

# Influência do protocolo de armazenamento de espécimes na formação da camada híbrida: estudo longitudinal em MEV

• **Graziella Silveira Medeiros** Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil • **Andréa Dias Neves Lago** Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil • **Cynthia Soares de Azevedo** Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil • **Bruna Uglík Garbui** Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil • **Adriana Bona Matos** Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

**RESUMO** | O objetivo deste estudo *in vitro* foi analisar qualitativamente as características morfológicas da interface adesiva empregando-se diferentes métodos de envelhecimento. Foram selecionados 25 terceiros molares humanos erupcionados recém-extraídos. Os dentes foram divididos em cinco grupos (n = 05) de acordo com o protocolo de envelhecimento usado: G1, água destilada por 24 h; G2, água destilada por 6 meses; G3, NaOCl a 10% por 1 h; G4, NaOCl a 10% por 3 h; e G5, NaOCl a 10% por 5 h. Os espécimes foram lixados em sua face oclusal, e, posteriormente, foram construídos blocos de resina composta utilizando um sistema adesivo condicione-e-lave, seguindo-se a aplicação de uma fina camada de resina *flow* e de resina composta nano-híbrida, conforme as instruções do fabricante. Os espécimes foram armazenados em água destilada por 24 h a 37°C e, em seguida, seccionados perpendicularmente para serem submetidos aos protocolos de envelhecimento citados anteriormente. Após processamento dos espécimes, uma avaliação comparativa da interface adesiva foi realizada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). O armazenamento de espécimes em solução de NaOCl a 10% por 1 ou 3 h produziu uma interface resina-dentina com características similares às da interface obtida após 6 meses de armazenamento em água.

**DESCRITORES** | Dentina; Adesivos Dentinários; Teste de Materiais; Restauração Dentária Permanente.

**ABSTRACT** | **Influence of specimen aging protocol on hybrid layer formation: a SEM longitudinal study** • The aim of this *in vitro* study was to qualitatively analyze the morphological characteristics of the adhesive interface using different aging methods. Twenty-five human recently extracted erupted third molars were divided into five groups (n = 05) according to the aging protocol used: G1, distilled water for 24 h; G2, distilled water for 6 months; G3, 10% NaOCl for 1 h; G4, 10% NaOCl for 3 h, and G5, 10% NaOCl for 5 h. The occlusal surface of the specimens was ground and, subsequently, blocks were constructed using an etch-and-rinse bond system, which was followed by application of a thin layer of flowable resin composite and a nanohybrid resin composite, according to the manufacturer's instructions. The specimens were stored in distilled water for 24 h at 37°C, and then sectioned perpendicularly to undergo the aging protocols mentioned above. After processing of the specimens, comparative analysis of the adhesive interface was performed using scanning electron microscopy (SEM). Storage of the specimens in the 10% NaOCl solution for 1 and 3 h produced a dentin-resin interface with features similar to those obtained after 6 months of storage in water.

**DESCRIPTORS** | Dentin; Dentin-Bonding Agents; Materials Testing; Dental Restoration, Permanent.

**AUTOR DE CORRESPONDÊNCIA** | • **Adriana Bona Matos** Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, University of São Paulo (USP) • **Av. Prof. Lineu Prestes, 2227** São Paulo, SP, Brazil • **05508-900** E-mail: bona@usp.br

• Received May 20, 2013 • Accepted Aug 23, 2013

## INTRODUÇÃO

Apesar do aperfeiçoamento da técnica restauradora e dos materiais poliméricos para uso odontológico, ainda não foi possível encontrar uma maneira de evitar a degradação da camada híbrida com o tempo.<sup>1-5</sup> Com isso, há a necessidade de substituições das restaurações, caracterizando o chamado ciclo restaurador repetitivo, que tem sido mantido por décadas. Nesse ciclo, as restaurações são repetidamente substituídas por outras maiores e mais complexas, comprometendo a resistência do remanescente dental.

Sistemas adesivos que requerem o condicionamento ácido prévio da dentina apresentam ótimo desempenho em ensaios de resistência adesiva quando testados em condições de armazenamento por curto período de tempo (24 h);<sup>5-8</sup> porém, quando testados longitudinalmente (6 meses ou mais), apresentam redução em seus valores de resistência de união.<sup>4,8,9</sup> Esta redução na longevidade deve-se à hidrólise da resina e/ou das fibras colágenas,<sup>3,5</sup> o que promove a degradação da camada híbrida,<sup>1,2,10</sup> comprometendo assim a estabilidade da adesão entre a resina e a dentina.

Os fatores que podem contribuir para a degradação da interface de união compósito-adesivo-dentina são resultado de um efeito combinado entre a degradação dos componentes resinosos da camada híbrida<sup>1</sup> e a degradação das fibras colágenas.<sup>2</sup>

A manifestação dos fatores de degradação dos componentes resinosos<sup>1</sup> pode ocorrer em três estágios:

- primeiro, a água é gradualmente absorvida pelo polímero da resina ou do adesivo,<sup>11</sup> devido à presença de solvente ou água residual após a polimerização do adesivo hidrofílico,<sup>12</sup> desencadeando a degradação química;<sup>13</sup>
- segundo, produtos de degradação e monômeros não reagidos são removidos da camada híbrida, promovendo sua exposição à água<sup>14</sup> e tornando-a cada vez mais permeável e susceptível à hidrólise;

- terceiro, as fibrilas colágenas expostas podem ser degradadas pela ação de enzimas proteolíticas presentes na dentina<sup>15</sup> ou na saliva.<sup>16</sup>

Os fatores de degradação das fibras colágenas<sup>2</sup> da camada híbrida geram a degradação da dentina desmineralizada e incompletamente hibridizada pelo componente resinoso que também pode sofrer hidrólise.<sup>16-18</sup> Este fato está relacionado à diferença entre a profundidade de desmineralização da dentina pelo ácido fosfórico e a profundidade de difusão dos componentes adesivos,<sup>16</sup> resultando em zonas na base da camada híbrida parcialmente infiltradas com componentes resinosos, havendo fibrilas colágenas desnudas que são vulneráveis à degradação.<sup>14,19</sup> Nessa zona são observados diferentes graus de nanoinfiltração<sup>20</sup> que possibilitam a penetração de fluidos nas porosidades, levando à degradação da camada híbrida.<sup>1,6</sup>

Um estudo<sup>21</sup> demonstrou ainda que essa falha na interdifusão dos monômeros resulta na redução das propriedades mecânicas dentro de um curto período de tempo (6 meses a 3 anos), havendo uma redução em até 50% da resistência de união quando um sistema adesivo do tipo condicione-e-lave foi utilizado, em comparação com os valores obtidos após 24 h.<sup>1,6</sup>

A literatura<sup>4,16,22</sup> indica que as metaloproteínas (MMPs) possuem papel na degradação das fibrilas de colágeno. Essas 23 endopeptidases estão presentes na saliva e na matriz extracelular de células humanas, e são secretadas como proenzimas inativas. Quando ativadas, por desmineralização da dentina, passam a exprimir atividade metabólica de remodelação e tornam-se capazes de degradar fibrilas colágenas, elastina e componentes da matriz extracelular.<sup>4,16,22</sup> Sendo assim, entende-se que a ativação das MMPs pode favorecer a degradação proteolítica do tecido dentinário,<sup>23</sup> comprometendo a durabilidade da adesão<sup>24</sup> devido à redução na sua resistência mecânica.<sup>24</sup>

A fim de ensaiar a durabilidade da interface dentina-resina, o método mais utilizado para o envelhecimento dos espécimes é o armazenamento em água.<sup>2,25,26</sup> Porém, esse método requer um tempo de espera de 6 meses a 2 anos até a obtenção dos resultados, sendo possível que, até o momento em que os resultados são obtidos, o produto testado tenha se tornado obsoleto ou esteja fora do mercado odontológico. Dessa forma, estudos comparativos que utilizem metodologias que requerem menor tempo de espera durante o protocolo de envelhecimento são fundamentais.

Com a intenção de otimizar o tempo de espera, alguns autores<sup>2,25-27</sup> têm utilizado o armazenamento dos espécimes em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 10%. Alguns autores<sup>2,25-27</sup> comprovaram que, nessas condições, ocorre uma redução da resistência de união (RU) e um aumento da nanoinfiltração<sup>28</sup> para sistemas adesivos do tipo condicione-e-lave. Ressalta-se que o protocolo de envelhecimento de espécimes com solução de hipoclorito de sódio a 10% ainda não está padronizado, observando-se na literatura a utilização de diferentes tempos de imersão nessa solução, por exemplo, 2, 4 ou 6 h e 5 h.<sup>29</sup> Assim, considera-se que o armazenamento em solução de hipoclorito de sódio a 10% pode abreviar a obtenção dos resultados de ensaios de durabilidade da interface adesiva, quando se utiliza adesivo do tipo condicione-e-lave.

## OBJETIVOS

Nesse contexto, este estudo objetiva avaliar, através de microscopia eletrônica de varredura, se diferentes tempos de imersão em solução de hipoclorito de sódio exercem influência nas características morfológicas da interface dentina/resina composta.

## MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética

em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob protocolo n. 130/11.

### Seleção dos dentes

25 molares humanos hígidos foram utilizados neste estudo. Todos os dentes foram lavados com água e sabão, raspados com curetas periodontais para remoção de resíduos orgânicos e limpos por profilaxia com pedra pomes e água, realizada com escova Robinson em baixa rotação.

### Preparo das amostras

O esmalte oclusal foi seccionado na altura do terço médio da coroa dental, perpendicularmente ao seu longo eixo, pelo corte de um disco diamantado acoplado a uma máquina de corte de precisão (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), sob refrigeração à água, para expor uma superfície plana de dentina.

A face oclusal dos dentes foi planificada, utilizando-se lixas de carbeto de silício de granulação decrescente (120, 240, 320 e 400), com refrigeração abundante à água em politriz acionada em baixa velocidade (100 rpm). Entre cada lixa, os espécimes foram levados a um aparelho de ultrassom, com água deionizada com imersão limitada a 5 minutos.

Previamente à realização do procedimento adesivo, foi criada uma camada de esfregaço padronizada desgastando-se a dentina com disco de lixa de granulação 600 por 60 s.

### Procedimentos adesivos

O sistema adesivo do tipo condicione-e-lave Adper Single Bond II (3M-ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 1).

Para todos os procedimentos, foi utilizado um aparelho de fotopolimerização (Astralis 3 Ivoclar Vivadent, Amherst, NY, USA). Uma fina camada da resina *flow* Z350 XT (3M-ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA) foi aplicada após o procedi-

**Tabela 1** | Materiais utilizados, número de lote e composição, e modo de aplicação.

Material (n. do lote)	Composição	Modo de aplicação
Condicionador	Ácido fosfórico (AF) a 35% (7KG)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar em dentina e esperar 15 s</li> <li>2. Lavar com água por 30 s</li> <li>3. Secar por 30 s com leve jato de ar</li> </ol>
Sistema adesivo	Adper Single Bond II (AUBR)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar camada de adesivo (10 s, com leve agitação)</li> <li>2. Aplicar segunda camada de adesivo com leve agitação por 10 s</li> <li>3. Aplicar leve jato de ar por 30 s com 20 cm de distância</li> <li>4. Fotopolimerizar (10 s, 600 mW/cm<sup>2</sup>)</li> </ol>
Resina composta	Filtek Z350 XT (N126984)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar uma fina camada de aproximadamente 1 mm</li> <li>2. Fotopolimerizar (20 s, 600 mW/cm<sup>2</sup>)</li> </ol>
	Filtek Z350 XT (N126984)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar um incremento de aproximadamente 1,5 mm</li> <li>2. Fotopolimerizar (20 s, 600 mW/cm<sup>2</sup>)</li> </ol>

mento adesivo e, posteriormente, três incrementos de 1,5 mm da resina composta Z350 XT (3M-ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA) foram aplicados e polymerizados individualmente por 20 s, perfazendo um espécime de resina composta com 4 mm de altura, que foi armazenado em água destilada por 24 h em estufa a 37°C.

### Grupos experimentais

Finalizada a construção dos espécimes, foi realizado um corte perpendicular, obtendo-se duas metades para exposição da interface adesiva. Posteriormente, os espécimes foram aleatoriamente divididos nos diferentes grupos experimentais (n = 5) segundo os seguintes protocolos de envelhecimento:

- Grupo 1, armazenamento em água destilada por 24 h a 37°C;
- Grupo 2, armazenamento em água destilada por 6 meses a 37°C;
- Grupo 3, armazenamento em hipoclorito de sódio a 10% por 1 h a 37°C;
- Grupo 4, armazenamento em hipoclorito de sódio a 10% por 3 h a 37°C;
- Grupo 5, armazenamento em hipoclorito de sódio a 10% por 5 h a 37°C.

### Microscopia eletrônica de varredura

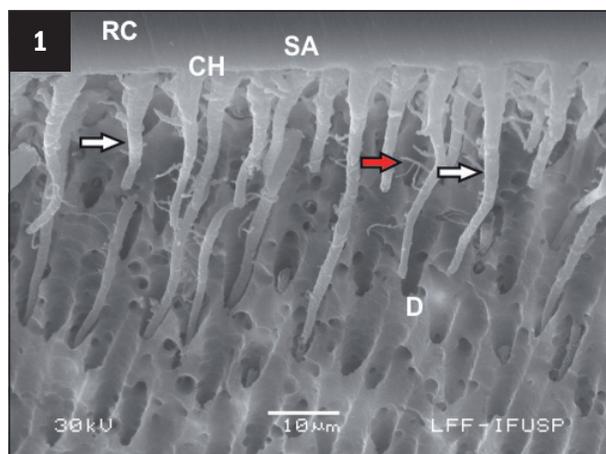
Após o preparo para microscopia eletrônica de varredura de interface adesiva,<sup>30</sup> cada espécime foi colado com fita dupla face em *stubs* de alumínio e cobertos com fina película de ouro e então observados num microscópio eletrônico de varredura (JEOL 6460 - LV, Jeol Ltd., Tóquio, Japão; FAPESP Proc. n. 00/08231-1) em aumento padronizado de 1500×, sempre no centro de cada espécime, focalizando a camada híbrida logo acima da câmara pulpar. Como cada espécime foi dividido em duas metades, ambas foram analisadas, e foi escolhido o espécime que melhor representou o resultado para o respectivo grupo experimental.

### RESULTADOS

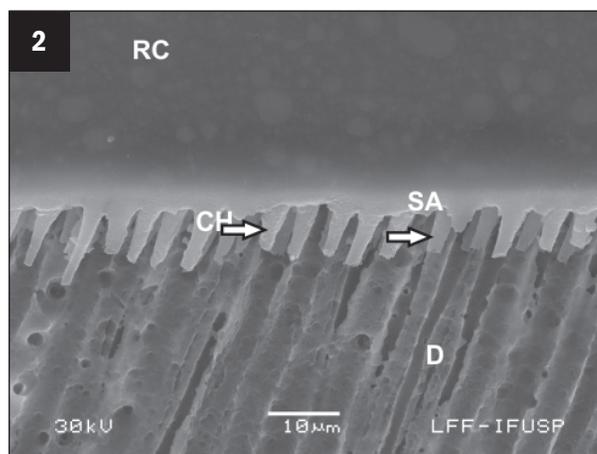
Por meio das imagens obtidas em microscopia eletrônica de varredura, conseguimos observar os componentes da interface dentina-resina:

- dentina (D),
- camada híbrida (CH),
- sistema adesivo (SA) e
- resina composta (RC).

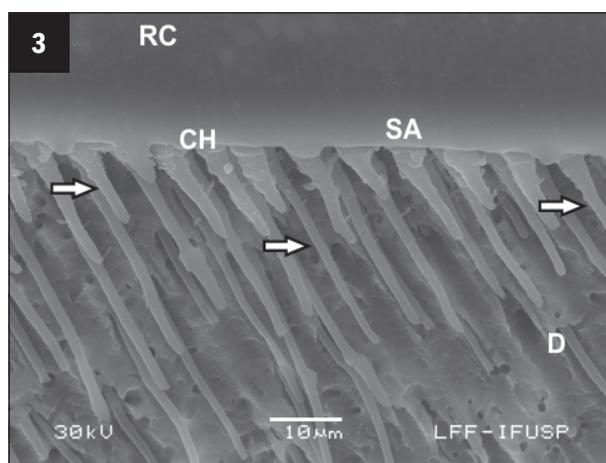
A Figura 1 ilustra o armazenamento por 24 h em água destilada (Grupo 1). Notou-se a formação de uma camada híbrida nítida e espessa, que se estende por toda a interface, com *tags* longos, íntegros e



**Figura 1** | Fotomicrografias do Grupo 1 (água destilada por 24 h). As setas brancas indicam *tags* longos e íntegros; a seta vermelha indica um *microtag*. RC: resina composta; SA: sistema adesivo; CH: camada híbrida; D: dentina do Grupo 1. Aumento original de 1500x.



**Figura 2** | Fotomicrografia do espécime armazenado por 6 meses em água destilada (Grupo 2). As setas brancas indicam *tags* curtos, fragilizados, com superfícies irregulares. R: resina composta do tipo *flow*; SA: sistema adesivo; CH: camada híbrida; D: dentina do Grupo 2. Aumento original de 1500x.



**Figura 3** | Fotomicrografia do espécime armazenado por 1 h em hipoclorito de sódio a 10% (Grupo 3). Setas brancas na Figura indicam *tags* fraturados. RC: resina composta do tipo *flow*; SA: sistema adesivo; CH: camada híbrida; D: dentina do Grupo 3. Aumento original de 1500x.

com superfícies regulares (setas brancas), além de *microtags* (seta vermelha) e um número maior de *tags* em comparação com os demais grupos experimentais.

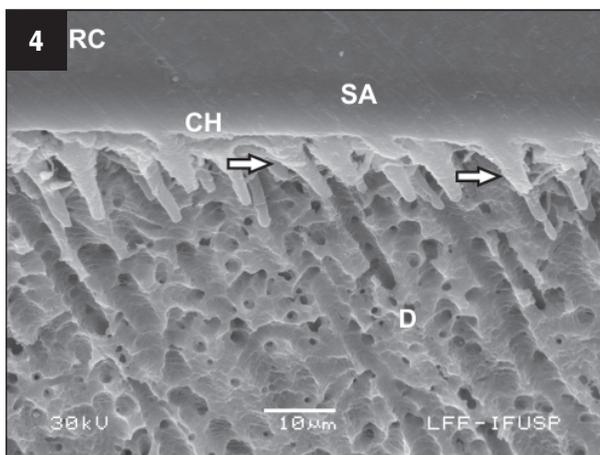
A Figura 2 apresenta o armazenamento por 6 meses em água destilada (Grupo 2). Notou-se a formação de uma camada híbrida espessa e ínte-

gra, que se estende por toda a interface, porém com *tags* curtos, com a aparência de fraturados e fragilizados em superfícies irregulares (seta branca).

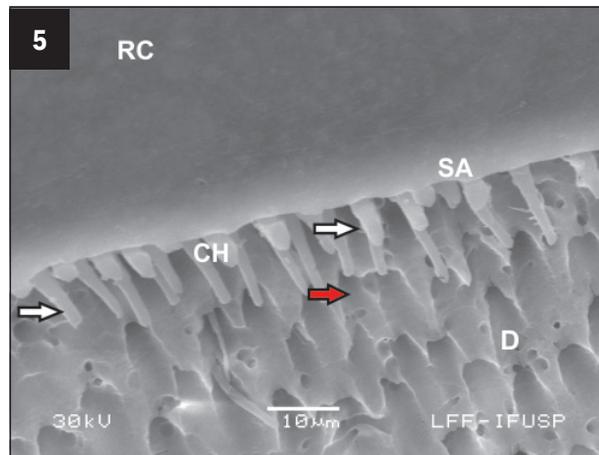
A Figura 3 representa os espécimes armazenados por 1 h em hipoclorito de sódio a 10% (Grupo 3). Podemos avaliar a formação da camada híbrida íntegra e espessa, com *tags* longos e curtos, afilados e com superfícies mais regulares em comparação com o grupo anterior, porém apresentam-se fraturados em sua maioria (seta branca). Nota-se uma quantidade menor de *microtags* em comparação com o Grupo 1.

A Figura 4 representa os espécimes armazenados por 3 h em hipoclorito de sódio a 10% (Grupo 4). Nota-se a presença de uma camada híbrida espessa e íntegra, que se estende por toda a interface, com formação de *tags* curtos que fraturaram devido à sua fragilidade (setas brancas). No que se refere à quantidade de *tags*, sua distribuição parece irregular, com áreas em que estão ausentes e outras em que se apresentam em menor quantidade em comparação com o Grupo 1. Não foi possível notar a presença de *microtags* nesse grupo experimental.

A Figura 5 ilustra os espécimes armazenados



**Figura 4** | Fotomicrografia do corpo de prova armazenado por 3 h em hipoclorito de sódio a 10% (Grupo 4). As setas brancas na indicam tags fraturados. RC: resina composta do tipo flow; SA: sistema adesivo; CH: camada híbrida; D: dentina do Grupo 4. Aumento original de 1500x.



**Figura 5** | Fotomicrografia do corpo de prova armazenado por 5 h em hipoclorito de sódio a 10% (Grupo 5). A seta vermelha indica a ausência de tags na camada híbrida, e as setas brancas indicam tags irregulares. RC: resina composta do tipo flow; SA: sistema adesivo; CH: camada híbrida; D: dentina do Grupo 5. Aumento original de 1500x.

por 5 h em hipoclorito de sódio a 10% (Grupo 5). Observa-se a formação de uma camada híbrida nítida, presente em toda a extensão da interface, com tags curtos, afilados e com superfície irregular (setas brancas), tags fragilizados que sofreram fraturas. Há ausência de tags em algumas regiões da camada híbrida (seta vermelha).

## DISCUSSÃO

Embora o armazenamento por longo período em água e a termociclagem sejam técnicas consagradas de envelhecimento da interface adesiva, ambos os métodos requerem um tempo experimental longo ou o uso de equipamento específico.<sup>28</sup> Devido a essa limitação, o envelhecimento da interface adesiva em solução de hipoclorito de sódio a 10% tem sido proposto por obter resultados mais rapidamente, sem a utilização de nenhum tipo de equipamento.<sup>27-29,31</sup>

O hipoclorito de sódio é um agente desproteinizante não específico que, em solução aquosa, forma radicais superóxido ( $O_2^-$ ), que, por sua vez, induzem a oxidação da cadeia de peptídeos de proteínas, tais como o colágeno.<sup>16</sup> Essa solução também pode cau-

sar cloração dos terminais amino das proteínas e formação de ácido hipocloroso. Algumas dessas cloraminas foram associadas com o aumento da susceptibilidade à degradação das fibras colágenas.<sup>32</sup>

Este potencial de degradação da solução de NaOCl efetivamente remove os componentes orgânicos da interface resina/substrato dental, devido à sua habilidade de dissolução das fibrilas colágenas não encapsuladas pelo agente adesivo,<sup>29,31</sup> gerando, dessa forma, uma maior degradação da interface de união em espécimes que possuem menores valores de resistência de união.<sup>28,31</sup> Essa pode ser uma forma indireta de comparar grupos experimentais quanto ao não encapsulamento das fibras colágenas desmineralizadas, corroborando dados de resistência de união.

No presente estudo, a análise qualitativa em MEV dos espécimes armazenados por 24 h em água destilada mostra resultados significativamente superiores. Nesse grupo, toda a superfície avaliada se apresenta mais regular, com maior número de tags resinosos, que são mais grossos e longos em comparação com os de espécimes armazenados em

água por 6 meses, corroborando os resultados presentes na literatura.<sup>33-35</sup>

Assim como no grupo envelhecido em água destilada por 6 meses, os espécimes armazenados em solução de hipoclorito de sódio a 10% por 1, 3 e 5 h apresentaram queda significativa na qualidade morfológica da camada híbrida, identificada pelo número menor de *tags*, de formato cônico e visivelmente fraturados, em comparação com os de espécimes armazenados por 24 h em água destilada.<sup>27,31,36</sup> Dessa forma, a utilização de hipoclorito de sódio é um método de envelhecimento acelerado dos espécimes.

Quando comparamos a interface resina-dentina dos grupos armazenados em NaOCl a 10% por 1, 3 e 5 h, observamos também uma diferença na morfologia dos tags à medida que o período de armazenamento era aumentado.<sup>27,31</sup> Uma possível explicação para esse achado é que, conforme houve o aumento do tempo de contato dos espécimes com o hipoclorito, maior foi o efeito desproteinizante. Dessa forma, os tags ficam muito debilitados devido à ação do hipoclorito.

Por fim, quando comparada a morfologia da camada híbrida dos espécimes envelhecidos por 3 h em hipoclorito de sódio a 10% com a dos espécimes envelhecidos em água destilada por 6 meses, pôde-se observar uma semelhança no padrão de degradação desses dois grupos, indicando, então, que o envelhecimento em NaOCl por 3 h pode ser um

método de envelhecimento acelerado, o que otimiza o tempo laboratorial da pesquisa, quando se utiliza um sistema adesivo do tipo condicione-e-lave.<sup>27</sup>

Ressalta-se que a escolha do tempo de imersão na solução de NaOCl a 10% – 1 ou 3 h – deve ficar a cargo do pesquisador. Esse protocolo possibilita a obtenção de dados longitudinais de maneira mais rápida, de forma que os resultados estejam disponíveis para os profissionais da área no exato momento em que os materiais estão presentes no mercado odontológico. Outros estudos utilizando esses protocolos de envelhecimento acelerado são necessários para testar outros tipos de sistemas adesivos.

## CONCLUSÕES

No presente estudo, pôde-se concluir que o armazenamento de espécimes em solução de NaOCl a 10%, por apenas 1 ou 3 h produziu uma interface resina-dentina com características similares a uma que seria obtida após 6 meses de armazenamento em água.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro recebido da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na forma da concessão de uma bolsa de iniciação científica (processo n. 2011/06774-2).

## REFERÊNCIAS

1. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res.* 2000 Jun;79(6):1385-91.
2. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res.* 2003 Feb;82(2):136-40.
3. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res.* 2005 Feb;84(2):118-32.
4. Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007 Jun;86(6):529-33.
5. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater.* 2008 Jan;24(1):90-101.

6. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res.* 2005 Feb;84(2):118-32.
7. Reis A, Grande RH, Oliveira GM, Lopes GC, Loguercio AD. A 2-year evaluation of moisture on microtensile bond strength and nanoleakage. *Dent Mater.* 2007 Jul;23(7):862-70.
8. Komori PC, Pashley DH, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, de Goes MF, et al. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2009 Mar-Apr;34(2):157-65.
9. Frankenberger R, Pashley DH, Reich SM, Lohbauer U, Petschelt A, Tay FR. Characterisation of resin-dentine interfaces by compressive cyclic loading. *Biomaterials.* 2005 May;26(14):2043-52.
10. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldini S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* 2007 Jan;86(1):90-4.
11. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mat.* 2006 Oct;22(10):973-80.
12. Nunes MF, Swift EJ, Perdigão J. Effects of adhesive composition on microtensile bond strength to human dentin. *Am J Dent.* 2001 Dec;14(6):340-3.
13. Dursun E, Le Goff S, Ruse D, Attal JP. Effect of chlorhexidine application on the long-term shear bond strength to dentin of a resin-modified glass ionomer. *Oper Dent.* 2013 May-Jun;38(3):275-81.
14. Armstrong SR, Keller JC, Boyer DB. The influence of water storage and C-factor on the dentin-resin composite microtensile bond strength and debond pathway utilizing a filled and unfilled adhesive resin. *Dent Mater.* 2001 May;17(3):268-76.
15. Sano H. Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. *J Dent Res.* 2006 Jan;85(1):11-4.
16. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004 Mar;83(3):216-21.
17. Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, et al. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003 Jul 15;66(1):287-98.
18. Loguercio AD, Barroso LP, Grande RH, Reis A. Comparison of intra- and intertooth resin-dentin bond strength variability. *J Adhes Dent.* 2005 Summer;7(2):151-8.
19. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. Fractographical analysis of resin-dentin bonds. *Am J Dent.* 2001 Dec;14(6):355-60.
20. Tay FR, King NM, Chan KM, Pashley DH. How can nanoleakage occur in self-etching adhesive systems that demineralize and infiltrate simultaneously? *J Adhes Dent.* 2002 Winter;4(4):255-69.
21. Koshiro K, Inoue S, Sano H, De Munck J, Van Meerbeek B. In vivo degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch and an etch-and-rinse adhesive. *Eur J Oral Sci.* 2005 Aug;113(4):341-8.
22. Mazzoni A, Visintini E, Vita F, Pasquantonio G, Saboia VP, Ruggeri A Jr, et al. ElectroBond improves immediate dentin microtensile bond strength of two etch-and-rinse adhesives. *J Adhes Dent.* 2009 Feb;11(1):27-33.
23. De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2010 Oct;118(5):494-501.
24. Zanchi CH, Münchow EA, Ogliaeri FA, de Carvalho RV, Chersoni S, Prati C, et al. Effects of long-term water storage on the microtensile bond strength of five experimental self-etching adhesives based on surfactants rather than HEMA. *Clin Oral Investig.* 2013 Apr;17(3):833-9.
25. Yamauti M, Hashimoto M, Sano H, Ohno H, Carvalho RM, Kaga M, et al. Degradation of resin-dentin bonds using NaOCl storage. *Dent Mat.* 2003 Jul;19(5):399-405.
26. Sauro S, Mannocci F, Toledano M, Osorio R, Pashley DH, Watson TF. EDTA or H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/NaOCl dentine treatments may increase hybrid layers' resistance to degradation: a microtensile bond strength and confocal-microporosity study. *J Dent.* 2009 Apr;37(4):279-88.
27. Garbui BU, Botta SB, Reis AF, Matos AB. Comparison of chemical aging and water immersion time on durability of resin-dentin interface produced by an etch-and-rinse adhesive. *J Contemp Dent Pract.* 2012 Jul;13(4):464-71.
28. Saboia VP, Silva FC, Nato F, Mazzoni A, Cadenaro M, Mazzotti G, et al. Analysis of differential artificial ageing of the adhesive interface produced by a two-step etch-and-rinse adhesive. *Eur J Oral Sci.* 2009 Oct;117(5):618-24.
29. Osorio R, Erhardt MC, Pimenta LA, Osorio E, Toledano M. EDTA treatment improves resin-dentin bonds' resistance to degradation. *J Dent Res.* 2005 Aug;84(8):736-40.
30. de Carvalho Mendonça EC, Vieira SN, Kawaguchi FA, Powers J, Matos AB. Influence of blood contamination

- on bond strength of a self-etching system. *Eur J Dent.* 2010 Jul;4(3):280-6.
31. Toledano M, Osorio R, Albaladejo A, Aguilera FS, Osorio E. Differential effect of in vitro degradation on resin-dentin bonds produced by self-etch versus total-etch adhesives. *J Biomed Mater Res A.* 2006 Apr;77(1):128-35.
32. Olszowski S, Mak P, Olszowska E, Marcinkiewicz J. Collagen type II modification by hypochlorite. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(2):471-9.
33. De Munck J, Shirai K, Yoshida Y, Inoue S, Van Landuyt K, Lambrechts P, et al. Effect of water storage on the bonding effectiveness of 6 adhesives to Class I cavity dentin. *Oper Dent.* 2006 Jul-Aug;31(4):456-65.
34. Duarte S Jr, Phark JH, Varjão FM, Sadan A. Nanoleakage, ultramorphological characteristics, and microtensile bond strengths of a new low-shrinkage composite to dentin after artificial aging. *Dent Mater.* 2009 May;25(5):589-600.
35. Reis AF, Giannini M, Kavaguchi A, Soares CJ, Line SR. Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine, and porcine teeth. *J Adhes Dent.* 2004 Summer;6(2):117-21.
36. Chaharom MEE, Kahnamoii MA, Kimyai S, Moghaddam MH. Effect of sodium hypochlorite on the shear bond strength of fifth- and seventh-generation adhesives to coronal dentin. *Afr. J. Biotechnol.* 2011 Oct 3;10(59).