ADRIANA PIGOZZO MANSO

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE CLOREXIDINA COM
ETANOL NA DURABILIDADE DA ADESÃO À DENTINA**

São Paulo

2009

Adriana Pigozzo Manso

**Avaliação da associação de clorexidina com etanol na
durabilidade da adesão à dentina**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo, para obter o
título de Doutor, pelo Programa de Pós-
Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Materiais Dentários

Orientadora: Rosa Helena Miranda Grande

Co-orientador: Ricardo Marins de Carvalho

São Paulo

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Manso AP. Avaliação da associação de clorexidina com etanol na durabilidade da adesão à dentina [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, ____/____/2009

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha adorada filha Olívia, meu anjo e meu sonho, que em tão pouco tempo já me permitiu experimentar a mais sublime dimensão do amor.

Ao meu amado esposo Ricardo, pelo cuidado e carinho com que me apóia, pelos nossos sonhos compartilhados, pelo zelo com o nosso "jardim".

À minha idolatrada família, que carinhosa e silenciosamente me ampara, me conforta, e me dá o suporte que preciso para seguir em frente.

À Deus, por me presentear com a vida, com o amor, e com estas pessoas maravilhosas que me cercam.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof^a. Dr^a. Rosa Helena Miranda Grande, Tia Rosa, o meu agradecimento especial. Seu apoio e incentivo desde o ingresso no programa, seu papel fundamental de orientadora, sua sabedoria e inteligência na visualização de possibilidades, sua amizade e amor incondicional à profissão e aos alunos a fazem um grande exemplo para todos que exercem, ou almejam exercer um dia, o papel de professor.

*"O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem. Por isso,
existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis."*

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Ana Karina Bedran-Russo, University of Illinois at Chicago, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório de pesquisa, pela disponibilização de todos os recursos necessários para a execução do estudo, pela amizade incondicional.

À Prof^a. Alessandra Reis, Universidade de Ponta Grossa, pelo valioso incentivo para que este sonho se tornasse possível.

À secretária Sr^a Rosa Cristina Nogueira, do Departamento de Materiais Dentários, pelo fundamental suporte técnico, e acima de tudo, pelo carinho, amizade e acolhida.

Ao Prof. Dr. David H. Pashley, Medical College of Georgia, pelo desprendimento de compartilhar seus conhecimentos e experiência científica, pelo carinho e apoio em muitos momentos decisivos.

Ao Sr. Dr. Byoung Suh, Bisco Inc., pelo apoio financeiro, técnico e científico, fundamentais para a realização deste trabalho.

À Thais Pegoraro, pelo carinho, acolhida e amizade incondicionais.

Aos colegas e professores de Pós-graduação, pela amizade, pelos ensinamentos e por todos os momentos compartilhados.

Ao CNPq pelo bolsa de Doutorado (142216/2007-0).

*“Quando a mente se abre para uma nova idéia
ela jamais retorna ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein

Manso AP. Avaliação da associação de clorexidina com etanol na durabilidade da adesão à dentina [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

A degradação do adesivo e colágeno é considerada uma das principais causas de falhas nos processos adesivos à dentina. A completa infiltração de resinas hidrofóbas facilitada pelo etanol, associada à presença de inibidores de metaloproteinases presentes na dentina, poderia construir a união ideal, resistente à hidrólise e atividades enzimáticas. Este estudo examinou os benefícios do uso combinado de clorexidina como inibidor de metaloproteinases e etanol, na durabilidade de uniões resina-dentina. Foram utilizados 48 terceiros molares hígidos para obter superfícies planas de dentina que foram condicionadas com ácido fosfórico a 32% por 15 segundos, lavadas por 30 segundos, e secas com papel absorvente. Imediatamente após, uma das seguintes soluções foi aplicada por 30 segundos: água (A); etanol (E); solução aquosa de clorexidina a 1% (CA); solução alcoólica de clorexidina a 1% (CE). O excesso foi removido com papel absorvente e um dos adesivos, All Bond 3 (AB3) ou Excite (EX), foi aplicado à superfície sob agitação por 15 segundos, seguido por um jato de ar por igual tempo, e fotoativado por 20 segundos. Uma coroa de

aproximadamente 4 mm foi construída incrementalmente em resina composta e os dentes foram armazenados por 24 horas em água destilada à 37°C. A seguir foram cortados em paralelogramos para o teste de microtração. Um terço dos corpos de prova foi ensaiado imediatamente e os demais permaneceram armazenados por 6 ou 15 meses. Os efeitos dos tratamentos e períodos de armazenagem foram analisados para cada adesivo. Os resultados não demonstraram interação entre os fatores para ambos os adesivos. AB3 foi significativamente afetado pela armazenagem, mas não pelos tratamentos. EX foi significativamente afetado pelo tratamento, mas não pela armazenagem. Concluiu-se que o uso de clorexidina/etanol não melhorou a estabilidade da união após 15 meses. AB3 quando tratado com A ou CA, e EX com todos os tratamentos não foram afetados pela armazenagem.

Palavras-Chave: dentina, adesivo, etanol, clorexidina, durabilidade

Manso AP. Evaluation of the adjunctive use of chlorhexidine and ethanol on the durability of resin dentin bonds [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

Both adhesive and collagen degradation have been regarded as major causes of resin-dentin bonds failures over time. Complete infiltration of hydrophobic resins facilitated by ethanol, and the presence of MMPs' inhibitors within the hybrid layer would build the ideal interface, resistant to hydrolysis and enzymatic activities. This study examined the benefits of the adjunctive use of chlorhexidine and ethanol on the durability of resin dentin bonds. Forty-eight flat dentin surfaces were etched (32% phosphoric acid), rinsed (30s) and blot-dried with absorbent paper. The surfaces were re-wetted with either water (Water); 1% chlorhexidine diacetate in water (CHX/Water); 100% ethanol (Ethanol); and 1% chlorhexidine diacetate in ethanol (CHX/Ethanol) solutions for 30s. They were then bonded with All Bond 3 (AB3, Bisco) or Excite (EX, Ivoclar-Vivadent) using a smooth, continuous rubbing application (15s), followed by 15s gentle air dry. The adhesives were light-cured (20s) and resin build-ups constructed incrementally for the microtensile method. Bonded beams were obtained and tested after 24-hours, 6-months, and 15-

months water storage at 37°C. Effects of treatment and testing periods were analyzed (ANOVA, Holm-Sidak, $p < 0.05$) for each adhesive. There were no interactions between factors for both adhesives. AB3 was significantly affected by storage, but not by treatments. Excite was significantly affected by treatments, but not by storage. Adjunctive use of ethanol/chlorhexidine did not improve bond stability after 15 months. AB3 treated either with ethanol or CHX/ethanol resulted in reduced bond strengths after 15 months. AB3 treated with water or CHX/water and all treatments for Excite were not affected by storage.

Keywords: dentin, adhesive, ethanol, chlorhexidine, durability

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Corte transversal para remoção da parte oclusal da coroa ..	53
Figura 4.2 - Superfície dentinária preparada	53
Figura 4.3 - Condicionamento com ácido fosfórico 32% por 15 s.....	53
Figura 4.4 - Solução de tratamento deixada na dentina por 30 s.....	53
Figura 4.5 - Absorção do excesso de solução com lenço de papel	53
Figura 4.6 - Aspecto da superfície previamente à aplicação do adesivo ..	53
Figura 4.7 - Aplicação do adesivo com agitação por 15 s.....	53
Figura 4.8 - Adesivo aplicado e fotoativado.....	53
Figura 4.9 - Construção de coroa em resina composta.....	53
Figura 4.10 - Coroa finalizada, previamente à armazenagem.....	53
Figura 4.11 - Cortes transversais após a armazenagem por 24 horas . ..	53
Figura 4.12 – Corpos de prova para teste imediato ou armazenagem . ..	53
Figura 5.1 – Distribuição percentual dos modos de fratura do adesivo AB3 testado em 24 horas.....	60
Figura 5.2 - Distribuição percentual dos modos de fratura do adesivo AB3 testado em 6 meses	60

Figura 5.3 - Distribuição percentual dos modos de fratura do adesivo AB3	
testado em 15 meses.....	.. 60
Figura 5.4 - Distribuição percentual dos modos de fratura do adesivo	
Excite testado em 24 horas.....	.. 61
Figura 5.5 - Distribuição percentual dos modos de fratura do adesivo	
Excite testado em 6 meses	.. 61
Figura 5.6 - Distribuição percentual dos modos de fratura do adesivo	
Excite testado em 15 meses	.. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Material, composição, fabricante e número de lote 48

Tabela 5.1 - Valores médios da resistência de união ($\pm$ desvios padrões) expressos em MPa, para os adesivos All Bond 3 e Excite, considerando os tratamentos e os tempos de armazenagem.58

Tabela 5.2 - Análise de Variância a 2 critérios para o adesivo All Bond 3 59

Tabela 5.3 - Analise de Variância a 2 critérios para o adesivo Excite 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MPa	MegaPascal
MMP	Metaloproteinase
rpm	rotações por minuto
s	segundos
mW/cm ²	miliWatt por centímetro quadrado
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
mm/min	milímetro por minuto
kgf	quilograma força
°C	graus Celsius
pH	potencial hidrogeniônico
AB3	All Bond 3
EX	Excite
A	Água
E	Etanol
CA	Solução aquosa de clorexidina a 1%
CE	Solução alcoólica de clorexidina a 1%
BAC	Cloreto de benzalcônio
AD	Falha adesiva
CR	Falha coesiva de resina
CD	Falha coesiva de dentina
M	Falha mista

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Dentina	21
2.2 Adesão à dentina	25
2.3 Aspectos que determinam a durabilidade da adesão	26
2.3.1 Infiltração da camada adesiva	29
2.3.2 Hidrólise dos sistemas adesivos	35
2.3.3 Degradação do colágeno	39
3 PROPOSIÇÃO	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
5 RESULTADOS	55
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXO	89

1 INTRODUÇÃO

Atualmente se aceita que os fenômenos responsáveis pela determinação da durabilidade das uniões dentina-resina são mais complexos do que se pensava. A longevidade da união é dependente da estabilidade química e mecânica de ambos, sistema adesivo *per se* e fibrilas de colágeno expostas para a hibridização. Como a maioria dos sistemas adesivos contém monômeros hidrófilos, estes absorvem água e estão vulneráveis às alterações estruturais resultantes da presença de água no polímero. Idealmente, se os sistemas adesivos pudessem resistir à ação dos fluidos bucais e, por consequência, fornecer proteção às fibrilas de colágeno poder-se-ia inferir que a união se tornaria mais estável ao longo do tempo.

A manutenção dos espaços interfibrilares na matriz dentinária desmineralizada é fundamental para a permeação dos monômeros adesivos por entre as fibrilas do colágeno durante a hibridização da dentina. A água é o solvente com melhores características para manter a trama de colágeno expandida em função da sua capacidade de romper as pontes de hidrogênio formadas entre os peptídeos das fibrilas quando a dentina é desidratada (1). Entretanto, a presença da água pode ocasionar a separação de fases em sistemas adesivos com características hidrófobas, resultando em infiltração deficiente da resina adesiva (2). A

água presente na dentina requer sistemas adesivos mais hidrófilos, os quais são mais permeáveis e suscetíveis à deterioração (3). Há ainda que se considerar que a água presente durante a hibridização da dentina é impossível de ser eliminada por completo pelos procedimentos clínicos usuais (4), podendo se tornar um fator de comprometimento da polimerização do adesivo.

O uso de solventes anidros, como o etanol, tem sido proposto como alternativa para saturar a dentina desmineralizada em substituição à água (1). Na presença de etanol, monômeros mais hidrófobos se dissolvem com maior facilidade e a difusão é favorecida por toda a extensão da zona desmineralizada (5). Com a dentina saturada com etanol ao invés de água, monômeros adesivos relativamente hidrófobos poderiam ser infiltrados na zona desmineralizada, eliminando a existência de fibrilas de colágeno expostas e não protegidas na base da camada hibridizada.

Demonstrou-se que é possível unir resinas hidrófobas à dentina condicionada utilizando-se o etanol como agente de saturação do substrato (6,7). Os estudos reportam valores de resistência de união que foram comparáveis aos rotineiramente obtidos com sistemas adesivos hidrófilos aplicados sobre dentina úmida (com água).

A degradação das fibrilas de colágeno expostas devido à incompleta hibridização da dentina tem sido aceita como fator importante no processo de deterioração de interfaces adesivas (8,9). Além dos inúmeros fatores inerentes ao meio bucal, a estrutura do colágeno exposto também está

sujeita à ação de enzimas proteolíticas (metaloproteinases) presentes no próprio substrato dentinário, as quais são liberadas durante os procedimentos de desmineralização (10). A contribuição destas enzimas na deterioração da matriz de colágeno foi demonstrada em recentes estudos, e tem implicação significativa sobre a durabilidade da união. Dentre os vários tipos de metaloproteinases dentinárias, as gelatinases e collagenases são capazes de degradar a matriz orgânica da dentina após a desmineralização, mesmo na ausência de enzimas bacterianas (10). Elas são liberadas da matriz dentinária durante a desmineralização, ativadas pelo baixo pH e presença de íons metálicos (como o Cálcio, por exemplo), e atuam degradando o colágeno presente na dentina desmineralizada e não protegido pela adequada infiltração da resina adesiva (10,11). O cálcio do meio é liberado da dentina pela desmineralização inerente ao procedimento adesivo e a degradação da matriz desmineralizada ocorre pela presença de enzimas oriundas da matriz mineralizada subjacente, as quais atuam durante prolongados períodos pós-procedimentos adesivos. A metaloproteinase-8 é a mais abundante gelatinase na dentina humana, encontrada tanto em frações mineralizadas como em desmineralizadas (12). Dados recentes mostram que a atividade colagenolítica das enzimas aumenta lentamente ao longo do tempo. Questiona-se que a enzima seja capaz de ser autoativada ou ainda, que possa haver uma progressiva inoperância dos respectivos agentes teciduais (inibidores naturais) responsáveis pelo controle da ação proteolítica dessas enzimas (12,13).

O mecanismo de ação das metaloproteinases ainda necessita ser completamente elucidado e detalhado, dado o grande número de diferentes enzimas que estariam envolvidas neste complexo processo. Contudo, as metaloproteinases 2, 8, 9 e 20 já foram identificadas na matriz orgânica de dentina humana sadia (12,13,14,15), sendo estas, portanto, as metaloproteinases relacionadas ao processo de degradação das uniões com a dentina.

Uma possível maneira de prevenir a ação das metaloproteinases sobre o colágeno e, assim, prevenir a degradação da interface adesiva seria por meio do emprego de agentes inibidores que impedissem a ativação dessas enzimas, tornando-as inócuas ao colágeno exposto. Ainda que existam inúmeros agentes que inibem a ativação de metaloproteinases (16), estes não apresentam praticidade de uso na rotina clínica. Recentes estudos in vivo e in vitro, entretanto, têm demonstrado que a integridade da camada híbrida pode ser preservada pela aplicação de soluções aquosas de clorexidina, após o condicionamento ácido e antes do sistema adesivo (8,9). A clorexidina é uma substância compatível do ponto de vista biológico e bastante utilizada em medicina e odontologia. Ainda que originalmente empregada com a finalidade de obter benefícios de seu potencial antibacteriano, a viabilidade de aplicação integrada aos procedimentos adesivos sem que haja comprometimento da adesão já foi demonstrada (17). Assim, o fato de a clorexidina atuar também como potencial inibidor de metaloproteinases e beneficiar a integridade da união é um avanço

importante para a melhoria da qualidade e durabilidade da adesão à dentina. A preservação do colágeno exposto poderia ocorrer pela completa infiltração dos monômeros resinosos. Considerando esse fenômeno pouco provável, a aplicação de clorexidina se torna, então, importante para proteger o colágeno exposto. Idealmente, deveríamos lançar mão de todos os recursos capazes de reduzir a degradação da união, assim, uma possível associação da técnica do etanol com o uso da clorexidina atenderia a esse objetivo. Essa abordagem associa os benefícios da utilização do etanol para possibilitar o uso e favorecer a infiltração de monômeros hidrófobos, com a proteção oferecida pela clorexidina contra a ação das metaloproteinases sobre fibrilas de colágeno que, eventualmente, ainda permaneçam desprotegidas.

Ainda que os benefícios do emprego do etanol e da clorexidina para a qualidade da união tenham sido demonstrados na literatura de forma individual, os potenciais benefícios da combinação do etanol com a clorexidina ainda não foram amplamente investigados, em especial com o uso de técnica clinicamente viável e material disponível no comércio. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho é investigar os efeitos do uso do etanol e da clorexidina, combinados ou não no procedimento adesivo, sobre a durabilidade da união de resina à dentina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dentina

A dentina é um substrato morfológicamente heterogêneo. É considerado um tecido vivo e funcionalmente integrante do complexo dentino-pulpar (18). Embora não existam terminações nervosas ou vascularização dentro da dentina, as injúrias ao tecido suscitam respostas dos odontoblastos da polpa pelo mecanismo hidrodinâmico de transmissão de estímulos (19).

O tecido dentinário é composto de cerca de 50% de matéria inorgânica, 20% de matéria orgânica e 30% de água em peso (20). Além disso, suas características morfofuncionais variam amplamente com a região e com o tratamento a que é submetido (21), o que faz da dentina um substrato complexo e bastante sensível aos diferentes passos operatórios envolvidos nos procedimentos restauradores adesivos. O arranjo radial dos túbulos dentinários no sentido polpa-junção amelodentinária e o seu maior diâmetro voltado para a polpa fazem com que a área de superfície ocupada pelos túbulos aproxime-se a 22% em regiões mais profundas e a apenas 1% próximo à junção amelodentinária (22). Tal variação regional

morfológica representa importante fator a ser considerado durante os procedimentos adesivos à dentina. O aumento da densidade tubular em dentina mais profunda e aumento da permeabilidade pelo condicionamento ácido durante os procedimentos adesivos têm sido demonstrados como importantes determinantes da qualidade da adesão (23,24).

A grande complexidade estrutural da dentina implica no comprometimento das suas propriedades mecânicas em função da proximidade com a polpa e orientação dos túbulos (25,26,27). Processos patológicos como esclerose e cárie resultam em alterações nas propriedades do substrato (28,29). Após a desmineralização da dentina ocorrem significantes alterações nas respectivas propriedades mecânicas, que são seguidas por outras transformações como enrijecimento e contração na matriz dentinária causadas pela aplicação de substâncias químicas durante os procedimentos adesivos (30,31). Os efeitos dos solventes e monômeros sobre a dentina desmineralizada têm um importante papel em todo o conceito de adesão e serão mais amplamente discutidos posteriormente.

Em sua microestrutura, a dentina constituiu-se de uma matriz orgânica proteica, sobre a qual se depositam cristais de apatita. O colágeno tipo I é responsável por aproximadamente 90% do conteúdo orgânico, enquanto proteínas não colagênicas (fosforinas, sialoproteínas) e glicosaminoglicanas (GAGs) participam na composição dos restantes 10% da matéria orgânica (18). As fibrilas de colágeno, com diâmetro médio de

20 a 50 nm (32) são compostas por moléculas alongadas e helicoidais. Cada molécula de colágeno tipo I é formada por três cadeias de peptídeos, sendo uma cadeia alfa 1 e duas cadeias alfa 2 (33). Tais cadeias se arranjam entre si rotacionando sobre si mesmas para o lado direito, conferindo à molécula de colágeno sua típica característica de estrutura helicoidal tripla. O aminoácido glicina que se encontra voltado para dentro da estrutura helicoidal é fundamental para a determinação e estabilidade dessa formação. Tal arranjo espacial é estabilizado por pontes de hidrogênio formadas entre os peptídeos das cadeias adjacentes, as quais têm crucial importância nas alterações dimensionais e propriedades mecânicas que ocorrem quando da aplicação de monômeros e solventes sobre a matriz dentinária desmineralizada (34,35,36). A estabilização definitiva da estrutura fibrilar é obtida pela formação de ligações cruzadas entre os aminoácidos das cadeias vizinhas, o que confere às moléculas e fibrilas suas propriedades mecânicas máximas. A distribuição das ligações cruzadas nas moléculas de colágeno da dentina parece ser única a esse substrato. Estudos mostram que a dentina possui alta concentração de ligações cruzadas em relação a outros tecidos (37), o que provavelmente confere a ela alta resistência a desafios como armazenagem em água por longo prazo (38), contato com soluções ácidas (39), ou à ação de certas enzimas como a pepsina. Uma interessante particularidade do colágeno tipo I da dentina, quando comparado com colágeno tipo I de outros tecidos, é a sua relativa resistência às alterações de pH, fazendo com que

resista à desnaturação mesmo quando exposto a condições ácidas extremas por períodos curtos de tempo (20,37,38).

As glicosaminoglicanas têm pouca influência nas propriedades mecânicas da matriz dentinária desmineralizada, mas podem exercer influência significativa na infiltrabilidade das resinas (21). Por sua vez, as proteínas não colagênicas são moléculas carregadas ionicamente (40) e atraem grandes quantidades de água. Assim, a dentina desmineralizada, que se constitui de colágeno, proteínas não colagênicas e glicosaminoglicanas é considerada um hidrogel (41), capaz de absorver grande quantidade de água, mas que se mantém insolúvel pela quantidade de ligações cruzadas no colágeno. Em contrapartida, muitas das proteínas não colagênicas são dissolvidas durante a desmineralização (21) e, subsequentemente, se depositam sobre as fibrilas de colágeno ou se aglomeram nos espaços interfibrilares, podendo comprometer a qualidade da infiltração do agente adesivo.

Assim, torna-se óbvio o entendimento de que a adesão à dentina é um procedimento complexo e intrincado, e modificado por fatores que determinam alterações de estrutura e propriedades frente às condições aplicadas durante o procedimento adesivo. O entendimento de tais fenômenos é crucial para o aperfeiçoamento de técnicas e materiais para a obtenção de uma confiável adesão à dentina.

2.2 Adesão à dentina

Desde que a adesão de material resinoso ao esmalte dentário foi considerada clinicamente viável (42), muita controvérsia e pesquisa foram geradas para que se atingisse o atual estágio de entendimento dos mecanismos de adesão à dentina (24,43). As características inerentes do tecido dentinário previamente descritas precisam ser consideradas durante o procedimento adesivo a fim de se obter sucesso. Mesmo assim, alguns fatores como dentina profunda, dentina cariada, dentina esclerótica, que estão presentes na grande maioria das cavidades preparadas na rotina diária da clínica são considerados substratos “desfavoráveis” para adesão (23,28,29,44,45). Grande parte dos estudos que avaliam qualidade das adesões à dentina, quer por testes de tração ou cisalhamento, investigam maneiras de melhorar a qualidade das uniões em dentina sadia, e principalmente, em manter as mesmas estáveis ao longo do tempo. Desta forma, uma análise mais profunda sobre os fatores que determinam a durabilidade da adesão serão discutidos de forma mais ampla em separado nesta revisão.

2.3 Aspectos que determinam a durabilidade da adesão

É interessante notar que o questionamento quanto à durabilidade da adesão à dentina já era presente no pioneiro trabalho de Buonocore, em 1956 (46). Naquele estudo os autores reportaram valores iniciais da resistência de união entre 2,8 MPa e 5,5 MPa, respectivamente para dentina não condicionada e tratada com ácido clorídrico a 7% por 1 minuto, ambos seguidos da aplicação de uma resina adesiva fluida experimental, de características ácidas ($\text{pH} = 2,5$). O grupo controle não condicionado e não tratado pela resina adesiva não produziu adesão mensurável e, por falta de outros parâmetros comparativos, os autores consideraram os valores obtidos com os grupos experimentais excelentes. Os espécimes foram imersos em água e a resistência de união determinada após intervalos de tempo de cerca de 3 a 5 meses pós-procedimento. Os autores notaram gradativa perda de resistência de união ao longo do tempo, sendo mais pronunciada nos períodos iniciais (15-30 dias) e com tendência a estabilização em períodos mais tardios. De qualquer maneira, os valores caíram ao redor de 50% após 3 meses para o grupo da resina adesiva, e 45% após 5 meses para o grupo do ácido e resina adesiva. Os autores atribuíram essa redução aos efeitos da água na interface. O exame das superfícies fraturadas, após o teste, revelou indícios da ação deteriorante da água tanto na resina adesiva quanto na

sua união com a superfície da dentina. Os autores atribuíram a bem sucedida adesão à dentina com sendo produto da reação química entre a resina experimental e o componente orgânico da dentina. Porém, o conhecimento atual sugere que o aclamado sucesso de 1956 possa ter sido resultado da retenção micromecânica proporcionada pela infiltração da resina fluida nas porosidades superficiais criadas pela acidez da própria resina adesiva e/ou pelo condicionamento prévio com o ácido.

O entendimento que a adesão à dentina se produz por meio de mecanismo micromecânico de retenção da resina adesiva com as fibrilas de colágeno teve início com o trabalho de Nakabayashi e colaboradores, em 1982 (47), e foi consolidado somente após 10 anos com o descritivo estudo morfológico de Van Meerbeek e colaboradores (48).

Após a aceitação do conceito de mecanismo micromecânico de retenção, os estudos se voltaram para investigar detalhes e elucidar fatores que pudessem comprometer a adequada formação da união. Observou-se que a zona de interdifusão entre o tecido dentinário e o material adesivo infiltrado, chamada "camada híbrida" (47,48), não era infiltrada em toda a extensão da área desmineralizada como se descrevera (49,50). Ao contrário, a infiltração da resina se mostrava não uniforme, dependente do sistema adesivo e, em geral, deficiente, principalmente nas regiões mais profundas da zona desmineralizada (51,52). Demonstrou-se ainda que a área desmineralizada e não infiltrada representava região de fragilidade da união, deixando exposto colágeno que estaria sujeito a

degradação ao longo do tempo (51,52,53). A deficiência de completa hibridização da dentina é fato mais característico para os adesivos ditos convencionais, entretanto, a ocorrência também foi reportada para adesivos autocondicionantes (54,55).

Como consequência das evidentes limitações dos adesivos para produzir união estável à dentina, as investigações se concentraram em buscar soluções por estudos individualizados dos componentes da união, identificando características dos mesmos que pudessem elucidar o intrincado processo de degradação.

Assim, aspectos que determinam a durabilidade da adesão à dentina começaram a ser melhor compreendidos. Em geral, os principais fatores que determinam a degradação precoce da adesão à dentina são: deficiência no encapsulamento das fibrilas de colágeno pelo sistema adesivo; suscetibilidade dos polímeros adesivos à hidrólise; suscetibilidade do colágeno desprotegido à ação de enzimas do próprio substrato. Estes aspectos serão discutidos em subtópicos para facilitar o entendimento; entretanto, é importante salientar que são interdependentes e ocorrem de forma associada a partir da execução do procedimento clínico.

2.3.1 Infiltração da camada híbrida

Considerando que este estudo investigou a durabilidade da adesão para sistemas convencionais, ou seja, que requerem o passo de condicionamento ácido separado do procedimento de infiltração do adesivo, este subtópico tratará apenas de aspectos relacionados à hibridização da dentina com esses adesivos.

O primeiro passo para a infiltração da resina adesiva num sistema convencional se dá com a aplicação de uma solução ácida, usualmente ácido fosfórico em concentração entre 32 a 37%, por um período de tempo que usualmente varia de 15 a 30 segundos. Este procedimento resulta em remoção da lama dentinária que cobre a superfície de dentina preparada, e na desmineralização da dentina subjacente numa profundidade aproximada de 5 μ m (48). Após a lavagem da solução ácida, a dentina desmineralizada apresenta-se como uma trama de fibrilas de colágeno dispersas na água remanescente. A manutenção da água nos espaços inter e intrafibrilares é fundamental para a obtenção de uma adequada infiltração do adesivo (56,20). O mecanismo através do qual a água interage com as fibrilas de colágeno e permite manter os espaços interfibrilares é amplamente explicado pela teoria dos parâmetros de solubilidade.

A teoria dos Parâmetros de Solubilidade (57) criou um modelo triplo como uma maneira de determinar ou prever a miscibilidade de substâncias químicas. Essas relações químicas moleculares têm um papel fundamental no entendimento do que acontece com o substrato dentinário, resinas adesivas e solventes durante o procedimento adesivo. Os parâmetros de solubilidade determinam as forças de atração molecular subdivididas em: dispersivas, polares, pontes de hidrogênio e coesivas totais. A teoria foi adaptada por Miller (58) para as pesquisas com sistemas adesivos e matriz dentinária. Posteriormente, vários estudos empregaram parâmetros de solubilidade para explicar as interações entre colágeno, solventes e resinas adesivas e respectivas consequências na alteração dimensional e propriedades físicas da dentina desmineralizada, bem como as implicações com a qualidade da infiltração de resina na dentina (59,60,61).

Numa extrapolação dos conceitos para o procedimento adesivo, entende-se que após a desmineralização da dentina, a trama de fibrilas de colágeno pode se encontrar expandida pela presença da água, ou colapsar, pela remoção física da água com uso de ar (56). Na ausência de água, a trama de colágeno contrai e, devido à maior proximidade das fibrilas, ocorre formação de pontes de hidrogênio entre os peptídeos das moléculas adjacentes, o que determina o enrijecimento da matriz no estado contraído. A re-expansão da matriz somente é possível se um solvente for capaz de romper a atração molecular entre os peptideos. Isso é possível quando o solvente possui um parametro de solubilidade maior

do que as forças que mantêm as fibrilas atraídas (59,60,61). Entre todos os solventes empregados nos sistemas e técnicas adesivas, a água apresenta o maior parâmetro de solubilidade (60). Na presença de água, as ligações entre os peptídeos são rapidamente rompidas e a água ocupa os espaços interfibrilares e produz expansão máxima entre as fibrilas (59). De maneira geral, qualquer substância ou mistura produz efeitos na matriz de colágeno de acordo com seu respectivo parâmetro de solubilidade. Assim, um solvente, monômero ou uma mistura de ambos, como acontece com a maioria dos sistemas adesivos, poderá produzir maior ou menor expansão da matriz de acordo com sua capacidade e velocidade de formar pontes de hidrogênio com os peptídeos. Tendo como referência os valores que determinam a formação de pontes de hidrogênio entre os peptídeos, quanto maior for o parâmetro de solubilidade para pontes de hidrogênio do solvente ou mistura maior e mais rápida será a expansão da trama de colágeno e vice-versa. Vários solventes e misturas de solventes com monômeros foram testados com relação a suas capacidades de manter as fibrilas de colágeno expandidas (61). A acetona e o HEMA puros, por exemplo, apresentam um parâmetro de solubilidade para pontes de hidrogênio que é menor do que o existente entre os peptídeos. Assim, essas substâncias não produzem re-expansão, mas causam contração da mesma se aplicadas em saturação sobre uma matriz expandida pela presença de água (59,60,61). Por outro lado, o metanol e o etanol são solventes que, mesmo em misturas com monômeros, apresentam um parâmetro de solubilidade mais alto e capaz de re-

expandir ou manter a matriz de colágeno expandida, ainda que de modo mais lento e em menor escala quando comparados com a água (59,60,61). Essas relações entre os adesivos, seus respectivos solventes e a água com a matriz de dentina desmineralizada são os fatores que explicam, por exemplo, o favorável desempenho de adesivos a base de etanol/água em comparação com adesivos cujo solvente é a acetona (1,62,63). É de se esperar, portanto, que a remoção da água dos espaços interfibrilares cause uma contração da matriz desmineralizada, reduzindo os espaços para a infiltração da resina adesiva. Dessa maneira, a hibridização fica comprometida e, por consequência, a adesão. O etanol é um solvente capaz de manter a matriz de dentina desmineralizada em uma condição expandida (1). Verificou-se também que a utilização de uma mistura de 65% etanol com 35% HEMA aplicada como *primer*, antes da aplicação de uma resina adesiva, resultou em altos valores de resistência da união (64).

Outro fator relevante e que participa em certo grau no processo de adesão é o enrijecimento das fibrilas quando da aplicação dos solventes, monômeros ou misturas dos mesmos. A água não produz nenhum enrijecimento à matriz, o que faz com que a mesma colapse ou contraia quando da remoção da água (1,20). Em contrapartida, etanol puro ou misturas de HEMA/etanol produzem algum enrijecimento da matriz, resultando em menor contração da mesma quando o solvente é evaporado (5,34). Esse aspecto é importante, pois se a água interfibrilar é substituída por um solvente ou mistura que enrijece a matriz, os espaços

interfibrilares são mantidos mesmo após a evaporação do solvente, favorecendo a infiltração posterior de resina adesiva.

A água pode ser considerada o solvente ideal para a manutenção das fibrilas de colágeno em seu grau máximo de expansão (1); entretanto, sua presença durante e após a infiltração dos monômeros adesivos tem sido reportada como indesejável por causar separação de fases em adesivos que contêm monômeros hidrófobos (65), comprometimento na polimerização do adesivo (4,66,67), aumento de sua permeabilidade (68) e consequente aumento de sua susceptibilidade à degradação hidrolítica (69,70).

Todos estes estudos sobre as alterações dimensionais da matriz desmineralizada e seu papel na qualidade da infiltração e hibridização da dentina são pontos de importante consideração quando se busca a obtenção de uma camada híbrida “perfeita”, na qual se espera principalmente: o recobrimento completo das fibrilas expostas pelo condicionamento ácido; a manutenção dos espaços interfibrilares em sua dimensão original a fim de se obter a máxima retenção; a estabilidade da união pelo uso de sistemas mais resistentes à degradação ao longo do tempo.

Como descrito, a relação dos diferentes solventes com a trama de fibrilas de colágeno têm sido investigada com o intuito de eliminar a água sem comprometer os espaços para a infiltração da resina adesiva. Dentre os vários solventes, o etanol se mostrou uma alternativa viável, haja vista

que mantém a matriz expandida, enrijece as fibrilas de colágeno e é empregado como solvente em diferentes sistemas adesivos. O conceito da “adesão com etanol” (1) reflete essas características, sugerindo que a superfície desmineralizada da dentina seja saturada com etanol antes da aplicação do agente adesivo. Após a substituição da água pelo etanol, adesivos hidrófobos podem ser aplicados sem que haja comprometimento da infiltração pela presença de água. As vantagens e viabilidade da técnica da adesão com etanol estão demonstradas em estudos que relatam superior resistência adesiva (7) e superior infiltração da resina na zona desmineralizada (71). Ao que parece, a técnica da adesão com etanol permite a produção de união duradoura de resinas adesivas hidrófobas com a dentina (72).

2.3.2 Hidrólise dos sistemas adesivos

Ao contrário do material adesivo utilizado para o esmalte, aquele destinado ao uso dentinário deve, obrigatoriamente, ter uma natureza mais hidrófila. A dentina requer um material com a habilidade de se misturar ou se infiltrar em superfície úmida e permeável. Misturas complexas com adição de diluentes e solventes facilitam o seu emprego clínico tanto por atender os quesitos de compatibilidade com a umidade dentinária quanto por reduzir o número de passos operatórios. Entretanto, resultam em produtos muito permeáveis e susceptíveis à deterioração ao longo do tempo (3).

Se por um lado a dentina desmineralizada e seca não permite que os monômeros adesivos sejam infiltrados (24), por outro, o excesso de umidade provoca a formação de micelas e glóbulos na superfície (fenômeno conhecido como *overwetting*), que compromete a qualidade da infiltração (73,74). Este ponto crítico de umidade ideal ainda varia conforme o solvente utilizado no adesivo (63). Sistemas adesivos a base de etanol requerem menos água na superfície, enquanto outros requerem uma superfície mais úmida. Por ser um solvente com habilidade relativa para romper as pontes de hidrogênio que se formam quando a matriz dentinária é seca com ar, mostra-se menos sensível ao relativo ressecamento da dentina, e os efeitos deletérios da secagem não são tão

significativos (62). Vale ressaltar que o excesso de água é sempre mais deletério para a adesão, independente do tipo de solvente empregado no adesivo (63).

Após a aplicação do adesivo, mesmo que o tempo para evaporação dos solventes seja maior que o recomendado pelos fabricantes (5 a 10 segundos), alguma água residual permanecerá entremeada na mistura quando da polimerização do adesivo (4). A água fica retida dentro do material polimerizado porque a pressão de vapor na mistura decresce de modo considerável à medida que a concentração de monômeros aumenta, tornando mais difícil a eliminação dos últimos traços de solvente na mistura (4,75). A presença da água residual durante a polimerização resulta em prejuízo na conversão de monômeros em polímeros (76,77), afetando diretamente suas propriedades mecânicas e durabilidade (77,78). Além da água, os próprios solventes presentes nas misturas dos adesivos disponíveis no mercado podem ser responsáveis pela deterioração das propriedades mecânicas dos sistemas adesivos polimerizados (79,80). É importante lembrar ainda que a proporção de monômeros e solventes em cada adesivo varia significativamente. Em alguns adesivos o solvente ocupa cerca de metade do volume da mistura, enquanto em outros ocupam apenas 8% do volume (81). Entretanto, a meticulosa eliminação dos solventes pode resultar em estabilidade dos polímeros em água ao longo do tempo, independentemente do adesivo utilizado (70).

A incorporação de monômeros mais hidrófilos que funcionam como solventes polimerizáveis para o Bis-GMA, tais como o HEMA, permite que o adesivo se difunda mais facilmente entre os espaços interfibrilares repletos de água. Em contrapartida, tais monômeros hidrófilos são em parte responsáveis pela degradação dos polímeros que os contêm por aumentarem o grau de sorção de água dos mesmos, o que plastifica o polímero e favorece a redução das propriedades mecânicas (82,83). Os sistemas simplificados são ainda mais suscetíveis à degradação do que suas versões multipassos, o que se deve ao seu maior caráter hidrófilo (84,85). As diferenças composicionais dos monômeros resinosos e das formulações dos compostos adesivos determinam variações nas propriedades dos polímeros (86,87). Dependendo da composição, podem permear a água com maior facilidade e ter como resultante os efeitos da plastificação. Ito et al. (88) demonstraram que um polímero produzido a partir de resina mais hidrófila sorve 23 vezes mais água do que uma hidrófoba. Há que se considerar ainda que o tempo de polimerização dos adesivos determina diretamente o seu grau de conversão e, por consequência, sua permeabilidade. Adesivos subpolimerizados resultam em interfaces mais permeáveis devido ao menor grau de conversão (68,89). Entretanto, outros fatores como inadequada irradiação e excesso de solvente também colaboram para a obtenção de um material subpolimerizado

A suscetibilidade ao processo de degradação de qualquer polímero tem relação com o coeficiente de difusão da água pela estrutura polimérica

(90), que pode acontecer de duas maneiras distintas. Pelo movimento livre da água nos microespaços do polímero, sem ocorrência de interações moleculares e alterações dimensionais do material (91); e/ou pela difusão lenta da água nas porosidades com subsequente rompimento das ligações moleculares do polímero e plastificação do material (92).

Recentemente, um grupo de pesquisadores tem investigado o comportamento de 5 resinas adesivas com composições conhecidas, da mais hidrófoba (R1) até a mais hidrófila (R5). Até então, os estudos envolvendo resinas adesivas investigavam o comportamento de misturas (sistemas adesivos comercializados) das quais não se sabia a formulação. Por isso, o entendimento do comportamento do material e seu respectivo desempenho com base na formulação química dos mesmos era limitado. Assim, as formulações (R1 até R5) permitiram o início de um processo de investigação mais preciso dos efeitos dos componentes nos seus respectivos comportamentos químico e físico. Dentre os vários estudos com as resinas experimentais encontram-se a avaliação da qualidade de infiltração no substrato dentinário (1,6,7) umedecido com água e/ou etanol, bem como sua durabilidade ao longo do tempo (72); identificação do papel dos diferentes monômeros na redução de permeabilidade da interface resina-dentina (93,94); avaliação do desempenho frente aos desafios presentes em clínica, como retenção de solventes na mistura (82), grau de conversão (68,89), propriedades mecânicas após o envelhecimento (88), dentre outras. A análise global desses trabalhos evidencia que sistemas adesivos hidrófilos, como os comercializados,

sorvem mais água, são permeáveis, apresentam polimerização comprometida e, decididamente, exercem papel coadjuvante fundamental na degradação da interface adesiva.

2.3.3 Degradação do colágeno

A união não se degrada apenas à custa da deterioração de um de seus componentes, mas de forma associada, num processo simultâneo de dissolução da resina e proteólise do colágeno. Esse entendimento é importante para que o desenvolvimento de métodos de prevenção da degradação sejam clinicamente viáveis e bem sucedidos.

A zona de colágeno exposta e desprotegida se torna vulnerável à degradação (95,96,97). Após longos períodos de armazenagem em água observa-se a desorganização da rede de colágeno, a ampliação dos espaços interfibrilares e a redução do diâmetro das fibrilas (98). Entende-se que o processo de degradação da matriz de colágeno ocorre devido à ação das metaloproteinases presentes na própria matriz dentinária. As metaloproteinases são endopeptidases zinco e cálcio dependentes que ficam aprisionadas e inativas na matriz de dentina mineralizada durante a formação do tecido. Pertencem a um grupo de enzimas capazes de

degradar quase todos os componentes extracelulares da matriz dentinária. Recebem nomes que correspondem ao tecido ou substrato a que pertencem ou degradam. Assim, collagenases degradam fibrilas de colágeno intactas; gelatinases degradam proteínas colagênicas desnaturadas (gelatinas); metaloelastases degradam elastina, etc. São moléculas estruturalmente homólogas que diferem em especificidade e transcrição. Constituem-se classicamente de duas cadeias, a *prodomain* composta de aproximadamente 80 aminoácidos e a *domain* que contém zinco. A cadeia *prodomain* deve ser dissociada da *domain* antes da ativação da enzima. A ativação, por sua vez, acontece por diferentes mecanismos relacionados com o tecido e ambiente em que se encontram (99).

As metaloproteinases desempenham um papel fundamental em diversos processos de desenvolvimento e autoregulação dos tecidos dentais, e em processos patológicos tais como doença periodontal, inflamação pulpar e cárie dentária (16). A maioria é formada por características que as distinguem em vários parâmetros incluindo a habilidade de clivar componentes da matriz extracelular, a dependência de um íon zinco para sua atividade, a necessidade de serem ativadas, a conservação de uma sequência específica de aminoácidos entre as enzimas de uma mesma família, e a inibição de sua atividade enzimática por inibidores teciduais endógenos de MMPs (16). As metaloproteinases são classificadas com base em sua estrutura e especificidade em 6 grupos: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9),

estromelisinases (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), transmembranase (MMP-15, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25), matrilisinases (MMP-7, MMP-26), outras (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27, MMP-28) (100).

A remodelação tecidual acontece durante toda a vida e se dá sob condições de pH fisiológico e neutro. Assim, a expressão de MMPs acontece somente quando são necessárias para a remodelação tecidual por meio da degradação da matriz extracelular e é considerada a maior função das MMPs. Entretanto, quando alterações de expressão das MMPs ocorrem, estão associadas a condições patológicas associadas com destruição tecidual como artrite reumatóide, fibroses, úlceras teciduais, periodontite e câncer. A expressão e atividade das MMPs são reguladas por transcrição, secreção, ativação de precursores de zimógenos, interação com componentes específicos da matriz extracelular, e inibição das TIMPs endógenas (16).

Em condições específicas, o colágeno Tipo I da dentina é degradado pelas collagenases MMP-1, MMP-8 e MMP-13. Após a molécula perder a conformação de tripla hélice, a agora gelatina é consumida pelas gelatinases MMP-2 e MMP-9. Os 10% restantes da matriz orgânica dentinária são constituídos pelas proteínas fosforiladas, dentre as quais as mais abundantes são as sialoproteínas e fosfoproteínas que podem formar complexos específicos com diferentes MMPs em suas formas latentes ou ativadas (16). Em princípio acreditava-se que as collagenases bacterianas

fossem responsáveis pela degradação do colágeno quando da invasão do tecido no processo de formação da cárie dental. Mais recentemente, demonstrou-se que a collagenase bacteriana não resiste à queda de pH presente na cárie ativa, sugerindo que a contribuição de tais enzimas na degradação da matriz dentinária não é tão importante (101). Isto implica dizer que enzimas proteolíticas endógenas, tais como as MMPs encontradas na dentina e na saliva, têm um papel mais importante na degradação da matriz dentinária (10,102). Várias MMPs (MMP-1, -2, -3, -8, -9, -20) foram identificadas na dentina humana sadia e na polpa, e sabe-se que as mesmas participam nos estágios iniciais da dentinogênese e no desenvolvimento dos tecidos dentários. Embora tais enzimas tenham papel fundamental na degradação da matriz de colágeno em quadros patológicos, o seu exato papel e envolvimento no processo de cárie e degradação dentinária permanecem obscuros (16).

Sabe-se que as MMPs participam do processo de degradação do colágeno em processos de cárie (11) e na deterioração das interfaces adesivas dentina-resina (8,9,10,101). Paradoxalmente, embora as MMPs sejam ativadas pelo baixo pH, elas não podem degradar a matriz orgânica da dentina em pH ácido. Por isso, durante os períodos de neutralização do pH na cavidade bucal, as áreas de dentina desmineralizada ficam suscetíveis para que as MMPs ativadas pelo baixo pH degradem a matriz orgânica (11). MMP-2, MMP-8, e MMP-9 foram identificadas na dentina amolecida em suas formas ativas e latentes. A MMP-20 também foi encontrada em lesões de cárie, embora nenhuma reatividade tenha sido

detectada (104). A MMP-9, a mais abundante MMP em lesões de cárie e na saliva, parece ser bastante importante no processo da lesão (11). Assim, embora existam várias evidências do papel das MMPs na evolução da lesão de cárie, seu papel na degradação da união adesiva é ainda pouco conhecido, haja vista que nenhum estudo quantificou a atividade de MMPs localmente na interface adesiva.

O envolvimento de MMPs no processo degradativo da adesão foi indiretamente confirmado pela utilização de clorexidina, um potente agente inibidor de MMP-2, -8 e -9 (105). Soluções de clorexidina aplicadas sobre a dentina desmineralizada com ácido fosfórico, e previamente à aplicação do adesivo resultou na preservação da integridade do colágeno dentro da camada híbrida ao longo do tempo (8,9). A demonstração de atividade colagenolítica e gelatinolítica na dentina desmineralizada por cárie ou em procedimentos adesivos são também provas da existência de tais metaloproteinases nesse substrato (13,106). O uso de soluções aquosas de clorexidina como agente de limpeza de cavidades foi proposto com a finalidade de usufruir dos efeitos antibacterianos da solução. Não se imaginava de que a mesma agiria como inibidor de metaloproteinases e, por consequência, atuaria como efetivo meio de manutenção da estabilidade das uniões adesivas à dentina ao longo do tempo. Os primeiros estudos utilizando a clorexidina no procedimento adesivo investigavam seus efeitos sobre a interação resina-dentina e a possibilidade de comprometer a resistência das uniões (17). Os achados de Gendron et al. (105) estimularam pesquisadores a

investigar os benefícios da clorexidina como agente de preservação da união, devido ao seu potencial de inibir a ação das MMPs. Assim, estudos in vitro e in vivo veem demonstrando que a aplicação de clorexidina após o condicionamento ácido e antes da aplicação do adesivo é um procedimento bem sucedido para aumentar a durabilidade da união (8,9,103,107). A inibição da atividade enzimática in situ pela clorexidina na união ainda requer ser demonstrada, mas as evidências indiretas que resultam no aumento da durabilidade da adesão são estimulantes e promissoras. Considerando que a eficiente infiltração da resina adesiva na zona desmineralizada é imprevisível, espera-se que em condições normais de aplicação de sistemas adesivos haja sempre fibrilas de colágeno expostas e sujeitas à ação da MMPs. Portanto, a clorexidina atuaria como mecanismo adicional de proteção da união.

Como vimos anteriormente, a técnica da adesão com etanol tem também se mostrado promissora para produzir união estável, favorecendo a infiltração de resinas hidrófobas na dentina desmineralizada. Isoladamente, tanto o emprego de clorexidina como do etanol se mostram eficientes na obtenção de uniões estáveis à dentina (8,9,72), mas pouco se conhece sobre os potenciais benefícios da combinação de clorexidina com etanol no processo adesivo.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral

Avaliar o efeito da aplicação de soluções aquosa e alcoólica de clorexidina a 1% na estabilidade da resistência de união entre adesivos convencionais simplificados e a dentina.

Objetivos específicos

- testar a hipótese nula de que não há influência da clorexidina sobre os valores de resistência da união para os sistemas adesivos em estudo;
- testar a hipótese nula de que não há influência do tipo de veículo da solução de clorexidina nos valores de resistência da união para os sistemas adesivos em estudo;
- testar a hipótese nula de que não há influência da armazenagem sobre os valores de resistência da união para os sistemas adesivos em estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Preparo dos dentes

Quarenta e oito terceiros molares humanos livres de cárie e estocados em solução salina a 0,1% de timol, sob refrigeração a 4°C, foram utilizados para este estudo. O desenho experimental do estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, nº. 164/07 (Anexo A).

Uma superfície plana de dentina foi criada pela remoção do esmalte oclusal com disco de diamante montado em máquina para corte (Isomet 1000 Precision Saw, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA, modelo #112160, série # 633-IPS02841) em baixa rotação sob refrigeração com água, para expor a dentina coronária mediana (figura 4.1). A superfície foi alisada em polidor (Ecomet 3000, Buehler Ltd., Lakebuff, IL, USA, modelo # 491769, serie # 629-EPN-00541) com lixas de carbeto de silício 320 e 600 a 250 rpm, com o intuito de criar uma lama dentinária padronizada para todos os grupos (figura 4.2). Quando do uso da lixa 600, um tempo de polimento de 30 segundos foi estabelecido como forma de padronização. A amostra foi dividida em 8 grupos aleatoriamente, contendo 6 dentes em cada grupo (N=6).

Os fatores em estudo constituíram-se de 2 sistemas adesivos, com condicionamento total, simplificados, a base de etanol, All Bond 3 (Bisco Inc. Schaumburg, IL, USA) e Excite (Ivoclar Vivadent, Lietchtenstein) e quatro soluções para tratamento da superfície: solução aquosa de diacetato de clorexidina a 1%; diacetato de clorexidina a 1% em etanol anidro; água e etanol anidro. Os sistemas adesivos selecionados representam sistemas que utilizam etanol como solvente, mas que não contêm água na formulação (tabela 4.1). Para cada combinação de fatores em estudo, ou seja, adesivo/solução, três tempos de armazenagem em água foram comparados, 24 horas, 6 meses e 15 meses.

Preparo das soluções de clorexidina

Diacetato de clorexidina monohidratada (Acros Organics, Fisher Scientific) foi utilizada para o preparo das soluções experimentais de clorexidina. 1% de diacetato de clorexidina, por peso, foi gradualmente incorporado em água destilada ou etanol anidro (Mettler Toledo, XP504 Delta Range) em bequer de vidro colocado sobre agitador magnético (Scholar 171, Corning, série # 043106306500). As soluções foram preparadas em um único lote, mantidas no refrigerador e utilizadas durante todo o experimento.

Tabela 4.1 – Nome comercial do material, fabricante, composição e número de lote dos materiais utilizados

Material	Fabricante	Composição química	Lote
Uni-etch 32% BAC	<i>Bisco Inc.</i>	Ácido fosfórico 32% com cloreto de benzalcônio	0700006350
All Bond 3	<i>Bisco Inc.</i>	PARTE A: etanol, MgNTG-GMA (Magnésio Nitro-triglicil glicidil metacrilato)	0700005251
		PARTE B: Bis-GMA (Bisfenol A – diglicidil, ester dimetacrilato); BPDM (bisfenil, dimetacrilato); HEMA (2-hidroxietil metacrilato); fotoiniciador, estabilizador	0700005255
Excite	<i>Ivoclar Vivadent</i>	Etanol, HEMA (2-hidroxietil metacrilato); acrilato de ácido fosfônico, dimetacrilato, sílica, partículas de carga, fotoiniciador, estabilizador	J25791
Aelite All Purpose Body	<i>Bisco Inc.</i>	Bis-GMAE (Bisfenol A etoxilado – diglicidil, ester dimetacrilato); TEGDMA: tri-etilenoglicol, dimetacrilato	0700005779
			0700005705
			0700005135
			0800001576

Não foi observada precipitação de clorexidina na concentração de 1%, tanto em solução alcoólica quanto aquosa. O pH das soluções foi verificado (Mettler Toledo, SevenMulti, pH mV/ORP, Schwerzenbach, Switzerland, série # 1227337250) e os valores encontrados foram de 7,5 e 9,1 para as soluções de água e etanol, respectivamente. As soluções não foram ajustadas para o pH neutro antes do uso.

Procedimentos adesivos

Os dentes preparados foram condicionados com ácido fosfórico a 32% (Uni-etch BAC 32%, Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) por 15 segundos (figura 4.3), lavados com água abundante por 15 segundos e mantidos úmidos até o procedimento de adesão. Antes que as soluções de tratamento fossem aplicadas à superfície dentinária, o excesso de água era removido com o auxílio de papel absorvente. Assim, a superfície era mantida levemente úmida, mas sem excesso de água. Em seguida, uma das quatro soluções era aplicada e mantida na superfície por 30 segundos (figura 4.4). Se houvesse evaporação da solução antes de terminado o tempo, a solução era prontamente reaplicada. Ao final dos 30 segundos, qualquer excesso da solução que pudesse estar presente na superfície era removido com o auxílio de um papel absorvente (figura 4.5 e figura 4.6). Em seguida, um dos dois sistemas adesivos em estudo era imediatamente aplicado ativamente à superfície por aproximadamente 10 segundos (figura 4.7), levemente seco com um jato de ar para facilitar a evaporação do solvente por 15 segundos, e fotoativado a 500mW/cm^2 (OptiLux 501, SDS KERR, Middleton, WI, USA, série # 58140720, modelo VCL 501) por 20 segundos (figura 4.8). Após a adesão, a superfície de dentina recebia 4 camadas de resina composta (figura 4.9) ativada por luz Aelite All Purpose Body (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) a fim de formar uma coroa de aproximadamente 4mm de altura (figura 4.10). A cada incremento de

1mm a resina era ativada por 40 segundos (OptiLux 501, SDS KERR, Middleton, WI, USA, série # 58140720, modelo VCL 501).

Preparo dos corpos de prova para teste de microtração e armazenagem

Os dentes preparados foram armazenados em água destilada a 37°C por 24 horas. Após este período foram seccionados perpendicularmente à interface adesiva (figura 4.11) usando um disco de diamante (Isomet 1000 Precision Saw, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA, model #112160, serial # 633-IPS02841) a fim de obter corpos de prova (cp) na forma de paralelogramo (palitos retangulares) com aproximadamente 0,8mm² de área (figura 4.12). Um terço dos palitos foi separado aleatoriamente e testado logo após o corte. O restante foi mantido em um frasco transparente com água destilada (pH=7) a 37°C. A água de armazenagem dos palitos foi trocada mensalmente (108) como um modelo para representar o envelhecimento acelerado (109). Não foram utilizados preservativos e antibacterianos na água de armazenagem. A cada período de teste, outro terço dos palitos era aleatoriamente removido da armazenagem e ensaiado como descrito a seguir.

Teste de microtração

Os cp eram montados num dispositivo para teste de microtração com cola de cianoacrilato e tensionados em máquina para ensaios de microtração (Microtensile Tester machine, Bisco Inc., Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) até a fratura, na velocidade de 1 mm/min. A área da fratura era medida com o auxílio de um paquímetro digital (Fisher Scientific) e utilizada para o cálculo da resistência média de união que foi expressa em MPa. Os modos de fratura foram avaliados sob microscópio óptico (Olympus, Tokyo, Japan) e classificados como coesiva quando exclusivamente em dentina ou resina, adesiva quando ocorria na interface, e mista quando o plano de fratura determinava a existência de ambos os modos anteriores, ou seja, coesiva e adesiva.

Análise estatística

Cada dente teve sua média de resistência calculada separadamente entre os cp testados por período de tempo. As médias calculadas dos 6 dentes testados por condição experimental foram usadas para obter as médias para cada tempo e em cada um dos 8 grupos. Falhas prematuras durante o preparo dos cp para o teste de microtração não foram observadas durante todo o estudo.

A análise de variância (ANOVA) a dois critérios foi utilizada para comparar valores de resistência adesiva à microtração para cada adesivo, adotando $\alpha = 5\%$. Os fatores em análise foram: efeitos dos tratamentos em quatro níveis; efeitos do tempo de armazenagem em três níveis (SigmaPlot 11, Systat Software Inc.). A análise das médias de Qui-quadrado foi utilizada e as variâncias foram dadas em erro padrão ao invés de desvio padrão (72). Comparações post hoc foram realizadas pelo método de Holm-Sidak.

Figura 4.1 – Corte transversal da remoção da metade oclusal da coroa

Figura 4.2 – Superfície dentinária sem esmalte remanescente e polida

Figura 4.3 – Condicionamento com ácido fosfórico 32% por 15 s

Figura 4.4 – Solução de tratamento deixada na dentina por 30 s

Figura 4.5 – Absorção do excesso de solução com lenço de papel

Figura 4.6 – Aspecto da superfície previamente à aplicação do adesivo

Figura 4.7 – Aplicação do adesivo com agitação por 15 s

Figura 4.8 – Adesivo aplicado, e polimerizado

Figura 4.9 – Construção da coroa em resina composta em 4 incrementos

Figura 4.10 – Coroa de resina finalizada, previamente à armazenagem

Figura 4.11 – Cortes transversais após a armazenagem por 24 horas

Figura 4.12 – Paralelogramos para teste imediato ou armazenagem

5 RESULTADOS

Os dados gerais e respectivas notações estatísticas estão descritos na tabela 5.1.

Para o All Bond 3, somente se observou influência significativa do tempo de armazenagem nos valores de resistência da união. Não houve influência significativa do tipo de tratamento e nem das interações entre os fatores. A análise de variância a 2 critérios para o All Bond 3 encontra-se descrita na tabela 5.2. Os tratamentos aplicados à dentina antes da aplicação do sistema All Bond 3 não exerceram nenhuma influência nos valores de resistência da união, sugerindo que não houve benefícios evidentes da aplicação da técnica da adesão com etanol ou da clorexidina, quer sejam isoladamente ou combinados. Os valores obtidos após 6 meses de armazenagem foram estatisticamente semelhantes aos valores iniciais de 24 horas, sugerindo estabilidade da união dentro desse período, independente do tratamento experimental empregado. Após 15 meses de armazenagem, entretanto, observou-se uma redução significativa da resistência da união no grupo tratado pela técnica da adesão com etanol e no grupo que recebeu a combinação do etanol com clorexidina, ambos quando comparados com os valores iniciais de 24 horas.

Para o Excite, somente se observou influência significativa do tipo de tratamento nos valores de resistência da união. Não houve influência significativa do tempo de armazenagem e nem das interações entre os fatores. A análise de variância a 2 critérios para o Excite encontra-se descrita na tabela 5.3. Observou-se que o grupo tratado com a combinação de etanol com clorexidina sempre resultou em maiores valores de resistência da união, sendo esta significativa, porém, somente para as médias obtidas após 6 meses de armazenagem em comparação com o grupo tratado com a solução de clorexidina e água. Em todos os outros períodos, os diferentes tratamentos não exerceram influência estatisticamente significativa na resistência da união. A armazenagem não exerceu influência significativa na resistência da união para todos os tipos de tratamentos, em qualquer tempo, sugerindo estabilidade da união ao longo de todo o experimento para esse material.

Neste estudo não houve fratura prematura dos cp durante o corte ou durante qualquer manobra operacional de manuseio ou estocagem. Todos os palitos obtidos pelo corte transversal das coroas foram empregados na análise dos dados, com exceção daqueles que apresentavam remanescentes de esmalte periférico, os quais foram excluídos da amostra. Os modos de fratura encontram-se representados nas figuras 5.1 a 5.3 para o All Bond 3 e figuras 5.4 a 5.6 para o Excite. De maneira geral, observou-se todos os modos de fraturas em todos os grupos em estudo, com exceção do grupo do Excite que recebeu o tratamento com solução de clorexidina em etanol testado após 6 meses de armazenagem,

o qual não apresentou fratura do tipo adesiva; e do grupo controle (água) do mesmo material testado após 15 meses, o qual não apresentou fratura coesiva em resina. O modo de fratura não aparentou seguir nenhuma tendência característica em função do tipo de tratamento ou do período de armazenagem, variando amplamente com as variáveis em estudo. Digno de nota talvez tenha sido a não observação, em geral, de alta frequência de fraturas mistas. A frequência relativamente alta de fraturas coesivas de resina e dentina também é um achado destacável.

Tabela 5.1 – Valores médios da resistência de união ($\pm$ desvios padrões) expressos em MPa, para os adesivos All Bond 3 e Excite, considerando os tratamentos e os tempos de armazenagem

TRATAMENTOS DENTINÁRIOS	ALL BOND 3			EXCITE		
	24 horas	6 meses	15 meses	24 horas	6 meses	15 meses
ÁGUA	51,07 $\pm$ 3,6 ^{A,a}	57,13 $\pm$ 3,6 ^{A,a}	47,29 $\pm$ 4,4 ^{A,a}	49,51 $\pm$ 5,4 ^{A,a}	42,10 $\pm$ 5,4 ^{A,B,a}	45,51 $\pm$ 6,6 ^{A,a}
CLOREXIDINA/ÁGUA	46,96 $\pm$ 3,6 ^{A,a}	50,69 $\pm$ 3,6 ^{A,a}	46,07 $\pm$ 4,4 ^{A,a}	40,05 $\pm$ 5,4 ^{A,a}	36,78 $\pm$ 5,4 ^{B,a}	40,87 $\pm$ 6,6 ^{A,a}
ETANOL	59,41 $\pm$ 3,6 ^{A,a}	56,41 $\pm$ 3,6 ^{A,a,b}	44,41 $\pm$ 4,4 ^{A,b}	49,67 $\pm$ 5,4 ^{A,a}	44,56 $\pm$ 5,4 ^{A,B,a}	42,48 $\pm$ 5,4 ^{A,a}
CLOREXIDINA/ETANOL	54,67 $\pm$ 3,6 ^{A,a}	52,17 $\pm$ 3,6 ^{A,a,b}	39,58 $\pm$ 4,4 ^{A,b}	53,37 $\pm$ 5,4 ^{A,a}	57,47 $\pm$ 5,4 ^{A,a}	49,55 $\pm$ 6,6 ^{A,a}

Valores identificados com diferentes letras superescritas para cada sistema adesivo são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos e letras minúsculas comparam tempos de armazenagem.

Tabela 5.2 – Análise de variância a 2 critérios para o adesivo All Bond 3

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P*
Tratamento	3	306,279	102,093	1,281	0,291
Tempo	2	1035,159	517,579	6,495	0,003*
Interação	6	446,042	74,340	0,933	0,480
Resíduo	52	4143,934	79,691		
Total	63	6001,082	95,255		

* Indica influência estatisticamente significativa

Tabela 5.3 – Análise de variância a 2 critérios para o adesivo Excite

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P*
Tratamento	3	1570,516	523,505	2,934	0,042*
Tempo	2	158,383	79,191	0,444	0,644
Interação	6	362,868	60,478	0,339	0,913
Resíduo	54	9634,352	178,414		
Total	65	11961,404	184,022		

* Indica influência estatisticamente significativa

Figura 5.1 –Distribuição percentual dos modos de fratura do adesivo All Bond 3 testado em 24 horas

Figura 5.2 –Distribuição percentual dos modos de fratura do adesivo All Bond 3 testado após 6 meses

Figura 5.3 –Distribuição percentual dos modos de fratura do adesivo All Bond 3 testado após 15 meses

Figura 5.4 –Distribuição percentual dos modos de fratura do adesivo Excite testado em 24 horas

Figura 5.5 –Distribuição percentual dos modos de fratura do adesivo Excite testado após 6 meses

Figura 5.6 –Distribuição percentual dos modos de fratura do adesivo Excite testado após 15 meses

6 DISCUSSÃO

A alta demanda por restaurações estéticas em odontologia resultou em aumento significativo do uso de técnicas adesivas para permitir a adesão do material aos tecidos dentários. Embora restaurações adesivas apresentem vantagens na redução da quantidade de estrutura sadia que tenha que ser removida para se obter retenção em restaurações não adesivas, estudos clínicos têm idemonstrado que restaurações adesivas falham devido a consequências da perda da adesão na união com o dente (110). As consequências da perda da adesão podem ser traduzidas para a clínica como fendas marginais, infiltração e cárie secundária (110). Quando uma restauração falha e tem que ser substituída, geralmente há mais desgaste de estrutura dentária, aumento da cavidade e a necessidade de procedimentos restauradores corretivos mais complexos e onerosos. Ainda, se a restauração substituta for adesiva, estabelecem-se novamente os riscos de falhas devido à imprevisibilidade de sucesso dos procedimentos adesivos. Um dado recente reporta que cerca de 122 milhões de restaurações de resina composta foram executadas por clínicos privados nos EUA no ano de 2006 (111). Outra informação indica que cerca de 60—70% dessas restaurações representam procedimentos de substituição de restaurações anteriores (112). Ainda que não tenham sido encontrados dados similares sobre a situação no Brasil, estima-se que o

quadro de reposições de restaurações seja semelhante. Dessa maneira, o desafio do tratamento restaurador continua sendo o de prolongar a durabilidade das restaurações por estratégias que ampliem a estabilidade da união entre o material restaurador e a estrutura dentária. Enquanto a adesão ao esmalte é considerada um procedimento duradouro e confiável, a adesão à dentina com a mesma confiabilidade ainda não foi obtida (113). Vários estudos *in vitro* estabeleceram que a união resina-dentina falha devido à degradação de um ou de ambos principais componentes da zona hibridizada, quais sejam colágeno e resina adesiva (113,114,115). A degradação desses componentes é favorecida pela dificuldade de infiltração da resina adesiva (50-53) que resulta na permanência de colágeno exposto, o qual é degradado pela ação das metaloproteinases endógenas da dentina (10). Por sua vez, o próprio adesivo sofre hidrólise ao longo do tempo, decorrente das suas intrínsecas características hidrófilas (3,43,82). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram com sucesso que o emprego da clorexidina durante os procedimentos adesivos foi capaz de preservar a estabilidade da união resina-dentina por tempos prolongados, provavelmente pela inibição da atividade das MMPs na interface (8,9,107). Por outro lado, sabe-se que adesivos hidrófobos são mais estáveis química e mecânicamente (3), entretanto, estes são incompatíveis com a natureza úmida da dentina (3). Esse problema foi contornado pelo desenvolvimento da técnica de adesão com etanol (1,7), a qual permitiu, com sucesso, a obtenção de altos valores de resistência da união quando resinas adesivas hidrófobas foram aplicadas sobre a

dentina saturada com etanol ao invés de água (1,6,7). Demonstrou-se ainda que essa técnica favorece a qualidade de infiltração de resinas hidrofóbicas na matriz de dentina desmineralizada (71) e produz adesões estáveis à dentina (72).

Considerando que a adesão com etanol e o emprego da clorexidina produziram resultados favoráveis para o aumento da qualidade e durabilidade da união à dentina, este estudo procurou investigar o potencial benefício da associação das duas estratégias para o mesmo benefício. Com base na literatura consultada, os estudos de adesão e durabilidade realizados com a técnica do etanol foram realizados com resinas adesivas experimentais (1,7,72), em sua maioria empregando tempos de tratamento que não se aplicam na clínica. Os adesivos para este experimento foram selecionados com base nas suas formulações, as quais não contêm água e possuem o etanol como solvente. Adicionalmente, ambos são representantes da categoria de condicionamento ácido total (convencionais), os quais são apontados como responsáveis pela ativação de MMPs dentinárias (116). Esses fatores combinados permitiriam investigar o papel da clorexidina e/ou etanol como potenciais soluções de pré-tratamento para o uso com os adesivos selecionados.

O desenho experimental adotou a distribuição simples de grupos, estabelecendo o uso das soluções puras como veículo (água e etanol) e das mesmas com a adição de clorexidina. Assim, os efeitos da clorexidina poderiam ser avaliados diretamente contra seu respectivo grupo de

veículo em que ela estava ausente. Os efeitos do etanol isoladamente poderiam ser comparados com o grupo que empregou água e, fortuitamente, o grupo da água serviria como controle geral, haja vista que é a técnica usualmente empregada com esses adesivos.

De uma maneira geral, os resultados deste experimento podem ser considerados inconclusivos sob o aspecto de que não houve uma clara evidência de superioridade de nenhum grupo. Embora a estabilidade dos grupos experimentais fosse esperada em função de relatos prévios da literatura à respeito do papel da clorexidina (8,9,107) e do possível efeito do etanol (72), a estabilidade do grupo controle após 15 meses foi um dado incomum para este tipo de estudo. A resistência de união do All Bond 3 não foi afetada por nenhum tratamento, e esse resultado se manteve após os períodos de armazenagem de 6 e 15 meses. Considerando sob o aspecto de viabilidade das técnicas, pode-se assumir que todas são aplicáveis em combinação com o adesivo All Bond 3. Observou-se ainda que não houve alteração da resistência adesiva após 6 meses de armazenagem, sugerindo estabilidade das uniões para todas as formas de tratamento nesse período. Aos 15 meses, entretanto, houve uma redução significativa da resistência adesiva para os grupos tratados com etanol, com e sem combinação com a clorexidina. Esse achado foi inesperado e não encontra suporte na literatura pertinente. O fato de que os grupos de água e clorexidina e água se mantiveram estáveis após o mesmo período sugere que o etanol, e não a clorexidina, possa ser o elemento responsável por essa redução em períodos mais prolongados de

armazenagem. O sistema All Bond 3 contém perto de 49% de etanol após a mistura dos *primers* A e B (informação do fabricante). Em uma superfície já saturada com etanol é possível que os monômeros tenham sido demasiadamente diluídos e, de alguma forma, houve comprometimento cujos efeitos se manifestaram em períodos mais tardios. Alguns estudos demonstram que a presença de etanol em pequenas concentrações favorece a polimerização de resinas adesivas, mas concentrações acima de 30% podem comprometer de modo significativo a polimerização de adesivos (66,68). É possível que a polimerização do All Bond 3 tenha sido comprometida pelo excesso de etanol, o que determinou uma lenta, mas detectável degradação da interface ao longo de 15 meses de armazenagem. Como a degradação nesse caso ocorreu por uma provável deficiência na qualidade final do polímero adesivo obtido, e da consequente redução das propriedades mecânicas do mesmo pela hidrólise após 15 meses, algum eventual benefício da clorexidina foi ineficaz ou não detectado. O fato de que não foram observadas diferenças entre os grupos água e clorexidina com água sugere que a clorexidina não exerceu nenhum efeito positivo sobre a estabilidade da adesão para o adesivo All Bond 3.

Contrariamente ao All Bond 3, a análise estatística demonstrou que a resistência da união do Excite foi significativamente afetada pelo tipo de tratamento experimental recebido. Essa diferença ocorreu somente entre os grupos etanol com clorexidina e água com clorexidina para o período de 6 meses. Os valores de resistência do Excite tratado com clorexidina e

água foram sempre os menores nos três períodos de armazenagem avaliados. Talvez a combinação de clorexidina com água tenha de alguma forma comprometido a adequada interação do Excite com a superfície da dentina. O diacetato de clorexidina pode se adsorver na superfície da dentina¹, o que seria desejável sob o aspecto de proteção prolongada. Entretanto, a adsorção de clorexidina ao colágeno exposto pode alterar as características de molhamento superficial, fato que pode ter sido desfavorável para o adesivo Excite. Como essa hipótese não se repetiu para o grupo do etanol com clorexidina, resultando na verdade em um relativo aumento da adesão, é provável que o etanol como solvente tenha sido fundamental para eliminar o possível efeito negativo da clorexidina adsorvida. Ainda que, em comparação, os valores possam sugerir que a aplicação de uma solução de água com clorexidina antes da aplicação do sistema Excite resulte em valores de resistência de união significativamente menores após 6 meses, prefere-se concluir que a diferença estatística observada neste período seja somente circunstancial, devido aos valores relativamente muito altos do grupo etanol clorexidina. Prefere-se ainda considerar que a combinação do etanol com clorexidina se mostrou promissora para uso com o sistema Excite. O mesmo fenômeno ocorrido com o All Bond 3 não seria esperado para o Excite,

¹ Comunicação feita pelo Dr. David Pashley no Medical College of Georgia, setembro de 2009.

pois este contém menos do que 20% de etanol em sua composição², reduzindo a possibilidade de supersaturação nos grupos tratados com etanol. Independentemente do tipo de tratamento, a resistência com o Excite se mostrou estável ao longo dos 15 meses de armazenagem. Embora esse achado impeça qualquer conclusão favorável sobre potenciais benefícios da técnica do etanol, clorexidina ou combinação de ambos na durabilidade da adesão, os dados são animadores no contexto que demonstram a possibilidade de se produzir uniões estáveis à dentina. Baseado em estudos que demonstram reduções significantes de adesão em curto período de tempo (109,117), poderia-se esperar que o mesmo ocorresse com o grupo controle (água) ao longo dos 15 meses. Entretanto, os achados demonstraram que as uniões foram estáveis para esse grupo, mesmo considerando que os cp foram armazenados já em palitos (109) e que a solução de armazenagem foi trocada rotineiramente como forma de acelerar a degradação (108). Estes achados concordam com estudo prévio (115) o qual demonstrou estabilidade de união em 3 meses, empregando outros adesivos, mas o mesmo protocolo de armazenagem. As razões para a estabilidade do grupo controle podem ser diversas. Os adesivos neste estudo foram aplicados empregando-se uma técnica ativa, esfregando levemente o material sobre a superfície. Estudos anteriores demonstraram que essa forma de aplicação de adesivos aumenta a resistência de união inicial (118,119) e resulta em uniões

²IvoclarVivadent

http://www.ivoclarvivadent.us/content/products/detail.aspx?id=prd_t1_1485205951&product=ExcITE

estáveis após 6 meses de armazenagem (120). Adicionalmente, a técnica pode favorecer a evaporação do solvente residual e otimizar a polimerização do adesivo (70, 121), reduzindo sua suscetibilidade à degradação.

Este estudo confirmou que a técnica da adesão com etanol é promissora com relação à produção de uniões estáveis com a dentina. Ainda que o fato já tenha sido previamente reportado (7,72) empregando resinas experimentais, este estudo que reporta sucesso da técnica empregando adesivos comercialmente disponíveis e no qual o tempo de aplicação das soluções (30s) é aceitável na clínica. O sucesso da técnica do etanol pôde ser observado mesmo sem a adição da clorexidina. Isso sugere que algum mecanismo ainda desconhecido possa estar envolvido na capacidade do etanol preservar a adesão. É possível que a adesão com etanol resulte em uma infiltração da resina mais eficiente, permitindo adequado encapsulamento do colágeno e consequente proteção do mesmo contra a ação das MMPs (71). Ainda como visto, resíduos de etanol na interface adesiva aumentam a polimerização do adesivo o que os torna polímeros mais estáveis (93).

A clorexidina pareceu não exercer um evidente benefício para a durabilidade da adesão neste estudo com os dois adesivos testados. O potencial efeito da clorexidina como inibidor da MMPs e consequente preservação de uniões adesivas está descrito na literatura (8,9,107). Esses estudos, entretanto, empregaram o digluconato de clorexidina em várias concentrações aquosas. Neste estudo, o diacetato de clorexidina foi

escolhido para que fosse possível preparar a solução com o etanol. O diacetato de clorexidina é fornecido na forma de pó, enquanto que o digluconato é adquirido já em solução aquosa, impedindo a formulação de soluções anidras com etanol. Vários estudos propuseram o uso do diacetato de clorexidina como potencial agente bioativo para ser incorporado a: resinas compostas, cimentos de ionômero de vidro, adesivos e cimentos temporários (122,123,124,125). Os achados do presente estudo suportam que o diacetato de clorexidina é uma opção viável para ser empregado na técnica de adesão à dentina, quer seja em combinação com água ou etanol, haja vista que não houve comprometimento da adesão inicial e nem nos períodos tardios de avaliação.

Um estudo recente (126) mostrou estabilidade da união quando a clorexidina foi empregada, tanto em solução aquosa quanto em etanol. O presente estudo também demonstrou estabilidade da adesão quando a clorexidina foi empregada, entretanto, não foi capaz de demonstrar um evidente benefício do uso da mesma em nenhuma das soluções. No estudo citado (126), houve significativa redução da resistência de união nos grupos controles, fato não observado neste estudo. A estabilidade observada no grupo controle do presente estudo, água sem clorexidina, não era esperada, mas encontra explicações no possível efeito de outros agentes que possam atuar como inibidores de MMPs. Este estudo empregou um condicionador de ácido fosfórico que contém cloreto de benzalcônio (Benzalconium chloride, BAC). Segundo o fabricante, a

concentração de BAC no condicionador é cerca de 0,5-1,0%, e o aditivo é empregado com a finalidade de conferir uma ação antibacteriana ao produto. O que não se aventava, porém, é o fato de que o BAC possui ação inibidora de MMPs. Em alguns estudos preliminares (Manso AP, Agee K, Pashley DH, Carvalho RM, 2009; dados não divulgados) foi demonstrado que soluções de BAC variando de 1 a 20% possuem significativo efeito inibidor da MMP-9. Este achado recente pode ser um coadjuvante na determinação da estabilidade do grupo controle, assim como em todos os grupos em estudo. Pouco se sabe ainda sobre os mecanismos antienzimáticos do BAC e sobre sua capacidade de adsorção na superfície da dentina quando empregado em um gel de ácido fosfórico, como neste estudo. Investigações nesse sentido encontram-se atualmente em curso para esclarecer essas questões.

A análise geral dos modos de fratura não revelou maior ou menor frequência de um determinado modo para nenhum grupo estudado, tampouco evidenciou alguma relação clara de modo de fratura com tratamento ou tempo de armazenagem. Com poucas exceções, observaram-se sempre os 4 tipos de fratura em todos os grupos estudados, distribuídas de forma aleatória. Notou-se que houve uma relativa alta frequência de fraturas coesivas de dentina e resina em vários grupos, achado não comum em estudos da mesma natureza. Todos os grupos em estudo resultaram em valores relativamente altos de resistência de união, o que pode ter aumentado a probabilidade de fraturas dos substratos aderidos.

7 CONCLUSÕES

- Não houve influência da clorexidina sobre os valores da resistência de união para ambos os sistemas adesivos testados.
- Não houve influência do tipo de veículo da solução de clorexidina sobre os valores de resistência de união para ambos os sistemas adesivos testados.
- Houve influência da armazenagem sobre os valores de resistência de união do sistema All Bond 3 quando empregado com as soluções de etanol e combinação de etanol com clorexidina.

REFERÊNCIAS¹

1. Pashley DH, Tay RF, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee K, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent* 2007; 20(1): 7-20.
2. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interfaces using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res* 2002 Jan; 59(1): 46-55.
3. Tay FR, Pashley DH. Have the adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc* 2003; 69(11): 726-31.
4. Yiu CKY, Pashley EL, Hiraishi N, King NM, Goracci C, Ferrari M, et al. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. *Biomaterials* 2005; 26: 6863-72.
5. Becker TD, Agee KA, Joyce AP, Rueggeberg FA, Borke JL, Waller JL, et al. Infiltration/evaporation-induced shrinkage of demineralized dentin by solvated model adhesives. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 80: 156-65.
6. Nishitani Y, Yoshiyama M, Donnelly AM, Agee KA, Sword J, Tay FR, et al. Effects of resin hydrophilicity on dentin bond strength. *J Dent Res* 2006; 85: 1016-21.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

7. Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho M, Donnelly A, Ferrari M, et al. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res A* 2008;84A: 19-29.
8. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005;84(8):741-6.
9. Carrilho MR, Geraldini S, Tay FR, De Goes M, Carvalho RM, Tjaderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007;86(6):529-33.
10. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83(3):216-21.
11. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998;77(8):1622-9.
12. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol* 2007;52(2):121-7.
13. Nishitani Y, Yoshiama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006;114:160-6.
14. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res* 2007;86(5):436-40. Erratum in: *J Dent Res* 2007;86(8):792.

15. Martin de las-Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 757-65.
16. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res* 2006; 85(1): 22-32.
17. de Castro FL, de Andrade MF, Duarte Júnior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent* 2003; 5(2): 129-38.
18. Mjor IA. *Histology of the human tooth*. Copenhagen: Munksgaard, Scandinavian University Books; 1973.
19. Brännstrom M, Asrtrom A. The hydrodynamic theory of dentinal pain: Sensation in preparations, caries and the dentinal crack syndrome. *J Endod* 1986; 12(10): 453-7.
20. Carvalho RM, Yoshiyama M, Pashley EL, Pashley DH. In vitro study on the dimensional changes of dentine after demineralization. *Arch Oral Biol* 1994; 41(4): 369-377.
21. Nakabayashi N, Pashley DH. *Hybridization of dental hard tissue*. Tokyo: Quintessence; 1998.
22. Garberoglio R, Brännstrom M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Archs Oral Biol* 1976; 21(6): 355-62.
23. Giannini M, Carvalho RM, Martins LRM, Dias CTS, Pashley DH. The influence of tubule density and area of solid dentin on bond strength of two adhesives to dentin. *J Adhes Dent* 2001; 3: 315-24.

24. Pashley DH, Carvalho RM. Dentin permeability and dentine adhesion. *J Dent* 1997; 25(5): 355-72.
25. Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent* 1997; 25(6): 441-58.
26. Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, et al. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res* 1999; 78(4): 906-11.
27. Carvalho RM, Fernandes CA, Villanueva R, Wang L, Pashley DH. Tensile strength of human dentin as a function of tubule orientation and density. *J Adhes Dent* 2001; 3(4): 309-14.
28. Nakajima M, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Yoshiyama M, Ebisu S, et al. Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesives. *J Dent Res* 1995; 74(10): 1679-88.
29. Yoshiyama M, Sano H, Ebisu S, Tagami J, Ciucchi B, Carvalho RM, et al. Regional strengths of bonding agents to cervical sclerotic root dentin. *J Dent Res* 1996; 75(6): 1404-13.
30. Maciel KT, Carvalho RM, Ringle RD, Preston CD, Russell CM, Pashley DH. The effects of acetone, ethanol, HEMA, and air on the stiffness of human decalcified dentin matrix. *J Dent Res* 1996; 75(11): 1851-8.
31. Pashley DH, Zhang Y, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Russell CM. H⁺-induced tension development in demineralized dentin matrix. *J Dent Res* 2000; 79(8): 1579-83.
32. Butler WT. Matrix macromolecules of bone and dentin. *Coll Relat Res* 1984; 4(4): 297-307.

33. Grant ME, Prockop DJ. The biosynthesis of collagen. 1. N Engl J Med 1972; 286(4): 194-9.
34. Garcia FCP, Otsuki M, Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM. Effects of solvents on the early stage stiffening rate of demineralized dentin matrix. J Dent 2005; 33(5): 371-7.
35. Pashley DH, Agee KA, Carvalho RM, Lee K-W, Tay FR, Callison TE. Effects of water and water-free polar solvents on the tensile properties of demineralized dentin. Dent Mater 2003; 19(5): 347-52.
36. Eddleston CL, Hindle AR, Agee KA, Carvalho RM, Tay FR, Rueggeberg FA, et al. Dimensional changes in acid-demineralized dentin matrices following the use of HEMA-water versus HEMA-alcohol primers. J Biomed Mater Res A 2003; 67(3): 900-7.
37. Veis A, Schlueter RJ. The macromolecular organization of dentine matrix collagen. Biochemistry 1964; 3: 1650-7.
38. Carvalho RM, Tay F, Sano H, Yoshiyama M, Pashley DH. Long-term mechanical properties of EDTA-demineralized dentin matrix. J Adhes Dent 2000; 2(3): 193-9.
39. Carvalho RM, Yoshiyama M, Pashley EL, Pashley DH. In vitro study on the dimensional changes of human dentine after demineralization. Arch Oral Biol 1996; 41(4): 369-77.
40. Cribb AM, Scott JE. Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen: proteoglycan interactions in stressed tendon. J Anat 1995; 187: 423-8.
41. Lindén LA, Källskog O, Wolgast M. Human dentine as a hydrogel. Arch Oral Biol 1995; 40(11): 991-1004.

42. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 1955;34(6):849-53.
43. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M. Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008;24(1):90-101.
44. Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Itou K, et al. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. *J Dent Res* 2002;81(8):556-60.
45. Yoshiyama M, Doi J, Nishitani Y, Itota T, Tay FR, Carvalho RM, et al. Bonding ability of adhesive resins to caries-affected and caries-infected dentin. *J Appl Oral Sci* 2004;12:171-6.
46. Buonocore M, Wileman W, Brudevold F. A report on a resin composition capable of bonding to human dentin surfaces. *J Dent Res* 1956;35(6):846-51.
47. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982;16(3):265-73.
48. Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. *J Dent Res* 1992;71(8):1530-40.
49. Van Meerbeek B, Dhem A, Goret-Nicaise M, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. *J Dent Res* 1993;72(2):495-501.
50. Carvalho RM, Yoshiyama M, Horner JA, Pashley DH. Bonding mechanisms of Variglass to dentin. *Am J Dent* 1995;8:253-8.

51. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res* 2003;82(2):141-5.
52. Wang Y, Spencer P, Yao X. Micro-Raman imaging analysis of monomer/mineral distribution in intertubular region of adhesive/dentin interfaces. *J Biomed Opt* 2006;11(2):024005.
53. Spencer P, Wang Y, Katz JL. Identification of collagen encapsulation at the dentin/adhesive interface. *J Adhes Dent* 2004;6(2):91-5.
54. Wang Y, Spencer P. Physiochemical interactions at the interfaces between self-etch adhesive systems and dentine. *J Dent* 2004;32(7):567-79.
55. Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials* 2005;26(9):1035-42.
56. Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int* 1993;24:618-31.
57. Hansen CM. The universality of the solubility parameter. *Indust Eng Chem Prod Res Dev* 1969;8:2-11.
58. Miller RG, Bowles CQ, Chappelow CC, Eick JD. Application of solubility parameter theory to dentin-bonding systems and adhesive strength correlations. *J Biomed Mater Res* 1998;41(2):237-43.
59. Pashley DH, Agee KA, Nakajima M, Tay FR, Carvalho RM, Terada RS, et al. Solvent-induced dimensional changes in EDTA-demineralized dentin matrix. *J Biomed Mater Res* 2001;56(2):273-81.

60. Pashley DH, Carvalho RM, Tay FR, Agee KA, Lee K-W. Solvation of dried dentin matrix by water and other polar solvents. *Am J Dent* 2002; 15(2):97-102.
61. Agee KA, Becker TD, Joyce AP, Rueggeberg FA, Borke JL, Waller JL, et al. Net expansion of dried demineralized dentin matrix produced by monomer/alcohol saturation and solvent evaporation. *J Biomed Mater Res* 2006; 79(2):349-58.
62. Van Meerbeek B, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, Duke ES, Eick JD, et al. A TEM study of two water-based adhesives bonded to dry and wet dentin. *J Dent Res* 1998; 77(1):50-9.
63. Reis A, Loguercio AD, Azevedo CL, Carvalho RM, Singer JM, Grande RH. Moisture spectrum of demineralized dentin for adhesive systems with different solvent bases. *J Adhes Dent* 2003; 5(3):183-92.
64. Carvalho RM, Mendonça JS, Santiago SL, Silveira RR, Garcia FCP, Tay FR, et al. Effects of HEMA/solvent combinations on bond strength to dentin. *J Dent Res* 2003; 82(8):597-601.
65. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res* 2002; 62(3):447-56.
66. Cadenaro M, Breschi L, Antoniolli F, Navarra CO, Mazzoni A, Tay FR, et al. Degree of conversion of resin blends in relation to ethanol content and hydrophilicity. *Dent Mater* 2008; 24(9):1194-1200.
67. Guo X, Wang Y, Spencer P, Ye Q, Yao X. Effect of water content and initiator composition on photopolymerization of a model BisGMA/HEMA resin. *Dent Mater* 2008; 24(6):824-31.

68. Cadenaro M, Antoniolli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci* 2005; 113(6):525-30.
69. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater* 2006; 22(10):973-80.
70. Manso AP, Bedran-Russo AK, Suh B, Pashley DH, Carvalho RM. Mechanical stability of adhesives under water storage. *Dent Mater* 2009; 25(6):744-9.
71. Shin TP, Yao X, Huenergardt R, Walker MP, Wang Y. Morphological and chemical characterization of bonding hydrophobic adhesive to dentine using ethanol wet bonding technique. *Dent Mater* 2009; 25(8):1050-7.
72. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, et al. Durability of resin-dentin bonds to water- VS ethanol-saturated dentin. *J Dent Res* 2009; 88(2):146-51.
73. Tay FR, Gwinnett JA, Wei SH. Micromorphological spectrum from overdrying to overwetting acid-conditioned dentin in water-free acetone-based, single-bottle primer/adhesives. *Dent Mater* 1996; 12(4):236-44.
74. Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SH. The overwet phenomenon: a transmission electron microscopic study of surface moisture in the acid-conditioned, resin-dentin interface. *Am J Dent* 1996; 9(4):161-6.
75. Pashley EL, Zhang Y, Lockwood PE, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effects of HEMA on water evaporation from water-HEMA mixtures. *Dent Mater*. 1998 Jan; 14(1):6-10.

76. Jacobsen T, Söderholm KJ. Some effects of water on dentin bonding. *Dent Mater* 1995 Mar; 11(2):132-6.
77. Paul SJ, Leach M, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. *J Dent*. 1999 Mar; 27(3):209-14.
78. Tanaka J, Ishikawa K, Yatani H, Yamashita A, Suzuki K. Correlation of dentin bond durability with water absorption of bonding layer. *Dent Mater J* 1999 Mar; 18(1):11-8.
79. Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Russell CM, Pashley DH. Tensile properties of resin-infiltrated demineralized human dentin. *J Dent Res* 1995; 74(4):1093-102.
80. Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Effects of storage media on mechanical properties of adhesive systems. *Am J Dent* 2004; 17(2):104-8.
81. Hashimoto M, Tay FR, Ito S, Sano H, Kaga M, Pashley DH. Permeability of adhesive resin films. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2005; 74B:699-705.
82. Yiu CKY, King NM, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Carrilho MR, et al. Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. *Biomaterials* 2004; 25:5789-96.
83. Unemori M, Matsuya Y, Matsuya S, Akashi A, Akamine A. Water absorption of poly(methyl methacrylate) containing 4-methacryloxyethyl trimellitic anhydride. *Biomaterials* 2003; 24(8):1381-7.
84. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003; 82(2):136-40.

85. Ortengren U, Andersson F, Elgh U, Terselius B, Karlsson S. Influence of pH and storage time on the sorption and solubility behaviour of three composite resin materials. *J Dent* 2001;29(1):35-41.
86. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Study of water sorption, solubility and modulus of elasticity of light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials* 2003;24(4):655-65.
87. Pereira SG, Nunes TG, Kalachandra S. Low viscosity dimethacrylate comonomer compositions [Bis-GMA and CH3Bis-GMA] for novel dental composites; analysis of the network by stray-field MRI, solid-state NMR and DSC & FTIR. *Biomaterials* 2002;23(18):3799-806.
88. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials* 2005;26(33):6449-59.
89. Breschi L, Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Biasotto M, Prati C, et al. Polymerization kinetics of dental adhesives cured with LED: correlation between extent of conversion and permeability. *Dent Mater* 2007;23(9):1066-72.
90. Martin N, Jedynakiewicz N. Measurement of water sorption in dental composites. *Biomaterials* 1998;19(1-3):77-83.
91. Soles CL, Yee AF. A discussion of the molecular mechanisms of moisture transport in epoxy resin. *J Polym Sci B: Polym Phys* 2000;38:792-802.
92. Musto P, Ragosta G, Scarinzi G, Mascia L. Probing the molecular interactions in the diffusion of water through epoxy and epoxy-bismaleimide networks. *J Polym Sci B: Polym Phys* 2002;40:922-38.
93. Cadenaro M, Breschi L, Rueggeberg FA, Suchko, Grodin E, Agee K, et al. Effects of residual ethanol on the rate and degree of conversion of five experimental resins. *Dent Mater* 2009;25(5):621-8.

94. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Carvalho RM, Hosaka K, et al. Membrane permeability properties of dental adhesive films. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;88(2):312-20.
95. Burrow MF, Satoh M, Tagami J. Dentin bond durability after three years using a dentin bonding agent with and without priming. *Dent Mater* 1996;12(5):302-7.
96. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res* 2000;79(6):1385-91.
97. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. Resin-tooth adhesive interfaces after long-term function. *Am J Dent* 2001;14(4):211-5.
98. Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, et al. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003;66(1):287-98.
99. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007;65(1):1-13.
100. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92(8):827-39.
101. Kawasaki K, Featherstone JD. Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res* 1997;76(1):588-95.
102. Dung SZ, Gregory RL, Li Y, Stookey GK. Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin. *Caries Res* 1995;29(6):483-9.

103. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldini S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res* 2007;86(1):90-4.
104. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res* 2002;81(9):603-7.
105. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(3):437-9.
106. van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res* 2003;37(1):58-65.
107. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, et al. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent* 2009;34(4):379-83.
108. Kitasako Y, Burrow MF, Nikaido T, Tagami J. The influence of storage solution on dentin bond durability of resin cement. *Dent Mater* 2000;16(1):1-6.
109. Shono Y, Terashita M, Shimada J, Kozono Y, Carvalho RM, Russell CM, et al. Durability of resin-dentin bonds. *J Adhes Dent* 1999;1(3):211-8.
110. Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials. *Dent Mater* 2005;21:864-81.

111. US Department of Health and Human Services. Funding Opportunities and Notices. RFA-DE-10-004: Increasing the Service Life of Dental Resin Composites [Internet]. Bethesda (Maryland): National Institute of Dental and Craniofacial Research; Natinal Institutes of Health (NIH); 2009 Sept 1 [cited 2009 Sept 30]. Available from: <http://grants.nih.gov/grants/guide/rfa-files/RFA-DE-10-004.html>

112. National Institue of Dental and Craniofacial Research (National Institutes of Health). Improving the Nation's Oral Health – Strategic Plan 2009-2013 [Internet]. Bethesda (Maryland): National Institue of Dental and Craniofacial Research (National Institutes of Health); 2009 Aug 20 [cited 2009 Sept 30]. Available from: <http://www.nidcr.nih.gov/Research/ResearchPriorities/StrategicPlan/>

113. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res* 2005;84(2): 118-32.

114. Carrilho MR, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater* 2005; 21(3):232-41.

115. Manso AP, Marquezini L Jr, Silva SM, Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM. Stability of wet versus dry bonding with different solvent-based adhesives. *Dent Mater* 2008;24(4):476-82.

116. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Manello F, Tjaderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 2006;27:4470-6.

117. Reis A, Loguercio AD, Carvalho RM, Grande RHM. Durability of resin dentin interfaces: effects of surface moisture and adhesive solvent component. *Dent Mater* 2004;20(7):669-76.

118. Dal Bianco K, Pelizzaro A, Patzlaff R, de Oliveira Bauer JR, Loguercio AD, Reis A. Effects of moisture degree and rubbing action on the immediate resin-dentin bond strengths. *Dent Mater* 2006;22(12):1150-6.
119. Higashi C, Michel MD, Reis A, Loguercio AD, Gomes OM, Gomes JC. Impact of adhesive application and moisture on the mechanical properties of the adhesive interface determined by the nano-indentation technique. *Oper Dent* 2009;34(1):51-7.
120. Reis A, Pelizzaro A, Dal-Bianco K, Gomes OM, Patzlaff, Loguercio AD. Impact of adhesive application to wet and dry dentin on long-term resin-dentin bond strengths. *Oper Dent* 2007;32(4):380-7.
121. Loguercio AD, Loeblein F, Cherobin T, Ogliari F, Piva E, Reis A. Effect of solvent removal on adhesive properties of simplified etch-and-rinse systems and on bond strengths to dry and wet dentin. *J Adhes Dent* 2009;11(3):213-9.
122. Lewinstein I, Chweidan H, Matalon S, Pilo R. Retention and marginal leakage of provisional crowns cemented with provisional cements enriched with chlorhexidine diacetate. *J Prosthet Dent* 2007;98(5):373-8.
123. Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine release and water sorption characteristics of chlorhexidine-incorporated hydrophobic/hydrophilic resins. *Dent Mater* 2008;24(10):1391-9.
124. Imazato S. Bio-active restorative materials with antibacterial effects: new dimension of innovation in restorative dentistry. *Dent Mater J* 2009;28(1):11-9.
125. Mehdawi I, Neel EA, Valappil SP, Palmer G, Salih V, Pratten J, et al. Development of remineralizing, antibacterial dental materials. *Acta Biomater* 2009;5(7):2525-39.

126. Carrilho MR, Carvalho RM, Breschi L, Mazzoni A, Tjaderhane L, Geraldelli S, et al. Effect of ethanol-based chlorhexidine on the durability of resin-dentin bonds. In: IADR meeting 2009: Abstr 284, Miami.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 164/07

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE SOLUÇÕES DE CLOREXIDINA NA ESTABILIDADE MECÂNICA DE INTERFACES ADESIVAS COM A DENTINA"**, de responsabilidade da Pesquisadora **ADRIANA PIGOZZO MANSO**, sob orientação da Professora Doutora **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 04 de dezembro de 2007

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP