



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL

LETÍCIA FERREIRA MONTARELE

EFEITO DA AGITAÇÃO DO ÁCIDO FOSFÓRICO, DURANTE O CONDICIONAMENTO DO
ESMALTE, NA RESISTÊNCIA AO MICROCISALHAMENTO E NA ESTRUTURA E SUPERFÍCIE EM
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - ESTUDO *IN VITRO*
EM DENTES DE BOVINOS

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado à Faculdade de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo.

Área: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson Filho

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Montarele, Letícia Ferreira

Efeito da agitação do ácido fosfórico, durante o condicionamento do esmalte, na resistência ao microcisalhamento e na estrutura e superfície em microscopia eletrônica de varredura - estudo *in vitro* em dentes de bovinos. Ribeirão Preto, 2018.

29p. : il.; 30cm

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson Filho

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a **Deus** que iluminou meu caminho durante essa jornada.

Agradeço aos meus **pais**, por todo esforço, suor e investimento, por terem me dado força e coragem por todo caminho, por toda paciência e por terem sempre acreditado em mim.

Agradeço ao meu **irmão** que mesmo tão jovem sempre me deu apoio e esteve ao meu lado.

Agradeço ao meu **namorado** que passou todos os momentos felizes e apreensivos dessa jornada, por ter me aguentado nas horas mais estressantes e por sempre estar ao meu lado me dando apoio.

Agradeço a minha querida amiga **Amanda**, que tornou possível a realização desse tcc, por toda calma em me ensinar e por me colocar sempre a frente de suas tarefas.

Agradeço ao meu querido orientador **Paulo Nelson Filho**, por me passar tanto conhecimento, pelo apoio e amizade e por acreditar em mim.

Agradeço a todas as minhas **amigas** que estiveram sempre ao meu lado e sempre me deram suporte, me suportaram por 5 anos e com certeza sempre estarão ao meu lado.

Agradeço a todos os **professores, funcionários e colegas** que contribuíram para essa jornada.

SUMÁRIO

RESUMO	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. PROPOSIÇÃO	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
4. RESULTADOS.....	18
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS.....	27

RESUMO

O condicionamento ácido, previamente à aplicação do adesivo dentinário, é essencial para evitar microinfiltrações e aumentar a resistência nas restaurações. Estudos neste sentido vem sendo realizados para melhorar a resistência, evitando que microinfiltrações ocorram, aumentando a longevidade da restauração. No presente estudo foi avaliado o efeito da agitação do ácido fosfórico a 37%, durante o condicionamento do esmalte, na resistência ao microcissalhamento, no padrão de fratura e na estrutura de superfície em microscopia eletrônica de varredura (MEV), *in vitro*, em dentes de bovinos. Foram utilizados 30 fragmentos de dentes de bovinos seccionados (1x1x2cm) e lixados, divididos em 4 grupos. Nos grupos I e II foi realizado o condicionamento ácido de forma convencional (controle), e nos grupos III e IV foi realizado o condicionamento sob agitação constante por 20 segundos (experimental). Sobre a superfície dos espécimes dos grupos I e III foram inseridas matrizes, para obtenção de cilindros de compósito (adesivo Adper Single Bond e compósito Filtek Z250), para posterior análise da resistência ao microcissalhamento, em uma máquina de ensaio universal. Nos espécimes dos grupos II e IV foi realizada análise em MEV. Os resultados foram submetidos ao teste t de Student. O nível de significância adotado foi de 5%. A análise em MEV evidenciou superfície mais uniforme e padrão de condicionamento tipo II nos espécimes submetidos à agitação (grupo IV). Nos espécimes do grupo II, onde não foi realizada agitação, houve predomínio de padrão de condicionamento tipo I. No entanto, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e III com relação à resistência ao microcissalhamento ($p=0,1322$). Apesar das diferenças morfológicas observadas em MEV, a agitação do ácido fosfórico a 37% não promoveu aumento da resistência ao microcissalhamento.

1. Introdução

INTRODUÇÃO

“Restaurar”, segundo o dicionário Aurélio, significa “reparar ou restabelecer”. A Odontologia Restauradora é a área da Odontologia que tem como objetivo restaurar o elemento dental, devolvendo forma, função e estética, por meio de materiais odontológicos restauradores, os quais são a chave para o sucesso do tratamento restaurador. O material utilizado para restauração deve apresentar as seguintes características: ser biocompatível, unir-se ao esmalte e à dentina, apresentar resistência às forças mastigatórias, ter propriedades mecânicas próximas às das estruturas dentárias, ser resistente à degradação no meio bucal e ser de fácil manuseio e utilização (Kugel, 2000).

O avanço da tecnologia aplicada aos materiais odontológicos, e os avanços ocorridos nos materiais adesivos tornou possível o uso de técnicas restauradoras mais conservadoras. Atualmente, é preconizada a remoção seletiva do tecido cariado, removendo-se somente a dentina infectada (Aswathi et al., 2017).

Uma nova era da Odontologia deu-se início quando a adesão efetiva dos materiais restauradores à superfície dentária tornou-se possível após a introdução da técnica de condicionamento ácido do esmalte (Buonocore, 1955; Brannstrom, 1982).

Em 1968, Buonocore et al. concluíram que o ácido altera a superfície do esmalte, tornando-a mais receptiva à adesão aos materiais restauradores, por meio do aumento da energia de superfície e aumento da área de superfície. O aumento da energia de superfície se dá pela dissolução ácida de alguns micrometros da superfície de esmalte não reativa, facilitando escoamento e contato do adesivo a ser aplicado. O aumento da área de superfície é promovido pela dissolução ácida seletiva dos prismas de esmalte, criando microporosidades nesta superfície.

Do ponto de vista clínico, anteriormente ao condicionamento ácido é imprescindível a realização do isolamento absoluto e da profilaxia com pedra-pomes e água, seguida da utilização do ácido fosfórico a 37% (Barros de Campos et al., 2015; Karaouzas et al., 2012; Silva et al., 2018). O tempo de condicionamento ácido no esmalte de dentes permanentes é de 15/20 segundos (Carrassi et al., 1985; Assed, 2005; Choi et al., 2010; Pimenta et al., 2010; Pimenta-Dutra et al., 2017; Silva, 2018) e de 30 segundos no esmalte de dentes decíduos (Silva, 2018).

Em 2013, Pucci et al. realizaram um estudo em microscopia eletrônica de varredura e concluíram que o condicionamento ácido da dentina, quando combinado com uma superfície de dentina úmida e o uso de agitação do adesivo, melhora a força de adesão à dentina. No entanto, até o momento não há estudos publicados na literatura específica avaliando se a agitação do ácido, durante o condicionamento, afeta positivamente a adesão do material restaurador ao esmalte.

2. Proposição

PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da agitação do ácido fosfórico a 37%, durante o condicionamento do esmalte de dentes de bovinos, na resistência ao microcissalhamento e analisar qualitativamente a estrutura de superfície em microscopia eletrônica de varredura.

A hipótese nula testada é de que não há diferença na resistência ao microcissalhamento, após condicionamento do esmalte, com ou sem agitação do ácido.

3. Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção da amostra e preparo dos espécimes

O cálculo amostral foi realizado utilizando o software Clinical & Translational Science Institute, Sample Size Calculators. O alfa foi de 0,05, o poder do teste de 80%. O cálculo amostral baseado no trabalho de Lima et al.,(2010) resultou na necessidade de 8 fragmentos de dentes bovinos por grupo.

Seleção da amostra e preparo dos espécimes

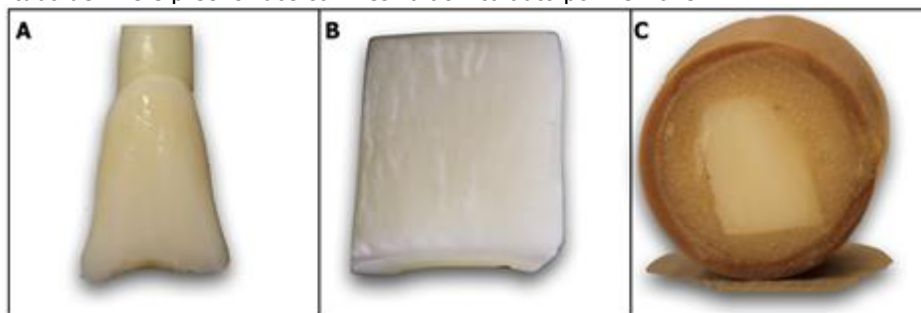
Foram utilizados 30 dentes bovinos hígidos, limpos com curetas periodontais e armazenados em solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 24 horas. Em seguida, foram enxaguados em água corrente, armazenados em coletores universais de 80mL contendo solução salina e identificados. Foram obtidos espécimes com dimensões de 1cm de largura, 1 cm de altura e 2 mm de espessura, a partir da área de maior volume da coroa dos dentes bovinos, que corresponde à área central da coroa dental. Os dentes foram seccionados por meio de disco diamantado de dupla face, montado em alta rotação (KG Sorensen Ind. e Com. Ltda. - ref 7020).

Todos os espécimes foram lixados com lixa D`água de granulações 400 e 600 (Norton – Guarulhos – SP – Brasil), enxaguados em água destilada e submetidos à profilaxia com uma mistura de pedra-pomes (Extra-Fina S.S. White, Duflex - Rio de Janeiro - Brasil) e água, com uma escova de Robinson (KG Sorensen - Barueri – SP - Brasil) acoplada ao motor de baixa rotação. Em seguida, foram novamente enxaguados por 30 segundos e secos por 30 segundos (Pimenta-Dutra et al., 2017).

Os espécimes submetidos ao teste de microcissalhamento foram incluídos em um tubo de Polivinil Cloro (PVC) 15,0 mm de altura e 25,0 mm de diâmetro, e preenchidos com resina acrílica auto polimerizável (Dencôr, Clássico – Campo Limpo Paulista – SP – Brasil).

A Figura 1 apresenta o preparo dos espécimes para realização do experimento.

Figura 1 - Preparo dos Espécimes: Dentes bovinos hígidos, limpos com curetas periodontais (A); obtenção dos espécimes com dimensões de 1cm de largura, 1 cm de altura e 2 mm de espessura, a partir da área de maior volume da coroa dos dentes bovinos (B); Para o teste de microcisalhamento os espécimes foram incluídos em um tubo de PVC e preenchidos com resina acrílica auto polimerizável.



Os espécimes foram aleatoriamente distribuídos de acordo com os seguintes grupos:

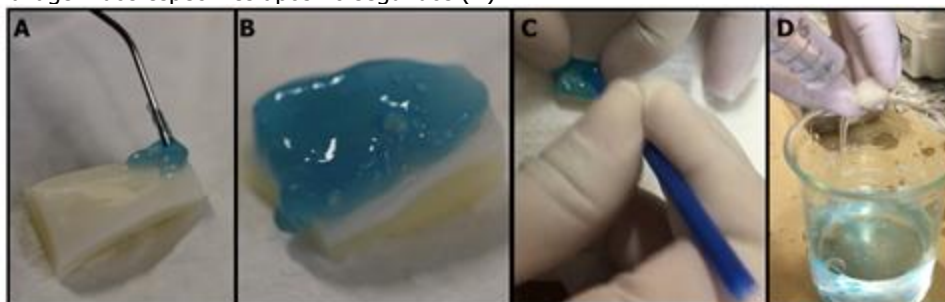
- **Grupo I** (n=10 dentes; controle): condicionamento ácido do esmalte sem agitação, para análise da resistência ao microcisalhamento.
- **Grupo II** (n=5 dentes; controle): condicionamento ácido do esmalte sem agitação, para análise em microscopia eletrônica de varredura.
- **Grupo III** (n=10 dentes; experimental): condicionamento ácido do esmalte sob agitação, para análise da resistência ao microcisalhamento.
- **Grupo IV** (n=5 dentes; experimental): condicionamento ácido do esmalte sob agitação, para análise em microscopia eletrônica de varredura.

Nos grupos I e II foi realizado o condicionamento com ácido fosfórico a 37% (Gel Etch, 3M ESPE - Oral Care Solutions Division. Sumaré - SP - Brasil), da forma convencional, de acordo com as instruções do fabricante, ou seja, aplicação do ácido com haste flexível de ponta flocada com microcerdas de nylon (microbrush, KG Sorensen - Barueri - SP - Brasil) por 20 segundos, seguido de lavagem abundante por 15 segundos e completamente seco com ar comprimido (Kanellis et al., 1997).

Nos grupos III e IV (experimental) também foi realizados o condicionamento com ácido fosfórico a 37%, porém sob agitação constante com microbrush por 20 segundos, sem atrito no esmalte, seguido de lavagem abundante por 15 segundos e completamente seco com ar comprimido (Kanellis et al., 1997).

A Figura 2 representa como foi realizado o experimento para a análise em Microscopia Eletrônica de Varredura, com e sem agitação do condicionamento ácido (Grupo II e IV).

Figura 2 - Experimento para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicação do ácido sob o fragmento (A); Aplicação sem agitação do condicionamento ácido (B); Aplicação do ácido de forma ativa, com agitação do condicionamento ácido (C); e lavagem dos espécimes após 20 segundos (D).



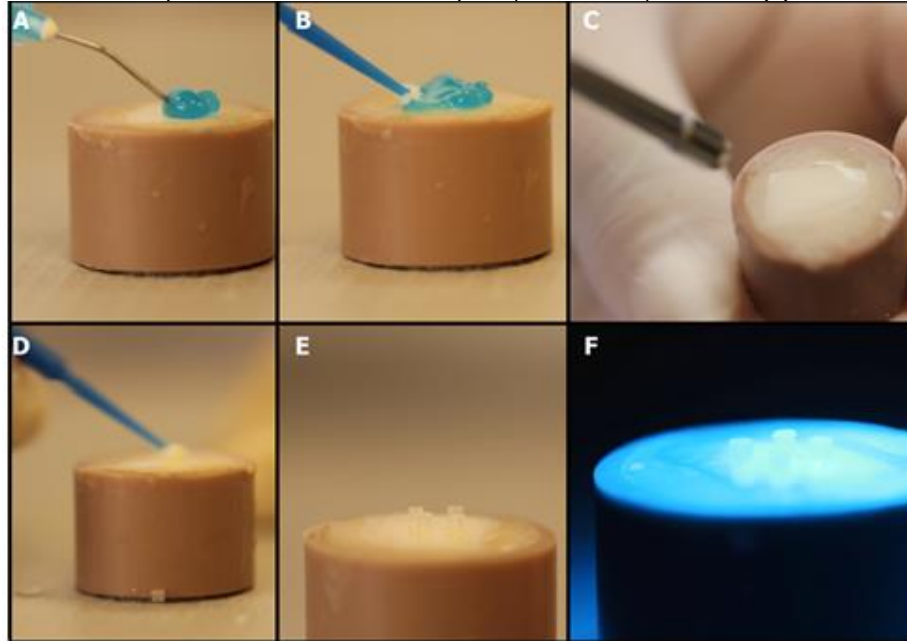
Em seguida, nos espécimes dos grupos I e III foi realizada a aplicação de duas camadas de adesivo Adper Single Bond (3M ESPE - Oral Care Solutions Division - Sumaré - SP - Brasil), de acordo com as instruções do fabricante, seguida de fotopolimerização (fotopolimerizador Gnatus Optilight Color, na potência de 1000 mW/cm² - Osasco - SP - Brasil). A seguir, foi posicionada uma matriz cilíndrica transparente de silicone de 1mm de altura com orifício de 7mm de diâmetro no centro do espécime. Esta matriz foi preenchida com resina composta (Filtek Z250, 3M ESPE - Oral Care Solutions Division - Sumaré - SP - Brasil), pela técnica incremental, e fotopolimerizada com o mesmo aparelho descrito, por 40 segundos (Özcan e Pekkan, 2013).

Após a fotopolimerização, a matriz foi cuidadosamente removida com lâmina de bisturi.

A Figura 3 representa como foi realizado o experimento para a análise de resistência ao microcisalhamento, com e sem agitação do condicionamento ácido (Grupo I e III).

Todos os procedimentos operatórios foram realizados por um único operador.

Figura 3 - Experimento para análise à resistência ao microcisalhamento: Aplicação do ácido sobre o fragmento (A); Aplicação do ácido de forma ativa, com agitação do condicionamento ácido (B); Lavagem dos espécimes após 20 segundos (C); aplicação de duas camadas de adesivo Adper Single Bond (D); A matriz cilíndrica transparente de silicone de 1mm de altura com orifício de 7mm de diâmetro foi posicionada (E); Esta matriz foi preenchida com resina composta, Filtek Z250, 3M ESPE (F).

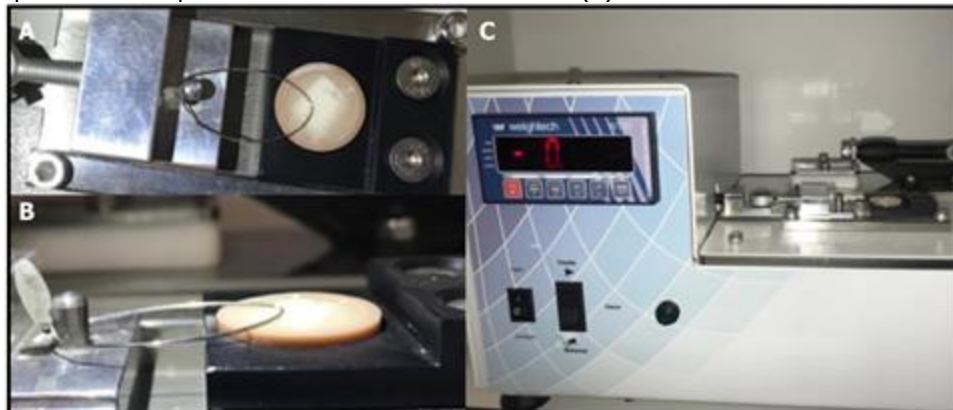


Teste de microcisalhamento

A resistência ao microcisalhamento de cada grupo foi medida usando uma máquina de ensaio universal (EMIC DL2000 - Brasil), com célula de carga de 10kg. Esta máquina possui um terminal de computador acoplado, preparado para efetuar a leitura dos dados transmitidos pelo ensaio mecânico, por meio de um programa próprio. Foi utilizada uma base metálica que possibilitou o posicionamento correto dos corpos de prova, e um fio ortodôntico de 0,2mm de diâmetro fixado na extremidade superior móvel da máquina formando um laço a fim de permanecer ao redor dos cilindros próximo à interface adesiva dos espécimes. A velocidade utilizada foi de 0,5mm/minuto e o valor da resistência ao microcisalhamento foi determinado pelo quociente da força máxima aplicada durante o teste pela área utilizada para adesão. Esse valor expresso em MPa (Megapascal) determinou a carga necessária para o rompimento da união adesiva, estabelecida na interface entre esmalte e resina composta (Pereira, 2008; Shakya et al., 2015).

A Figura 4 ilustra como foi realizado o ensaio de resistência ao microcisalhamento.

Figura 4 - Máquina de ensaios universais (EMIC DL2000 - Brasil); Corpo de prova posicionado para medir a resistência ao microcisalhamento (A,B); computador acoplado que mede em Mpa a resistência ao microcisalhamento(C).



Análise Morfológica Superficial em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após o teste de microcisalhamento foi realizado o teste de microscopia eletrônica em 5 espécimes de cada grupo a ser avaliado, com agitação e sem agitação do ácido durante o condicionamento no esmalte. Os espécimes foram submetidos à análise morfológica em MEV, com relação ao padrão de condicionamento obtido (tipo I, II ou III), como descrito por Gwinnett et al. (1963) e Silverstone et al. (1975).

Os espécimes foram cobertos com ouro puro até a obtenção de uma espessura aproximada de 200 micrometros, em metalizador EMITECH K650 Spitter Coater (Londres - Inglaterra). Após metalização, os espécimes foram examinados em um microscópio eletrônico de varredura (DSM 940A; Zeiss, Oberkochen - Alemanha), operado a 15kV, para análise do padrão do condicionamento ácido.

Foram feitas imagens nos aumentos 1000, 2500, 3500, 10000 vezes e a análise foi realizada no aumento de 1000 vezes e classificadas de acordo com o padrão de condicionamento descrito por Silverstone et al, (1975), sendo o Tipo I, o mais prevalente, revelando a dissolução preferencial do centro dos prismas do esmalte, mantendo intacta a periferia dos mesmos. No Tipo II, a predominância da dissolução preferencial da periferia dos prismas do esmalte, permanecendo intacto o núcleo dos primas. No tipo III, observa-se uma mistura do padrão tipo I e II.

A Figura 5 representa os espécimes dispostos em um "stub", cobertos com uma fina camada de ouro.

Figura 5 - Espécimes preparados para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura.



Análise do padrão de fratura

Os espécimes foram analisados sob um microscópio estereoscópico (Nikon Instrument Group Inc. Melville, NY, EUA) com aumento de 40 × para determinar os tipos de fratura: adesiva, na interface adesiva; coesiva, no corpo da resina ou esmalte, mantendo uma interface intacta; e mista, quando ocorreu a ruptura da ligação adesiva e o material ou o substrato ao mesmo tempo (Mesquita-Guimarães et al., 2016).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do Test t de Student para a análise de resistência ao Microcisolhamento. O nível de significância foi de 5%.

4. Resultados

RESULTADOS

Teste de Microcissalhamento

Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e III com relação à resistência ao microcissalhamento ($p=0,1322$).

A Figura 6 e a Tabela 1 apresentam a Resistência ao microcissalhamento, em Mpa, comparando os grupos controle e experimental.

Figura 6 - Análise da resistência ao microcissalhamento. Letras Iguais representam ausência de significância estatística.

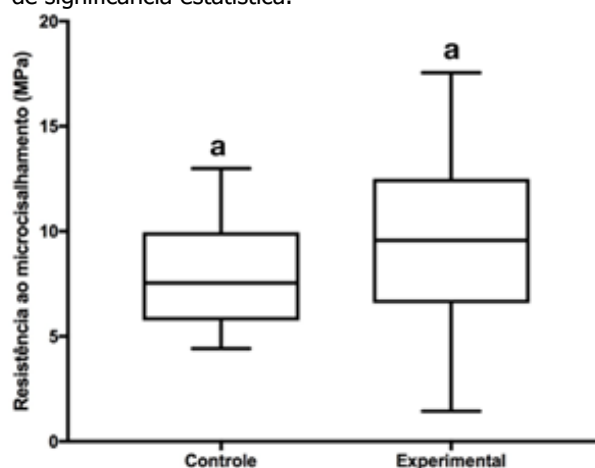


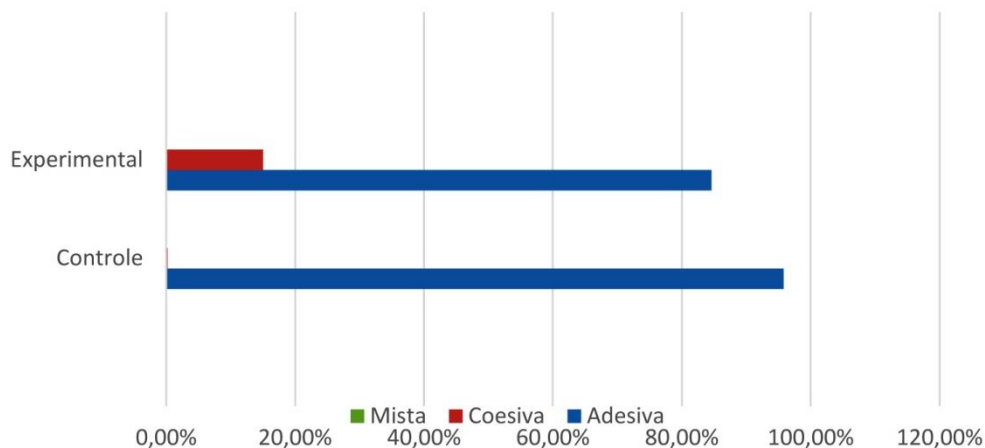
Tabela 1 - Comparação das medias (desvio-padrão) de resistência ao microcissalhamento – Teste t Student (nível de significância: 95%)

	Experimental	Controle
Resistência ao microcissalhamento (MPa)	9,54 (3,9)	8,05 (2,4)

Análise do Padrão de Fratura

A análise do padrão de fratura revelou uma predominância de fraturas adesivas em 95,8% no grupo controle e de 84,6% no grupo experimental. Por outro lado, as fraturas coesivas estiveram presente em 15% no grupo experimental e 4,2% no grupo controle.

O Gráfico 1, mostra o resultado em porcentagem da análise do padrão de fratura, em coesiva, mista ou adesiva.

Gráfico 1 - Resultado, em Porcentagem da análise do Padrão de Fratura.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise em MEV evidenciou superfície mais uniforme e padrão de condicionamento tipo II nos espécimes submetidos à agitação. Nos espécimes do grupo II, onde não foi realizada agitação, houve predomínio de padrão de condicionamento tipo I.

Figura 6 e 7 representam fotomicrografias dos espécimes submetidos a análise à Microscopia Eletrônica de Varredura, em aumentos de 2500X e 10000X.

Figura 6 - Fotomicrografias da análise em Microscopia Eletrônica de Varredura: Controle, Grupo II (A - aumento de 2500X; B - aumento de 10000X); Experimental, Grupo IV (B – aumento de 2500X; D – aumento de 10000).

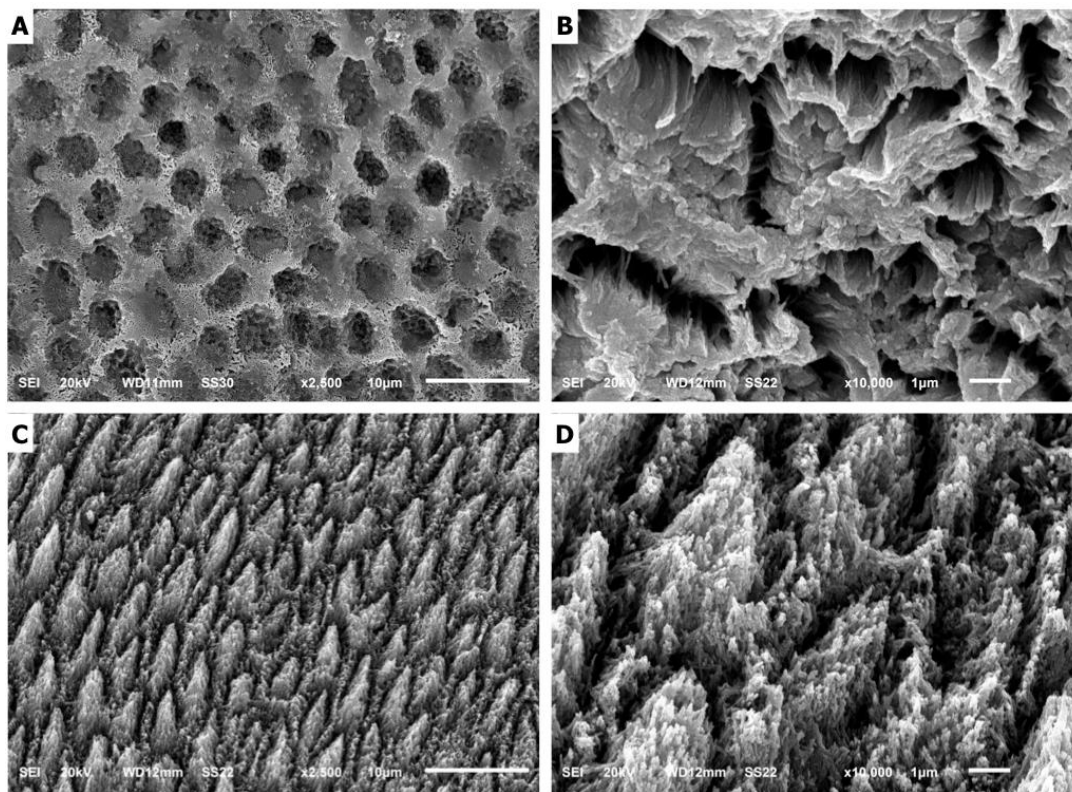
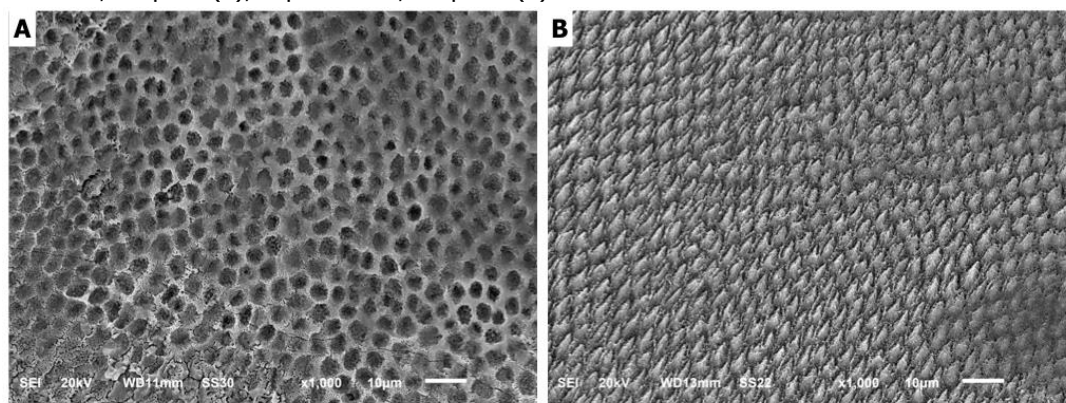


Figura 7 - Fotomicrografias da análise da Microscopia Eletrônica de Varredura, aumento 1000X; Controle, Grupo II (A); Experimental, Grupo IV (B).



5. Discussão

DISCUSSÃO

A técnica pioneira de condicionamento com ácido fosfórico para aumentar a adesão dos materiais resinosos ao esmalte dental preoconizada por Buonocore (1955), tornou-se a base para introdução dos procedimentos adesivos na odontologia.

Os prismas do esmalte dos dentes bovinos e humanos apresentam propriedades físicas e químicas, como composição, densidade, profundidade, diâmetro e dureza do esmalte, semelhantes, portanto a escolha dos dentes bovinos para o presente estudo tornou-se viável. Outro aspecto é o fato dos espécimes terem sido seccionados, de modo que a região central da coroa dental fosse analisada. Isto foi realizado, pois esta região apresenta superfície plana e esmalte de aproximadamente 1 mm de espessura, semelhante à espessura média dos incisivos superiores humanos (Pimenta-Dutra et al., 2017).

Na literatura específica, está bem estabelecido que o ácido fosfórico a 37% é o melhor agente condicionante, (Pimenta-Dutra et al., 2017, Zanet et al., 2006), assim como o tempo de condicionamento ácido, de 20 segundos para dentes bovinos e/ou permanentes de humanos (Brannstrom et al., 1982; Gwinnett e Garcia Godoy et al., 1992).

A utilização de materiais odontológicos aplicados de forma ativa, ou seja, com agitação, foi comprovada, na Endodontia, com a aplicação do EDTA por 3 minutos sob agitação (Nelson-Filho et al., 2009), assim como na aplicação do adesivo dentinário, aplicado ativamente com um microbrush, no entanto ainda não existem estudos na literatura específica e correlata que analisam a agitação do condicionamento ácido em esmalte. Desta forma, tornou-se viável a análise da agitação do condicionamento ácido na resistência ao microcissalhamento e análise superficial em MEV.

Dundar et al. (2018) avaliaram in vitro, os efeitos do ácido cítrico contendo fluoreto, nano-hidroxiapatita e caseína na erosão do esmalte, utilizando a MEV, pode-se observar em vários aumentos a superfície do esmalte, inclusive os prismas. Como esta metodologia já esta bem consolidada na literatura especifica e correlata, no presente estudo foi avaliado o padrão de condicionamento ácido nos prismas de

esmalte.

A resistência ao microcisalhamento também foi escolhida como metodologia neste estudo, para avaliar se houve aumento da resistência após a agitação do condicionamento ácido.

Na análise dos resultados, da resistência ao microcisalhamento, apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa, no grupo experimental, pode-se observar que houve uma tendência numérica maior, o fato do estudo ser inédito nos impossibilita comparações.

Na microscopia eletrônica de Varredura do presente estudo, foi encontrado um padrão de condicionamento Tipo II no grupo experimental, e no grupo controle um padrão de condicionamento misto, Tipo I e Tipo II, além disso, no grupo experimental foi encontrada superfície mais uniforme quando comparado com o grupo controle. O padrão de condicionamento não está relacionado somente com o ácido utilizado, tempo, forma de apresentação (gel ou solução), mas também com o próprio substrato que difere entre diferentes indivíduos e diferentes dentes (Mandarino, 2003).

Fava et al. (2010) compararam o ácido fosfórico em diversos tempos, e observou padrão de condicionamento Tipo I nos tempos de 7, 15 e 30 segundos e no tempo de 45 segundos o padrão de condicionamento tipo II. Assim, como Fava et al. (2010), no presente estudo também se observou uma mudança do padrão de condicionamento com a agitação do condicionamento ácido, porém no tempo de 20 segundos.

Portanto, pode-se concluir que a hipótese nula foi aceita, apesar de haver uma diferença no padrão de condicionamento, na microscopia eletrônica de varredura, não foi possível encontrar diferença estatística na análise do microcisalhamento. Assim, considerando as limitações de um estudo *in vitro* e com base nos resultados obtidos, não é necessário realizar agitação durante o condicionamento ácido.

6. Conclusão

CONCLUSÃO

Apesar das diferenças morfológicas observadas em MEV, a agitação do ácido fosfórico a 37% não promoveu aumento da resistência ao microcisalhamento.

Referências

REFERÊNCIAS

- Assed S. Odontopediatria Bases para prática clínica, Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Artes Médicas, São Paulo. 2005.
- Aswathi KK, Rani SP, Athimuthu A, Prasanna P, Patil P, Deepali KJ. Comparison of efficacy of caries removal using polymer bur and chemomechanical caries removal agent: A clinical and microbiological assessment - An in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2017 Jan- Mar;35(1):6-13.
- Barros de Campos PR, Maia RR, Rodrigues de Menezes L, Barbosa IF, Carneiro da Cunha A, da Silveira Pereira GD. Rubber dam isolation - key to success in diastema closure technique with direct composite resin. *Int J Esthet Dent*. 2015 Winter;10(4):564-74.
- Brannstrom M. Dentin and pulp in restorative dentistry. Castelnuovo, Wolfe Medical, 1982.
- Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res*. 1955 Dec;34(6):849-53
- Carrassi A, Garattini G, Strohmer L. Technic for acid etching in primary teeth. Effect of chemical conditioning using 37% H₃PO₄ on enamel surfaces. *Mundo odontostomatol*. 1985 Jan- Feb;27(1):33-40.
- Choi S, Cheong Y, Lee GJ, Park HK. Effect of fluoride pretreatment on primary and permanent tooth surfaces by acid-etching. *Scanning*. 2010 Nov-Dec;32(6):375-82.
- Dündar A, Şengün A, Başlak C, Kuş M. Effects of citric acid modified with fluoride, nano-hydroxyapatite and casein on eroded enamel. *Arch Oral Biol*. 2018 Jun 15;93:177-186. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.06.009.
- Fava M; Ramos CJ; Lacava LMA. Micromorfologia do esmalte de dentes decíduos condicionados pelo ácido maleico a 10% ou fosfórico a 35%. *Cienc Odontol Bras*, v.5, n.3, set./dez. 2002
- Gwinnett AJ: Human prismless enamel and its influence on sealant penetration. *Arch Oral Biol* 1973;18:441–444.
- Karaouzas L, Kim YE, Boynton JR Jr. Rubber dam isolation in pediatric patients: a review. *J Mich Dent Assoc*. 2012 Jan;94(1):34-7.
- Kugel G. Direct and indirect adhesive restorative materials: a review. *Am J Dent*. 2000 Nov;13(Spec No):35D-40D.
- Kanellis MJ, Warren JJ, Levy SM. Comparison of air abrasion versus acid etch sealant techniques: six-month retention. *Pediatr Dent*. 1997 May-Jun;19(4):258-61.
- Mandarino F. Adesivos odontológicos; 2003.
- Mesquita-Guimarães KS, Sabbatini IF, Almeida CG, Galo R, Nelson-Filho P, Borsatto MC. Bond Strength of a Bisphenol-A-Free Fissure Sealant With and Without Adhesive Layer under Conditions of Saliva Contamination. *Braz Dent J*. 2016 May-Jun;27(3):309-12.

- Nelson-Filho P, Leite Gde A, Fernandes PM, da Silva RA, Rueda JC. Efficacy of SmearClear and ethylenediaminetetraacetic acid for smear layer removal in primary teeth. *J Dent Child (Chic)*. 2009 Jan-Apr;76(1):74-7.
- Özcan M, Pekkan G. Effect of different adhesion strategies on bond strength of resin composite to composite-dentin complex. *Oper Dent*. 2013 Jan-Feb;38(1):63-72.
- Pereira CA. Avaliação comparativa pelos teste "micropush-out" e "micro-cisalhamento" da resistência adesiva de restaurações diretas de resina composta usando diferentes adesivos. Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, 2008.
- Pimenta RA, Penido CV, Cruz R de A, Alves JB. Morphology of the dentin on primary molars after the application of phosphoric acid under different conditions. *Braz Oral Res*. 2010 Jul- Sep;24(3):323-8.
- Pimenta-Dutra AC, Albuquerque RC, Morgan LS, Pereira GM, Nunes E, Horta MC, Silveira FF. Effect of bleaching agents on enamel surface of bovine teeth: A SEM study. *J Clin Exp Dent*. 2017 Jan 1;9(1):e46-e50.
- Pucci CR, de Oliveira RS, Caneppele TM, Torres CR, Borges AB, Tay FR. Effects of surface treatment, hydration and application method on the bond strength of a silorane adhesive and resin system to dentine. *J Dent*. 2013 Mar;41(3):278-86.
- Shakya VK, Singh RK, Pathak AK, Singh BP, Chandra A, Bharti R, Yadav RK. Analysis of micro- shear bond strength of self-etch adhesive systems with dentine: An in vitro study. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2015 Sep-Dec;5(3):185-8.
- Silverstone LM, Saxton CA, Dogon IL, Fejerskov O: Variation in the pattern of acid etching of human dental enamel examined by scanning electron microscopy. *Caries Res*. 1975; 9:373–387.
- Silva LAB. Tratado de Odontopediatria 2ª Ed. Amolca. Caracas, Venezuela. 2018.
- Zanet CG, Arana-Chavez VE, Fava M. Scanning electron microscopy evaluation of the effect of etching agents on human enamel surface. *J Clin Pediatr Dent*. 2006 Spring;30(3):247-50.