

## Influência do uso de um *primer* na microinfiltração em dentina desproteinizada

Carlos Rocha Gomes TORRES<sup>a</sup>, Amanda Peres da SILVA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP

<sup>b</sup>Aluna do Curso de Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, UNESP 12245-000 São José dos Campos - SP

Torres CRG, Silva AP. Primer influence on microleakage in deproteinized dentin. Rev Odontol UNESP. 2006; 35(1): 7-13.

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de nulidade de que o uso de um *primer* num substrato dental condicionado e desproteinizado não teria influência na microinfiltração marginal. Para tal, 60 incisivos bovinos receberam preparos classe V na junção amelo-cementária e foram divididos em dois grupos. No Grupo C foi realizado condicionamento com ácido fosfórico a 35% por 15 segundos, enquanto, no Grupo H, após o condicionamento ácido idêntico ao do Grupo C, foi feita a aplicação de uma solução de NaOCl a 10% por 1 minuto. Cada grupo foi dividido em três subgrupos. No subgrupo PA, foram aplicados o *primer* e o adesivo do sistema Scotchbond Multipurpose (SBMP); no A foi aplicado apenas o adesivo do SBMP e no MB o adesivo para esmalte Magic Bond. As cavidades foram restauradas com dois incrementos com o compósito Z250. Os dentes foram imersos em água destilada a 37°C por 24 horas e submetidos a 500 ciclos térmicos (5 e 55°C). A microinfiltração foi avaliada quantitativamente pelo método do nitrato de prata seguido pela diafanização. Os dados foram submetidos à análise de variância a dois fatores e teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ). Foram observadas diferenças significativas apenas para o fator tipo de adesivo. As médias ( $\pm$  desvio padrão) observadas para cada tipo de adesivo foram: PA: 1,10 ( $\pm$  0,54)a; A: 3,15 ( $\pm$  1,50)b; MB: 3,74 ( $\pm$  1,04)b. Os grupos acompanhados de letras iguais não apresentaram diferenças significantes. Concluiu-se que o uso do *primer* sobre o substrato dentinário desproteinizado melhorou o selamento marginal e que a desproteinização não teve influência sobre a microinfiltração marginal.

**Palavras-chave:** Infiltração dentária; dentina; hipoclorito de sódio; colágeno.

**Abstract:** The aim of this study was to test the nullity hypothesis that the use of a primer in an acid etched and deproteinized dentin substratum would not have significant influence on microleakage. Sixty incisive bovine teeth received class V preparations at the cemento-enamel junction and were assigned into two groups. In the group C the acid etching was performed with 35% phosphoric acid for 15 seconds, while in the group H, after being acid etched in the same way as the group C, an application of a 10% NaOCl solution was carried out for 1 min. Each group was divided into 3 subgroups. In the subgroup PA, the primer and the adhesive of the Scotchbond Multipurpose adhesive system (SBMP) were applied. In the subgroup B, only the adhesive of the SBMP was applied. In the subgroup MB, the enamel adhesive Magic Bond was applied. The cavities were restored with 2 increments of Z250 composite. The teeth were immersed in distilled water at 37°C for 24 hours and submitted to 500 thermal cycles (5 and 55°C). The microleakage was evaluated quantitatively by the silver nitrate method followed by clearing. The data were submitted to two-way ANOVA and Tukey's test ( $\alpha = 5\%$ ). Significant differences were only observed for the factor adhesive type. The mean ( $\pm$  standard deviation) observed for each adhesive type were: PA: 1.10 ( $\pm$  0.54)a; A: 3.15( $\pm$  1.50)b; MB:3.74( $\pm$  1.04)b. The groups accompanied by the same letters do not present significant differences. We concluded that the use of the primer on the deproteinized dentin substratum improved the marginal sealing and that the deproteinization did not influence the marginal microleakage.

**Keywords:** Dental leakage; dentin; sodium hypochlorite; collagen.

## Introdução

A estratégia de adesão à dentina mais utilizada atualmente baseia-se na chamada hibridização obtida por meio do condicionamento ácido total. Ela consiste em promover uma desmineralização do substrato dentinário, removendo a *smear layer* e expondo sua rede de fibras colágenas a uma profundidade de cerca de 5  $\mu\text{m}$ , resultando numa superfície úmida e com baixa energia. Essa superfície deve, a seguir, ser impregnada pela aplicação dos monômeros adesivos, formando a denominada camada híbrida<sup>12</sup>.

Os primeiros estudos visando adesão à superfície dentinária tratada com ácidos não obtiveram sucesso, pois as características hidrófobas dos monômeros resinosos utilizados impossibilitavam o adequado molhamento do substrato. Visando contornar esse problema, foram desenvolvidos os *primers* ou promotores de adesão, incorporando-se em sua formulação monômeros com propriedades hidrófilas associados a solventes com alta pressão de vapor. Esses solventes são capazes de carrear esses monômeros para dentro da malha colágena desmineralizada. Esta associação resultou em soluções com baixa tensão superficial, melhorando as características de molhamento. Após o *primer*, aplicam-se então os monômeros hidrófobos, que podem ligar-se aos monômeros hidrófilos impregnados na rede colágena e unir-se à resina composta restauradora<sup>4</sup>.

Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado que pode existir uma discrepância entre a profundidade da desmineralização produzida pelo ácido e a penetração dos monômeros na malha colágena, resultando em fibras colágenas desprotegidas na região basal da camada híbrida<sup>6,23</sup>. Tais fibras são susceptíveis à hidrólise com o passar do tempo, comprometendo a durabilidade da adesão<sup>5</sup>. Além disso, esses sistemas adesivos são muito sensíveis à umidade superficial presente após o condicionamento ácido. Uma secagem muito intensa pode levar ao colapso da rede colágena e impedir a adequada impregnação<sup>9</sup>, enquanto o excesso de umidade pode levar à formação de defeitos interfaciais<sup>26</sup>.

Na última década, uma nova alternativa de tratamento do substrato dentinário vem sendo proposta. Ela consiste na aplicação de solventes de matéria orgânica, como o hipoclorito de sódio ou a enzima colagenase, sobre a camada de colágeno exposta pelo condicionamento ácido<sup>7,10</sup>. Dessa forma ocorre a remoção completa desse colágeno, expondo o substrato mineral da dentina localizado imediatamente abaixo. Essa superfície exposta apresenta-se extremamente rugosa e com alta energia, semelhante ao esmalte dental condicionado, favorecendo o embriçamento micromecânico com os sistemas adesivos<sup>25</sup>. Diversos estudos têm comprovado que essa técnica pode levar a um aumento da resistência adesiva e à melhora do selamento marginal das restaurações<sup>2,19,32,33</sup>. Além disso, devido à não formação da camada híbrida, o risco de uma impregnação incompleta do

colágeno exposto, quer pela discrepância entre a profundidade de desmineralização e impregnação quer pela umidade superficial, é teoricamente eliminado<sup>17</sup>, resultando numa técnica adesiva com resultados mais previsíveis, aumentando a durabilidade da adesão<sup>30</sup>.

Por outro lado, deve-se lembrar que os sistemas adesivos foram idealizados para utilização sobre uma camada de colágeno exposto. Porém, com a realização da técnica da desproteção, uma situação inteiramente nova estará presente na superfície da dentina, não existindo a necessidade de difusão dos monômeros nos espaços interfibrilares preenchidos por água. Além disso, uma superfície rica em colágeno e com baixa energia é modificada para uma superfície rica em hidroxiapatita e com alta energia, favorecendo o molhamento<sup>25,28</sup>. Hosoda et al.<sup>10</sup> realizaram um estudo avaliando a resistência adesiva à dentina ácido-condicionada ou condicionada e desproteída. Sobre esses substratos eles aplicaram um *primer* seguido pelo adesivo ou apenas o adesivo do sistema Clearfil Photo Bond (Kuraray). Constataram que, em dentina desproteída, o uso do *primer* não contribuía de forma significativa na força de adesão, sugerindo que seu uso seria desnecessário.

Mediante tamanhas alterações em virtude do tratamento desproteizante, um substrato adesivo diferenciado se faz presente, sendo necessário determinar quais os requisitos de um sistema adesivo para ser utilizado nessa situação. Com base nisso, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese nula de que o *primer* não teria influência na microinfiltração marginal quando aplicado sobre a dentina desproteída.

## Material e método

Para a confecção dos corpos-de-prova foram selecionados 60 incisivos bovinos livres de defeitos. Os dentes tiveram os terços apicais das raízes e as polpas dentais removidos. Das porções remanescentes das raízes, as metades apicais foram incluídas em resina acrílica, e os dentes levados a um dispositivo para preparos cavitários padronizados. Foram realizados preparos classe V nas superfícies vestibulares, no nível do limite amelo-cementário, com 2 mm de largura, 2 mm de altura e 1,5 mm de profundidade, de forma que a parede gengival ficasse localizada em cimento.

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em 2 grupos de 30 dentes, cada um recebendo um tipo diferente de tratamento de superfície. No Grupo C, foi aplicada a técnica convencional, pela qual todas as cavidades foram condicionadas com gel de ácido fosfórico a 35% por 15 segundos, seguindo-se uma lavagem com água por 30 segundos e remoção do excesso de umidade com papel absorvente de forma que a superfície permanecesse visivelmente úmida. No Grupo H, após o condicionamento ácido semelhante ao do Grupo C, foi realizada a aplicação de uma solução aquosa de hipoclorito de sódio a 10% por 1 minuto, seguida por

lavagem com água por 30 segundos e secagem com papel absorvente.

Cada grupo foi subdividido em três grupos de dez dentes, dependendo do tipo de adesivo aplicado. No subgrupo PA, foi aplicado o *primer* e o adesivo do sistema Scotchbond Multipurpose Plus (SBMP), segundo as instruções do fabricante, servindo como um controle. No subgrupo A, foi aplicado apenas o adesivo do sistema SBMP, e, após, um jato de ar e fotopolimerização por 10 segundos. No subgrupo MB, foi aplicado o agente adesivo para esmalte Magic Bond, seguindo-se um suave jato de ar e fotopolimerização por 10 segundos.

A composição química e a marca comercial dos sistemas adesivos utilizados estão apresentadas na Tabela 1.

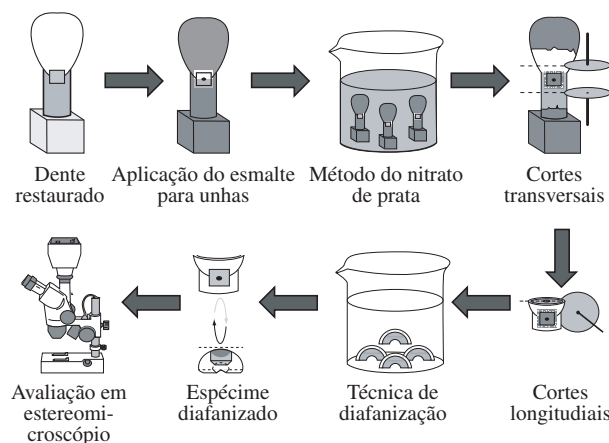
Todas as cavidades foram restauradas empregando-se a resina composta Z250 (Lote 1LU, 3M-Espe, St. Paul, MN, USA), em dois incrementos oblíquos, sendo cada incremento fotopolimerizado por 20 segundos, conforme recomenda o fabricante, empregando-se um fotopolimerizador (Optiligth 600, Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com densidade de potência de 600 mW/cm<sup>2</sup>. Após o término das restaurações, todos os espécimes foram imersos em água destilada a 37°C por 24 horas, sendo então realizado o acabamento e o polimento com discos Sof-Lex (3M-Espe, St. Paul, MN, USA).

Os espécimes foram submetidos a 500 ciclos térmicos. Cada ciclo consistiu num banho em água a 5°C por 30 segundos, seguido por outro banho pelo mesmo tempo a 55°C, empregando uma máquina específica para esse fim (Ética Equipamentos Científicos, São Paulo, SP, Brasil). A seguir, os dentes foram impermeabilizados com três camadas de esmalte para unhas, deixando-se apenas a restauração e uma janela de 0,5 mm ao redor da mesma sem aplicação do esmalte. Para a avaliação da microinfiltração, foi utilizado o método proposto por Tay et al.<sup>27</sup> e modificado por Torres et al.<sup>30</sup> (Figura 1).

Os dentes foram imersos numa solução aquosa de nitrato de prata a 50% durante 24 horas em ambiente escuro. Posteriormente foram lavados em água destilada corrente por 10 minutos, imersos em solução reveladora (Kodak, São José dos Campos, SP, Brasil) e expostos à luz fluorescente

por 6 horas, sendo então lavados em água corrente por 2 horas. Foram realizados cortes transversais e longitudinais, próximos à interface dente-resina composta, de forma a separar a metade vestibular do dente que continha a restauração (Figura 1).

A seguir, os blocos contendo as restaurações foram imersos em ácido clorídrico a 6%, por três dias, para que ocorresse a completa desmineralização. Após esse período, os dentes foram lavados e desidratados em soluções crescentes de etanol (70, 80, 95 e 100%), imersos durante duas horas em cada solução e, posteriormente, mergulhados em salicilato de metila para diafanização até que se obtivesse total transparência, permitindo uma visão tridimensional da restauração. A microinfiltração foi evidenciada por uma coloração enegrecida sobre a resina composta. A profundidade de penetração na parede gengival foi avaliada em milímetros a partir do ângulo cavo-superficial, no sentido da parede axial. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, empregando-se os testes de análise de variância a dois fatores e teste de Tukey, a um nível de significância de 5%.



**Figura 1.** Técnica de preparo dos espécimes para avaliação da microinfiltração.

**Tabela 1.** Composição dos agentes adesivos utilizados no estudo

Nome	Componentes	Composição	Fabricante (País)	Lote
SBMP	Condicionador	Ácido fosfórico a 35%, sílica	3M/Espe (USA)	3007
	<i>primer</i>	HEMA, água, etanol, co-polímero do ácido polialcenóico	3M/Espe (USA)	2YT
	adesivo	HEMA, Bis-GMA, fotoiniciadores	3M/Espe (USA)	7HU
Magic Bond		Éster do ácido Metacrílico, fotoiniciadores	Vigodent (Brasil)	00603

Superfícies de dentina submetidas aos dois tratamentos superficiais ( $n = 1$ ) e preparadas de acordo com o protocolo descrito por Perdigão et al.<sup>15</sup> foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

## Resultado

Na Tabela 2 observam-se os resultados da análise de variância a dois fatores.

Constata-se na Tabela 2 que para, o fator Tratamento de superfície, a hipótese de nulidade não pode ser rejeitada, indicando que a desproteinização não exerceu influência significativa na microinfiltração marginal. Por outro lado, para o fator Tipo de adesivo, a hipótese nula pode ser rejeitada, indicando a presença de diferenças significativas. Os fatores Tratamento de superfície e Tipo de adesivo não apresentaram uma interação significativa.

Na Tabela 3 observam-se os resultados do teste de Tukey para o fator Tipo de adesivo.

Observa-se, na Tabela 3, que o subgrupo no qual se empregou *primer* e adesivo mostrou uma média estatisticamente menor de microinfiltração do que os subgrupos que empregaram apenas o adesivo do SBMP e o Magic Bond. Os subgrupos que não empregaram o *primer* não apresentaram diferenças significativas entre si.

A Figura 2 mostra as médias de microinfiltração obtidas para os diferentes tratamentos de superfície e adesivos aplicados.

**Tabela 2.** Resultados da análise de variância a dois fatores

Fator	Graus de Liberdade	F	p
Tratamento de superfície (grupos)	1	0,38	0,53
Tipo de adesivo (subgrupos)	2	27,74	0,00*
Interação Tratamento X Tipo de adesivo	2	1,12	0,33

\*diferenças significativas

**Tabela 3.** Médias ( $\pm$  Desvios Padrão) e resultados do teste de Tukey para o fator Tipo de adesivo

Tipo de adesivo (subgrupos)	Média ( $\pm$ Desvio Padrão)	Conjuntos homogêneos*
<i>primer</i> + adesivo SBMP	1,10 ( $\pm$ 0,54)	A
adesivo SBMP	3,15 ( $\pm$ 1,50)	B
Magic Bond	3,74 ( $\pm$ 1,04)	B

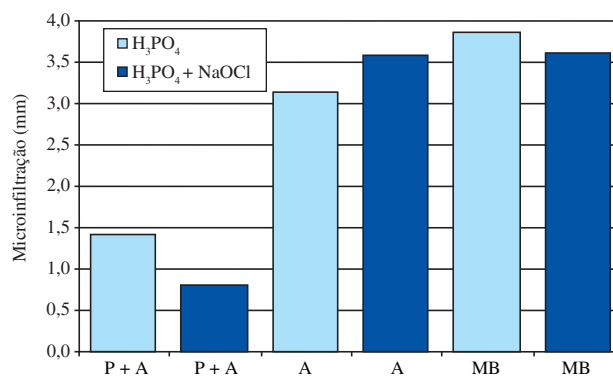
\*Os subgrupos seguidos de letras iguais não apresentaram diferenças significantes

As Figuras 3 e 4 mostram imagens representativas, em MEV, de espécimes ácido-condicionados e desproteinizados. Pode-se observar que o condicionamento ácido promoveu a remoção da lama dentinária e a exposição da rede colágena, enquanto a aplicação de NaOCl a 10% promoveu a completa remoção do colágeno dentinário, ampliando a entrada dos túbulos e resultando numa superfície altamente rugosa.

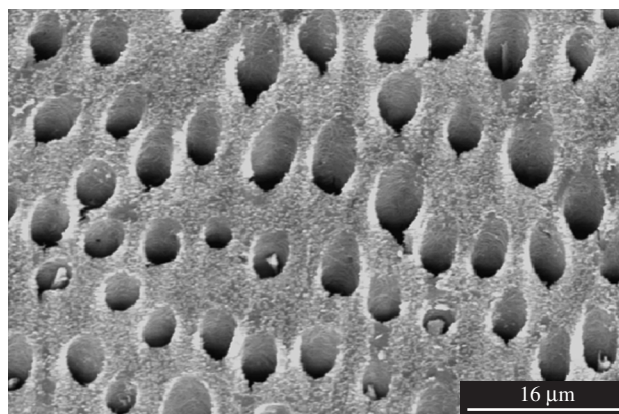
A Figura 5 mostra exemplos de espécimes com diferentes graus de microinfiltração. A coloração enegrecida representa áreas de penetração mais profunda da prata nas paredes cavitárias. O espécime da Figura 5d mostra que a penetração do traçador não ocorreu de forma homogênea em toda a parede cavitária.

## Discussão

A observação da presença da camada híbrida é muitas vezes considerada como sinal de sucesso na adesão ao tecido

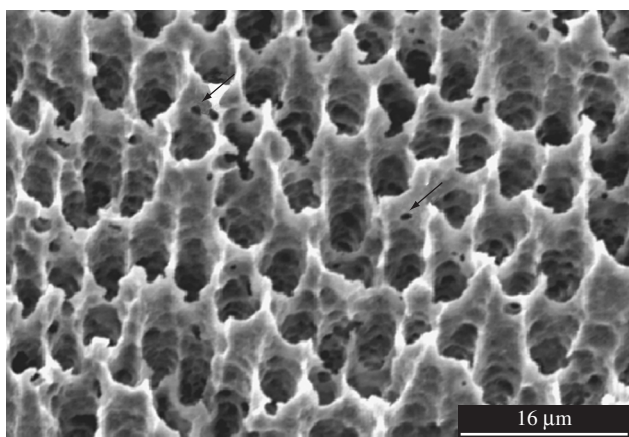


**Figura 2.** Médias de microinfiltração para os diferentes tratamentos de superfície e adesivos aplicados. P: *primer*; A: adesivo; e MB: Magic Bond.



**Figura 3.** Fotomicrografia da superfície da dentina ácido-condicionada (2000X).

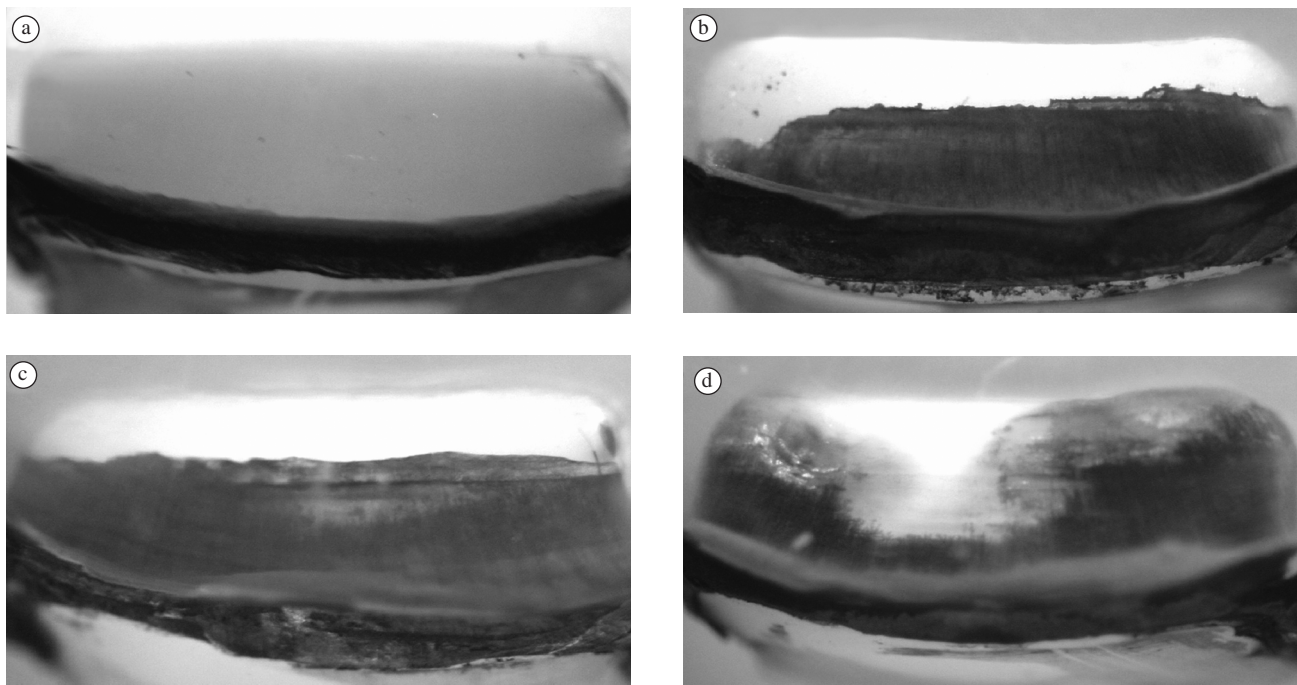
dentinário<sup>13,20</sup>. Por outro lado, alguns estudos têm mostrado que, ao se empregar a técnica da desproteïnização, a camada híbrida não é formada. Mesmo nessas circunstâncias, uma adesão semelhante ou superior pode ser obtida<sup>8,21,29-31</sup>. Os resultados observados neste estudo são concordantes com os da literatura, pois não foi constatada uma diferença significativa mesmo com a remoção completa da rede colágena superficial exposta pelo ácido (Tabela 2).



**Figura 4.** Fotomicrografia da superfície da dentina desproteïnizada (2000x); setas: anastomoses tubulares.

Com relação ao uso do *primer*, observamos na Tabela 3 que, nos grupos nos quais ele não foi utilizado, foram constatados valores significativamente maiores de microinfiltração em relação àqueles que receberam o *primer* e o adesivo. Com a técnica convencional, pela qual foi realizado apenas o condicionamento ácido, esse comportamento já era esperado pois a impregnação da malha colágena exposta apenas é possível quando se emprega uma solução hidrófila e com baixa tensão superficial<sup>14</sup>. Por outro lado, mesmo com a remoção da malha colágena com o uso do NaOCl, conforme pode ser observado na Figura 4, o papel do *primer* foi fundamental (Figura 2). Esse desempenho pode estar relacionado à técnica de secagem do substrato dentinário.

O presente estudo mostrou resultados discrepantes com os de Hosoda et al.<sup>10</sup>, que avaliaram a resistência adesiva ao substrato dentinário mediante diferentes tratamentos de superfície. Os autores observaram que o uso do *primer* em dentina desproteïnizada não contribuiu de forma significativa na efetividade da adesão, não sendo constatado um aumento da resistência adesiva quando do seu emprego. Por se tratar de um estudo *in vitro*, os dentes avaliados por Hosoda et al.<sup>10</sup> não possuíam o fluido dentinário advindo da polpa. Além disso, após o condicionamento ácido e a aplicação do NaOCl, a superfície dentinária foi seca com jatos de ar. Dessa forma, após a desproteïnização, a dentina apresentou-se como um substrato mineralizado, ressecado e com alta energia, o que pode ter favorecido o molhamento da



**Figura 5.** Espécimes com diferentes níveis de microinfiltração. a, b e c: Aquém da parede axial; e d: Atingindo a parede axial.

superfície pelos monômeros resinosos hidrófobos presentes no adesivo.

No presente trabalho, que avaliou a capacidade de selamento marginal das restaurações pela análise da microinfiltração marginal, o substrato dental, após os respectivos tratamentos de superfície, foi seco pela técnica da absorção, utilizando-se discos de papel absorvente. Essa manobra é fundamental para garantir a permeabilidade da trama colágena exposta pelo condicionamento ácido aos monômeros adesivos. Caso contrário, ela sofreria um colapso, o que impediria a sua correta impregnação<sup>1</sup>. Araújo et al.<sup>1</sup> mostraram que a secagem da dentina condicionada com jatos de ar pode resultar num aumento da microinfiltração marginal, enquanto Swift Junior, Triolo<sup>24</sup> observaram uma diminuição da resistência adesiva. Tratando-se da dentina desproteínizada, não seria preocupante realizar a secagem por meio de jatos de ar, uma vez que não haveria colágeno para colapsar. Contudo, introduz-se dessa maneira um novo fator de variação no estudo, o qual poderia influenciar os resultados finais.

Com relação ao adesivo do sistema Scotchbond Multipurpose e ao Magic Bond, constata-se um comportamento semelhante entre eles e inferior ao quando se empregou o *primer* (Tabela 3). Este fato pode ser relacionado às suas composições à base de monômeros hidrófobos (Tabela 1). Estes materiais devem ter sido incapazes de impregnar completamente a dentina úmida, tanto a condicionada quanto a desproteínizada. Embora o adesivo do sistema Scotchbond Multipurpose possua uma certa concentração do monômero hidrófilo HEMA, ela deve ser insuficiente para proporcionar um adequado molhamento da dentina úmida, associado-se ainda o fato de não possuir solventes, os quais são responsáveis por carrear os monômeros resinosos para dentro das microporosidades.

Os subgrupos nos quais foi utilizado o *primer* apresentaram uma média de infiltração ligeiramente menor nos espécimes desproteínizados, embora essa diferença não fosse significativa (Figura 2). Analisando a literatura, constata-se que os resultados das diferentes pesquisas não são uniformes. Trabalhos publicados mostram que o tratamento com NaOCl pode não ter uma influência significativa<sup>11</sup> ou levar a uma diminuição da resistência adesiva<sup>16</sup>. Esses resultados contraditórios podem estar relacionados a variações na composição do sistema adesivo<sup>11,20,22</sup> ou a uma deficiência da solução desproteínizante utilizada nesses estudos em remover completamente o colágeno. Fatores como o uso de baixas concentrações e a instabilidade da solução podem diminuir sua eficiência. A remoção incompleta do colágeno resulta num gel que oblitera completamente os espaços interfibrilares e impede a impregnação satisfatória do substrato, resultando numa queda da resistência adesiva<sup>16</sup>.

Embora a desproteínização não tenha levado a uma melhora significativa no selamento marginal (Tabela 2), alguns

estudos mostraram que essa técnica pode promover uma adesão mais estável, pois evita que fibras colágenas eventualmente não impregnadas venham a sofrer hidrólise<sup>18,30</sup>, o que justifica novas investigações para verificar a efetividade desse tratamento de superfície.

Como toda pesquisa *in vitro*, os resultados deste estudo devem ser interpretados à luz das limitações do método. Fatores como o uso de dentes bovinos, a ausência de pressão pulpar<sup>3</sup> e a de estresse mecânico sobre as restaurações podem não simular completamente a situação clínica, dificultando prever com exatidão o comportamento *in vivo* dos procedimentos adesivos testados.

## Conclusão

- O uso do *primer* sobre o substrato dentinário desproteínizado melhorou o selamento marginal;
- a desproteínização não teve influência sobre a microinfiltração marginal.

## Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Processo nº 03/00865-0.

## Referências

1. Araújo MAM, Torres CRG, Araújo RM. Influência do estado de hidratação da dentina ácido-condicionada no selamento marginal em restaurações de resina composta. Rev Odontol UNESP. 1998; 27: 363-79.
2. Blunck U, Speyer F, Roulet JF. Effect of hypochlorite treatment of conditioned dentin on the marginal adaptation of composite resin restorations [abstract 46]. J Dent Res. 1997; 76 (special issue): 19.
3. Bränström M. The effect of dentin desiccation and apirated odontoblasts on the pulp. J Prosthet Dent. 1968; 20: 165-71.
4. Burke FJ. Fourth generation dentine bonding agents. Br Dent J. 1994; 177 (1): 9.
5. Burrow MF, Tagami J, Hosoda H. The long term durability of bond strength to dentin. Bull Tokyo Med Dent Univ. 1993; 40:173-91.
6. Chan AR, Tittley KC, Chernecky R, Smith DC. A short and long-term shear bond strength study using acids of varying dilutions on bovine dentine. J Dent. 1997; 25:145-52.
7. Fujita E, Takada Y, Kato T, Kondo Y, Susuki K, Yamashita A. Effect of dentin treatment on adhesion of adhesive composite resin to dentin-dissolution of collagen. Adhesive Dent. 1990; 8: 227-35.
8. Gwinnett AJ, Tay FR, Pang KM, Wei SH. Quantitative contribution of the collagen network in dentin hybridization. Am J Dent. 1996; 9: 140-4.

9. Gwinnett AJ. Altered tissue contribution to interfacial bond strength with acid conditioned dentin. *Am J Dent.* 1994; 7: 243-6.
10. Hosoda H, Sugizaki J, Nakagima M, Shono T, Tagami J. A study on the mechanism of bonding between resin and dentin. Part 1. Bonding to dentin treated with sodium hypochlorite. *Jap J Conserv Dent.* 1993; 36: 1054-8.
11. Inai N, Kanemura N, Tagami J, Watanabe LG, Marshall SJ, Marshall GW. Adhesion between collagen depleted dentin and dentin adhesives. *Am J Dent.* 1998; 11: 123-7.
12. Nakabayashi N, Ashizawa M, Nakamura M. Identification of a resin-dentin hybrid layer in vital human dentin created in vivo: durable bonding to vital dentin. *Quintessence Int.* 1992; 23: 135-41.
13. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by infiltration of monomers into tooth substrate. *J Biomed Mater Res.* 1982; 16: 265-73.
14. Nakabayashi N, Takarada K. Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dent Mater.* 1992; 8: 125-30.
15. Perdigão J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G, Lopes AL. Field emission SEM comparison of four post-fixation drying techniques for human dentin. *J Biomed Mater Res.* 1995; 29: 1111-20.
16. Perdigão J, Lopes M, Geraldini S, Lopes GC, Garcia-Godoy F. Effect of a sodium hypochlorite gel on dentin bonding. *Dent Mater.* 2000; 16: 311-23.
17. Phrukkanon S, Burrow MF, Hartley PG, Tyas MJ. The influence of modification of etched bovine dentin on bond strengths. *Dent Mater.* 2000; 16: 255-65.
18. Pimenta LA, Amaral CM, Bedran de Castro AK, Ritter AV. Stability of dentin bond strengths using different bonding techniques after 12 months: total -etch, deproteinization and self-etching. *Oper Dent.* 2004; 29: 592-8.
19. Pioch T, Kobaslija S, Huseinbegovic A, Muller K, Dorfer CE. The effect of NaOCl dentin treatment on nanoleakage formation. *J Biomed Mater Res.* 2001; 56: 578-83.
20. Pioch T, Kobaslija S, Schagen B, Gotz H. Interfacial micromorphology and tensile bond strength of dentin bonding systems after NaOCl treatment. *J Adhes Dent.* 1999; 1: 135-42.
21. Prati C, Chersoni S, Pashley H. Effect of removal surface collagen fibrils on resin-dentin bonding. *Dent Mater.* 1999; 15: 323-31.
22. Saboia VPA, Pimenta LAF, Ambrosano GMB. Effect of collagen removal on microleakage of resin composite restorations. *Oper Dent.* 2002; 27: 38-43.
23. Spencer P, Swafford J. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. *Quintessence Int.* 1999; 30: 501-7.
24. Swift Junior E, Triolo PT. Bond strengths of Scotchbond Multipurpose to moist dentin and enamel. *Am J Dent.* 1992; 5: 318-20.
25. Tanaka J, Nakai H. Application of root canal cleaning agents having dissolving abilities of collagen to the surface treatment for enhanced bonding of resin to dentin. *Dent Mater J.* 1993; 12: 196-208.
26. Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SHY. The overwet phenomenon: a scanning electron microscopic study of surface moisture in the acid conditioned, resin-dentin interface. *Am J Dent.* 1996; 9: 109-14.
27. Tay FR, Pang KM, Gwinnett AJ, Wei SHY. A method for microleakage evaluation along the dentin/restorative interface. *Am J Dent.* 1995; 8: 105-8.
28. Toledano M, Osorio R, Perdigão J, Rosales JI, Thompson JY, Vilchez MAC. Effect of acid etching and collagen removal on dentin wettability and roughness. *J Biomed Mater Res.* 1999; 47: 198-203.
29. Toledano M, Perdigão J, Osório R, Osorio E. Effect of dentin deproteinization on microleakage of Class V composite restorations. *Oper Dent.* 2000; 25: 497-504.
30. Torres CRG, Araújo MAM, Torres ACM. Effects of dentin collagen removal on microleakage of bonded restorations. *J Adhes Dent.* 2004; 6: 33-42.
31. Uno S, Finger WJ. Function of the hybrid zone as a stress-absorbing layer in resin-dentin bonding. *Quintessence Int.* 1995; 26: 733-8.
32. Vargas MA, Cobb DS, Armstrong SR. Resin-dentin shear bond strength and interfacial ultrastructure with and without a hybrid layer. *Oper Dent.* 1997; 22: 159-66.
33. Wakabayashi Y, Kondou Y, Suzuki K, Ytani H, Yamashita A. Effect of dissolution of collagen on adhesion to dentin. *Int J Prosthodont.* 1994; 7: 302-6.

