



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

MARIO RUY MAIA DE FREITAS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ALTERAÇÃO DE COR DE
DIFERENTES RESINAS COMPOSTAS POR CAFÉ E VINHO TINTO**

NATAL/RN

2015

MARIO RUY MAIA DE FREITAS

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ALTERAÇÃO DE COR DE
DIFERENTES RESINAS COMPOSTAS POR CAFÉ E VINHO TINTO

Trabalho de Conclusão do Curso de
Odontologia apresentado ao Departamento
de Odontologia da Universidade Federal do
Rio Grande do Norte.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Dorini.

NATAL/RN

2015

MARIO RUY MAIA DE FREITAS

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ALTERAÇÃO DE COR DE DIFERENTES RESINAS
COMPOSTAS POR CAFÉ E VINHO TINTO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de
graduação de Odontologia UFRN como parte integrante dos
requisitos para obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

Aprovado em: __/__/__.

Prof. Dr. André Luís Dorini
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Orientador

Prof. Dra. Marília Regalado Galvão Rabelo Caldas
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Membro

Prof. Dra. Giovanna de Fátima Alves da Costa
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Membro

DEDICATÓRIA

Inicialmente, dedico a esse trabalho a Deus, que mesmo sem que eu o pudesse ver, tocar ou até mesmo ouvir, esteve e está ao meu lado, me protegendo de tudo quanto for ruim e me guiando sempre para o que é bom. Encheu-me de forças, coragem e determinação quando eu pensei em desistir muitas vezes, quando achei que não conseguiria chegar onde estou.

À minha mãe Maria Alvanir, minha base, meu alicerce, minha dose diária de amor e positividade, dedico essa vitória. Esse sonho, que começamos a sonhar juntos desde 2009, agora finalmente está se concretizando.

À minha irmã Mariana Maia, a qual tenho sentimento de filha, dedico essa conquista como forma de retribuir todo o amor que me dá diariamente, sem cessar, desde que entrou na minha vida desde 2005. Sua alegria, seu jeito meigo e simples de ser, me fortaleceu todas as vezes em que pensei que não chegaria a esse momento.

Aos meus irmãos Benicio Maia e Marcos Antonio, os meus mais sinceros e puros agradecimentos, por terem suportado minhas alterações de humor, quando algo não acontecia como eu queria, por terem me ajudado nos momentos de apertado, por me consolarem nos momentos tristes e por compartilharem alegria nos momentos felizes.

E, por mim, mas não menos importante, aos meus avós maternos, Benicio Maia e Aurinice Leão (*in memoriam*), dedico a vocês dois, meus maiores exemplos de força, determinação, honestidade e humildade, essa grande conquista. Obrigado por todos os valores que me foram passados e tenho certeza que cada dia compartilhado ao lado de vocês, uma nova lição era aprendida. E as minhas tias e tios, primas e primos, em especial a minha “menzinha” Camila Tavares e a Maricélia, essa vitória é nossa. Sem o incentivo de vocês talvez não tivesse conseguido chegar tão longe.

AGRADECIMENTOS

Começo meus agradecimentos, agradecendo ao querido professor e amigo Dr. André Luís Dorini, que, sem hesitar, aceitou o convite para ser meu orientador nesse trabalho. Que, com maestria, durante o decorrer de todo o estudo, foi mais do que um professor, foi um conselheiro particular, escutou muitas vezes meus desabafos, minhas angustias e sempre chegava com a palavra certa na hora certa. Sabia o momento certo de dizer “calma Mario, vai dar tudo certo”. Não tenho palavras para agradecer tamanha dedicação, assistência e atenção.

A chefia do departamento de Odontologia, da Universidade Federal do Rio grande do Norte, por ter cedido os espaços físicos para que eu pudesse desenvolver a pesquisa. Aos funcionários, Cristina, Manoel, por sempre abrirem a clínica e por me confiarem a responsabilidade de lá ficar o tempo que eu precisasse. A fofa da Andréia, por sempre me receber no DOD com um sorriso no rosto e um abraço fraterno de bom dia. E a todos os funcionários desse departamento que durante dois anos e meio tornou-se minha segunda casa, meus sinceros agradecimentos.

As professoras Marília Regalado e Isana Álvares, por terem aceitado fazer parte da minha banca.

Aos colegas de faculdade Anna Brenna e Alex, por terem me ajudado na parte crucial do trabalho, que foi o começo, meu muito obrigado.

A minha dupla Gabriella Pinheiro, não tenho palavras para descrever a importância que ela exerceu sobre a minha trajetória nessa universidade. Uma amizade que se formou no cursinho pré-vestibular e que pelas coincidências do destino, fomos dupla, e que dupla. Bastava um olhar, e um já sabia o que o outro estava pensando, querendo, achando e sentindo. Sempre estava ali, para me amparar, me ajudar, compartilhar comigo dos meus momentos bons e ruins, celebrar minhas vitórias e me reerguer nas derrotas. E que, tem parcela significativa nessa conquista do trabalho de conclusão de curso. Á você minha

dupla, meu mais sincero agradecimento, por tudo que passamos juntos. Você sempre vai ser minha “bb”.

A outra dupla querida Maria Luíza e Luana Laís, meu muito obrigado por sempre estar comigo, por compartilhar as melhores risadas que uma possa dar durante uma faculdade. Por não deixar desanimar quando a rotina estava desanimadora, por não deixar a lágrima cair quando o olho estava cheio dela. Agradeço simplesmente o fato de vocês existirem. O dia a dia com vocês na sala de aula e posteriormente na clínica era bem mais divertido.

A minha amiga querida Larissa Moreira, a qual eu tenho a honra de tê-la ao meu lado desde 2009. Essa pessoa tão pura e singela, que por algum motivo Deus a colocou na minha vida e que eu serei grato para sempre. Obrigado minha Lari, por ter me entendido nas minhas crises, por ter me aconselhado nas minhas indecisões, por ter me ajudado nos momentos difíceis, e por ser essa amiga maravilhosa que Odontologia me presenteou.

As integrantes do grupo “Nazi”, em especial Lorena de Souza, Camila Ataíde e Ingrid Azevedo, meu muito obrigado pelos incentivos, elogios, gozações, apoios, pelos risos compartilhados e pela amizade de vocês. E, de modo geral, à turma 97, por ter me acolhido tão bem, quando caí de paraquedas nessa sala tão maravilhosa.

E aos meus amigos de fora da faculdade, Euzary, Meryelle, Valeska Idalino, Isabel, Naiara, Breno, Alana, Thaise, Brunna, Edmilson, Vivianne Torres, Juliana, Carlos, Ana karla, Mariana Matos, Danielle Alves, Lorena Miranda, Marcelo Camargo, André Henrique, Aryanne Freire, Viviane Viana (*madrinha*), Mikelly e Paloma, agradeço a vocês a compreensão de terem me entendido quando eu não podia estar reunido com vocês, para celebrar a alegria que vocês significam. Agradeço as palavras de incentivo, as mensagens de apoio e de forças, que me foram de bastante valia. Vocês são os melhores amigos que alguém pode ter.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3	RESULTADOS.....	14
4	DISCUSSÃO.....	17
5	CONCLUSÕES.....	20
	REFERÊNCIAS.....	21

DENTÍSTICA RESTAURADORA – ESTUDO DE MATERIAIS

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ALTERAÇÃO DE COR DE DIFERENTES RESINAS COMPOSTAS POR CAFÉ E VINHO TINTO

* ANDRÉ LUÍS DORINI; +55 84 9839-5555 ANDREDORINI@YAHOO.COM,
PROFESSOR DOUTOR ADJUNTO DO DEPARTAMENTO DE
ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE, NATAL, RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.

* MARIO RUY MAIA DE FREITAS; +55 84 9919-9703;
MARIOO_MAIA@HOTMAIL.COM; GRADUANDO EM ODONTOLOGIA,
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE, DEPARTAMENTO
DE ODONTOLOGIA, NATAL, RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.

RESUMO

As resinas compostas apresentaram melhorias notáveis nos últimos anos, entretanto a alteração de cor ainda é um problema constante na utilização desses materiais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a alteração de cor de quatro marcas comerciais de resina composta Filtek™Z350XT, Filtek™Z250 e Filtek™Z100 (3M, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) e Opallis (FGM, Joinville, Santa Catarina, Brasil), quando submetidas ao manchamento por vinho tinto e café. **Materiais e métodos:** 240 corpos de prova cilíndricos foram confeccionados e submetidos ao manchamento por 1, 3 ou 7 dias. Em cada intervalo de tempo, eles foram avaliados com o aparelho EasyShade®, nos parâmetros L, a, b, e o ΔE , correspondente a alteração global de cor, foi calculado. **Resultados:** Utilizando o teste de Tuckey ($p \leq 0,05$), o vinho tinto alterou mais a cor dos espécimes, exceto para Filtek™Z250. Com o vinho tinto, a maior alteração de cor foi obtida por Filtek™Z350XT ($p \leq 0,05$). Com o café, por Opallis e Filtek™Z350 para Teste T ($p \leq 0,05$). As resinas Filtek™Z100 e Filtek™Z250 apresentaram os melhores resultados, independente do corante. Exceto para Filtek™Z250, os espécimes alteram mais a cor quando imersos por 7 dias na solução corante, em comparação com 1 ou 3 dias. **Conclusão:** As resinas alteram sua cor quando expostas a agentes comumente ingeridos na rotina diária. Conhecer essa interação entre agentes corantes e o material resinoso utilizado é importante para aumentar a longevidade estética das restaurações realizadas.

Palavras – chaves: Resinas compostas, pigmentação, espectrofotometria.

ABSTRACT

The composites showed remarkable improvements in recent years, however, the color change is also a constant problem in the use of these materials. The objective of this study was to evaluate the change of color of four commercial brands of composite resin Filtek™ Z350XT, Filtek™ Z250 and Filtek™ Z100 (3M, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) and Opallis (FGM, Joinville, Santa Catarina, Brazil) when subjected to staining by red wine and coffee. **Materials and methods:** 240 cylindrical specimens were prepared and subjected to staining by 1, 3 or 7 days. In each time interval, they were evaluated with the Easyshade® apparatus in parameters L, a, b, and ΔE corresponding global color change was calculated. **Results:** Using the Tuckey test ($p \leq 0.05$), red wine changed over the color of the specimens, except for Filtek™ Z250. With red wine, most color change was obtained by Filtek™ Z350XT ($p \leq 0.05$). With coffee, for Opallis and Filtek™ Z350 to t test ($p \leq 0.05$). The Filtek™ Z100 and Z250 Filtek™ resins showed the best results regardless of the dye. Except for Filtek™ Z250, specimens longer change color when immersed for 7 days in a dye solution, compared to 1 to 3 days. **Conclusion:** The resins alter its color when exposed to agents commonly ingested in the daily routine. Knowing this interaction between coloring agents and the resinous material used is important to increase the aesthetic longevity of restorations.

Key words: Resins composed, Pigmentation, Spectrophotometry

INTRODUÇÃO

Com a introdução das resinas compostas na Odontologia, por Bowen, esse material tem sido amplamente utilizado, principalmente em função da sua capacidade estética restauradora¹. As resinas compostas dentais testemunharam melhorias notáveis nos últimos anos, especialmente devido à redução no tamanho das suas partículas, o que aumentou sua capacidade de polimento e a resistência ao desgaste².

Uma propriedade importante dos materiais restauradores estéticos é a sua estabilidade a longo prazo no ambiente bucal. Apesar dos grandes avanços que foram alcançados nos últimos anos, estabilidade de cor ainda é um problema³. A estabilidade da cor foi definida como a capacidade de um material manter a sua cor ao longo de um período de tempo em um determinado ambiente⁴.

A alteração de cor dos dentes restaurados com resina composta pode ser uma razão para a substituição de restaurações dentárias em áreas estéticas⁵.

A alteração de cor de materiais restauradores a base de resina, pode ser causada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos envolvem a descoloração do próprio material, alterações na matriz orgânica e na interface da matriz. Os fatores extrínsecos incluem coloração por adsorção ou absorção de corantes, tal como um resultado de contaminação a partir de fontes exógenas⁶. O grau de alteração a partir de fontes exógenas varia de acordo com a higiene oral, dieta e hábitos etilistas e tabagistas dos pacientes⁷.

Bebidas e alimentos, podem afetar a estética, bem como as propriedades físicas (dureza, rugosidade superficial) das resinas compostas, comprometendo a qualidade e a longevidade das restaurações^{8, 6}. O potencial de manchamento destas bebidas pode variar de acordo com a sua composição, propriedades e frequência de uso⁹.

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o efeito do contato de dois alimentos corantes, vinho tinto e café, sobre a alteração de cor de 4 marcas comerciais de resina composta. As hipóteses nulas desse estudo foram que, o tempo de contato, o tipo de solução corante e o tipo de resina composta, não estão relacionados com a susceptibilidade destes materiais ao manchamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo avaliou o grau de manchamento de quatro diferentes resinas compostas: Filtek™Z100 (microhíbrida), Filtek™Z250 (microhíbrida), Filtek™Z350XT (nanopartículas) (3M, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) e Opallis (nanohíbrida) (FGM, Joinville, Santa Catarina, Brasil), todas de cor A3 quando imersas em duas soluções corantes, vinho tinto e café preto puro, em intervalos de tempo de 1, 3 e 7 dias.

Utilizando uma matriz plástica e cilíndrica, com 5 mm de largura e 2mm de espessura, foram confeccionados 60 corpos de prova de cada marca comercial de resina, totalizando 240 corpos de prova.

As matrizes plásticas foram colocadas sobre uma placa de vidro, em contato com uma matriz de poliéster e preenchidas pela técnica do incremento único, com o auxílio de uma espátula de resina (Suprafill - SS Whithe). Os corpos de prova foram então polimerizados por 20 segundos em cada um dos lados da matriz, com o auxílio de um led fotopolimerizador (Optilight LD MAX, Gnatus), previamente calibrado para uma potência mínima de 400 mW / cm². A distancia entre a fonte de luz e a matriz foi padronizada, utilizando-se de uma lamínula de vidro com 1 mm de espessura. Após a confecção, esses foram armazenados em um recipiente fechado, escuro, para evitar fotopolimerizações secundárias, contendo água destilada, em temperatura ambiente, pelo período de 24 horas.

Os corpos de prova foram removidos do recipiente e secados com papel absorvente e foi realizada a leitura inicial com o aparelho EasyShade® (Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen, Alemanha).

Inicialmente, o aparelho foi calibrado na mesa calibradora do próprio equipamento. Em seguida, os corpos de prova receberam a leitura inicial, tendo a ponta do EasyShade® sido colocada no centro do corpo de prova.

Os valores obtidos nesse estudo *in vitro* foram conseguidos através de um espectrofotômetro digital (Vita EasyShade®, Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen, Alemanha). Esse aparelho pode ser calibrado para quantificar a cor do dente com base no padrão de cor CIEL *a * b *, proposto pela Comissão Internacional de Iluminação (Comission Internationale l'Eclairage – CIE) em 1976.

De posse desses dados pode se calcular a diferença de cor (ΔE) entre dois objetos e relacioná-la com a perceptibilidade e aceitabilidade visual.

O parâmetro L refere-se à luminosidade/clareza (branco puro ao preto puro). O parâmetro A refere-se à variação de vermelho/verde (quando positivo: verde, quando negativo: magenta). O parâmetro B refere-se à variação de amarelo/azul (quando positivo: amarelo, quando negativo: azul).

Para cada corpo de prova, foram anotados os valores dos parâmetros L^* a^* b^* , fornecidos pelo aparelho.

A seguir, os corpos de prova de cada marca comercial foram divididos em seis grupos (10 corpos de prova, cada), de acordo com o corante utilizado (vinho tinto ou café) e referente ao tempo de contato com a solução corante (24h, 72h e 168h).

Nos grupos do café (Café Pilão – Master Blenders), o preparo da solução foi feito seguindo a proporção recomendada pelo fabricante (80g de pó – para 1l de água). Nos grupos do vinho tinto (Marcus James Cabernet Sauvignon – Vinícula Aurora), foi usado sem diluição.

Cada corpo de prova foi colocado em um recipiente (Eppenforf - Nanchang Ganda Medical Devices Co., Ltd.) contendo 1 ml da solução corante, e permaneceu imerso nela durante o tempo previsto (24h, 72h ou 168h), de acordo com a divisão dos grupos. As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente.

Os corpos de prova foram removidos do corante, lavados em água corrente, secados com papel absorvente e novamente lidos com o EasyShade®, tendo os valores L^* , a^* b^* aferidos.

Nos grupos que permaneceram mais de 24 horas, as soluções foram renovadas diariamente, sendo os espécimes lavados, secados com papel absorvente e depois imersos novamente na solução corante.

Através dos valores L^* , a^* , b^* aferidos, foram calculados os valores de ΔL , Δa e Δb , correspondentes à diferença nos valores obtidos entre a primeira e segunda leitura, em cada um dos parâmetros avaliados.

Através destes valores de ΔL , Δa e Δb , calculou-se o ΔE , correspondente a alteração de cor total ocorrida entre dois determinados momentos de avaliação.

O ΔE foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\Delta E = [(L_1 - L_2)^2 + (a_1 - a_2)^2 + (b_1 - b_2)^2]^{1/2}$$

RESULTADOS

Os resultados obtidos através da leitura final após as imersões nas soluções corantes foram tabulados, e submetidos a testes estáticos, Análise de Variância (ANOVA), teste de Tukey e Teste T, todos com $p \leq 0,05$.

Os resultados de alteração de cor estão expressos nas tabelas a seguir:

A tabela 1 mostra a Análise de Variância em relação às médias de alteração de cor das resinas quando imersas em vinho tinto ou café, quando independente do tempo de imersão e quando relacionadas ao tempo de imersão.

Tabela 1- (ANOVA) para as médias dos valores de ΔE das resinas compostas imersas em vinho tinto e café, independente do tempo de imersão e relacionadas ao tempo de imersão:

	VINHO			CAFÉ		
Independente do tempo	Soma dos quadrados	F	Sig.	Soma dos quadrados	F	Sig.
Entre os grupos	3147.492	4.238	.006	6335.213	7.049	.000
Dentro dos grupos	58427.795			70703.266		
Total	61575.287			77038.479		
Relacionadas ao tempo	VINHO			CAFÉ		
	Soma dos quadrados	F	Sig.	Soma dos quadrados	F	Sig.
Entre os grupos	21581.858	25.255	.000	22012.933	18.722	.000
Dentro dos grupos	39993.429			55025.546		
Total	61575.287			77038.479		

A Análise de Variância mostra que houve diferenças significativas, tanto relacionadas tanto ao tipo de resina quanto ao tempo de imersão em corante.

Em seguida, foi aplicado o pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$), para determinar onde se encontravam tais diferenças (tabelas 2 e 3)

Tabela 2- Diferenças nos valores das médias de ΔE entre as resinas compostas quando imersas em vinho tinto ou café, independente do tempo.

VINHO				
RESINAS/	Z100	Z 250	OPALLIS	Z350
Média (d.p.)	21,72 ($\pm 12,13$)	21,47 ($\pm 10,74$)	22,23 ($\pm 21,59$)	30,15 ($\pm 16,18$)
Z 100	a	a	a	b
Z 250	a	a	a	b
OPALLIS	a	a	a	b
Z 350	b	b	b	a
CAFÉ				
RESINAS/	Z 250	Z100	Z350	OPALLIS
Média (d.p.)	15,34($\pm 10,46$)	16,59($\pm 8,90$)	20,89($\pm 12,24$)	28,48($\pm 29,42$)
Z 250	a	a	a	b
Z 100	a	a	a	b
Z 350	a	a	a	a
OPALLIS	b	b	a	a

Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) Letras diferentes nas linhas indicam diferenças estatísticas significativas.

Quando avaliado o efeito da imersão nos corantes, independente do tempo de imersão, para o vinho tinto, Filtek™Z350XT apresentou a maior alteração de cor em comparação a Filtek™Z100, Filtek™Z250 e Opallis, e, para o café, Opallis e Filtek™Z350XT apresentaram a maior alteração de cor em relação à Filtek™Z100, Filtek™Z250.

Tabela 3 - Diferenças nos valores das médias de ΔE entre as resinas compostas quando imersas em vinho tinto ou café, relacionadas ao tempo de imersão.

VINHO				CAFÉ			
TEMPO/ MÉDIA (d.p.)	A	B	C	TEMPO/ MÉDIA (d.p.)	A	B	C
A - 26,34($\pm 15,1$)	a	a	b	A - 21,87($\pm 17,33$)	a	a	b
B - 29,48($\pm 17,2$)	a	a	b	B - 26,17($\pm 17,33$)	a	a	b
C - 39,89($\pm 16,6$)	b	b	a	C - 37,55($\pm 20,56$)	b	b	a

Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) Letras diferentes nas linhas indicam diferenças estatísticas significativas. A (0-24h); B (0-72h); C (0-168h).

Quando avaliado o efeito da imersão nos corantes, relacionada ao tempo de imersão, quando imersas em vinho tinto ou café, não houve diferenças entre os valores de manchamento após 1 ou 3 dias de imersão, porém, após 7 dias, as resinas alteraram de cor significativamente mais.

A tabela 04 mostra a Análise de Variância (ANOVA) para as resinas avaliadas isoladamente, relacionadas ao tempo de imersão e independente do tipo do corante utilizado.

Tabela 4 - (ANOVA) para as médias dos valores de ΔE das resinas Filtek® Z100, Filtek® Z250, Filtek® Z350 e Opallis, relacionadas ao tempo de imersão e independente do corante utilizado:

	Z100			Z250		
	Soma dos quadrados	F	Sig.	Soma dos quadrados	F	Sig.
Entre os grupos	5495.958	14.596	.000	3449.888	7.341	
Dentro dos grupos	8584.947			10714.091		.000
Total	14080.906			14163.979		
	Z350			Opallis		
	Soma dos quadrados	F	Sig.	Soma dos quadrados	F	Sig.
Entre os grupos	14453.368	26.197	.000	29473.412	13.369	.000
Dentro dos grupos	12579.127			50266.171		
Total	27032.495			79739.583		

As Análises de Variância mostraram que houve diferenças significativas em relação ao tempo de imersão para as resinas testadas.

Em seguida, foi aplicado o pós-teste de Tuckey ($p \leq 0,05$).

Tabela 05 - Diferenças nos valores das médias de ΔE das resinas Filtek® Z100, Filtek® Z250, Filtek® Z350 e Opallis, relacionadas ao tempo de imersão e independente do corante.

TEMPO	RESINAS			
	Z100 Média (d.p.)	Z 250 Média (d.p.)	Z350 Média (d.p.)	Opallis Média (d.p.)
A	a 19,55($\pm 5,33$)	a 8,15($\pm 5,59$)	a 26,97($\pm 8,50$)	a 31,75($\pm 29,11$)
B	a 20,18($\pm 8,95$)	a 21,61($\pm 11,82$)	a 33,93($\pm 10,37$)	a 35,57($\pm 27,90$)
C	b 32,47($\pm 11,5$)	a 26,96($\pm 10,89$)	b 43,65($\pm 14,77$)	b 51,80($\pm 24,12$)

Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas significativas. A (0-24h); B (0-72h); C (0-168h).

Para Filtek™ Z100 e Filtek™ Z350XT, entre 1 e 3 dias de imersão, não houve diferenças entre os valores de alteração de cor, porém, após 7 dias, elas alteraram de cor significativamente mais.

Para Filtek™ Z250, não houve diferenças na alteração de cor após 1, 3 ou 7 dias de imersão no corante.

Para Opallis houve diferenças significativas de alteração de cor apenas entre 1 e 7 dias de imersão no corante.

A tabela 06 mostra os resultados do teste T ($p \leq 0,05$), realizado para verificar se houve diferenças entre a alteração de cor causada pelo vinho tinto ou pelo café em cada uma das resinas, independente do tempo de imersão.

Tabela 06 – Teste T para as resinas Filtek™Z100, Filtek™Z250, Filtek™Z350XT e Opallis comparando os valores de ΔE entre o vinho tinto e o café, independente do tempo de imersão.

Corante	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão Média	Significância
Z100				
Vinho	21,7235	12,12859	1,56579	<u>0,007</u>
Café	16,4284	8,79204	1,13505	
Z250				
Vinho	21,4678	10,73887	1,38638	<u>0,002</u>
Café	15,4303	10,30579	1,33047	
Z350				
Vinho	30,1454	16,18304	2,08922	<u>0,000</u>
Café	20,5206	12,21406	1,57683	
Opallis				
Vinho	22,2265	21,58668	2,78683	<u>0,187</u>
Café	28,4770	29,4223	3,79839	

Teste T ($p \leq 0,05$)

Para Filtek™Z100, Filtek™Z250 e Filtek™Z350XT, houve alteração de cor significativamente maior quando expostas ao vinho tinto em comparação ao café.

Para Opallis, não houve diferenças na alteração de cor quando exposta ao vinho tinto ou ao café.

DISCUSSÃO

As hipóteses nulas testadas foram parcialmente aceitas, visto que, tanto o tempo, como o tipo de resina e as soluções corantes, influenciaram no manchamento dos corpos de prova.

A alteração de cor pode ser avaliada visualmente ou por técnicas e instrumentais específicos¹². Os valores obtidos nesse estudo *in vitro* foram conseguidos através de um espectrofotômetro digital (Vita EasyShade®, Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen, Alemanha). Esse aparelho pode ser calibrado para quantificar a cor do dente com base no padrão de cor CIEL *a * b *, proposto pela Comissão Internacional de Iluminação (Comission Internationale l'Eclairage – CIE) em 1976.

Como é um parâmetro de análise objetiva, favorece a comparação entre grupos, minimizando erros de análise por influência humana, razão pela qual foi escolhido para ser utilizado no presente estudo.

Tem sido relatado que valores de ΔE^* que variam entre 1 e 3 são perceptíveis ao olho nu¹⁰. ΔE^* com valores maiores de 3,3 são clinicamente inaceitáveis¹¹.

O presente estudo avaliou o efeito de duas soluções corantes frequentemente relacionadas à pigmentação de resinas compostas.

A frequência de ingestão de café, especialmente no Brasil, torna o conhecimento de sua interação com os materiais resinosos de extrema valia.

Sugere-se que este corante pode manchar seja por absorção, seja por adsorção dos seus corantes pela matriz orgânica das resinas compostas¹².

Em um estudo utilizando café e realizado com dentes bovinos, constatou-se um grau de pigmentação, porém sem nunca atingir valores de ΔE superiores a 3,3 em nenhum dos tempos analisados, não tendo assim, segundo os autores, relevância clínica. Entretanto, foi avaliado dentes bovinos e não material resinoso¹³.

No presente estudo, realizado com compósitos resinosos, o café causou ΔE superiores a 3,3 em todos os tempos de imersão, possuindo, portanto, importante relevância clínica. No caso específico da resina Opallis, causou até valores maiores de ΔE quando comparado ao vinho tinto, embora não estatisticamente significativos.

De maneira geral, os corpos de prova que foram submetidos ao manchamento com vinho tinto, alteraram de cor significativamente mais do que os que foram imersos em café, exceto para a resina Opallis.

Essa tendência do vinho para manchar os espécimes com maior intensidade pode estar relacionada à presença de álcool em sua composição¹⁴. Estudos demonstraram que os corantes em soluções aquosas causaram menor alteração de cor do que em solução alcoólica ou ácida. Isso acontece devido ao amolecimento da matriz de resina provocado pelo álcool e pelo ácido, fazendo com que a estrutura da matriz de resina torne-se mais "aberta", facilitando o "manchamento"¹⁵.

Além da ajuda do álcool como veículo de penetração, o corante do vinho (enocianina), deve provavelmente apresentar maior afinidade à matriz orgânica

das resinas testadas do que o corante presente no café (melanoidina), contribuindo para que o vinho seja absorvido pelos compósitos com maior facilidade¹⁵. Tal resultado está de acordo com outro estudo, no qual o vinho tinto causou mais alteração de cor do que o café¹⁶.

Quando avaliadas as resinas, isoladamente, com o vinho tinto, Z 350 e Opallis, apresentaram alteração de cor significativamente maior do que Z100 e Z250, que não diferiram entre si.

As resinas Z100 e Z250 são microhíbridas e as resinas Z350 e Opallis nanoparticulada e nanohíbrida, respectivamente.

Talvez, a maior área de contato matriz/partícula nos materiais com componente nanométrico possa explicar essa diferença, tendo influenciado negativamente, permitindo maior espaço para a penetração do corante.

Estudos relataram que os compósitos nanoparticulados podem apresentar maior degradação no ambiente oral do que os híbridos¹⁷. Isso acontece como resultado da adsorção de água, que conduz o monômero a eluição¹⁸. O fenômeno de adsorção em resinas compostas depende principalmente da hidrofiliabilidade de suas matrizes poliméricas¹⁹. Além disso, devido a maior área de superfície das resinas nanoparticuladas permite que mais água se acumule nas interfaces da matriz polimérica, aumentando assim a absorção de água²⁰.

A diferença entre Filtek™Z100 e Filtek™Z250, ambas microhíbridas, pode estar relacionada ao tipo da matriz resinosa.

A resina Filtek™Z100 tem em sua matriz resinosa o bis-GMA (Bisfenol A - diglicidil éter dimetacrilato) e o TEGDMA (trietileno glicol dimetacrilato). A alta concentração de um componente de baixo peso molecular como o TEGDMA resulta em um sistema orgânico que oferece as vantagens tais como a diminuição da viscosidade da resina permitindo maior incorporação de carga do que somente o sistema bis-GMA. Entretanto, a presença do TEGDMA também produz desvantagens, como, por exemplo, o fato do mesmo ser relativamente hidrofílico. Já a matriz resinosa da Filtek™Z250 é constituída por 3 componentes principais. Grande parte do monômero TEGDMA foi substituído por uma mistura de UDMA (uretano dimetacrilato) e bis-EMA (6) (Bisfenol A - polietileno glicol dieter dimetacrilato). Diminuindo assim o seu grau de

hidrofilicidade, o que pode ter colaborado para seu melhor desempenho em relação a Filtek™ Z100.

Quando avaliado o tempo de imersão na solução corante, conforme a lógica nos faria pensar, de maneira geral, os espécimes que permaneceram 7 dias em contato com o agente corante, alteraram mais sua cor em comparação àqueles imersos por 1 ou 3 dias, exceto para a resina Z250, que apresentou comportamento semelhante entre os diferentes períodos analisados.

Em um estudo utilizando bebidas esportivas ácidas, o período de análise com imersões de sete dias foi utilizado por ser suficiente para avaliar as alterações de cor nas resinas²¹.

Em outro estudo, com 7 dias de imersão, os materiais resinosos apresentaram alterações de cor perceptíveis ao olho nu²².

Em um experimento realizado com a resina Z350, com uma semana de imersão em vinho tinto, os valores de ΔE foram superiores a 3,3, tornando-se clinicamente inaceitáveis²³.

Por estas razões, na hora de se fazer uma restauração, o hábito dos pacientes em relação à frequência de consumo de soluções corantes como o café e o vinho tinto deve ser levado em conta, para a correta escolha dos materiais restauradores a base de resina composta e para a correta instrução do paciente quanto aos cuidados a serem tomados.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, as hipóteses testadas foram parcialmente aceitas.

Com relação ao tipo de corante:

Houve diferenças entre os materiais. O vinho tinto alterou mais a cor dos espécimes, exceto para uma das resinas testadas, Opallis.

Com relação ao tipo de resina:

Houve diferenças entre os materiais. Com o vinho tinto, a maior alteração de cor foi obtida por Z350. Com o café, por Opallis. Os melhores resultados foram obtidos por Z100 e Z250, independente do corante.

Com relação ao tempo:

Houve diferenças entre os tempos. Exceto para Z250, os espécimes alteram mais a cor quando imersos por 7 dias na solução corante, em comparação com 1 ou 3 dias.

REFERÊNCIAS

1. Bowen RL. Effect of particle shape and size distribution in a reinforced polymer. *J Am Dent Assoc.* 1964; 69:481-495.
2. Andrade ICGB, Basting RT, Rodrigues JA, Amaral FLB, Turssi CP, França FMG. Microhardness and color monitoring of nanofilled resin composite after bleaching and staining. *Eur J Dent.* 2014;8(2):160-165.
3. Poggio C, Beltrami R, Scribante A, Colombo M, Chiesa M. Surface discoloration of composite resins: effects of staining and bleaching. *Dent Res J.* 2012; 9(5):567-573.
4. Yu H, Pan X, Lin Y, Li Q, Hussain M, Wang Y. Effects of carbamide peroxide on the staining susceptibility of tooth-colored restorative materials. *Oper Dent.* 2009;34(1):72-82.
5. Wilson NH, Burke FJ, Mjor IA. Reasons for placement and replacement of restorations of direct restorative materials by a selected group of practitioners in the United Kingdom. *Eur J Dent.* 2009;3(1):245-248.
6. Topcu FT, Sahinkesen G, Yamanel K, Erdemir U, Oktay AE, Ersahan S. Influence of different kinds of drinks in the color stability of dental composite resins, *Eur J Dent.* 2009;3(1):50-56.
7. Satou N, Khan AM, Matsumae I, Satou J, Shintani H. In vitro color change of composite-based resins. *Dent Mater J.* 1989;5(6):384-387.
8. Awilya WY, AL-Alwani DJ, Gashmer ES, Al-Mandil HB. The Effect of commonly used types of coffee on surface microhardness and color stability of resin-based composite restorations. *Saudi Dent J.* 2010;22(4):177-181.
9. Al Kheraif AA, Qasim SSB, Ramakrishnaiah R, Rehman I. Effect of different beverages on the color stability and degree of conversion of nano and microhybrid composites. *Dent Mater J.* 2013;32(2):326-331.
10. Noie F, O'Keefe KL, Powers JM. Color stability of resin cements after accelerated aging. *Int. J. Prosthodont.* 1995; 8: 51-55.

11. Ruyter IE, Nilner K, Mooler B, Color stability of dental composite resin materials for crown and bridge veneers. *Dent Mater.* 1987; 3(5): 246-251
12. Van Groeningen G, Jongebloed W, Arendes J. Composite degradation in vivo. *Dent Mater.* 1986; 2(5):225-227.
13. Pirollo R, Mondelli RF, Correr GM, Gonzaga CC, Furuse AY. Effect of coffee and a cola-based soft drink on the color stability of bleached bovine incisors considering the time elapsed after bleaching. *J Appl Oral Sci.* 2014; 22(6):534-540.
14. Asmussen E, Hansen EK. Surface discoloration of restorative resins in relation to surface softening and oral hygiene. *Scand J Dent Res.* 1986;94(2): 174-177.
15. Dorini AL. Avaliação da pigmentação superficial por café e vinho em compósitos odontológicos, Avaliação da pigmentação superficial por café e vinho em compósitos odontológicos, Unicamp: Piracicaba, SP; 2001.
16. Karadas M, Sete N. The effect of different drinks on tooth color after home bleaching. *Eur J Dent.* 2014;8(2):249-253.
17. Silva EM, Almeida GS, Poskus LT, Guimarães JGA. The relationship between the degree of conversion, salivary sorption and solubility of a hybrid resin and a composite nanoparticle: influence of photoactivation mode. *J Appl Oral Sci.* 2008;16(2):161-166.
18. Sideridou I, Tserki V, Papanatasiou G. Studies of water absorption, the solubility and elasticity modulus of the photopolymerizable resin-based dental dimethacrylate. *Biomaterials.* 2003;24(4):655-665.
19. Antonucci JM, Skrtic D. Co-bifunctional monomeric effect on the mechanical strength and the sorption amorphous calcium phosphate composite with water silanized vitro fiber based Bis-GMA. *Biomaterials.* 2011;2(4):2881-2888.
20. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects of dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006; 22(3):211-222.
21. Turkun LS, Turkun M. The effect of one-step polishing system on the surface roughness of three esthetic resin composite materials. *Oper Dent.* 2004;29(2):203-211.
22. Villalta P, Lu H, Okte Z, Garcia-Godoy F, Powers JM. Effects of staining and bleaching on color change of dental composite resins. *J Prosthet Dent.* 2006; 95(2):137-142.

23. Leite MLAS, Silva FDSCM, Meireles SS, Duarte RM, Andrade AKM. The effect of drinks on color stability and surface roughness of nanocomposite. *Eur J Dent.* 2014;8(3):330-336.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. Our mission 1.1. Brazilian Oral Research (BOR) is a quarterly publication whose aim is to disseminate and promote an exchange of information on the various areas related to dental research. 2. Requirements for acceptable manuscripts 2.1. Only manuscripts of basic or applied research are acceptable. 2.2. Clinical trials must be registered in one of the CLINICAL TRIAL REGISTRIES validated by the criteria set by the World Health Organization (WHO) and by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). A registry entry number must be provided at the end of the abstract. 2.3. Studies involving animals, human beings and/or the environment should be approved by an Ethical Research Committee. To this end, the manuscript must be accompanied by an approval certificate of the Ethical Research Committee of the institution where the research was conducted. 2.4. Literature review manuscripts will occasionally be accepted at the discretion and invitation of the Editorial Board. 3. Language 3.1. All material must be submitted in English. 4. Responsibility for the content 4.1. Concepts and information found in the original manuscripts and published in the BOR are the responsibility of the author(s) and do not necessarily reflect the opinion of the Editorial Board or of the SBPqO (Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, Brazilian Division of the IADR – International Association of Dental Research). 5. Originality and copyrights 5.1. Manuscripts must be original and submitted exclusively to the BOR. 5.2. Submission of a manuscript to the BOR entails the complete and irrevocable transfer of copyright ownership. 5.3. Manuscripts must be accompanied by a “Copyright Transfer and Author Responsibility Letter,” signed by all authors, and it should read as follows: I (we), [name of author(s)], author(s) of the manuscript [title of the manuscript], submitted to the Brazilian Oral Research for publication, state, by means of this document, that copyright

ownership regarding the abovementioned manuscript is transferred to the Brazilian Oral Research as of the submission date. Any form of reproduction, whether total or partial, in any other vehicle of communication can be made only after permission is granted by the Brazilian Oral Research. If the manuscript is not accepted, the transfer of copyright ownership will automatically be void after definitive return of the manuscript and after the authors are notified. I (we) also declare that the abovementioned manuscript has not been and is not currently being considered for publication, in print or electronic format, in any other journal. [Date/signature(s)]

6. Media and delivery of manuscripts

6.1. The text (including tables) and illustrations (photographs, drawings and graphs) should be submitted in digital media (CD-ROM) and should be delivered in person or by mail.

6.2. Manuscripts should be sent to: Brazilian Oral Research SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 Cidade Universitária 05508-900 – São Paulo, SP, Brazil

6.3. Alternatively, the text and illustration files may be sent via e-mail to bor@sbpqi.org.br. In this case, the documents required in abovementioned items 2.3 and 5.3, i.e., the “Copyright Transfer and Author Responsibility Letter” and the approval certificate of the Ethical Committee of the institution where the research was conducted may be sent via fax to +55 11 3091-7855.

7. Evaluation

7.1. Manuscripts which do not comply with the instructions provided herein regarding presentation, whether deemed inappropriate or incomplete, will be immediately returned even before evaluation of their merit or relevance for publication.

7.2. Once the presentation format has been approved, the manuscripts will be submitted for assessment by the Editorial Board and by ad hoc reviewers, who have full authority to evaluate the merit of the study and determine its relevance for publication with or without any alterations.

7.3. Studies which are not considered relevant for publication in the BOR will be definitively returned to authors.

7.4. The evaluation process will be conducted according to a double-blind, peerreview system.

8. Color illustrations

8.1. The publishing of color illustrations will be financed by the interested author(s), who must, in this case, express his/her interest by attaching a note when submitting the originals.

8.2. Should the author(s) show(s) any interest in including color illustrations, the BOR will provide an estimate of the costs involved, which varies according to the number of illustrations, the distribution of these on

different pages, and the concurrent publication of other colored material submitted by other author(s). 8.3. Once the estimate for reproduction of color illustrations is presented to the author(s), the author(s) should sign the estimate and thereafter be legally responsible for paying the firm that provided these services. 9. Authorship 9.1. The academic degree(s) of the author(s) must be presented as (a) footnote(s). 9.2. Only one academic degree and one affiliation for each author will be accepted. The author(s) must, therefore, choose from among his/her different degrees and affiliations those that he/she considers most adequate for publication. Use of acronyms and abbreviations should be avoided. 9.3. Authorship implies a substantial intellectual contribution to the manuscript, involving participation in preparing and planning the study, in obtaining, analyzing and interpreting the data, in writing or critically reviewing the text, and in approving the final draft. Other contributions not directly involved in the study, such as help in obtaining financial support, merely collecting and classifying data, technical assistance in performing experimental routines, referral of patients, interpreting of routine exams, and heading a department or service do not constitute authorship. These indirect contributions may be acknowledged at the end of the text. 9.4. The BOR considers a maximum of 5 authors per manuscript as an acceptable limit. However, a greater number of authors may extraordinarily be accepted for manuscripts of greater complexity. In this case, a convincing justification for the participation of the additional author(s) should be submitted on a separate sheet. 10. Digital formatting and quantitative limits 10.1. The text (including tables, bibliographical references and illustration legends) must be provided as a digital file created in Microsoft Word for Windows or compatible format. 10.2. The text must be formatted in size 12 Arial font, 1.5 spacing between lines, on A4 paper, with a 3 cm margin on each side of the document, comprising a maximum of 23,000 characters (with spaces), including bibliographical references, tables (and respective legends), and illustration legends (for photographs, graphs and drawings). 10.3. Digital photographs are acceptable as long as their primary capture already complies with the stipulated size (approximately 10 cm x 15 cm) and resolution (300 dpi) requirements. 10.4. Digital photographs with artificially augmented size and/or resolution by way of image editing computer software manipulation will not be accepted. 10.5. Photographs (including radiographs, micrographs

and imaging exam results) must be submitted in TIFF file format. 10.6. Montages of photographs will not be accepted. Occasional overlaying callouts (arrows, letters, asterisks, etc.) should be applied in reduced size so as not to obstruct good visualization of the underlying area (for letters, use size 10 Arial font). 10.7. Graphs and drawings must be submitted as digital files created in vector art software (Microsoft Excel, CorelDraw, Adobe Illustrator, etc.) and exported as EPS files. 10.8. Graphs must always be submitted with the respective numeric values used to generate them. 10.9. A maximum of 10 (ten) illustrations (among photographs, graphs and drawings) may be submitted, provided they are essential to substantiate the scientific record and to allow full comprehension of the subject. 10.10. A maximum of 5 (five) descriptors may be submitted. 10.11. A maximum of 30 (thirty) bibliographical references may be submitted. 10.12. A maximum of 5 (five) authors may be included, each having only one academic degree and one affiliation (see abovementioned items 9.1 through 9.4). 10.13. The manuscript title may have a maximum of two lines with 60 (sixty) characters each. 14 10.14. The manuscript abstract may have a maximum of 250 (two hundred and fifty) words. 11. Numbering, citation and placement of tables 11.1. Tables must be sequentially numbered using Arabic numbers. 11.2. Table legends must be placed above the tables. 11.3. All tables, without exception, must be cited in the text. 11.4. Tables must be placed immediately below their citation in the text (see abovementioned items 6.1 and 6.2). 12. Numbering, citation and placement of illustrations (photographs, graphs and drawings) 12.1. Illustrations must be sequentially numbered using Arabic numbers. 12.2. All illustration legends must be placed together at the end of the text, after the bibliographical references. 12.3. All illustrations, without exception, must be cited in the text. 12.4. Illustrations must be submitted in separate files. Thus, they must not be embedded in the submitted text file (see abovementioned items 6.1 and 6.2). 13. Footnotes 13.1. Footnotes must be denoted by asterisks and must be kept to the minimum necessary. 14. Spelling of scientific and commercial expressions and of measuring units 14.1. Scientific expressions must be written out in full and not abbreviated. The expressions included in this category are: names of chemical elements and compounds, and microbiological, zoological, botanical binomial nomenclature, etc. 14.2. Generic names of products are preferred to commercial names, followed by the name of

the manufacturer, and the city and country where it was manufactured, in parenthesis and separated by commas. 14.3. Units of measurement must comply strictly with the International System of Units. 15. Order of presentation of manuscript components 15 a) Specialty or research area focused on in the manuscript b) Manuscript title c) Name(s) of the author(s) d) Abstract e) Descriptors f) Introduction g) Material and methods h) Results i) Discussion j) Conclusion(s) k) Acknowledgements l) Bibliographical references m) Illustration legends 16. Content of manuscript components a) Specialty or research area focused on in the manuscript: a single word that enables readers to immediately identify the specialty or research area addressed in the manuscript. b) Manuscript title: titles must be concise (limited to two lines of 60 characters each) and contain only information essential to describing the content of the research. c) Name(s) of the author(s): must be separated by line breaks. There must be a footnote for each author on the first page indicating his/her academic degree and affiliation (see abovementioned item 9). d) Abstract: must be a concise, sequential presentation of the problem being addressed, the proposition or hypothesis of the study, its materials and methods, results and conclusion. A maximum of 250 words is accepted. e) Descriptors: these correspond to the words and expressions that identify the content of the manuscript. When choosing descriptors, authors should refer to the 16 “Health Science Descriptors – DeCS” created by BIREME (available at <http://decs.bvs.br/>) or to the “MeSh – Medical Subject Headings” (available at <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>). A minimum of 3 and a maximum of 5 descriptors should be used. f) Introduction: must clearly describe the problem or the subject researched and its relation to other articles in the same area. The hypothesis or proposition should be concisely presented at the end of this section. An extensive literature review should be avoided; instead, the most recent bibliographic references should be cited, containing certain aspects and reviews that have already been presented. g) Material and methods: methods, equipment (the name and the city, state and country of the manufacturer should be stated in parenthesis) and procedures must be described in detail, so that other researchers can replicate the results. Authors should cite references of established methods, including statistical methods, cite references and briefly describe methods that have been published but are not wellknown. They should

also describe new methods or those which have been largely modified, give reasons for using them and evaluate their limitations. Authors should identify in precise terms all drugs and chemical substances used, including generic name(s), dose and methods of administration. Tables and respective legends must be presented immediately after their citations in the text. On the other hand, photographs, graphs and drawings should only be cited, and their respective legends should be presented together at the end of the text, after the bibliographical references.

h) Results: must be presented with the least possible amount of discussion or personal interpretation, accompanied by tables and/or illustrative material when needed. The data presented in tables and/or illustrations should not be repeated in the text. Statistical data must be submitted to appropriate analyses. Tables and respective legends must be presented immediately after their citations in the text. On the other hand, photographs, graphs and drawings should only be cited, and their respective legends should be presented together at the end of the text, after the bibliographical references.

i) Discussion: must be limited to explaining the data obtained, avoiding hypotheses which cannot be based on the results. Data should be analyzed in light of existing knowledge and results obtained in other relevant studies. Authors should point out new and important aspects of the study and conclusions derived from it. They should not engage in extensive rewriting of data already mentioned in the Introduction or Results sections, and should include implications for future research.

j) Conclusion(s): must be pertinent to the proposed objectives and based on data obtained. The working hypothesis of the study must be answered here.

k) Acknowledgements: the acknowledgement of technical, financial and material support must specify the nature of the contribution. Non-authorship contributions 17 may be acknowledged here (see abovementioned items 9.1 through 9.4). Relationships that might result in conflicts of interest must be presented. It is recommended that the author(s) obtain authorization from those acknowledged. 16.

Bibliographical references 16.1. References must be numbered and must follow the Vancouver style, according to the rules of the International Committee of Medical Journal Editors in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (available at http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). There can be no more

than 30 references. 16.2. The titles of periodicals must be abbreviated in accordance with the "List of Journals Indexed in Index Medicus" (available at <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>) and must not be printed in bold, in italics or underscored. All references must be presented in the same format. 16.3. The author's surname must be followed by his/her abbreviated first and middle names without periods or commas. Commas must be used only to separate the names of different authors. 16.4. All authors should be cited in references with up to six authors. In publications with seven or more authors, the first six should be cited and followed by the Latin expression et al.. 16.5. For periodicals, include the year, volume number, number (issue) and the page numbers of the article immediately after the title of the journal. 16.6. The citation of personal communications, studies in progress and nonpublished studies should be avoided; if any of these citations are essential, they should not be included in the listing of references, but should rather be cited as a footnote. 16.7. Authors are responsible for the accuracy of references. 16.8. For examples of correct reference citations, refer to <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=citmed.part.1323>

17. Checklist of the material to be submitted

- "Copyright Transfer and Author Responsibility Letter," signed by all the authors
- Copy of the approval certificate of the Ethical Research Committee
- Digital media (CD-ROM) containing all the digital files (one file compatible with Microsoft Word for Windows for the text; and one TIFF file or EPS file for each one of the illustrations)

18 • Justification for the participation of more than 5 authors (if applicable)