration process of the hybrid layer;<sup>13-15</sup> explaining why all groups showed better values of microleakage and  $\mu$ TBS.

The PA + E groups were the presents higher microleakage and lower  $\mu$ TBS numbers after thermocycling, and adhesive viscosity may be the key factor to explain the results. The adhesive material cannot fully penetrate the conditioned area which contains gaps between the substrate and the resin material approximately 10–50 nm in size.<sup>16,17,19</sup> This problem worsens when using universal adhesive due to its viscosity, it becomes more difficult to penetrate the dentin.<sup>17</sup> In addition, the etching promoted by the phosphoric acid would cause the removal of the smear layer, which would be something to avoid since the monomer 10-MDP, which can interact with the hydroxyapatite crystals and form salts of calcium (MDP-Ca) are present in its composition.<sup>10,12,19</sup>

The self-etching adhesives do not require a moist dentin surface to bond, reducing the technique sensitivity. Despite this, they inevitably incorporate water in their composition.<sup>12,16,20</sup> The water is responsible for the ionization process of the resin monomers. Moreover, this kind of material has a high percentage of ionic resin monomers in its composition, which will lead to osmotic imbibition of fluids from the tubules of dentin.<sup>20-22</sup> Furthermore, the increase in temperature produced during the light-curing process leads to a convective flow of the enmeshed water, forming water channels through the hybrid layer, known as water trees, which are responsible for increasing the permeability of the interface by producing a more hydrophilic hybrid layer.<sup>21,22</sup> This would explain why the values of microleakage and  $\mu$ TBS of group C were equal or lower than group E after thermocycling. The ethanol use combined with self-etching applience of universal adhesive promotes a less incorporation of water during the polymerization process and as consequence a less hydrophilic hybrid layer.

The concept of ethanol wet-bonding (EWB) in dentin relies on the water present in the substrate being replaced gradually by resin monomers, promoting a more hydrophobic hybrid layer.<sup>5,22,23</sup> The literature also shows that the EWB technique would have the potential to generate a contraction in the diameter of the collagen fibrils, being greater than the contraction

of the collagen matrix volume, and thus resulting in an increase in the interfibrillar spaces, which by consequently it promotes an increase in the efficiency of monomeric infiltration [24]. Some studies have shown that the EWB technique applied to dentin optimizes the monomeric infiltration rate, improves the sealing of the collagen matrix, reduces the permeability of the polymerized adhesive layer and minimizes water sorption by polymers, forming more stable and less permeable bonding interfaces over time [15,24]. The literature validates the use of the wet-bonding technique by Hoy's triple solubility parameter theory, which consists of polar forces ( $\delta_p$ ) used to predict if the material can re-expand the dentin, hydrogen bonding forces ( $\delta_h$ ), dispersive forces ( $\delta_d$ ) and total cohesive forces ( $\delta_t$ ) [25].

A solvent or a resin-based monomer needs to blend with a hydrogen force superior to  $14.8 \text{ (Jcm}^3)^{1/2}$  to re-expand a collapsed dentin [26,27]. Ethanol has  $20.0 \text{ [Jcm}^3)^{1/2}$  [26,27]. Therefore, it can break hydrogen bonds and promote a re-expansion of the collapsed dentin [22-24]. Although the water is more capable of re-expanding the fiber network, the viscosity of the universal adhesive will leave gaps, which may lead to leakages. Also, hydrophobic monomers will perform better with ethanol than water [28].

Initially, the ethanol wet-bonding protocol included utilization of 50, 70, 80, 95, and 100% ethanol three times each, for 30 s, a total time of 3 to 4 minutes, which might be a disadvantage due to increasing time [22]. Furthermore, previous studies show that 100% ethanol has the same effect due to the highest cross-link collagen network, with less time required [5,6,22-25]. However, although the ideal protocol application time (15 s, 20 s, 1 min, or 5 min) of 100% ethanol is unresolved [22,26], there is evidence that ethanol used for a longer time is better, promoting more efficiency without any additional damage to the pulp [22,25,27].

Studies show that ethanol wet-bonding techniques improve or do not negatively affect the adhesive bonding of both hydrophilic and hydrophobic monomers [22-27]. Thus, microleakage rates decrease with this technique, which may increase monomer penetration into interfibrillar spaces [21,22,25,26]. This corroborates with results of the present study, which demonstrate more stability after thermocycling on  $\mu$ TBS and microleakage tests. However, the result reduces after aging due to the inevitable process of deterioration of the hybrid layer by the time.

Another key variable is dentin morphology, which can influence the bond strength and durability according to its location: superficial, middle, or deep dentin [27,28]. The more dentinal tubules present, the more fluid in the tissue, and the greater the probability of

hydrolysis. Hydrolysis reduces the bond strength and durability of the restoration system.<sup>24,27</sup> This pattern can be observed by evaluating the results of microleakage and  $\mu$ TBS testing.

As mentioned previously, water plays an important role in the bonding process.<sup>21,22</sup> This bonding, combined with the mechanical retention (promoted by phosphoric acid), might be the two key factors explaining why the group control and the PA+E showed better initial performance. In Hoy's theory, the solubility parameters are used to evaluate the probability of two mixed solutions, comparing total cohesive energy rates.<sup>20-23</sup> Hoy proposes that if the difference between the total cohesive force ( $\delta t$ ) rates of a first solution and a second solution or a substrate is less than  $5 [\text{Jcm}^3]^{1/2}$ , the solution will wet the surface, which will lead to a successful infiltration process.<sup>21</sup> The ethanol wet-bonding technique permits a better performance by hydrophobic monomers and a better infiltration process. The results of  $\mu$ TBS and microleakage tests show that the hybrid layer becomes more stable in the long term with ethanol use on middle and deep dentin. The pattern observed in the present study corroborates with previous studies, demonstrating that ethanol application increases hydrolysis resistance of the material.<sup>5,8,21-29</sup> However, the results demonstrate that ethanol plays an effective role in middle and specially in deep dentin, that presents a higher number of dentinal tubules and consequently higher volume of water to remove. Therefore it is possible to relate the effectiveness of ethanol appliances to the increase of dentinal tubule numbers.

During the polymerization process, the resin will inevitably contract, this increase in energy will generate tensions at the bonding interface.<sup>30</sup> Consequently, this process can affect the quality of the marginal adaptation of resin restorations and provide a greater probability of generating future complications.<sup>30,31</sup> Gaps in the marginal interface of the restoration will lead to microleakage and other problems, such as the subsequent gradual development of marginal staining, secondary caries and pulp irritation.<sup>31</sup> In a class I cavity this problem becomes even greater, due to the greater number of walls present in the preparation, known as C-factor;<sup>31</sup> for this reason, the reconstruction of the samples was done with a bulk-fill resin, as it presents a lower degree of polymerization shrinkage. In addition, the reconstruction was done with the incremental technique, using increments of up to 4mm, but joining a maximum of 2 walls. This change in the technique resin bulk-fill application may have enhanced the results observed in all groups of present study. In addition, it may be a likely explanation for why there were low rates of sample loss during its confection.

Previous studies classified the remaining material in the tooth and restoration as cohesive failure,<sup>32</sup> which was observed in the groups of this study to a modest degree. Adhesive

and mixed failure were the most frequent types observed in this study, indicating that the adhesive bond strength to the surface (dentin) is weaker than the bonding to restoration.<sup>32</sup>

The ethanol application combined with universal adhesive use in self-etching mode can be considered the better protocol in this present study. The modification of the organic matrix of the smear layer allows the crystals to be able to bond and helps in the interdiffusion of the material in the collagen network.<sup>26,27</sup> In addition, in the self-etching mode, there is a high percentage of hydroxyapatite available for the monomer 10-MDP to bond.<sup>33</sup>

Furthermore, the concept of enzyme immobilization can be considered a benefit of ethanol use, consisting of molecular imprinting of the enzyme template.<sup>34</sup> In this technique, the non-collagen proteins (such as the matrix metalloproteinases, MMPs) and remaining water are removed by the ethanol auxiliary.<sup>22</sup> The comonomers are dissolved in the ethanol through the interfibrillar field, leading to the molecular immobilization of the proteins after the polymerization process.<sup>35</sup> The enzyme molecules are covalently linked to each other to form a matrix, and this reaction ensures that the binding site does not cover the active (catalytic) site of the enzyme.<sup>35</sup> Therefore, the resin compound only affects their catalytic sites and by immobilization.<sup>22,32</sup>

Results of the Spearman test between microleakage and  $\mu$ TBS showed that there is a strong co-relationship between both tests (superficial:  $\rho = -0.609$ ;  $\rho < 0.001$ ; middle:  $\rho = -0.598$ ;  $\rho < 0.001$ ; deep:  $\rho = -0.814$ ;  $\rho < 0.001$ ), which corroborates the results that the higher the microleakage rate, the lower the bond strength.

The use of ethanol wet-bonding technique combined with universal adhesives in a self-etching mode can significantly improve the hybrid layer's quality in deep dentin. Thus, it might be a good alternative to protocol only in middle to deep dentin. However, further studies, regarding its association to other adhesive systems and also different time of application are still needed to indicate its clinical use and best protocol. It's important to consider that ethanol can boost the action of the hydrophobic monomers of the adhesive, but it also can negatively affect the hydrophilic part if it reduces the water content in excess. Therefore it is important to find an equilibrium between those two parts, to improve the hydrophobic part without compromising the hydrophilic part of the universal adhesive.

## CONCLUSIONS

1. Phosphoric acid + ethanol etching can improve the immediate adhesion. The use of ethanol in self-etching mode application improved the bonding stability of the universal adhesive only in middle and deep dentin.

2. The greater the dentin deep, the less stable  $\mu$ TBS.
3. The aging for all adhesion protocols decreased the  $\mu$ TBS, indicating a lower stability of the hybrid layer.

## References

- [1]. Yu H, Zhao Y, Li J, Luo T, Gao J, Liu H, Liu W, Liu F, Zhao K, Liu F, Ma C, Setz JM, Liang S, Fan L, Gao S, Zhu Z, Shen J, Wang J, Zhu Z, Zhou X. Minimal invasive microscopic tooth preparation in esthetic restoration: a specialist consensus. *Int J Oral Sci.* 2019 Oct 2;11(3):31. doi: 10.1038/s41368-019-0057-y.
- [2]. L. Breschi, T. Maravic, S.R. Cunha, A. Comba, M. Cadenaro, L. Tjaderhane, D.H. Pashley, F.R. Tay, A. Mazzoni, Dentin bonding systems: from dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications, *Dent. Mater.* 34 (1) (2018) 78–96.
- [3]. Kewlani M, Saha SG, Bhardwaj A, Saha MK, Vijaywargiya P, Jain S, Sai Prasad SV. Comparative evaluation of the effect of decontamination protocol on the shear bond strength of eighth generation bonding agent to contaminated dentin: an in vitro study. *Med Pharm Rep.* 2020 Jul;93(3):287-291. doi: 10.15386/mpr-1488.
- [4]. C.A. Stewart, Y. Finer, Biostable, antidegradative and antimicrobial restorative systems based on host-biomaterials and microbial interactions, *Dent. Mater.* 35 (1) (2019) 36–52.
- [5]. Heintze SD. Clinical relevance of tests on bond strength, microleakage and marginal adaptation. *Dent Mater.* 2013 Jan;29(1):59-84. doi: 10.1016/j.dental.2012.07.158. Epub 2012 Aug 21. PMID: 22920539.
- [6]. Al-Ammar, J.L. Drummond, A.K. Bedran-Russo, The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 91 (1) (2009) 419–424.
- [7]. Cuevas-Suárez CE, da Rosa WLO, Lund RG, da Silva AF, Piva E. Bonding Performance of Universal Adhesives: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *J Adhes Dent.* 2019;21(1):7-26. doi: 10.3290/j.jad.a41975.
- [8]. D.H. Pashley, F.R. Tay, R.M. Carvalho, F.A. Rueggeberg, K.A. Agee, M. Carrilho, Donnelly, F. Garcia-Godoy. From dry bonding to water-wet bonding to ethanolwet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer, *Am. J. Dent.* 20 (1) (2007) 7–20.

- [9]. F.T. Sadek, D.H. Pashley, Y. Nishitani, M.R. Carrilho, A. Donnelly, M. Ferrari, F.R. Tay, Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 84 (1) (2008) 19–29.
- [10]. Giacomini MC, Scaffa PMC, Gonçalves RS, Zabeu GS, Vidal CMP, Carrilho MRO, Honório HM, Wang L. Profile of a 10-MDP-based universal adhesive system associated with chlorhexidine: Dentin bond strength and in situ zymography performance. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2020 Oct;110:103925. doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.103925.
- [11]. Comba A, Maravić T, Villalta V, Tozzola S, Mazzitelli C, Checchi V, Mancuso E, Scotti N, Tay FR, Breschi L, Mazzoni A. Effect of an ethanol cross-linker on universal adhesive. *Dent Mater.* 2020 Dec;36(12):1645-1654. doi: 10.1016/j.dental.2020.10.004.
- [12]. Makishi P, André CB, Silva JL, Bacelar-Sá R, Correr-Sobrinho L, Giannini M. Effect of Storage Time on Bond Strength Performance of Multimode Adhesives to Indirect Composite resin and Lithium Disilicate Glass Ceramic. *Oper Dent.* 2016 Sep-Oct;41(5):541-551.
- [13]. Armstrong S, Breschi L, Özcan M, Pfefferkorn F, Ferrari M, Van Meerbeek B. Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength ( $\mu$ TBS) approach. *Dent Mater.* 2017 Feb;33(2):133-143. doi: 10.1016/j.dental.2016.11.015.
- [14]. Vinagre A, Ramos J. Adhesion in restorative dentistry. *Adhesives-Applications and Properties.* 2016 Nov 23:59-97.
- [15]. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent.* 2007;20(1):7–20.
- [16]. Kumagai RY, Hirata R, Pereira PNR, Reis AF. Moist vs over-dried etched dentin: FE-SEM/TEM and bond strength evaluation of resin-dentin interfaces produced by universal adhesives. *J Esthet Restor Dent.* 2020 Apr;32(3):325-332. doi: 10.1111/jerd.12537.

- [17]. Tay FR, Pashley DH (2001) Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Location of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater* 17:296–308.
- [18]. Perdigao J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater* 2010;26(2):e24–37.
- [19]. N. Nakabayashi, K. Kojima, E. Masuhara, The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates, *J. Biomed. Mater. Res.* 16 (3) (1982) 265–273.
- [20]. Chen C, Niu LN, Xie H, Zhang ZY, Zhou LQ, Jiao K, Chen JH, Pashley DH, Tay FR. Bonding of universal adhesives to dentine--Old wine in new bottles? *J Dent.* 2015 May;43(5):525-36. doi: 10.1016/j.jdent.2015.03.004.
- [21]. M.G. Brackett, N. Li, W.W. Brackett, R.J. Sword, Y.P. Qi, L.N. Niu, et al. The critical barrier to progress in dentine bonding with the etch-and-rinse technique *Journal of Dentistry*, 39 (2011), pp. 238-248.
- [22]. F.R. Tay, D.H. Pashley, B.I. Suh, N. Hiraishi, C.K. Yiu. Water treeing in simplified dentin adhesives – déjà vu? *Operative Dentistry*, 30 (2005), pp. 561-579.
- [23]. Ayar MK. A review of ethanol wet-bonding: Principles and techniques. *Eur J Dent.* 2016 Jan-Mar;10(1):155-159. doi: 10.4103/1305-7456.175687.
- [24]. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, et al. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. *J Dent Res.* 2009;88(2):146–51. DOI: 10.1177/0022034508328910.
- [25]. Kuhn E, Farhat P, Teitelbaum AP, Mena-Serrano A, Loguercio AD, Reis A, et al. Ethanol-wet bonding technique: Clinical versus laboratory findings. *Dent Mater.* 2015;31:1030–7.
- [26]. Ayar M. Ethanol application protocols and microtensile dentin bond strength of hydrophobic adhesive. *Tanta Dent J.* 2014;11:206–12.
- [27]. Carvalho AA, Leite MM, Zago JKM, Nunes CABCM, Barata TJE, Freitas GC, Torres ÉM, Lopes LG. Influence of different application protocols of universal adhesive system on the clinical behavior of Class I and II restorations of composite resin - a randomized and double-blind controlled clinical trial. *BMC Oral Health.* 2019 Nov 21;19(1):252. doi: 10.1186/s12903-019-0913-3.

- [28]. Souza MY, DI Nicoló R, Bresciani E. Influence of ethanol-wet dentin, adhesive mode of application, and aging on bond strength of universal adhesive. *Braz Oral Res.* 2018 Oct;32(0):e102. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0102>.
- [29]. Sadek FT, Pashley DH, Ferrari M, Tay FR. Tubular occlusion optimizes bonding of hydrophobic resins to dentin. *J Dent Res.* 2007;86:524–8.
- [30]. Shin TP, Yao X, Huenergardt R, Walker MP, Wang Y. Morphological and chemical characterization of bonding hydrophobic adhesive to dentin using ethanol wet bonding technique. *Dent Mater.* 2009;25:1050–7.
- [31]. Ramić BD, Stojanac IL, Drobac MR, Kantardžić IR, Maletin AZ, Cvjetičanin MT, Otašević KS, Petrović LM. Application of Scanning Electron Microscopy in the observation of dentin-adhesive interface. *Microsc Res Tech.* 2021 Apr;84(4):602-607. doi: 10.1002/jemt.23618.
- [32]. Campos, E. A., Ardu, S., Lefever, D., Jasse, F. F., Bartolotto, T., & Krejci, I. (2014). Marginal adaptation of class II cavities restored with bulk-fill composites. *Journal of Dentistry*, 42, 575–581.
- [33]. Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel/dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater.* 2005Oct;21(10):895-910.
- [34]. Yokota Y, Fujita KN, Uchida R, Aida E, Aoki NT, Aida M, et al. Quantitative Evaluation of MDP-Ca Salt and DCPD after Application of an MDP-based One-step Self-etching Adhesive on Enamel and Dentin. *J Adhes Dent.* 2016;18(3):205-13.
- [35]. Zucca, Paolo; Sanjust, Enrico. "Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms". *Molecules.* 19 (9): 14139–14194. doi:10.3390/molecules190914139.

### **3. Conclusão**

1. O condicionamento ácido fosfórico e etanol melhoraram a adesão imediata, porem com pouca estabilidade a longo prazo. O uso do etanol associado ao modo autocondicionante do adesivo universal melhorou a estabilidade de união do adesivo universal apenas em dentina média e profunda.
2. Quanto maior a profundidade dentinária, menor a estabilidade de união.
3. O envelhecimento da amostra mostrou que para todos os protocolos houve uma diminuição significativa dos valores, indicando uma menor estabilidade da camada híbrida.

**Referências \***

1. Al-Ammar, J.L. Drummond, A.K. Bedran-Russo, The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 91 (1) (2009) 419–424.
2. Ayar MK. A review of ethanol wet-bonding: Principles and techniques. *Eur J Dent.* 2016 Jan-Mar;10(1):155-9. doi: 10.4103/1305-7456.175687.
3. Breschi L, T. Maravic, S.R. Cunha, A. Comba, M. Cadenaro, L. Tjaderhane, D.H. Pashley, F.R. Tay, A. Mazzoni, Dentin bonding systems: from dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications, *Dent. Mater.* 34 (1) (2018) 78–96.
4. Carvalho AA, Leite MM, Zago JKM, Nunes CABCM, Barata TJE, Freitas GC, Torres ÉM, Lopes LG. Influence of different application protocols of universal adhesive system on the clinical behavior of Class I and II restorations of composite resin - a randomized and double-blind controlled clinical trial. *BMC Oral Health.* 2019 Nov 21;19(1):252. doi: 10.1186/s12903-019-0913-3.
5. Comba A, Maravić T, Villalta V, Tozzola S, Mazzitelli C, Checchi V, Mancuso E, Scotti N, Tay FR, Breschi L, Mazzoni A. Effect of an ethanol cross-linker on universal adhesive. *Dent Mater.* 2020 Dec;36(12):1645-1654. doi: 10.1016/j.dental.2020.10.004.
6. Cuevas-Suárez CE, da Rosa WLO, Lund RG, da Silva AF, Piva E. Bonding Performance of Universal Adhesives: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *J Adhes Dent.* 2019;21(1):7-26. doi: 10.3290/j.jad.a41975.
7. Giacomini MC, Scaffa PMC, Gonçalves RS, Zabeu GS, Vidal CMP, Carrilho MRO, Honório HM, Wang L. Profile of a 10-MDP-based universal adhesive system associated with chlorhexidine: Dentin bond strength and in situ zymography performance. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2020 Oct;110:103925. doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.103925.
8. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, et al. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. *J Dent Res.* 2009;88(2):146–51. DOI: 10.1177/0022034508328910.

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

9. Kewlani M, Saha SG, Bhardwaj A, Saha MK, Vijaywargiya P, Jain S, Sai Prasad SV. Comparative evaluation of the effect of decontamination protocol on the shear bond strength of eighth generation bonding agent to contaminated dentin: an in vitro study. *Med Pharm Rep.* 2020 Jul;93(3):287-291. doi: 10.15386/mpr-1488.
10. Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, Pashley DH, Breschi L (2013) Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res* 92:82–86
11. Makishi P, André CB, Silva JL, Bacelar-Sá R, Correr-Sobrinho L, Giannini M. Effect of Storage Time on Bond Strength Performance of Multimode Adhesives to Indirect Composite resin and Lithium Disilicate Glass Ceramic. *Oper Dent.* 2016 Sep-Oct;41(5):541-551.
12. Nikaido T, Nurrohman H, Takagaki T, Sadr A, Ichinose S, Tagami J. Nanoleakage in Hybrid Layer and Acid-Base Resistant Zone at the Adhesive/Dentin Interface. *Microsc Microanal.* 2015 Oct;21(5):1271-7. doi: 10.1017/S1431927615015068.
13. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent* 2007;20:7-20.
14. Perdigao J. New developments in dental adhesion. *Dent Clin North Am* 2007; 51(2):333–57, viii.
15. Perdigao J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater* 2010;26(2):e24–37.
16. Perote LC, Kamozaki MB, Gutierrez NC, Tay FR, Pucci CR. 2015. Effect of matrix metalloproteinase-inhibiting solutions and aging methods on dentin bond strength. *J Adhes Dent.* 17(4):347–352.
17. Sadek FT, D.H. Pashley, Y. Nishitani, M.R. Carrilho, A. Donnelly, M. Ferrari, F.R. Tay, Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 84 (1) (2008) 19–29.
18. Souza MY, DI Nicoló R, Bresciani E. Influence of ethanol-wet dentin, adhesive mode of application, and aging on bond strength of universal adhesive. *Braz Oral Res.* 2018 Oct;32(0):e102. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0102>.
19. Spencer P, Ye Q, Misra A, Goncalves SE, Laurence JS. Proteins, pathogens, and failure at the composite-tooth interface. *J Dent Res* 2014;93:1243-9.

20. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res* 2002;62:447-56.
21. Stewart CA, Y. Finer, Biostable, antidegradative and antimicrobial restorative systems based on host-biomaterials and microbial interactions, *Dent. Mater.* 35 (1) (2019) 36–52.
22. Shin TP, Yao X, Huenergardt R, Walker MP, Wang Y. Morphological and chemical characterization of bonding hydrophobic adhesive to dentin using ethanol wet bonding technique. *Dent Mater* 2009;25:1050-7.
23. Tay FR, Carvalho R, Sano H, Pashley DH (2000) Effect of smear layers on the bonding of a self-etching primer to dentin. *J Adhes Dent* 2:99–116
24. Tay FR, Pashley DH (2001) Aggressiveness of contemporary self- etching systems. I: Location of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater* 17:296–308.
25. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, et al. Bonding BisGMA to dentin – A proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res* 2007;86:1034-9.
26. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldini S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho M, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH (2013) Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer—a review. *Dent Mater* 29:999–1011.
27. Vermelho PM, Reis AF, Ambrosano GMB, Giannini M. Adhesion of multimode adhesives to enamel and dentin after one year of water storage. *Clin Oral Investig.* 2017 Jun;21(5):1707-1715. doi: 10.1007/s00784-016-1966-1.
28. Yi L, Yu J, Han L, Li T, Yang H, Huang C. Combination of baicalein and ethanol-wet-bonding improves dentin bonding durability. *J Dent.* 2019 Nov;90:103207. Doi: 10.1016/j.jdent.2019.103207. Epub 2019 Oct 3. PMID: 31586587.

## Apêndice

### Metodologia Detalhada - Materiais e Métodos

#### Delineamento experimental

Unidades experimentais: a unidade experimental foi considerada o elemento dental (60 molares humanos hígidos), de onde foram retirados palitos (360) após aplicação de protocolo adesivo e restaurador.

Fatores em estudo:

- 1) Protocolo de aplicação do adesivo universal
- 2) Morfologia dentinária (Profundidade)
- 3) Estabilidade da adesão (Envelhecimento)

Variável resposta:

- 1) Resistência à microtração (n=10)
- 2) Microinfiltração (n=10)

O projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / Universidade Estadual de Campinas. CAAE: 29522820.4.0000.5418.

#### Preparo das Amostras

Os dentes utilizados foram de até 6 meses após a extração, de pacientes com idade entre 18 e 35 anos, e seu armazenamento foi feito em água destilada 4°C.

Para preparar a dentina, o esmalte oclusal (Figura 1-I) foi removido e a raiz seccionada 2 mm abaixo da junção cimento-esmalte com uma serra diamantada a 250rpm (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) sob refrigeração a água. Superfície de dentina oclusal foi desgastada com papel carbetto de silício (granulação 600) sob refrigeração (água), utilizando uma máquina polidora (APL-4; Arotec, Cotia, SP, Brasil). Uma cavidade (Figura 1-II) classe I (4 mm de profundidade x 3 mm de comprimento x 3 mm de largura, medida com paquímetro digital - Mitutoyo Corporation, Tóquio, Japão) foi realizada pelo mesmo operador previamente calibrado, com pontas de diamante, sob diferentes granulações (1090, 1090F, 1090F; KG Sorensen, São Paulo, Brasil). Os grupos foram divididos de acordo com o sistema de aplicação do adesivo e profundidade dentinária:

1. Controle - Adesivo Scotchbond Universal (3M ESPE, St. Paul, MN, USA):
  - Adesivo foi aplicado por 20 segundos, seguido de leve jato de ar por 5 segundos

- Fotopolimerização por 10 segundos (Valo, Ultradent- Products Inc; South Jordan; UT; USA).
2. Adesivo Scotchbond Universal (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) com aplicação de ácido fosfórico a 37% seguido de etanol a 100%:
- Aplicação de ácido fosfórico a 37%, por 15 segundos na dentina
  - Lavagem por 60 segundos com etanol 100% e remoção dos excessos de com algodão
  - Aplicação de uma camada do adesivo por 20 segundos, seguido por leve jato de ar por 5 segundos.
  - Fotopolimerizado por 10 segundos (Valo, Ultradent- Products Inc; South Jordan; UT; USA).
3. Adesivo Scotchbond Universal (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) com aplicação de etanol a 100% prévio:
- Aplicação de etanol 100%, por 60 segundos
  - Adesivo foi aplicado por 20 segundos, seguido de leve jato de ar por 5 segundos
  - Fotopolimerização por 10 segundos (Valo, Ultradent- Products Inc; South Jordan; UT; USA).

A reconstrução (Figura 1-III) foi realizada em tecnica incremental sem unir mais do que 2 paredes, com o intuito de diminuir o stress gerado pela contração de polimerização, utilizando uma resina composta (Tabela 1) bulk-fill (Tetric N-Ceram Bulk Fill -Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein), com incrementos de até 4mm, seguido fotopolimerização por 20 segundos (1.000mW/cm<sup>2</sup>, Valo, Ultradent- Products Inc; South Jordan; UT; USA).

Material/Fabricante	Composição
Adesivo (Scotchbond Universal (3M ESPE, St. Paul, MN, USA)	10-MDP, fosfato monomero, dimetacrilato resina, HEMA, metacrilato-modificado polialquenoico acido copolimero, partícula, etanol, água, iniciadores, silano
Condicionamento	Ácido fosfórico (37.5 %)
Resina composta (Tetric N-Ceram Bulk Fill-Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein)	Bis-GMA, UDMA dimetacrilato co-monomeros e partículas de carga

Tabela 1 Materiais e respectivas composições

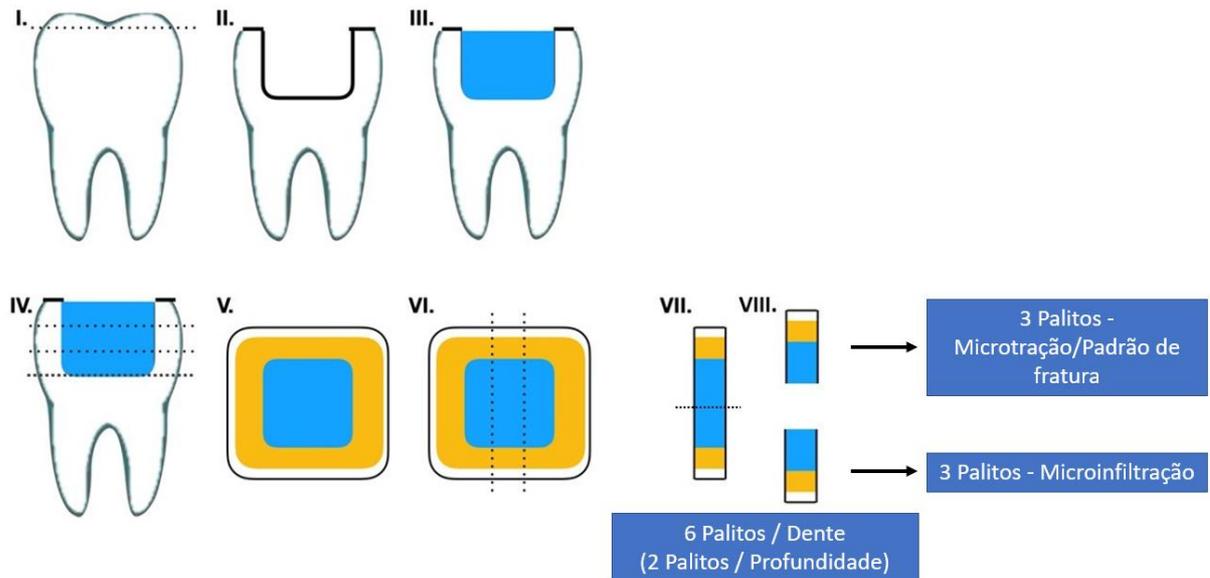


Figura 1. Preparo das amostras. I-exposição de dentina. II-Cavidade CLI. III-aplicação da técnica restauradora. IV- divisão em terços (oclusal; médio; cervical). V-vista oclusal depois do corte horizontal.VI-corte longitudinal.VII-palito.VIII-amostra final (palito). As cores representam: azul - resina composta; amarelo - dentina; branco - esmalte.

Após a confecção das amostras, as mesmas foram submetidas ao envelhecimento térmico.

### Envelhecimento Térmico <sup>14</sup>

Dez amostras de cada grupo foram submetidas a termociclagem (Figura 2), sendo termociclados por 10.000 ciclos entre 5°C e 55 °C por 250 h (MSCT-3e, ElQuip; São Carlos, São Paulo, Brazil). Durante a termociclagem, o tempo de permanência dos espécimes em cada poço foi de 30 s. Correspondendo a 1 ano de uso intraoral.

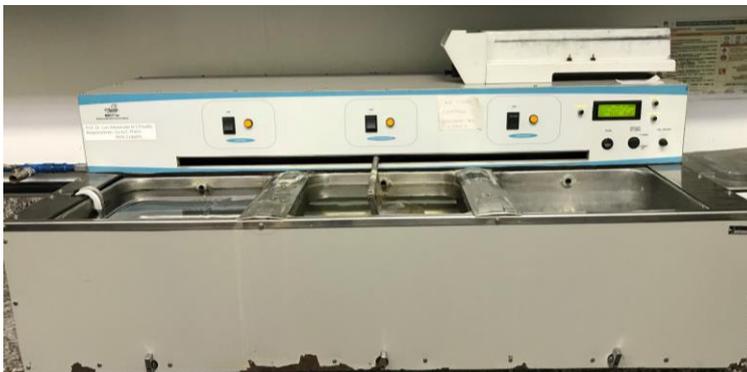


Figura 2. Termocicladora.

Após o envelhecimento termomecânico, os dentes foram seccionados em 3 terços de 1mm (Figura 1-IV e V) no eixo longitudinal com lâmina diamantada (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA): 1- Superficial; 2- Medio; 3- Profundo.

Sequencialmente, cada terço foi seccionado para obtenção final da amostra (palitos- Figura 1-VII), nas dimensões de 1mm<sup>2</sup>. Cada palito foi armazenado em água a 37°C, por 24h e em seguida submetidos aos testes de resistência à microtração e microinfiltração.

Foram utilizados 360 palitos para realização do estudo: 180 palitos para o teste de resistência à microtração (24h e pos termociclagem) e 180 para o teste de resistência à microinfiltração (24h e pos termociclagem).

#### **Teste de Resistência à Microtração<sup>9</sup> (n=10)**

As amostras foram submetidas para teste (Figura 3) em uma máquina universal de testes (EZ Test; Shimadzu, Kyoto, Japão – Figura 4) a uma velocidade de 0,5 mm / min até a falha. Os palitos foram fixados na maquina com auxilio de cianoacrilato cyanoacrylate (Zapit, DVA, Anaheim, CA). As áreas transversais foram medidas com paquímetro digital (modelo 727-150; Starret, Itu, SP, Brasil) para cálculo da resistência de união (MPa). Um único valor de falha foi atribuído para cada terço pela equação:

$$\text{Microtração (Mpa)} = \frac{\text{Força de fratura (N)}}{\text{Área da amostra (mm}^2\text{)}}$$



Figura 3. Teste de Microtração.



Figura 4. Ez-test.

### **Padrão de fratura<sup>9</sup> (n=10)**

Em seguida as amostras fraturadas foram completamente secas e revestidas com ouro (MED 010; Balzers, Balzer, Liechtenstein). As amostras foram examinadas utilizando um Microscópio Electrónico de Varredura-MEV (JSM-5900 LV; Jeol Inc., Peabody, MA, USA – Figura 5). Os padrões de falha foram classificados como: Adesivo ao longo da superfície da dentina; Coesivo na dentina; Coesivo na resina composta; Misto.



Figura 5. Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

### **Microinfiltração<sup>15</sup> (n=10)**

As amostras de cada grupo foram imersas em solução de nitrato de prata (composta por 10 gramas de cristais de nitrato, adicionados a 10 mL de água deionizada e posterior aplicação de gotas de hidróxido de amônio a 28% - Figura 6.I), por 24 horas em ambiente escuro à 37°C. Sequencialmente, foram lavados em água corrente por 2 minutos e imersas em solução reveladora (100 ml de água destilada + 10,9g de pó revelador – Figura 6), por 8h sob luminária fluorescente (Figura 6.II). Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada e incluídas em resina de poliestireno (Figuras 6.III e 7).

Após inclusão, as amostras foram desgastadas em politriz com lixas d'água 600, 1200 e 2000 (Figura 6.IV), respectivamente, e polidos com discos de feltro e pastas diamantadas em granulação decrescente 3, 0,5 e 0,25 $\mu$ m. Entre cada granulação de lixa e de pasta, as amostras foram levadas à cuba de ultrassom por 10 minutos para remoção de detritos. As amostras foram secas com papel absorvente e, a seguir, receberam aplicação de uma solução de ácido fosfórico a 85% por 10 segundos (Figura 6.V) para desmineralização, seguida de

lavagem com água destilada. Para a desproteinização, foi utilizada solução de hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos (Figura 6.VI).

Em seguida, foi realizada a lavagem com água destilada e a secagem a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em álcool etílico em concentrações crescentes (50%, 75%, 90% e 100%) por 10 minutos em cada concentração (Figura 6.VII-X). Em seguida as amostras foram secas com papel absorvente e armazenadas em sílica (Figura 6. XI/XII).

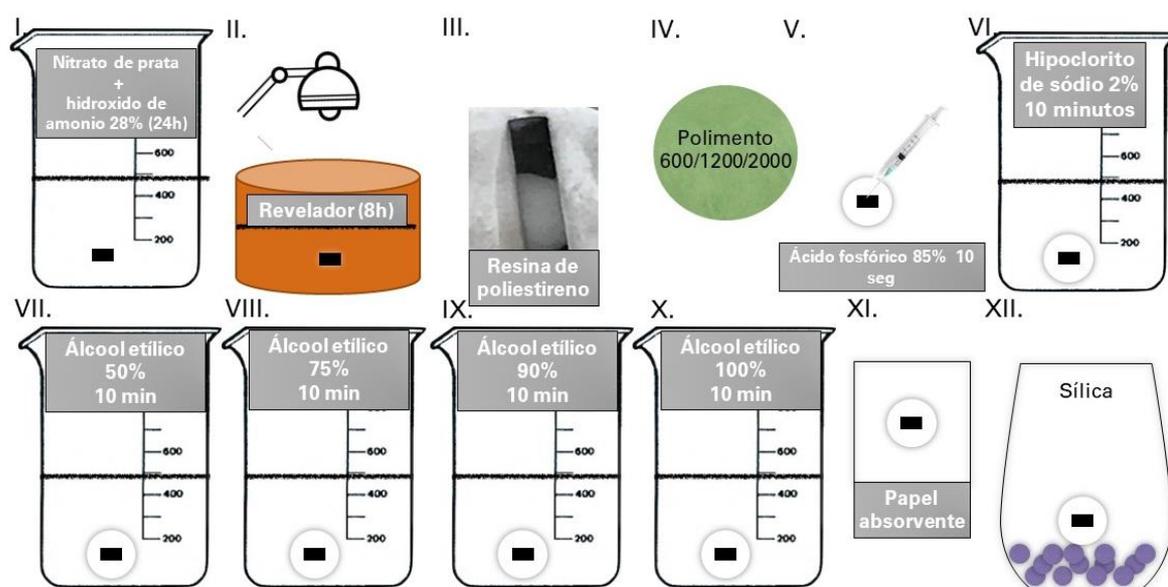


Figura 6. Fluxograma teste de microinfiltração.

As amostras após o polimento (Figura 7) foram montadas em stubs de alumínio e, depois, receberam um revestimento com uma camada delgada de carbono (Figura 8- BalTec SCD 050-SputterCoater) para serem observadas em MEV, operando em alto vácuo numa potência de 20 KV, no qual foram obtidas imagens em elétrons retroespalhados. As imagens foram gravadas para avaliação quantitativa da área infiltrada (Figura 9) pelo software ImageJ ((ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

A área infiltrada foi calculada seguindo a equação:

$$\text{Microinfiltração (\%)} = \frac{\text{Área infiltrada (mm)}}{\text{Área da amostra (mm)}}$$



Figura 7. Amostra apos poimento



Figura 8. BalTec SCD 050-SputterCoater

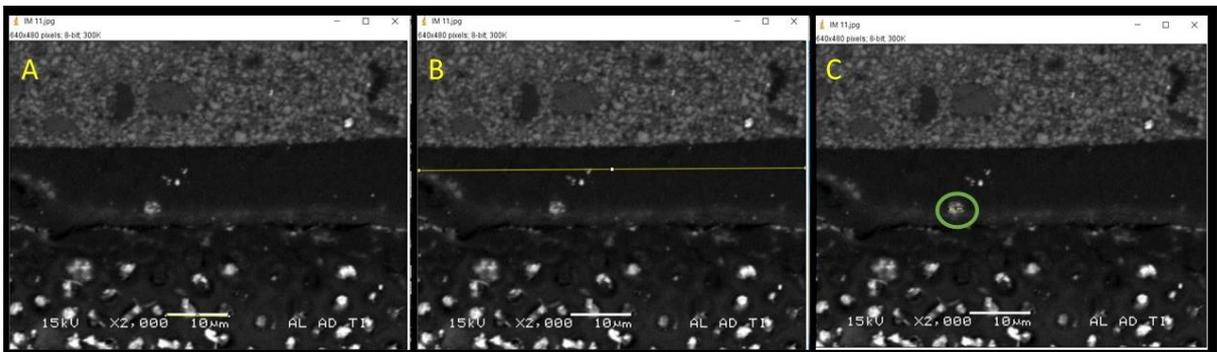


Figura 9. A-Calibração da regua de medição. B- Medição da area total. C- Medição da area infiltrada (area demarcada em verde como exemplo).

### Análise estatística

Os dados de  $\mu$ TBS e microinfiltração foram avaliados quanto aos testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Levene). Os resultados foram submetidos à correlação de Spearman (microinfiltração x  $\mu$ TBS) e ANOVA de três vias (protocolo de aplicação do adesivo, envelhecimento e terceiro dentina) para comparações múltiplas seguido do teste post hoc de Bonferroni no nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

## Anexo 1 – Parecer do comitê de ética em Pesquisa

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da efetividade da aplicação de etanol previamente ao adesivo universal sob os diferentes terços dentinários **Pesquisador:** Enrico Angelo **Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 29522820.4.0000.5418

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.947.681

#### Apresentação do Projeto:

Transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil

A EQUIPE DE PESQUISA citada na capa do projeto de pesquisa inclui ENRICO ANGELO (Cirurgião Dentista, Doutorando no PPG em Clínica Odontológica, área de Dentística, da FOP-UNICAMP, Pesquisador responsável) e LUÍS ROBERTO MARCONDES MARTINS (Cirurgião Dentista, Docente da área de Dentística da FOP-UNICAMP, Pesquisador participante), o que é confirmado na declaração dos pesquisadores e na PB.

Delineamento da pesquisa: Trata-se de estudo laboratorial, comparativo, que envolverá 54 molares humanos hígidos, obtidos em doação por uma dentista que os extraiu, por indicação clínica, em seu consultório privado em Monte Mor – SP de pacientes com idades estimadas entre 15 a 35 anos. O objetivo desse estudo é avaliar a efetividade da aplicação de etanol previamente ao adesivo universal sob as diferentes terços dentinárias. Unidades experimentais: o elemento dental (54 molares humanos hígidos). Fatores em estudo: 1) Técnica de aplicação do adesivo universal; 2) Morfologia dentinária (terços). Variável resposta: 1) Resistência a microtração (n=8); 2) Resistência a microinfiltração (n=10). Os grupos serão divididos de acordo com o sistema de aplicação do adesivo: adesivo (controle – apenas adesivo universal); aplicação de ácido fosfórico a

37% seguido etanol 100% previamente ao adesivo universal; aplicação de etanol 100% previamente ao adesivo universal.

Pendência 1 (atendida em 30/03/20)– Quanto às características estimadas dos indivíduos dos quais os dentes foram extraídos, os pesquisadores informaram que “Estimativa de idade entre 18 e 35 anos e distribuição aleatória dos sexos, pois é um fator irrelevante para a pesquisa”.

Pendência 2 (atendida em 30/03/20)– Quanto à origem e as circunstâncias da obtenção da doação dos dentes, os pesquisadores informaram que “Os dentes foram doados por um único dentista, o qual realizou os procedimentos somente por indicação clínica para das extrações”.

Pendência 3 (atendida em 30/03/20)– Critérios de inclusão: todos molares humanos hígidos, com indicação de exodontia somente por motivos clínicos.

Pendência 4 (atendida em 30/03/20)– Critérios de exclusão: dentes que não sejam molares, e/ou cariados.

**Materiais e Métodos:**

**Delineamento experimental:** Unidades experimentais: a unidade experimental será considerada o elemento dental (54 molares humanos hígidos). Fatores em estudo: 1) Técnica de aplicação do adesivo universal 2) Morfologia (terços) dentinária Variável resposta: 1) Resistência à microtração (n=8) 2) Resistência à microinfiltração (n=10) O projeto será encaminhado para a avaliação e aprovação do Comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / Universidade Estadual de Campinas.

**Observações:** 1. Estimativa de idade entre 18 e 35 anos e distribuição aleatória dos sexos, pois é um fator irrelevante para a pesquisa. 2. Os dentes foram doados por um único dentista, o qual realizou os procedimentos somente por indicação clínica para das extrações. 3. Critérios de inclusão – todos molares humanos hígidos, com indicação de exodontia somente por motivos clínicos. Critérios de exclusão: dentes que não sejam molares, e/ou cariados. 4. Toda a pesquisa será realizada na Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas – FOP/UNICAMP. A pesquisa será realizada pelo pesquisador Enrico Angelo, nos laboratórios do Departamento de Odontologia Restauradora. Os equipamentos que serão utilizados na pesquisa são: Cortadeira Metalografica; Aparelho para Termociclagem (Cicladora); Microscopio Eletronica de Varredura (MEV); Ez-test; Politriz. Preparo das Amostras: Os dentes utilizados serão de até 6 meses após a extração e seu armazenamento será feito em água destilada 4°C. Para preparar a dentina, o esmalte oclusal será

removido e a raiz seccionada 2 mm abaixo da junção cimento-esmalte com uma serra diamantada a 250rpm (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) sob refrigeração a água. Superfície de dentina oclusal será desgastada com papel carbeta de silício (granulação 600) sob refrigeração (água) por 10 s, utilizando uma máquina polidora (APL-4; Arotec, Cotia, SP, Brasil). Em seguida será realizado uma cavidade classe I para a aplicação do Sistema restaurador (Figura 1-II).

Os grupos serão divididos de acordo com o sistema de aplicação do adesivo: 1. Controle - Adesivo Scotchbond Universal (3M ESPE, St. Paul, MN, USA): Adesivo será aplicado por 20 segundos, seguido de leve jato de ar por 5 segundos Fotopolimerização por 10 segundos (Valo, Ultradent- Products Inc; South Jordan; UT; USA). 2. Adesivo Scotchbond Universal (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) com aplicação de ácido fosfórico a 37% seguido de etanol a 100%: Aplicação de ácido fosfórico a 37%, por 15 segundos na dentina Lavagem por 20 segundos com etanol 100% e remoção dos excessos de com algodão Aplicação de uma camada do adesivo por 20 segundos, seguido por leve jato de ar por 5 segundos.

Fotopolimerizado por 10 segundos (Valo, Ultradent- Products Inc; South Jordan; UT; USA). 3. Adesivo Scotchbond Universal (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) com aplicação de etanol a 100% prévio: Aplicação de etanol 100%, por 60 segundos Adesivo será aplicado por 20 segundos, seguido de leve jato de ar por 5 segundos Fotopolimerização por 10 segundos (Valo, Ultradent- Products Inc; South Jordan; UT; USA).

A reconstrução será realizada com resina composta bulk-fill (Tetric N-Ceram Bulk Fill - Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein), com incrementos de até 4mm, seguido fotopolimerização por 20 segundos (Valo, Ultradent- Products Inc; South Jordan; UT; USA).

Após a confecção das amostras, as mesmas serão submetidas ao envelhecimento termomecânico. Envelhecimento Termomecânico: Oito amostras de cada grupo serão desafiadas termomecanicamente, sendo termociclados por 10.000 ciclos entre 5°C e 55 °C por 250 h. Durante a termociclagem, o tempo de permanência dos espécimes em cada poço será de 30 s. O tempo de transferência entre os poços será de 30 s. Correspondendo a 1 ano de uso intraoral. Após o envelhecimento termomecânico, os dentes serão seccionados em 3 terços de 1mm (Figura 1-IV e V) no eixo longitudinal com lâmina diamantada (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA): 1. Terço Coronal 2. Terço Médio 3. Terço Cervical Sequencialmente, cada terço será seccionado para obtenção final da amostra (palitos- Figura 1-VII), nas dimensões de 1mm<sup>2</sup>. Cada palito será armazenado em água a 37°C, por 24h e em seguida submetidos aos testes de

resistência à microtração e microinfiltração. Serão utilizados 54 palitos para realização do estudo: 24 para o

Página 03 de

teste de resistência à microtração, e 30 para o teste de resistência à microinfiltração.

Teste de Resistência à Microtração: (n=8) As amostras serão submetidas para teste em uma máquina universal de testes (EZ Test; Shimadzu, Kyoto, Japão) a uma velocidade de 0,5 mm / min até a falha. As áreas transversais serão medidas com paquímetro digital (modelo 727-150; Starret, Itu, SP, Brasil) para cálculo da resistência de união (MPa).

Padrão de fratura: (n=8) Em seguida as amostras fraturadas serão completamente secas e revestidas com ouro (MED 010; Balzers, Balzer, Liechtenstein). As amostras serão examinadas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura-MEV (JSM-5900 LV; Jeol Inc., Peabody, MA, USA). Os padrões de falha serão classificados como: 1. Adesivo ao longo da superfície da dentina 2. Coesivo na dentina 3. Coesivo na resina composta 4. Misto

Teste de Resistência à Microinfiltração: (n=10) As amostras de cada grupo serão imersas em solução de nitrato de prata (composta por 10 gramas de cristais de nitrato, adicionados a 10 mL de água deionizada e posterior aplicação de gotas de hidróxido de amônio a 28%), por 24 horas em ambiente escuro à 37°C. Sequencialmente, serão lavados em água corrente por 2 minutos e imersas em solução reveladora (100 ml de água destilada + 10,9g de pó revelador), por 8h sob luminária fluorescente. Em seguida, as amostras serão lavadas com água destilada e incluídas em resina de poliestireno. Após inclusão, as amostras serão desgastadas em politriz com lixas d' água 600, 1200 e 2000, respectivamente, e polidos com discos de feltro e pastas diamantadas em granulação decrescente 3, 0,5 e 0,25m. Entre cada granulação de lixa e de pasta, as amostras serão levadas à cuba de ultrassom por 10 minutos para remoção de detritos. As amostras serão secas com papel absorvente e, a seguir, receberam aplicação de uma solução de ácido fosfórico a 85% por 10 segundos para desmineralização, seguida de lavagem com água destilada. Para a desproteinização, será utilizada solução de hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos. Em seguida, será realizada a lavagem com água destilada e a secagem a temperatura ambiente.

Posteriormente, as amostras serão desidratadas em álcool etílico em concentrações crescentes (50%, 75%, 90% e 100%) por 10 minutos em cada concentração.

Em seguida as amostras fraturadas serão completamente secas e revestidas com ouro (MED 010; Balzers,

Balzer, Liechtenstein). As amostras serão examinadas utilizando um Microscópio Eletrônico de VarreduraMEV (JSM-5900 LV; Jeol Inc., Peabody, MA, USA). Dez imagens representativas de cada grupo serão submetidas para avaliação. Será calculada a porcentagem de infiltração da área no softwear ImageJ.

Página 04 de

Análise dos dados: Após a coletas dos dados, os mesmos serão submetidos a análise de normalidade e homogeneidade dos valores. Se os valores forem normais e homogêneos, será realizado teste estatístico paramétrico, caso contrário, um teste não-paramétrico será aplicado. Os testes específicos serão determinados após a coleta dos dados com auxílio de um Estatístico. A avaliação do padrão de fratura será apenas descritivo.

Pendência 5 (atendida em 30/03/20)- Local da pesquisa: Quanto ao local da pesquisa e equipamentos envolvidos, os pesquisadores informaram que “Toda a pesquisa será realizada na Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas – FOP/UNICAMP. A pesquisa será realizada pelo pesquisador Enrico Ângelo, nos laboratórios do Departamento de Odontologia Restauradora. Os equipamentos que serão utilizados na pesquisa são: Cortadeira Metalográfica; Aparelho para Termociclagem (Cicladora); Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV); Ez-test; Politriz”. Acrescenta-se à resposta dos pesquisadores que o MEV não está localizado no laboratório de Dentística e sim no Centro de Microscopia e Imagem da FOP-UNICAMP. A autorização de acesso e uso do mesmo já foi apresentada. O cronograma descrito na PB indica que a pesquisa será iniciada em 30/03/2020 e será concluída em 30/10/2020, em cerca de 7 meses.

O arquivo ajustado do projeto de pesquisa, com as áreas modificadas marcadas em amarelo foi apresentado.

**Objetivo da Pesquisa:**

HIPÓTESE: A hipótese nula testada será: 1) A aplicação de etanol influenciará na adesão do adesivo universal. 2) A morfologia diferente dos terços dentinários influenciará na adesão do adesivo universal. OBJETIVO PRIMÁRIO: O objetivo desse estudo é avaliar a efetividade da aplicação de etanol previamente ao adesivo universal sob as diferentes terços dentinárias.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS: Não descritos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Quanto aos riscos e desconfortos previstos para os participantes, os pesquisadores informaram que “Não há risco aos participantes da pesquisa, por ela em si, pois os dentes já serão extraídos previamente à pesquisa. Os pesquisadores estarão sujeitos a riscos biológicos (transmissão de microorganismos patogênicos) e desgaste físico pelo uso dos equipamentos utilizados na pesquisa”.

Página 05 de

Quanto aos benefícios diretos previstos para os participantes, os pesquisadores informaram que “A pesquisa não beneficiará os envolvidos na pesquisa em si, pois esta se trata de uma pesquisa com conhecimentos científicos como benefício, e como tal, será revertido para proporcionar melhor técnica e comodidade/longevidade de restaurações para os pacientes”.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pendência 6 (atendida em 30/03/20)- Quanto ao modo de abordagem dos participantes da pesquisa para a obtenção do TCLE os pesquisadores informaram que “A impossibilidade de contato entre o pesquisador e o participante/paciente que ocorre quando os dentes são estocados pelo dentista sem identificação individual do paciente e portanto não é possível saber de qual indivíduo um dado dente foi extraído”. Entende-se que os pesquisadores quiseram informar que há impossibilidade de contato com os participantes, o que impede a aplicação do TCLE.

Pendência 7 (atendida em 30/03/20)- Quanto à justificativa para participação de grupos vulneráveis os pesquisadores informaram que “Estimativa de idade entre 18 e 35 anos e distribuição aleatória dos sexos, pois é um fator irrelevante para a pesquisa”.

Quanto às medidas para proteção ou minimização dos desconfortos e riscos previsíveis os pesquisadores informaram que “Por se tratar de amostras biológicas, os pesquisadores utilizarão equipamentos de proteção individual (EPI), isto inclui: luvas, gorro, máscara, óculos de proteção e jaleco. Além de seguir as regras estabelecidas no laboratório. Como: sapato fechado, roupa adequada, higienização adequada do local de trabalho antes e após o experimento e higienização das mãos”.

Quanto às medidas de proteção à confidencialidade os pesquisadores informaram que “A pesquisa não envolverá a identificação dos indivíduos. Logo, não serão diretamente envolvidos os sujeitos da pesquisa, somente os dentes coletados”.

Pendência 8 (atendida em 30/03/20)- Quanto à previsão de ressarcimento de gastos os pesquisadores informaram que “A realização da pesquisa não causará para os mesmos gastos de qualquer ordem”. Entende-se que os pesquisadores estejam se referindo aos participantes quando citam “mesmos”. Quanto à previsão de indenização e/ou reparação de danos os pesquisadores informaram que “Não é previsto indenização ou reparação de danos, pois a pesquisa será realizada em dentes extraídos previamente”.

Quanto aos critérios para suspender ou encerrar a pesquisa os pesquisadores informaram que “Os

critérios para suspender a pesquisa envolvem apenas o comprometimento dos equipamentos necessários para a parte experimental, não impedindo a possibilidade de discutir o delineamento do projeto, podendo até vir a suspendê-lo. Reforçando que ao final do experimento a pesquisa provavelmente se encerrará”. O arquivo com os comentários éticos ajustados, com as áreas modificadas marcadas em amarelo foi apresentado.

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A FR foi apresentada preenchida (54 participantes, sem patrocinador principal) e assinada pelo pesquisador responsável (Dr Enrico Angelo) e pelo Diretor da FOP-UNICAMP (Dr. Francisco Haiter Neto). A FR foi datada de 28/02/2020.

A capa do projeto cita os dados solicitados pelo CEP-FOP.

Foi apresentada a declaração dos pesquisadores, adequadamente preenchida e assinada.

Foi apresentada a declaração da instituição, adequadamente preenchida e assinada.

Foi apresentada a autorização de acesso e uso ao Centro de Microscopia e Imagem da FOP-UNICAMP assinada pelo Prof Pedro Duarte Novaes.

Foi apresentado o Termo de Doação de 54 terceiros molares humanos, assinado pela Dra Eliane Mazonetto Zanetti, a partir de seu consultório privado em Monte Mor – SP.

Foi apresentada a justificativa para a não aplicação do TCLE aos participantes da pesquisa do seguinte modo “A impossibilidade de contato entre o pesquisador e o participante/paciente que ocorre quando os dentes são estocados pelo dentista sem identificação individual do paciente e, portanto não é possível saber de qual indivíduo um dado dente foi extraído”.

Pendência 9 (atendida em 30/03/20)- Foi apresentado o regulamento do biorrepositório para a presente pesquisa. O pesquisador Enrico Ângelo será o responsável pela guarda, armazenamento e manejo das amostras. Serão estocados 54 molares humanos. A duração do biorrepositório será de 6 meses e as amostras serão descartadas ao final do período e após os testes, que têm natureza destrutiva para as amostras.

O orçamento descrito na PB informa que a pesquisa terá custo de R\$ 800,00, para despesas relacionadas à pesquisa e que será bancada pelos pesquisadores.

A pesquisa foi classificada na Grande Área 2 (Ciências Biológicas) e tem como título público “Avaliação da efetividade da aplicação de etanol previamente ao adesivo universal sob os diferentes terços dentinários”.

A pesquisa não foi classificada nas áreas temáticas especiais. A Instituição proponente da pesquisa é a Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp e não foi listada Instituição coparticipante.

### **Recomendações:**

As recomendações a seguir não são pendências e podem ou não ser aplicáveis ao protocolo em tela. Não há necessidade de resposta às mesmas. RECOMENDAÇÃO 1- É obrigação do pesquisador desenvolver o projeto de pesquisa em completa conformidade com a proposta

apresentada ao CEP. Mudanças que venham a ser necessárias após a aprovação pelo CEP devem ser comunicadas na forma de emendas ao protocolo por meio da PB.

RECOMENDAÇÃO 2- Após a aprovação do protocolo de pesquisa os pesquisadores devem atentar para a necessidade de envio de relatórios parciais de atividade (no mínimo um a cada 12 meses) e do relatório final de atividade (ao término da pesquisa). Os pesquisadores devem informar e justificar ao CEP a eventual necessidade de interrupção ou interrupção total ou parcial da pesquisa.

RECOMENDAÇÃO 3- Reforça-se a necessidade do registro de Biorrepositórios para as amostras biológicas coletadas e que não sejam de uso imediato. A intenção deve ser registrada no projeto, no Regulamento do Biorrepositório e no TCLE que será assinado pelo participante.

RECOMENDAÇÃO 4- Os pesquisadores devem atentar para a necessidade de aplicação de TCLE para coleta de amostras a serem estocadas em Biobancos e Biorrepositórios e para a necessidade de aplicação de novo TCLE quando da realização de novas pesquisas com o material estocado.

RECOMENDAÇÃO 5- Pesquisas com dentes doados por profissionais de saúde ainda são toleradas em hipótese pelo CEP-FOP, mas os pesquisadores devem estar cientes de que esta solução dista do ideal ético de consulta direta ao participante por meio de TCLE específico da pesquisa ou da obtenção dos dentes a partir de um Biobanco de dentes e que estas últimas situações deveriam ser escolhidas em substituição à primeira.

RECOMENDAÇÃO 6- Os pesquisadores devem manter os arquivos de fichas, termos, dados e amostras sob sua guarda por pelo menos 5 anos após o término da pesquisa.

RECOMENDAÇÃO 7- Destaca-se que o parecer consubstanciado é o documento oficial de aprovação do sistema CEP/CONEP e os certificados emitidos pela secretaria do CEP-FOP, a pedido, após a aprovação final do protocolo, só têm valor simbólico e devem ser evitados.

RECOMENDAÇÃO 8- Intercorrências e eventos adversos devem ser relatados ao CEP-FOP por meio da PB.

RECOMENDAÇÃO 9- Os pesquisadores devem encaminhar os resultados da pesquisa para publicação e divulgação, com devido crédito a todos que tenham colaborado com a realização da pesquisa.

RECOMENDAÇÃO 10- O parecer do CEP-FOP é fortemente baseado nos textos do protocolo encaminhado pelos

pesquisadores e pode conter inclusive trechos transcritos literalmente do projeto ou de outras partes do protocolo. Trata-se, ainda assim, de uma interpretação do protocolo. Caso algum trecho do parecer não corresponda ao que efetivamente foi proposto no protocolo, os pesquisadores devem se manifestar sobre esta discrepância. A não manifestação dos pesquisadores será interpretada como concordância com a fidedignidade do texto do parecer no tocante à proposta do protocolo.

### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há mais pendências por resolver (vide texto acima).

### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Parecer de aprovação de Protocolo emitido "ad referendum" conforme autorização do Colegiado na reunião de 19/02/2020. O parecer será submetido para homologação na reunião de 08/04/2020.

### **Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1511598.pdf	30/03/2020 12:10:24		Aceito
Outros	Biorrepositorio.pdf	30/03/2020 12:09:46	Enrico Angelo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	30/03/2020 12:07:53	Enrico Angelo	Aceito
Outros	Respostaparecer.pdf	30/03/2020 12:01:35	Enrico Angelo	Aceito
Outros	4Comentarios.pdf	30/03/2020 12:01:19	Enrico Angelo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	5TCLE.pdf	30/03/2020 12:01:01	Enrico Angelo	Aceito
Outros	CEPCompleto.pdf	03/03/2020 13:24:54	jacks jorge junior	Aceito

Outros	66TermoDoacao.pdf	01/03/2020 21:38:35	Enrico Angelo	Aceito
Outros	65Autarq.pdf	28/02/2020 13:51:37	Enrico Angelo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	21DecPesq.pdf	28/02/2020 13:48:50	Enrico Angelo	Aceito

Página 09 de

Declaração de Instituição e Infraestrutura	62DecInst.pdf	28/02/2020 13:48:29	Enrico Angelo	Aceito
Folha de Rosto	1FolhaDeRosto.pdf	28/02/2020 13:48:00	Enrico Angelo	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PIRACICABA, 01 de Abril de 2020

---

**Assinado por: jacks jorge junior  
(Coordenador(a))**

## Anexo 2 – Teste anti-plágio (Turnitin)

Avaliação da efetividade da aplicação de etanol previamente ao adesivo universal sob os diferentes terços dentinários

### RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

<b>24%</b> ÍNDICE DE SEMELHANÇA	<b>20%</b> FONTES DA INTERNET	<b>15%</b> PUBLICAÇÕES	<b>5%</b> DOCUMENTOS DOS ALUNOS
------------------------------------	----------------------------------	---------------------------	------------------------------------

### FONTES PRIMÁRIAS

<b>1</b>	<b>bds.ict.unesp.br</b> Fonte da Internet	<b>6%</b>
<b>2</b>	<b>Submitted to Universidade Estadual de Campinas</b> Documento do Aluno	<b>2%</b>
<b>3</b>	<b>tede2.uepg.br</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>Muhammet Kerim Ayar. "A review of ethanol wet-bonding: Principles and techniques", European Journal of Dentistry, 2019</b> Publicação	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>CRG Torres, MG Augusto, IF Mathias-Santamaria, R Di Nicoló, AB Borges. "PureOrmocer vs Methacrylate Composites on Posterior Teeth: A Double-blinded Randomized Clinical Trial", Operative Dentistry, 2020</b> Publicação	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>Submitted to Universidad Estadual Paulista</b>	

### Anexo 3 – Comprovante de Submissão do artigo

---

**De:** Journal of Dentistry  
**Enviado:** quarta-feira, 5 de maio de 2021 20:45  
**Para:** Enrico Angelo  
**Assunto:** Submission Confirmation for Journal of Dentistry

Dear Mr. Angelo,

Your submission entitled "Evaluation of Effectiveness Use of Ethanol Wet-bonding Technique on Universal Adhesive" has been received by the Journal of Dentistry.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is

<https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fwww.editorialmanager.com%2Fjod%2F&data=04%7C01%7C%7C1b52678ae0594591747b08d9101fd222%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637558551116105659%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWlloiMC4wLjAwMDAiLCJQJjoiV2luMzliLCJBTiI6IklhaWwiLCJXVCI6Mn0%3D%7C1000&data=JnHVCosPijx2t4DJga8eqLElGeiUNJ%2F0MYZPvV0SXyc%3D&reserved=0>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to the Journal of Dentistry.

Kind regards,

Journal of Dentistry

---

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL:

<https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fwww.editorialmanager.com%2Fjod%2Flogin.asp%3Fa%3Dr&data=04%7C01%7C%7C1b52678ae0594591747b08d9101fd222%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637558551116105659%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWlloiMC4wLjAwMDAiLCJQJjoiV2luMzliLCJBTiI6IklhaWwiLCJXVCI6Mn0%3D%7C1000&data=VzzvT3MN6ZpxVOiKcZoRXLhRxyIZM8E90FBxPxWDr8%3D&reserved=0>). Please contact the publication office if you have any questions.