**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

LESLIE CAROLL CASAS APAYCO

**Efeito da solução de clorexidina a 2% na adesão de um sistema
restaurador adesivo à dentina previamente erodida com
refrigerante tipo cola regular e light**

**BAURU
2013**

LESLIE CAROLL CASAS APAYCO

Efeito da solução de clorexidina a 2% na adesão de um sistema restaurador adesivo à dentina previamente erodida com refrigerante tipo cola regular e light

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Atta

Versão corrigida

**BAURU
2013**

C264e Casas Apayco, Leslie Caroll
Efeito da solução de clorexidina a 2% na adesão de um sistema restaurador adesivo à dentina previamente erodida com refrigerante tipo cola regular e light / Leslie Caroll Casas Apayco. – Bauru, 2013.
124 p. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Atta

Nota: a versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 131/2009
Data: 30/09/2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente à minha família, verdadeira razão de meu viver e meu apoio constante.

A Deus

Por me permitir viver, ter saúde e sonhar. Obrigada por tudo o que Ele me brindou até agora, por me oferecer oportunidades nos momentos certos da minha vida rodeada de pessoas maravilhosas. Por ter abençoado meu caminho e minhas decisões, por ter sido a força que me leva a perseverar.

Aos meus pais, César e Luisa

Por seu amor incondicional, por sempre me apoiarem e acreditarem que posso ser capaz de atingir meus sonhos mesmo eles sendo distantes e encorajar-me a segui-los. Acho difícil conseguir expressar o quanto os amo e admiro!

À minha irmã Heizel

Por estar sempre presente em todos os momentos e cuidar de mim. Por me encorajar a continuar e não desanimar. Amo você!

À minha família, meu avô Pedro, minha avó Francisca (in memoriam), meu avô Maximo (in memoriam) e minha avó Juana (in memoriam), meus anjos da guarda, por cuidar de nós em cada momento e por torcerem por cada sonho nosso. A meus tios e primos por serem minha eterna torcida.

À Profa. Dra. Linda Wang, a Profa. Dra. Teresa Atta, a Marcela Calabria e Luff Francisconi, por serem parte importante neste sonho e colaborarem em fazê-lo realidade. Linda, nunca esquecerei o dia em que conversamos sobre seus projetos e me brindou a oportunidade de trabalhar com você. Obrigada por permitir crescer como pessoa e profissional, me brindar novos caminhos. Além de saber que posso contar com você como amiga e mestre. Professora Teresa, queria lhe agradecer por ter sido muitas vezes para mim, além de minha orientadora, amiga, segunda mãe e conselheira. Por ter me orientado e incentivado a seguir em frente, por orientar meu caminho acadêmico e acreditar em meu potencial. Marcela “Ser” e Luff, sem sua ajuda, companhia e amizade não teríamos conseguido este trabalho, apesar das dificuldades e das longas horas de trabalho, contar com vocês foi essencial para eu estar aqui. Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

A meus pais Luisa e César,

Vocês são meu maior exemplo de amor, constância, luta e sacrifício. Este sonho começou há muitos anos, e com o transcorrer do tempo este caminho se tornou mais difícil e com muitas saudades, mas eu sempre contei com o apoio incondicional de vocês neste novo projeto de vida apesar da distância, do tempo e do sacrifício. Por isso eu agradeço a vocês por tudo o que foram, são e serão para mim, porque esta conquista não é só minha, se não também é de vocês, sem sua ajuda, paciência e amor eu não estaria conseguindo cumprir mais uma etapa. Amo vocês eternamente!

À minha irmã Heizel,

Obrigada porque apesar da distância sempre estávamos comunicadas, por entender minha ausência em momentos difíceis e por me encorajar sempre a seguir e não desistir. Por ter vencido muitas dificuldades e saber que podemos superar tudo. Você sempre será meu orgulho!

Aos meus avós, meus tios paternos e maternos e todos meus primos,

Por torcer pela realização deste e de todos meus outros sonhos, apoiando-me em minhas decisões e por se preocuparem comigo durante minha estadia aqui no Brasil.

Às amigas e amigos da vida toda,

Às amigas da escola Ximena, Virginia, Andrea e Lucia, por sua companhia e por torcerem sempre pelo meu sucesso, além de eu ser a cirurgiã dentista favorita de vocês!

Aos amigos da faculdade, em especial a Claudia, Silvana, Jeanette e Irma Andrea por todos os momentos vividos desde a época da faculdade, por torcerem por meus sonhos e por me encorajarem a cumpri-lo.

Às minhas amigas Lupe, Patty (in memoriam) e Carolina mesmo que tenhamos tomado rumos diferentes, nossa amizade supera a distância e o tempo.

As meus amigos Brenda, Mario, Gabriela, Hernan, Gemmi, Juan, Carito, Milagros, Felix, Claudia amizade que nasceu da alma e pela fé. Obrigada pela torcida e sempre saber que posso contar com vocês.

Às minhas bruxinhas queridas, Katty, Viviana, Patty, Angela, Sandy; aos meus amigos queridos Sofia, Monica, Ivette, Sandra, Lucia, Felix e Iveth obrigada por seu apoio e incentivo, e torcer pelo meu sucesso.

A todos eles meu maior agradecimento, que apesar da distância sempre estiveram presentes em minha vida.

Aos meus amigos do coração do Brasil,

À minha irmã de coração Roberta Santos Domingues, minha amiga, confidente e companheira de nuvenzinhas, obrigada por ter estado comigo todo este tempo, por sempre estar disposta a me escutar, ser meu ombro de apoio, nunca ter me deixado sozinha com a nuvenzinha ainda quando aconteciam muitas tormentas.

Ao melhor irmão que escolhi, Gabriel e as amigas do coração Elen Tolentino, Fernanda Menechino e Nathalia Borges obrigada por fazer esta caminhada mais fácil, não só os últimos 4 anos, mas desde o tempo do mestrado, por todos os momentos compartilhados, alegrias, tristezas, lembranças e risos. Amizade que terei para sempre e vocês em meu coração. Nossas torcidas continuarão apesar da distância. Adoro vocês!

Às minhas amigas, companheiras e parceiras, Thais, Cris, Damaris e Livia C. obrigada por compartilhar muitos momentos especiais comigo tanto os felizes como os tristes.

Aos amigos Alejandra, Juan Fernando, Pablo e Carlos pela amizade e alegrias juntos.

Às minhas meninas amigas da turma de doutorado, Flávia, Lulu, Luff, Karin, Polliana e Marcela Ser por todo este tempo compartilhado nas clínicas, nas aulas e seminários. Nossa amizade se fortaleceu cada vez mais com o tempo, apesar de tomarmos caminhos diferentes sempre estaremos torcendo uma pela outra.

Às minhas queridas roommates durante minha estadia em Bauru, Nathalia, Elen, Kiki e Livia obrigada pelos pequenos detalhes e momentos que tornaram meus dias em casa mais alegres, e o apoio nesses momentos ruins e tristes, por nossa convivência cheia de cumplicidade e amizade. Cada uma de vocês sempre morará em meu coração.

À Família Borges, Família Bernini, Família Tolentino, Família Menechino Costa, Família Domingues e Família Francisconi obrigada por permitir que eu fizesse parte de sua família, por me tratarem com muito carinho e por compartilhar muitos momentos em família durante este tempo. Vocês me fizeram sentir em casa.

Às turmas de mestrado e doutorado contemporâneas das outras áreas da faculdade por todos os momentos vividos e por fazer os dias mais alegres compartilhando nossas conquistas, pela amizade e companheirismo.

Às turmas de doutorado contemporâneas de Dentística, em especial a Ana Carolina, obrigada por tua amizade e teu apoio constante, você é muito especial para mim querida amiga.

Aos meus queridos da turma de mestrado 2011, vocês são uma turma especial, obrigada por me permitir ajudá-los, e por essas longas conversas nos laboratórios que faziam o trabalho mais leve.

E a todos os amigos que conheci durante este longo caminho, aqueles que ainda convivo, aqueles que por estarem longe não vejo fisicamente mas sempre nos comunicamos, de outras cidades, de outros países, de outras áreas da FOB e outros lugares... Obrigada porque cada um de vocês contribuiu para que minha estadia no Brasil fosse mais feliz.

*“Meus companheiros amados,
não vos espero nem chamo:
porque vou para outros lados.
Mas é certo que vos amo.*

*Nem sempre os que estão mais perto
fazem melhor companhia.
Mesmo com sol encoberto,
todos sabem quando é dia.*

*Pelo vosso campo imenso,
vou cortando meus atalhos.
Por vosso amor é que penso
e me dou tantos trabalhos.*

*Não condeneis, por enquanto,
minha rebelde maneira.
Para libertar-me tanto,
fico vossa prisioneira.*

*Por mais que longe pareça,
ides na minha lembrança,
ides na minha cabeça,
valeis a minha Esperança”.*

Cecília Meireles

Levarei sempre vocês no meu coração queridos amigos!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Maria Teresa Atta, quem tive o prazer de ter como orientadora durante especialização, mestrado e doutorado. Que além de ser professora e orientadora também tem sido amiga e conselheira, e muitas vezes mãe. Professora, você me ensinou o que é ser professor, eu sempre tenho e terei seu exemplo de dedicação e a forma de conduzir as coisas com os alunos. Seus conselhos têm sido fundamentais em muitos momentos importantes nestes anos, soube identificar e corrigir minhas fraquezas ajudando a superar-me e ser melhor cada dia. Seu espírito determinado e perseverante me levou a buscar conhecimento e resolver minhas dúvidas, conseguindo expressar o que há de melhor em mim. Sempre incentivou meus projetos, confiando em mim e que podia ter o potencial para cumprir meus objetivos. Sempre serei grata por tudo o que você me ensinou, como pessoa e profissional admirável que você é.

À Profa. Dra. Linda Wang, professora e amiga. Linda nestes últimos anos tive a honra de te ajudar nessa experiência que é a pesquisa científica seja em equipe ou orientando os alunos de IC, incentivando-os a participar de congressos e eventos científicos. Sempre serei grata por essa oportunidade, que me permitiu descobrir o interessante que é o mundo científico. Obrigada porque aprendi muito nestes anos sob sua orientação e agradeço a confiança depositada em mim em cada um de seus projetos. Admiro muito sua perseverança e dedicação em tudo que você faz.

À Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro, por ter aberto as portas dessa faculdade de forma acolhedora e carinhosa desde a especialização. Seu exemplo de dedicação e entusiasmo me incentivou a estudar e trabalhar cada vez mais por meus objetivos. Eu fico honrada de ter uma professora como a senhora e por todos seus ensinamentos. Obrigada por sempre me escutar e orientar em minhas decisões profissionais. Eu sempre serei grata por seu tempo e dedicação a minha pessoa.

Ao Prof. Dr. José Mondelli, por seus constantes ensinamentos e incentivo compartilhando suas experiências profissionais, o senhor sempre será um grande mestre para todos aqueles que o tivemos como professor. Obrigada por proporcionar orientação e ajuda em todos estes anos e por todas as vezes que o senhor dedicou seu tempo à minha pessoa.

Ao Prof. Dr. Rafael Lia Mondelli, pela oportunidade de ampliar meus horizontes acadêmicos e profissionais desde a especialização. Obrigada pelas oportunidades oferecidas durante o programa de mestrado e doutorado confiando à realização de muitos trabalhos científicos e clínicos. Muito obrigada!

Aos professores Dr. Heitor Honório e Dra. Dani Rios com quem tive o prazer de trabalhar durante este último ano e que me acompanharam na realização deste trabalho. São pessoas e profissionais realmente admiráveis, conselheiros e sempre dispostos a ajudar. Heitor obrigado pela ajuda e dedicação nas análises estatísticas deste trabalho e por seus ensinamentos. Dani obrigada por sua orientação na realização de aulas e casos clínicos em crianças, por seu entusiasmo e delicadeza em cada uma de suas palavras e conselhos. Obrigada pela paciência que tiveram comigo em cada momento de dúvida e questionamento.

À Luciana Francisconi e Marcela Calabria, sem ajuda de vocês este trabalho não seria realizado. Este trabalho em equipe foi possível pela ajuda, disposição e amizade que tivemos em cada momento de trabalho e fora dele. Obrigada por ter aprendido muito com vocês e pelo companheirismo até altas horas e dias de fim de semana.

Às minhas queridas orientadas de IC, Vanessa, Fran, Carolzinha, Camila M., Aline, Camila R., Tamara e Marina ajudar e acompanhar vocês no transcurso deste tempo, foi aprender cada dia mais. Muito obrigada por todos estes anos de convivência, aprendizagem e amizade.

À Márcia Graeff, Marcelo Milanda, Seu Renato e Dona Neusa do Centro Integrado de Pesquisa (CIP) porque vocês foram importantes neste trabalho. A maior parte do tempo durante o doutorado estive no CIP, e cada um de vocês fez minha estadia no laboratório mais agradável. Sempre com muita disposição, profissionalismo e amizade, me ajudaram na elaboração deste trabalho e outros projetos.

Aos amigos e colegas Luciana Francisconi, Camila Machado e de prática profissionalizante de Estômato que me ajudaram na execução e apoio deste trabalho. Sem sua ajuda, este trabalho não teria sido possível.

Aos Professores do Departamento de Dentística, Prof. Dr. Aquira Ishikiriana, Prof. Dr. Carlos Eduardo Francischone, Prof. Dr. Eduardo Batista Franco, Prof. Dr. José Carlos Pereira, Prof. Dr. José Mondelli, Profa. Dra. Linda Wang, Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro, Profa. Dra. Maria Teresa Atta, Prof. Dr. Rafael Francisco Lia Mondelli, Prof. Dr. Sérgio Kiyoshi Ishikiriana, por seus ensinamentos, pelo apoio e incentivo. Levo cada um de vocês como meus professores desta alma mater.

Aos funcionários do departamento de Dentística, Rita, Nati, Audrea, Rita, Nelson, Zuleica, Charlene, Elizio e Ligia, pela disposição, colaboração e pronta ajuda, porque muitas vezes me auxiliaram e fizeram essa convivência no departamento amena. Também aos funcionários do Departamento de Materiais Dentários, Sandrinha, e Alcides por sua disposição e ajuda em todo este tempo.

Aos professores do Departamento de Materiais Dentários, Prof. Dr. Paulo Afonso Silveira Francisconi, Profa. Dra. Ana Flavia Borges, Prof. Dr. César Antunes de Freitas, Prof. Dr. Paulo Amarante, por sempre estarem dispostos a ensinar e resolver qualquer dúvida.

A todos os professores e funcionários dos diferentes departamentos da FOB-USP, aos funcionários das Clínicas, Biblioteca, Reitoria e Pós-graduação obrigada pela indiscutível disposição e ajuda, por sempre acolherem os alunos com carinho.

À Ana Amélia, obrigada pela ajuda e dedicação neste trabalho.

Aos alunos da graduação desde a turma XLI até às turmas atuais que confiaram no trabalho dos alunos da pós-graduação e aceitaram nossos conselhos e discreta experiência já vivenciada. Obrigada pela confiança, por permitirem que eu aprendesse com vocês em cada dia e por sua amizade, que será sempre lembrada.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Prof. Dr. João Grandino Rodas, digníssimo reitor da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. José Carlos Pereira, digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris, digníssimo Prefeito do Campus da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti, digníssimo Presidente da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), órgão de fomento de meu doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), concessora de Auxílio Regular (processo 2009/14986-0) à Profa. Dra. Linda Wang, para desenvolvimento de parte do presente trabalho.

E a todos que, de alguma maneira, colaboraram direta ou indiretamente ao longo do meu doutorado na realização deste trabalho.

...muito obrigada!

Leslie Caroll Casas Apayco

*“O futuro pertence àqueles que
acreditam na beleza de seus sonhos.”*

Eleanor Roosevelt

RESUMO

Os refrigerantes são potentes agentes erosivos que podem provocar perda de estrutura dentária e requerer o tratamento restaurador adesivo, dependendo do grau de comprometimento. Pelas diferentes propriedades apresentadas, estas bebidas podem afetar a adesão à dentina de diferentes formas. Este estudo teve como objetivo avaliar a resistência de união (RU) em dentina erodida tratada com solução de clorexidina a 2%. Sessenta terceiros molares tiveram a superfície dentinária do terço oclusal exposta e foram distribuídos em 3 grupos, de acordo com o protocolo erosivo: controle, sem desafio (C), desafio erosivo com Coca-Cola (CC) e desafio erosivo com Coca-Cola Light (CL). As ciclagens erosivas foram por ciclos de 5-min de imersão 3x/dia durante 5 dias. Em seguida, metade dos dentes foi tratado com solução de clorexidina a 2% (1,5ul) e o restante com água deionizada (1,5ul) e o processo adesivo realizado com Adper Single Bond 2[®] e resina composta Filtek Z350[®]. Os espécimes foram mantidos em estufa a 37°C por 24 horas. Após esse período, todos os espécimes foram seccionados em palitos (0,80mm² a 1mm²). Um terço dos palitos obtidos de cada grupo foi testado imediatamente (I-24 h) pelo teste de microtração. Os espécimes remanescentes foram envelhecidos em saliva artificial por 6 meses (6m) e 1 ano (1a) antes do teste. Os dados obtidos da microtração foram analisados por meio dos testes de ANOVA a três critérios e Tukey ($p < 0,05$). O modo de fratura foi analisado e classificado em adesivo, misto e coesivo em dentina ou resina composta. Simultaneamente, uma fatia (mesiodistal) de cada espécime foi analisado por microscopia confocal para análise da interface resina/dentina e formação de *tag* nos tempos de envelhecimento. Os valores médios de resistência adesiva (MPa $\pm$ dp; 24 horas/6 meses /1 ano) foram: C (38,57 $\pm$ 15,36/26,67 $\pm$ 19,37/12,21 $\pm$ 11,24); C-Chx2% (41,93 $\pm$ 9,97/31,12 $\pm$ 17,02/11,86 $\pm$ 10,4); CC (21,80 $\pm$ 7,09/8,33 $\pm$ 10,71/4,70 $\pm$ 9,04); CC-Chx2% (19,85 $\pm$ 7,87/24,32 $\pm$ 11,7/6,19 $\pm$ 12,37); CL (22,70 $\pm$ 9,63/10,25 $\pm$ 15,6/4,93 $\pm$ 5,54); CL-Chx 2% (22,40 $\pm$ 7,34/20,94 $\pm$ 14,68/16,05 $\pm$ 13,91). A resistência de união à dentina erodida foi significativamente inferior ao do grupo controle, independentemente do tempo de armazenagem dos espécimes. Tanto a dentina normal e erodida, apresentaram redução dos valores de resistência de união ao longo do tempo. Apesar de os espécimes tratados com solução de clorexidina a 2% manterem os valores de resistência de união por 6 meses, eles reduziram após 1 ano. De acordo com as imagens por microscopia confocal, não houve diferenças observadas na qualidade geral da camada híbrida e formação de *tags* entre os grupos. A solução de digluconato de clorexidina a 2% pode ser uma alternativa para manter a estabilidade da interface de união adesiva até os 6 meses. A resistência de união mais estável à dentina erodida por Coca-Cola Light comparada à dentina erodida por Coca-Cola ao longo do tempo, sugere a implicação de suas propriedades na adesão.

Palavras-Chave: Erosão Dentária. Clorexidina. Sistema adesivo.

ABSTRACT

Effect of 2% chlorhexidine solution on adhesive bond strength to eroded dentin by regular and light cola drinks

Soft drinks are potent erosive agents, which can provoke loss of dental structure and require adhesive restorative treatment, depending on the compromising level. Due to the different properties, these beverages can affect bonding to dentin in different manners. The aim of this study was to evaluate the bond strength (BS) to eroded dentin treated with 2% chlorhexidine solution. Sixty third human molars had their occlusal thirds removed to expose flat dentin and were divided into three groups, according to erosive protocol: Control (C) with no surface treatment, erosive challenge with Regular Coke (CC), erosive challenge with Light Coke (CL). The erosive challenge was performed by cycles of 5-min immersions, 3x/day during 5 days. After that, half of the teeth were treated with 2% chlorhexidine solution (1,5ul) and the remaining with deionized water (1,5ul) before adhesion procedure with Adper Single Bond 2[®] and Filtek[™] Z350[®]. Specimens were stored at 37°C in deionized water for 24 hours. After this period, all specimens were sectioned into sticks ($\approx 0.81 \text{ mm}^2$ to 1 mm^2). A third of the specimens were tested immediately (I-24 h), for microtensile test. The remaining sticks aged in artificial saliva for 6 months (6m) and 1 year (1y) before testing. The failure mode was analyzed and classified as adhesive, mixed and cohesive in dentin or resin. Bond strength data was analyzed by three-way ANOVA and Tukey tests ($p < 0.05$). Simultaneously, one slice (mesial-distal) of each specimen was analyzed by confocal microscopy for analysis of the interface resin/dentin and tag formation over the aging time. Means and standard-deviation (MPa) of each group (I, 6m and 1y) were: C (38.57 ± 15.36 , 26.67 ± 19.37 , 12.21 ± 11.24), C-Chx 2% (41.93 ± 9.97 , 31.2 ± 17.02 , 11.86 ± 10.4), CC (21.80 ± 7.09 , 8.33 ± 10.71 , 4.70 ± 9.04), CC-Chx 2% (19.85 ± 7.87 , 24.32 ± 11.7 , 6.19 ± 12.37) CL (22.70 ± 9.63 , 10.25 ± 15.6 , 4.93 ± 5.54) and CL-Chx 2% (22.40 ± 7.34 , 20.94 ± 14.68 , 16.05 ± 13.91). Adhesive and/or mixed failures were frequently observed in all specimens. Bond strength of eroded dentin specimens was lower than of the normal dentin specimens, for all testing times. Both normal and eroded dentin showed decrease on μTBS values with time. Although the specimens treated with 2% chlorhexidine solution maintained the bond strength values for 6 months, they reduced significantly, after 1 year. after this period the bond strength values went down. According to confocal microscopy images, no difference in the overall quality of hybrid layer and tags formation among groups was observed. The use of 2% chlorhexidine solution could be an alternative to maintain the stability of bonding interface. More stable bonding strength to eroded dentin with Coca-Light over time, compared to dentin eroded by Regular Cola suggests the implication of their properties on bonding.

Keywords: Tooth erosion. Chlorhexidine. Dentin-Bonding Agents.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Delineamento experimental:** **A** - Obtenção dos terceiros molares humanos hígidos extraídos; **B** - Seccionamento dos terços oclusal e apical dos terceiros molares; **C** - Formação de *smear layer* sobre a dentina exposta, por meio da ação de uma lixa granulação de 600 por 1 min, sob irrigação em politriz; **D** - Erosão da dentina em 2/3 dos espécimes por dois refrigerantes à base de cola: Coca-Cola e Coca-Cola Light (n=11); imersões de 5 min; 3x/dia; 5 dias – CC e CL e submissão dos demais espécimes (dentina controle) diretamente à próxima etapa; **E** - Condicionamento da dentina por 15s com ácido fosfórico a 37%, lavagem e secagem; **F** - Reidratação de cada metade dos espécimes do grupo controle (sem erosão) com água deionizada (controle C) ou solução de Chx a 2% (C-Chx 2%) também realizado nos grupos CC e CL, respectivamente; **G** - Aplicação do sistema adesivo Adper Single Bond 2; **H** - Inserção incremental (2mm cada incremento) da resina composta na porção coronária com Filtek Z350; **I** - Seccionamento dos espécimes em palitos (área de secção transversal de $\approx 0,80\text{mm}^2$), após armazenagem em água deionizada por 24 horas a 37°C; **J** - Testes de microtração (EMIC; 0,5mm/min), imediatamente, após 6 meses e após 1 ano de envelhecimento, e avaliação dos tipos de falhas de fraturas adesivas com um microscópio digital; **K** - Os espécimes restaurados com adesivo marcado com Rodamina B, foram seccionados em fatias (0,80mm espessura) para sua avaliação em microscopia confocal de varredura a laser **52**
- Figura 2a -** Marcação do terço oclusal e radicular dos terceiros molares, para exposição da dentina coronária, subjacente ao esmalte **54**

Figura 2b -	Seccionamento da porção oclusal e parte da radicular, com auxílio de um disco diamantado dupla face, refrigerado com água deionizada, a uma velocidade de 300rpm	54
Figura 2c -	Planificação da dentina exposta com uma lixa de granulação 320 sob refrigeração em politriz, com água deionizada, para remoção de remanescente de esmalte	54
Figura 2d -	Criação de uma <i>smear layer</i> sobre a mesma dentina, por meio da ação de uma lixa de silicone carbide de granulação 600 (1 min.) sob refrigeração na mesma politriz.....	54
Figura 3 -	Desafio erosivo em laboratório. As superfícies dentinárias foram expostas à bebida refrigerante durante 5min /3 vezes ao dia/ 5 dias, e mantidas em saliva artificial entre os desafios e também ao termino do experimento por 12 horas	58
Figura 4a -	Condicionamento com ácido fosfórico a 37% (15s), lavagem (30s) e secagem com papel absorvente.....	59
Figura 4b -	Hidratação dos espécimes após condicionamento ácido por 60s. Metade de cada grupo (CC, CL, Controle) foram hidratados com 1,5µL de água deionizada (n=10) e a outra metade com 1,5µL de solução de digluconato de clorexidina a 2% (n=10).....	59
Figura 4c -	Remoção dos excessos das respectivas soluções com papel absorvente.....	59
Figura 4d -	Aplicação do sistema adesivo Adper Single Bond 2 em duas camadas finas	59
Figura 4e -	Fotopolimerização do sistema adesivo por 20 segundos	59
Figura 4f -	Aplicação do primeiro incremento (2mm) de resina composta.....	60
Figura 4g -	Adaptação da resina composta em toda a superfície dentinária .	60
Figura 4h -	Fotoativação de cada incremento de resina composta por 20 segundos.....	60

Figura 4i -	Aplicação do segundo incremento (2mm) de resina composta aplicado sobre o primeiro	60
Figura 5a -	Espécime fixado com cera pegajosa pela porção radicular, ao dispositivo metálico na máquina de corte, para seccionamento perpendicular à interface adesiva em sentido mesiodistal	61
Figura 5b -	Vista oclusal do seccionamento no sentido mesiodistal (fatias com aproximadamente 0,80mm) cortados somente em fatias.....	61
Figura 5c -	Seccionamento do espécime no sentido vestibulolingual	61
Figura 5d -	Cada palito foi extraído do conjunto, com auxílio de uma pinça clínica. Em média, 15 a 20 palitos foram obtidos de cada dente .	61
Figura 6a -	Fixação de um palito, pelas extremidades, com um adesivo à base de cianocrilato, a um dispositivo tipo Bencor.....	62
Figura 6b -	Ruptura da interfase adesiva do espécime	62
Figura 6c-	Máquina de testes Universal EMIC	62
Figura 7a -	Microscópio Digital Dino-Lite Digital Microscope®	63
Figura 7b -	Superfícies fraturadas	63
Figura 8 -	As interfaces adesivas foram qualitativamente analisadas com um microscópio confocal de varredura a laser (40x de aumento, 0,976µm de resolução); Microscópio Leica TCS SPE®, Leica Microsystems, Mannheim/ Bade-Vurtemberg – Alemanha.....	64
Figura 9 -	A-C: Imagens obtidas em microscopia confocal de varredura a laser das fatias de cada grupo (C-CC-CL) tratado com água deionizada analisadas durante o tempo de envelhecimento	77
Figura 10 -	A-C: Imagens obtidas em microscopia confocal de varredura a laser das fatias de cada grupo (C-CC-CL) tratado com Chx 2% analisadas durante o tempo de envelhecimento	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Valores médios de RU (MPa) entre os grupos comparados em função da aplicação de solução de Chx 2% ou água deionizada e do tempo de envelhecimento dos espécimes (inicial, 6 meses, 1 ano)	75
Gráfico 2 -	Porcentagem (%) de falhas do tipo adesiva (A), mista (M), coesiva em dentina (CD) ou coesiva em resina (CR) para os diferentes grupos experimentais, em função do tempo de envelhecimento dos espécimes (inicial, 6 meses, 1 ano)	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Grupos experimentais	55
Quadro 2 -	Principais materiais utilizados no presente estudo	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores médios $\pm$ desvio padrão de resistência de união (Mpa $\pm$ dp) à dentina controle e à dentina erodida com refrigerante tipo cola (Coca-Cola), em função da aplicação de solução de Chx 2% ou água deionizada (controle) e do tempo de envelhecimento dos espécimes (inicial, 6 meses, 1 ano).....	69
Tabela 2 -	Valores médios $\pm$ desvio padrão de resistência de união (MPa $\pm$ dp) à dentina controle e à dentina erodida com refrigerante tipo cola (Coca-Cola Light), em função da aplicação de solução de Chx 2% ou água deionizada e do tempo de envelhecimento dos espécimes (inicial, 6 meses, 1 ano).....	71
Tabela 3 -	Valores médios $\pm$ desvio padrão de resistência de união (MPa $\pm$ dp) à dentina erodida com refrigerante tipo cola Coca-Cola vs refrigerante tipo Coca-Cola Light, em função da aplicação de solução de Chx 2% ou água deionizada e do tempo de envelhecimento dos espécimes (inicial, 6 meses, 1 ano)	72
Tabela 4 -	Valores médios $\pm$ desvio padrão de RU (MPa $\pm$ dp) entre os grupos em função da aplicação de solução de Chx 2% ou água deionizada e do tempo de envelhecimento dos espécimes (inicial, 6 meses, 1 ano).....	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

-	a
%	por cento
*	asterisco
/	por
<	menor
=	igual
±	mais ou menos
≈	aproximadamente
≤	menor ou igual
®	marca registrada / <i>registered trademark</i>
1a	1 ano
6m	6 meses
A	adesiva / <i>adhesive</i>
AD	água deionizada
ANOVA	análise de variância
Bis-EMA	bis-fenol a-glicidil metacrilato etoxilado
Bis-GMA	bis-fenol a-glicidil metacrilato
Bras.	brasileira
BS	<i>bond strength</i>
C	controle
Ca	Cálcio
CA	<i>California</i>
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CC	Coca-Cola
CD	coesiva em dentina
CEP	Código de Endereçamento Postal
Chx	digluconato de clorexidina / <i>chlorhexidine digluconate</i>
CL	Coca-Cola Light
cm	centímetro(s)
cm ²	centímetro(s) quadrado(s)
Corp.	<i>Corporation</i>

CPF	Cadastro de Pessoas Físicas
CR	coesiva em resina
CRO	Conselho Regional de Odontologia
CT	<i>Connecticut</i>
DF	Distrito Federal
dp	desvio-padrão
et al.	<i>et alii</i> ; e outros
EUA	Estados Unidos da América
EVA	Espuma Vinílica Acetinada
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
H₂O	água
H₃PO₄	ácido fosfórico
HEMA	hidroxi-etil metacrilato
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
HFCS	high fructose corn syrup/ Xarope de milho de alta frutose
hrs	hora(s) / <i>hour(s)</i>
I	inicial, a 24 horas
IL	<i>Illinois</i>
Inc.	<i>Incorporation</i>
Ind.	Indústria
KCl	cloreto de potássio
kgf /cm²	quilograma(s)-força por centímetro quadrado
kgf	quilograma(s)-força
KH₂PO₄	monopotássio fosfato
LED	diodo emissor de luz
Ltda.	limitada
M	mista / <i>mixed</i>
mg/ml	miligrama(s) por mililitro
MgCl₂	cloreto de magnésio
min	minuto(s) / <i>minute(s)</i>
ml	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
mM/L	milimolar(es) por litro

mm/min	milímetro(s) por minuto
mm²	milímetro(s) quadrado(s)
MMP(s)	metaloproteinase(s) da matriz
MPa	megapascal(s)
mW/cm²	miliwatt(s) por centímetro quadrado
N	Newtons
n	número(s)
NaCl	cloreto de sódio
NaN₃	azida de sódio
New Rd	<i>New Road</i>
nm	nanômetro(s)
no	número
o	grau(s)
°C	grau(s) Celsius
P	fosforo
p	nível de significância
pH	potencial hidrogeniônico
RC	resina(s) composta(s)
Ref	referencia
RG	Registro Geral - Carteira de Identidade
RJ	Rio de Janeiro
rpm	rotação(ões) por minuto
RU	resistência de união
s	segundo(s)
S.A.	Sociedade Anônima
sd	standard deviation
SiC	carbeto de silício
SP	São Paulo
TEGDMA	trietileno glicol dimetacrilato
TEM	Transmission electron microscopy
TM	marca registrada / trademark
UDMA	uretano dimetacrilato
UF	Unidade da Federação
USP	Universidade de São Paulo

Vic.	Victoria
vs	versus
WD	wide
x	vez(es) / times
y	year /ano
μL	microlitro(s)
μm	micrômetro(s)
μTBS	<i>microtensile bond strength</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	33
3	PROPOSIÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	51
4.2	PREPARO DOS ESPÉCIMES	53
4.2.1	Obtenção dos dentes humanos	53
4.2.2	Exposição e planificação da dentina	53
4.2.3	Determinação dos grupos experimentais	55
4.2.4	Pré-tratamento da superfície dentinária / desafio erosivo	57
4.2.5	Procedimentos restauradores adesivos	58
4.2.6	Seccionamento do espécime e obtenção dos palitos	60
4.3	TESTE DE MICROTRAÇÃO	61
4.3.1	Análise dos padrões de fratura	63
4.3.2	Análise em microscopia confocal de varredura a laser	63
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
5	RESULTADOS	67
5.1	1°. FATOR: SUBSTRATO – EROSÃO	69
5.1.1	Grupo controle vs grupo refrigerante Coca-Cola	69
5.1.2	Grupo controle vs grupo refrigerante Coca-Cola Light	70
5.2	2°. FATOR: BEBIDAS	72
5.2.1	Grupo refrigerante Coca-Cola vs grupo Coca-Cola Light	72
5.3	3°. FATOR: TODOS OS GRUPOS	74
5.3.1	Controle, Coca-Cola e Coca-Cola Light, solução de Clorexidina e tempo	74
5.4	ANÁLISE DO PADRÃO DE FRATURAS	75
5.5	IMAGENS ANALISADAS NA MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER	76

6	DISCUSSÃO	79
6.1	SOBRE A ANÁLISE ESTATÍSTICA	81
6.2	SOBRE OS RESULTADOS	82
6.2.1	Da resistência adesiva	82
6.2.1.1	<i>Fator substrato- erosão: Hígidos (C) vs Erodidos (CC-CL)</i>	83
6.2.1.2	<i>Fator bebidas: CC vs CL</i>	85
6.2.1.3	<i>Todos os grupos</i>	88
6.2.2	Das imagens obtidas pela microscopia confocal	90
7	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICES	109
	ANEXOS	119

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a incidência do desgaste dentário, especificamente da erosão dental, tem apresentado um aumento significativo na Odontologia (DEERY et al., 2000; AL-DLAIGAN; SHAW; SMITH, 2001; GANSS; KLIMEK; GIESE, 2001; HOLBROOK; ARNADOTTIR; KAY, 2003; YIP; SMALES; KAIDONIS, 2003). A erosão dental pode ser definida como o mecanismo responsável pela perda de estrutura dental decorrente de um processo químico de dissolução da porção mineralizada dos dentes (ECCLES, 1979; MEURMAN; TEN CATE, 1996; ZERO, 1996; MOSS, 1998; LUSSI et al., 2011). Esse processo pode ser desencadeado principalmente por ácidos de origem não bacteriana e substâncias com propriedades quelantes (MEURMAN; TEN CATE, 1996; ZERO, 1996; MOSS, 1998; WEST; HUGHES; ADDY, 2001; LUSSI; JAEGGI; ZERO 2004; BARBOUR et al., 2005), porém a doença é considerada multifatorial. Na erosão dental, existe uma desmineralização parcial da superfície de esmalte que, em conjunto com uma ação abrasiva (escovação), pode chegar a estruturas mais profundas expondo dentina, podendo até ocasionar danos pulpares (RIOS et al., 2006a; RIOS et al., 2006b; HONÓRIO et al., 2010). Esse mecanismo de desmineralização envolve a ação direta de íons hidrogênio liberados pelas substâncias ácidas na presença de água que se ligam diretamente aos íons carbonatos ou fosfatos da estrutura dentária, ou ainda a ação de ânions capazes de se ligar ao cálcio, formando outros complexos (AMAECHI 2001; BARBOUR et al., 2005). Como consequência, a hidroxiapatita é perdida ao meio, originando um desequilíbrio molecular e desorganização da estrutura prismática do esmalte. Esses eventos repetidos de erosão provocam o desgaste na estrutura do dente. Dessa forma, em um primeiro estágio, a erosão provoca um amolecimento da superfície, a qual pode ser remineralizada pela saliva. Com a evolução da lesão, em um segundo estágio, essa superfície fica muito fragilizada, desprendendo-se da superfície e resultando em desgaste, com perda irreversível da estrutura. Desse momento em diante, caso o desafio erosivo persista, uma nova superfície sofrerá o primeiro estágio de amolecimento e assim sucessivamente até que a dentina subjacente seja exposta (LUSSI, 2011)

A erosão dental pode ser causada por fatores extrínsecos e intrínsecos (ZERO, 1996; JENSDOTTIR et al., 2004; ZERO; LUSSI, 2005). Os extrínsecos são aqueles associados à dieta como substâncias, alimentos ou bebidas, ácidas, assim como à exposição ambiental a agentes ácidos. Os intrínsecos são aqueles associados aos ácidos do estômago produzidos por vômitos, como parte das doenças de distúrbios alimentares (anorexia e bulimia), refluxo esofagogástrico e regurgitação (WEST; HUGHES; ADDY, 2001; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004). Dentro dos fatores extrínsecos, destaca-se o consumo massivo de substâncias potencialmente erosivas, tais como bebidas refrigerantes e bebidas isotônicas com níveis baixos de pH (LUSSI et al., 2000; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; RIOS et al., 2006; TAHMASSEBI et al., 2006; HONÓRIO et al., 2008a; MAGALHÃES et al., 2009a; RIOS et al., 2009).

A literatura tem evidenciado que essa bebida refrigerante, especialmente do tipo cola, em suas diferentes versões regular, light e zero teriam um potencial erosivo diferente. Isto seria devido aos diferentes pH das bebidas refrigerantes particularmente ácida (oscilam entre pH2 a pH4 aproximadamente), diferente capacidade tampão e sua formulação (diferentes concentrações de cálcio e , açúcar e adoçantes) (DAVIS; WINTER, 1980; BARBOUR et al., 2005; HANNIG et al., 2005; JENSDOTTIR et al., 2006; RIOS et al., 2009; RIOS et al., 2011).

Estudos recentes *in vitro* têm sido desenvolvidos para identificar os efeitos erosivos na estrutura dental dessas bebidas refrigerantes (LUSSI et al., 2000; MAGALHÃES et al., 2008a; MAGALHÃES et al., 2009a; RIOS et al., 2009; RIOS et al., 2011), a ação de diversas substâncias para prevenção ou proteção da estrutura dentária da erosão (GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004; HONÓRIO et al., 2008a; KATO et al., 2009a; KATO et al., 2009b; MAGALHÃES et al., 2009c; KATO et al., 2010), assim como sua interação com a abrasão dental intra/extraoral (RIOS et al., 2006a; RIOS et al., 2006b; MAGALHÃES et al., 2008b; WIEGAND et al., 2008a; KATO et al., 2009b). Porém estudos relacionados aos tratamentos restauradores ainda são poucos explorados.

Diversos autores têm relatado que uma possível forma de tratamento das lesões erosivas seria as restaurações de resina composta, tanto em esmalte como em dentina, mas são poucos os estudos relacionados ao processo adesivo nos tratamentos restauradores em superfícies erodidas, tanto relacionada à adesão

imediate, quanto à manutenção da adesão o longo do tempo, Os processos adesivos em dentina hígida ou cariada têm sido estudados avaliando o comportamento dos materiais adesivos na camada híbrida e a resistência da interface dentina/restauração ao longo do tempo (PASHLEY et al., 1995; HASHIMOTO et al., 2000; HASHIMOTO et al., 2003; ARMSTRONG et al., 2004; CARRILHO et al., 2005a; CARRILHO et al., 2005b; DE MUNCK et al., 2005; GARCIA-GODOY et al., 2007; BRACKETT et al., 2008; BRESCHI et al., 2008). A degradação da camada híbrida tem sido observada por diferentes mecanismos, tais como a degradação da matriz de colágeno na dentina pelas Matrizes de Metaloproteinases (MMP). Essas MMPs ocasionariam a degradação das fibrilas de colágeno não infiltradas pelo sistema adesivo e alterariam a estabilidade da camada híbrida ao longo do tempo, resultando na nanofiltração marginal e, consequentemente, no fracasso da restauração adesiva (GENDRON et al., 1999; DE MUNCK et al., 2003; HASHIMOTO et al., 2003; PASHLEY et al., 2004; HEBLING et al., 2005; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; MAZZONI et al., 2006; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HANNAS et al., 2007).

Diversos estudos científicos têm demonstrado que a aplicação do digluconato de clorexidina a 2% inibe as MMPs, que são ativadas logo após o condicionamento ácido, e mantém a estabilidade da camada híbrida ao longo tempo. (GENDRON et al., 1999; HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; KOMORI et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009b; BRESCHI et al., 2010b; KATO et al., 2010).

Com base nesses fundamentos e ante a pouca evidência científica de estudos em superfícies erodidas em relação aos tratamentos adesivos e à aplicação de clorexidina a 2% como inibidor da ação das MMPs, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da aplicação da solução de clorexidina a 2% na adesão à dentina erodida por duas bebidas refrigerantes tipo cola, ao longo do tempo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

As lesões não cáries despertam a atenção dos profissionais da área odontológica pela perda gradativa de estrutura dentária. Dependendo do fator etiológico, esta perda pode ser considerada fisiológica devido ao maior tempo de exposição da estrutura dentária aos desafios do ambiente bucal (próximo a 10µm por ano) (NUNN; SHAW; SMITH, 1996; ZERO; LUSSI, 2005). Além da quantidade perdida, a qualidade do substrato exposto e as características de progressão podem indicar a necessidade de procedimentos restauradores.

Dessa forma, o primeiro passo relevante é determinar a provável origem do comprometimento dentário. Essas lesões podem ser de origem mecânica, como a abrasão e abfração e de origem química como a erosão (ABRAHAMSEN, 2005; ZERO; LUSSI, 2005; HARA; LUSSI; ZERO, 2006; RIOS et al., 2006b; RIOS et al., 2008).

A erosão é definida como o desgaste químico da estrutura dentária sem o envolvimento de microrganismos ou seus produtos (ECCLES, 1979; MEURMAN; TEN CATE, 1996; ZERO, 1996; MOSS, 1998; SCHLUETER et al., 2011). Com os estudos sobre a erosão dentária, a literatura evidenciou os principais fatores etiológicos que provocam esse processo.

Etiologicamente, a erosão pode ser classificada em dois grupos principais: os decorrentes de fatores intrínsecos e de fatores extrínsecos. A erosão intrínseca pode ser originada dos ácidos endógenos decorrentes de vômito constante, devido a desordens alimentares (como a bulimia e a anorexia nervosa), ou de outras formas de disfunção como regurgitações crônicas e refluxo gástrico (JENSDOTTIR et al., 2004; ZERO; LUSSI, 2005; LUSSI; JAEGGI, 2008; LUSSI et al., 2012). Outros casos incluem gravidez, pacientes alcóolatrás, terapias por abuso de álcool, desordens gastrointestinais, como disfunção gástrica, úlcera duodenal e péptica (IMFELD, 1996). A erosão extrínseca pode ser subdividida em erosão alimentar, medicamentosa, ambiental e decorrente do estilo de vida do indivíduo (JENSDOTTIR et al., 2004; ZERO; LUSSI, 2005; LUSSI; JAEGGI, 2008; LUSSI et al., 2012).

O consumo de alimentos, notadamente refrigerantes, sucos, bebidas ácidas, frutas ácidas e vegetais, podem causar erosão nos dentes (KUNZEL; CRUZ; FISCHER, 2000; CAIRNS et al., 2002; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; BARTLETT; SHAH, 2006; WONGKHANTEE et al., 2006; GANSS; SCHLUETER; KLIMEK, 2007; WIEGAND; ATTIN, 2007). Na dentina, os ácidos podem provocar um alargamento dos túbulos, ocasionando a sensibilidade dos dentes afetados durante a lesão e expondo estruturas internas de dentina. Vários estudos apontam um crescimento cada vez mais precoce de consumo de bebidas com baixo pH, além da maior quantidade, reforçando a exposição dos dentes decíduos e permanentes a condições que favorecem o estabelecimento de erosão dentária (TAHMASSEBI et al., 2006).

Diversos estudos *in vitro* e *in situ* avaliaram o efeito que os refrigerantes a base de cola provocam em substratos de esmalte e dentina, destacando também a diferença entre os produtos regulares e com adição de adoçantes, como por exemplo Coca-Cola e Coca-Cola Light, (WEST; HUGHES; ADDY, 2001; HONÓRIO et al., 2008a; MAGALHÃES et al., 2008a; MAGALHÃES et al., 2009a; RIOS et al., 2009; WIEGAND et al., 2009; RIOS et al., 2011), uma vez que são representativos do consumo e problemas erosivos (MAGALHÃES et al., 2009a; RIOS et al., 2009; RIOS et al., 2011). O pH dessas bebidas varia de 2,5 a 4,0 com potencial de provocar a dissolução da fluorapatita na superfície, dissolvendo assim o esmalte camada por camada, podendo atingir a dentina (ABRAHAMSEN, 2005; GANSS et al., 2009).

No entanto, apesar dos recursos fisiológicos e mecânicos disponíveis para conter as consequências da erosão, dependendo do tipo ou da frequência do agente erosivo, esses recursos não são suficientes, havendo uma perda evidente de estrutura dentária. Quando há a necessidade de restaurar, esmalte ou dentina, o uso de materiais adesivos se torna um dos principais recursos aplicados (MAGNE; MAGNE; BELSER, 2007; REIS; HIGASHI; LOGUERCIO, 2009; GAMBON; BRAND; NIEUW AMERONGEN, 2010).

As principais indicações clínicas para a restauração destas lesões ocorrem em casos com ameaça da integridade estrutural do dente afetado; de hiperestesia dentária; com uma perda significativa de dimensão vertical e/ou função; ou quando o paciente se encontra insatisfeito com a aparência de seus dentes; e finalmente

quando existe exposição pulpar (LAMBRECHTS et al., 1996; REIS; HIGASHI; LOGUERCIO, 2009). Neste cenário, a qualidade do substrato passa a ser um importante parâmetro clínico de avaliação a ser considerado antes do procedimento adesivo.

Meurman et al. (1996) analisaram, em modelo laboratorial, o padrão de desgaste erosivo com soluções ácidas em dentina, constatando a perda mineral em dentina intra e peritubular. Com o passar do tempo ocorre o alargamento da embocadura dos túbulos até a completa destruição da dentina peritubular. Mais recentemente, Zimmerli et al. (2012), verificaram que a dentina submetida a processo erosivo foi capaz de alterar sua resistência de união à dentina.

Clinicamente, as lesões erosivas se apresentam resistentes, de superfícies brilhantes e lisas, dependendo do grau de erosão. Diversos estudos (AMAECHI; HIGHAM, 2001; GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004; RIOS et al., 2006b; MAGALHÃES et al., 2008b) têm estabelecido que a dentina resultante do desafio erosivo *in vitro* apresenta características similares à dentina erodida *in vivo*, mostrando uma superfície amolecida.

Existem evidências, tanto *in vitro* como *in situ*, das diferenças morfológicas, estruturais e químicas entre a dentina erodida e a dentina normal. Embora os aspectos de união de material restaurador aos diversos padrões de dentina tem sido foco de estudo como a dentina normal ou afetada por cárie, dentina infectada, esclerótica ou profunda, pouco ainda tem sido estudado em relação a esse mecanismo na dentina erodida (NAKAJIMA et al., 1995; PERDIGÃO, 2010).

Na dentina normal, os cristais de hidroxiapatita estão organizados formando as paredes dos túbulos dentinários (dentina peritubular) e, também, encontram-se imersos na matriz dentinária composta pela rede de colágeno (dentina intertubular). Essa morfologia da dentina caracterizada por inúmeros túbulos e canalículos que atravessam toda sua espessura, confere grande permeabilidade a essa estrutura e é fundamental para o entendimento das reações e processos de difusão que ocorrem entre os dentes e o meio bucal (MARSHALL et al., 1997; BERTASSONI et al., 2012; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012). A matriz intertubular é composta principalmente por fibrilas de colágeno tipo I associada a proteínas não colágenas e proteoglicanos, formando uma matriz tridimensional reforçada com cristais de apatita.

Baseado nesse padrão, os experimentos laboratoriais são variáveis na tentativa de reproduzir as condições clínicas dos substratos dentários (WEST; HUGHES; ADDY, 2001; HONÓRIO et al., 2008a; WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011). Nos protocolos de simulação de desafios erosivos *in vitro*, o objetivo é de provocar características morfológicas da camada superficial da dentina. As alterações nas características da superfície dentinária induzidas pelo processo de erosão artificial (com ácido nítrico ou bebida refrigerante Coca-Cola, por exemplo) provocam perda mineral, expondo a matriz orgânica, principalmente as fibrilas de colágeno, e o alargamento da embocadura dos túbulos dentinários (GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004; MIRKARIMI; TOOMARIAN, 2012; ZIMMERLI et al., 2012). De acordo com Mirkarimi e Toomarian (2012), num estudo de erosão artificial com Coca-Cola, a superfície dentinária externa foi completamente desmineralizada, com a presença de alguns cristais de hidroxiapatita remanescente ao redor dos túbulos dentinários. Este fato poderia ser atribuído à menor suscetibilidade da dentina peritubular à desmineralização comparada à dentina intertubular (MIRKARIMI; TOOMARIAN, 2012).

Se as diferentes bebidas, mesmo com base similar, como as bebidas à base de cola, apresentam características distintas, poderiam também determinar modificações e consequências distintas em relação ao processo adesivo. Trabalhos de Rios et al. (2009); Rios et al. (2011) demonstraram que o desgaste e a perda mineral provocados pela Coca-Cola na versão light determinam padrões mais sutis de alteração. Este desempenho foi atribuído à presença de adoçante aspartame, que ao ser hidrolisado poderia formar uma barreira à base de fenilalanina. Mas para esse processo, a presença de saliva nos modelos *in situ* foi importante para os resultados obtidos. Em ambos os trabalhos, o substrato avaliado foi o esmalte, não havendo evidências para o comportamento em dentina e nem deste comportamento na adesão dentinária (RIOS et al., 2009; RIOS et al., 2011).

No processo adesivo à dentina, o condicionamento ácido cria microporosidades, pela desmineralização da hidroxiapatita e exposição das fibrilas de colágeno, a qual é infiltrada pelos monômeros dos sistemas adesivos criando adesão à estrutura dentária por retenção micromecânica (PASHLEY et al., 1995). Esse processo denominado hibridização resulta na formação de uma zona de

infiltração-interdifusão na dentina denominada camada híbrida (NAKABAYASHI; NAKAMURA; YASUDA, 1991; NAKABAYASHI, 1992).

Porém a estabilidade dessa ligação é fraca, e sua longevidade se vê afetada por diversos fatores como os fluidos orais e bactérias que atingem a interface. Essas ligações são muito estáveis inicialmente, mas, com o tempo, ocorre a perda de matriz de colágeno da camada híbrida (HASHIMOTO et al., 2000; PASHLEY et al., 2004). Durante os últimos 10 anos, o entendimento dos mecanismos que envolvem a degradação proteolítica das interfaces adesivas à dentina tem ganhado uma imensa atenção por parte dos pesquisadores (TJADERHANE et al., 1998; TJADERHANE et al., 2001). Isto tem levado a diversas tentativas para prevenir uma das principais causas da degradação da interface adesiva que seria a atividade enzimática.

Atualmente, diversas enzimas proteolíticas como as matrizes de metaloproteinases (MMPs) e catepsinas cisteínas têm sido identificadas em dentina e sugerem ser responsáveis pela degradação das fibrilas de colágeno expostas na interface adesiva (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a; TJADERHANE et al., 2013); como também nas lesões cariosas (TJADERHANE et al., 1998; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006). Apesar de a adesão imediata à dentina ser satisfatória, a longevidade da interface adesiva torna-se questionável diante da ação de agentes físicos (forças oclusais e estresses decorrentes da expansão e contração relacionadas às mudanças de temperatura) e químicos sobre ela (DE MUNCK et al., 2003; ARMSTRONG et al., 2004; BRACKETT et al., 2005; DE MUNCK et al., 2005; TAY et al., 2006; GARCÍA-GODOY et al., 2007; BRESCHI et al., 2008). Sugere-se que a concentração decrescente de monômeros difundidos no interior da dentina condicionada por ácido e a subsequente eluição do adesivo a partir dos hidrogéis poliméricos hidroliticamente instáveis das camadas híbridas (HASHIMOTO et al., 2002a; TAY et al., 2002; DE MUNCK et al., 2003; HASHIMOTO et al., 2003b; WANG; SPENCER, 2003; CARRILHO et al., 2005; YIU et al., 2005) deixariam as fibrilas de colágeno expostas e vulneráveis à degradação pelas MMPs (HASHIMOTO et al., 2000; HASHIMOTO et al., 2003c; PASHLEY, 2004; HEBLING et al., 2005; MAZZONI et al., 2006; CARRILHO et al., 2007a; LOGUERCIO et al., 2009; BRESCHI et al., 2010b).

Sugere-se, ainda, que a degradação da matriz orgânica exposta na erosão dentinária também seja decorrente da ação de enzimas do próprio hospedeiro, como as metaloproteinases, similarmente ao que ocorre na cárie dentária (TJÄDERHANE et al., 1998; HARA et al., 2005; KATO et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009; KATO et al., 2010).

Essas MMPs desempenham papel fundamental na degradação do colágeno em lesões de cárie (TJÄDERHANE et al., 1998; MARTIN-DE LAS HERAS; VALENZUELA; OVERALL, 2000; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; HANNAS et al., 2007; MAZZONI et al., 2009), já que tal atividade não é atribuída às bactérias, que podem causar a desmineralização da superfície da dentina, mas não a degradação da matriz orgânica, necessária à formação da cavidade (TJÄDERHANE et al., 1998). Em humanos, a família das MMPs contém 23 membros que são divididos em seis grupos: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, membrana tipo MMPs (MT-MMPs) e outras MMPs baseada em substratos específicos (MARTIN-DE LAS HERAS; VALENZUELA; OVERALL, 2000; HANNAS et al., 2007; MAZZONI et al., 2007; SULKALA et al., 2007).

As MMPs são identificadas nas lesões de cárie dentária tanto na forma latente, quanto na forma ativa. Ante uma queda pH na presença de ácidos, as formas latentes dessas enzimas tornam-se ativas nos desafios cariogênicos (TJÄDERHANE et al., 1998) e, talvez, dos erosivos (GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004, HARA et al., 2005; KATO et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009; KATO et al., 2010). Avaliando, ainda, o papel da aplicação de inibidores de MMPs na dentina condicionada, Pashley et al. (2004) consideraram que a prevenção da degradação das fibrilas de colágeno incompletamente infiltradas por monômeros resinosos durante a criação da camada híbrida seria uma estratégia valiosa na manutenção da qualidade de união de materiais restauradores resinosos à dentina. A ausência de efeito dos inibidores de proteases incorporados à solução de armazenamento na prevenção da redução da resistência de união de uma resina composta à dentina indica que ela é, então, decorrente da inibição das MMPs intrínsecas à dentina (PASHLEY et al., 2004). O efeito inibitório da clorexidina sobre as MMPs pode ser atribuído a um mecanismo de quelatação, já que a adição de cloreto de cálcio em soluções experimentais de clorexidina reverte ou impede a inibição das MMPs -2 e -9, respectivamente. Em concentrações elevadas, a CHX pode inibir a atividade das

MMPs, destacavelmente da MMP-2, por meio da sua desnaturação. (GENDRON et al., 1999).

De forma geral, a estratégia para melhorar a estabilidade das ligações adesivas se baseia na inibição da atividade dessas enzimas. O digluconato de clorexidina tem sido usado na prática clínica por apresentar uma função antimicrobiana (LESSA et al., 2010), alta substantividade à matriz de dentina (CARRILHO et al., 2010; KIM et al., 2010) e baixa citotoxicidade transdental (LESSA et al., 2010). A substantividade da clorexidina, ou sua capacidade de permanecer retida na matriz orgânica da dentina, pode ser responsável, portanto, pela prevenção ou minimização da diminuição dos valores de resistência de união de resina compostas aos diferentes substratos dentinários com o passar do tempo (PASHLEY et al., 2004; HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; BRESCHI et al., 2009; CARRILHO et al., 2010; LIU et al., 2011), justificando a efetividade da solução de CHX a 2%. Porém o sucesso da solução de clorexidina no aumento da durabilidade das ligações adesivas tem sido principalmente devido a sua capacidade inibitória da atividade proteolítica das MMPs (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009; BRESCHI et al., 2010a; BRESCHI et al., 2010b), principalmente das MMP-2, -8, e -9 (GENDRON et al., 1999) e das catepsinas cisteinas (SCAFFA et al., 2012). Devido a essa ação, a solução de clorexidina pode ter uma ação benéfica na estabilidade da camada híbrida, como inibidor da atividade proteolítica das MMPs. A aplicação dessa solução é realizada após condicionamento ácido, para evitar a ação das MMPs sobre as fibras de colágeno expostas pela desmineralização e não infiltradas pelo sistema adesivo (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; CARRILHO et al., 2007a; HANNAS et al., 2007; KOMORI et al., 2009). Existem, no entanto, poucos estudos que avaliam a efetividade da adesão à dentina erodida (ZIMMERLI et al., 2012). Um estudo clínico mostrou que restaurações cervicais adesivas permaneceram retidas, por um ano, à dentina não preparada (FEDERLIN et al., 1998), mas, em uma outra investigação, uma elevada taxa (44-50%) de restaurações perdidas foi observada (BRACKETT et al., 2005).

A atividade da solução de digluconato de clorexidina é pH dependente (5.5 a 7), porém, é neutralizada na presença de surfactantes iônicos, ânions inorgânicos

(fosfato, nitrato ou cloro). A capacidade da clorexidina em interferir na degradação promovida pelas MMPs tem sido considerada, por sua vez, dose-dependente (GENDRON et al., 1999). Soluções aquosas de clorexidina 2% impedem ou minimizam, em alguns casos por até dois anos, a diminuição dos valores de resistência de união de materiais resinosos à dentina e a nanoinfiltração da interface adesiva, *in vitro* e *in vivo*, em dentes decíduos e permanentes, hígidos ou cariados (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; KOMORI et al., 2009; BRESCHI et al., 2010b). *In vitro*, soluções a 0,2% mostraram-se tão eficazes, quando aplicadas sobre a dentina normal, quanto aquelas a 2% (BRESCHI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009; BRESCHI et al., 2010b). Estudos prévios têm demonstrado que a aplicação de soluções de digluconato de clorexidina a 2%, apresenta-se como uma estratégia promissora à prevenção da diminuição dos valores de resistência de união de resinas compostas tanto à dentina normal quanto à dentina erodida (FRANCISCONI et al., 2012).

Embora o preparo da superfície, ou mínima asperização da mesma com uma ponta diamantada, seja recomendável ao estabelecimento de uma adesão mais satisfatória, em longo prazo, à dentina erodida, uma abordagem menos invasiva e tão efetiva quanto seria preferível (ZIMMERLI et al., 2012).

Os valores de resistência adesiva são geralmente usados para a análise dessa interface adesiva tão questionada. O teste aceito para avaliar a resistência adesiva da interface dente/restauração é o teste de microtração, que permite a utilização de espécimes com pequenas dimensões, entre 0,5mm² a 1,0mm² na interface de união (SANO et al., 1994; PASHLEY et al., 1999).

A avaliação da influência da clorexidina na estabilidade da camada híbrida, pode ser conduzida em forma qualitativa através de análise em microscopia confocal. Para realizar esse tipo de avaliação, o sistema adesivo utilizado é marcado com Rodamina B. A superfície dos espécimes é produzida de maneira similar as obtidas no MEV, mas com as vantagens da simplicidade da técnica (WATSON, 1991; WATSON; BOYDE, 1991). A metodologia empregada na microscopia confocal não oferece complexidade nem dificuldade na preparação da amostra. Essa vantagem leva a um menor risco de artefatos de contração ou ressecamento, sem alteração das características próprias da amostra (WATSON, 1991; WATSON; BOYDE, 1991; PIOCH et al., 1997), o que permite que o mesmo espécime possa ser

estudado em outra técnica microscópica adicional e/ou analisado em diferentes tempos de avaliação. A capacidade de foco e melhor resolução do que a imagem convencional, associadas à vantagem adicional da visualização da superfície e subsuperfície do espécime também são relevantes.

Portanto, essa metodologia oferece a possibilidade de obter uma imagem tridimensional, levando à correlação mais precisa e informativa quando comparada à análise bidimensional (WATSON; BOYDE, 1991; DIASPRO; ROBELLO, 2000).

A adição de corantes fluorescentes como a Rodamina B a sistemas adesivos permite caracterizar a micromorfologia e a espessura da camada híbrida formada, a distribuição dentro da dentina, a extensão dos *tags* de resina, a espessura da camada adesiva e os possíveis defeitos ou alterações existentes na interface adesiva (D'ALPINO et al., 2006a; D'ALPINO et al., 2006b).

Apesar de estudos apontarem as consequências deletérias da erosão dentária, não há relatos relacionados à adesão ao substrato dentinário resultante da ação das bebidas tipo cola (Coca-Cola e Coca Light), nos tempos iniciais do processo adesivo, nem sobre sua ação ao longo do tempo. Da mesma forma, não há estudos sobre a ação da solução de clorexidina na dentina erodida por essas bebidas na preservação da adesão ao longo do tempo.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a influência da aplicação da solução de clorexidina a 2% na resistência de união (RU) e qualidade da interface adesiva de um sistema restaurador adesivo à dentina normal e dentina erodida por bebidas refrigerantes tipo cola (Coca-Cola e Coca-Cola Light), ao longo do tempo (24 horas, 6 meses e 1 ano).

Foram consideradas as hipóteses nulas de que:

- 1) Não há diferença entre os valores de RU do sistema restaurador adesivo à dentina, em função da condição do respectivo substrato (dentina normal ou erodida);
- 2) Não há diferença entre os valores de RU do sistema restaurador adesivo à dentina, em função das duas bebidas refrigerantes do tipo cola;
- 3) Não há diferença entre os valores de RU do sistema restaurador adesivo à dentina, em função do tempo de envelhecimento dos espécimes (24 horas, 6 meses ou 1 ano) relacionados aos tratamentos de substratos propostos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo *in vitro* avaliou a resistência de união de um sistema restaurador adesivo ao substrato dentinário erodido por duas bebidas refrigerantes do tipo cola, tratado previamente com concentrações de solução de clorexidina a 2%, em três tempos de avaliação (24 horas, 6 meses e 1 ano de envelhecimento dos espécimes). A variável de resposta principal foi a resistência de união por microtração (RU).

A análise do fator erosão (dentina hígida vs dentina erodida com Coca-Cola ou dentina erodida Coca-Cola Light) foi feita por meio de três fatores de estudo:

- Fator Substrato: em 2 níveis (hígido e erodido);
- Fator Tratamento: em 2 níveis (água deionizada e clorexidina);
- Fator Tempo: em 3 níveis (inicial, 6 meses e 1 ano).

A análise comparativa entre as bebidas Coca-Cola e Coca-Cola Light dos espécimes erodidos também foi feita por meio de três fatores de estudo:

- Fator Bebida: em 2 níveis (Coca-Cola e Coca-Cola Light);
- Fator Tratamento: em 2 níveis (água deionizada e clorexidina);
- Fator Tempo: em 3 níveis (inicial, 6 meses e 1 ano).

Por fim, a análise comparativa entre todos os grupos (fator substrato, fator tratamento e fator tempo) foi feita por meio de três fatores de estudo:

- Fator Substrato: em 3 níveis (hígido/sem erosão, Coca-Cola, Coca-Cola Light);
- Fator Tratamento: em 2 níveis (água deionizada e clorexidina);
- Fator Tempo: em 3 níveis (inicial, 6 meses e 1 ano).

Figura 1 - Delineamento experimental: **A** - Obtenção dos terceiros molares humanos hígidos extraídos; **B** - Seccionamento dos terços oclusal e apical dos terceiros molares; **C** - Formação de *smear layer* sobre a dentina exposta, por meio da ação de uma lixa granulação de 600 por 1 min, sob irrigação em politriz; **D** - Erosão da dentina em 2/3 dos espécimes por dois refrigerantes à base de cola: Coca-Cola e Coca-Cola Light (n=11); imersões de 5 min; 3x/dia; 5 dias – CC e CL e submissão dos demais espécimes (dentina controle) diretamente à próxima etapa; **E** - Condicionamento da dentina por 15s com ácido fosfórico a 37%, lavagem e secagem; **F** - Reidratação de cada metade dos espécimes do grupo controle (sem erosão) com água deionizada (controle C) ou solução de Chx a 2% (C-Chx 2%) também realizado nos grupos CC e CL, respectivamente; **G** - Aplicação do sistema adesivo Adper Single Bond 2; **H** - Inserção incremental (2mm cada incremento) da resina composta na porção coronária com Filtek Z350; **I** - Seccionamento dos espécimes em palitos (área de secção transversal de $\approx 0,80\text{mm}^2$), após armazenagem em água deionizada por 24 horas a 37°C; **J** - Testes de microtração (EMIC; 0,5mm/min), imediatamente, após 6 meses e após 1 ano de envelhecimento, e avaliação dos tipos de falhas de fraturas adesivas com um microscópio digital; **K** - Os espécimes restaurados com adesivo marcado com Rodamina B, foram seccionados em fatias (0,80mm espessura) para sua avaliação em microscopia confocal de varredura a laser

4.2 PREPARO DOS ESPÉCIMES

4.2.1 Obtenção dos dentes humanos

Para este estudo foram utilizados dentes terceiros molares extraídos por indicação odontológica, sendo que dentes com dimensões semelhantes foram selecionados para o estudo e os demais utilizados para o teste piloto. Os dentes foram obtidos nas Clínicas de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP e por doações de cirurgiões-dentistas que atendem em consultórios particulares, mediante assinatura do termo de Doação de Dentes (Anexos A e B), segundo a resolução nº 196 do Conselho Nacional de Saúde (Ministério da Saúde, DF) e após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da FOB-USP (processo nº 131/2009 – Anexo C e D).

Após a extração, os dentes foram limpos com curetas (Duflex 55G, SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para remoção de restos de tecidos gengivais e, posteriormente, armazenados em solução de azida de sódio a 0,02% renovada a cada 10 dias, onde ficaram imersos durante todo o período até o preparo dos espécimes. A solução foi trocada periodicamente e o período máximo de armazenagem dos dentes foi de 6 meses antes da utilização.

4.2.2 Exposição e planificação da dentina

Os 60 dentes selecionados foram fixados com cera pegajosa no centro de um dispositivo metálico acoplado à máquina de corte digital de precisão Isomet 1000 Precision Saw (Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA). O terço oclusal ($\approx 2,5\text{mm}$ a partir da ponta de cúspide mais baixa) dos terceiros molares foi removido, para exposição da dentina coronária, subjacente ao esmalte, com o auxílio de um disco diamantado dupla face (High Concentration Diamond - Wafering Blade 102mm x 0,3mm x 12,7mm - Ref 12205; Exttec Corp., Enfield, CT, EUA), refrigerado com água deionizada, a uma velocidade de 300rpm. O terço apical radicular também foi removido, para facilitar o corte dos espécimes posteriormente, durante a obtenção

dos palitos para microtração. Em seguida, cada dente foi submetido à ação de uma lixa de carbeto de silício de granulação 320 (Excet 15005, WD 8" (203mm), 320 grit – Excet Corp, Enfield, CT, EUA) em uma politriz metalográfica em baixa velocidade, sob refrigeração com água deionizada, para remoção de qualquer remanescente de esmalte. Posteriormente, com o intuito de criar uma *smear layer* sobre a dentina planificada e exposta, todas as superfícies dentinárias dos dentes foram submetidas à ação de uma lixa de carbeto de silício de granulação 600 (Excet 15007, WD 8" (203mm), 600 grit – Excet Corp, Phoenix CT, EUA) por 1 minuto sob refrigeração constante com água deionizada, em uma politriz metalográfica Aropol 2V (Arotec, Cotia, SP, Brasil) (Figuras 2a - 2d).

Figura 2a - Marcação do terço oclusal e radicular dos terceiros molares, para exposição da dentina coronária, subjacente ao esmalte

Figura 2b - Seccionamento da porção oclusal e parte da radicular, com auxílio de um disco diamantado dupla face, refrigerado com água deionizada, a uma velocidade de 300rpm

Figura 2c - Planificação da dentina exposta com uma lixa de granulação 320 sob refrigeração em politriz, com água deionizada, para remoção de remanescente de esmalte

Figura 2d - Criação de uma *smear layer* sobre a mesma dentina, por meio da ação de uma lixa de carbeto de silício de granulação 600 (1 min.) sob refrigeração na mesma politriz

4.2.3 Determinação dos grupos experimentais

Os espécimes foram, então, distribuídos, após estabelecimento dos diferentes grupos por meio de aleatorização, nos seguintes grupos, para serem submetidos a análise de RU posteriormente.

Grupo	Desafio erosivo	Tratamento após condicionamento ácido	Tempo de envelhecimento dos espécimes
Controle - C (n=10)	Nenhum	Reidratação com água deionizada	Inicial (24horas), 6 meses e 1 ano
C-Chx 2% (n=10)		Reidratação com solução de Clorexidina a 2%	
Coca-Cola - CC (n=10)	Coca-Cola	Reidratação com água deionizada	Inicial (24horas), 6 meses e 1 ano
CC-Chx 2% (n=10)		Reidratação com solução de Clorexidina a 2%	
Coca-Cola Light - CL (n=10)	Coca-Cola Light	Reidratação com água deionizada	Inicial (24horas), 6 meses e 1 ano
CL-Chx 2% (n=10)		Reidratação com solução de Clorexidina a 2%	

Quadro 1 - Grupos experimentais

Os materiais utilizados no experimento são descritos no Quadro 2.

MATERIAL	FABRICANTE	CATEGORIA	COMPOSIÇÃO*
Filtek™ Z350 Restaurador Universal® Cor A2	3M do Brasil Ltda., St Paul, MN, EUA.	Resina composta nanoparticulada	Matriz orgânica: -Bis-GMA -Bis-EMA -UDMA -Pequenas quantidades de TEGDMA -Canforoquinona Parte inorgânica (78,5%, em peso): -Nanopartículas de sílica não-aglomerada (20nm) -Nanoaglomerados de zircônia/sílica (0,6-1,4µm)
Adper™ Single Bond 2®	3M do Brasil Ltda., St Paul, MN, EUA.	Sistema adesivo convencional de 2 passos	-Bis-GMA -HEMA -Diuretanodimetacrilato -copolímero do ácido polialcenóico -canforoquinona -água -etanol -glicerol 1.3 dimetacrilato -sílica (5nm; 10% em peso)
Clorexidina a 2%	Manipulada em laboratório	Solução de limpeza não desmineralizante/Solução Bactericida	Solução de digluconato de clorexidina na concentração de 2%, em água deionizada
Condicionador Dental Gel®	Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil	Ácido fosfórico a 37%	Solução de ácido fosfórico na concentração de 37%, em gel
Coca-Cola®	Coca-Cola Brasil, Spaipa S.A. Ind. Bras. de Bebidas, Marília, SP, Brasil	Refrigerante à base de cola	pH: 2,74/120ml/** -água carbonada -extrato de noz de cola -caféina -aroma natural -corante caramelo IV -acidulante ácido fosfórico -edulcorantes artificiais -conservador benzoato de sódio -regulador de acidez citrato de sódio
Coca-Cola Light®	Coca-Cola Brasil, Spaipa S.A. Ind. Bras. de Bebidas, Marília, SP, Brasil	Refrigerante à base de cola	pH: 3,0/120ml/** - água gaseificada -extrato de noz de cola -caféina -aroma natural -corante caramelo IV -acidulante ácido fosfórico -edulcorantes artificiais -aspartame (24mg/100ml) -acesulfame de potássio (16mg/100ml) - conservador benzoato de potássio -regulador de acidez citrato de sódio
Saliva artificial	Manipulada em laboratório	Solução artificial para armazenagem dos espécimes	-CaCl ₂ 0,70mM/l -MgCl ₂ .6H ₂ O 0,20mM/l -KH ₂ PO ₄ 4,00mM/l -KCl 30,0mM/l -NaN ₃ 0,30mM/l -Tampão HEPES (ácido) 20,0mM/l

*Dados obtidos do fabricante

**Analisado em laboratório: pH/titulação para pH7

Quadro 2 - Principais materiais utilizados no presente estudo

4.2.4 Pré-tratamento da superfície dentinária / desafio erosivo

As superfícies de dentina dos dentes dos grupos C e C-Chx 2% não receberam nenhum tipo de tratamento, apenas a formação de *smear layer* para o processo restaurador. As superfícies de dentina dos dentes restantes foram submetidas a um desafio erosivo em laboratório, semelhante àqueles adotados pela literatura (HONÓRIO et al., 2008a; KATO et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009a; RIOS et al., 2009; KATO et al., 2010) determinando-se o que se chamou de dentina erodida. Esse processo erosivo em laboratório foi realizado com duas bebidas gaseificadas tipo cola (Coca-Cola e Coca-Cola Light).

Os espécimes do grupo CC e CC-Chx 2% foram imersos em 60 ml/espécime de refrigerante à base de cola (Coca-Cola), durante 5 minutos, três vezes ao dia, por 5 dias e mantidos em saliva artificial durante o restante do processo do desafio erosivo, a qual foi substituída diariamente. Cada dente foi posicionado em um orifício padronizado, com diâmetro compatível à área da dentina exposta, em uma base de Espuma Vinílica Acetinada (EVA) que, flutuando sobre as respectivas soluções, permitia o contato exclusivo da superfície com as soluções refrigerantes. Previamente ao primeiro contato com o refrigerante, as superfícies dentinárias foram colocadas em contato com a saliva artificial por 12 horas. Da mesma forma, os espécimes dos grupos CL e CL-Chx 2% foram imersos em outro refrigerante à base de cola (Coca-Cola Light), pelo mesmo período e mesmo mecanismo de desafio erosivo em laboratório dos espécimes erodidos pela Coca-Cola.

As soluções refrigerantes eram substituídas a cada exposição e a saliva artificial, diariamente. Quando os espécimes erodidos foram movimentados da saliva artificial para o refrigerante não receberam tratamento nenhum, mas quando foram deslocados do refrigerante para a saliva, nos intervalos entre os desafios, foram lavadas abundantemente com água deionizada. Finalizando todo o processo de desafio erosivo, que foi realizado em ambiente com temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ (soluções utilizadas nessa mesma condição), as superfícies de dentina erodida foram, por fim, lavadas com água deionizada e secas com suaves jatos de ar da seringa tríplice, para receberem, junto com os espécimes de dentina normal, os procedimentos adesivos/restauradores posteriores (Figura 3).

Figura 3 - Desafio erosivo em laboratório. As superfícies dentinárias foram expostas à bebida refrigerante durante 5min /3 vezes ao dia/ 5 dias, e mantidas em saliva artificial entre os desafios e também ao termino do experimento por 12 horas

4.2.5 Procedimentos restauradores adesivos

Todos os espécimes tiveram a superfície dentinária condicionada com ácido fosfórico a 37% por 15 segundos, lavada por 30 segundos e sequencialmente seca com jatos de ar. Após o condicionamento, metade dos espécimes foi reidratada com 1,5µL de água deionizada (AD) e a outra metade foi tratada com 1,5µL de solução de digluconato de clorexidina a 2% (Chx 2%). Depois de 60 segundos, as superfícies dentinárias desses dentes foram suavemente secas com papel absorvente. Em seguida, o sistema adesivo convencional de dois passos Adper Single Bond 2 foi aplicado seguindo as indicações do fabricante: duas camadas finas de forma ativa (15s), com um leve jato de ar para facilitação da evaporação do solvente, e fotoativação por 20 segundos (Radii-cal® - 1000mW/cm², SDI Limited, Bayswater, Vic, Austrália) (Figuras 4a - 4e).

Figura 4a - Condicionamento com ácido fosfórico a 37% (15s), lavagem (30s) e secagem com papel absorvente

Figura 4b - Hidratação dos espécimes após condicionamento ácido por 60s. Metade de cada grupo (CC, CL, Controle) foram hidratados com 1,5µL de água deionizada (n=10) e a outra metade com 1,5µL de solução de digluconato de clorexidina a 2% (n=10)

Figura 4c - Remoção dos excessos das respectivas soluções com papel absorvente

Figura 4d - Aplicação do sistema adesivo Adper Single Bond 2 em duas camadas finas

Figura 4e - Fotopolimerização do sistema adesivo por 20 segundos

Dois incrementos (2mm de espessura cada) de resina composta nanoparticulada (Filtek Z350) cor A2, foram aplicados sobre os espécimes e cada um deles foi fotoativado por 20 segundos, utilizando-se, para tal, o mesmo aparelho fotopolimerizador LED (Figuras 4f - 4i).

Figura 4f - Aplicação do primeiro incremento (2mm) de resina composta

Figura 4g - Adaptação da resina composta em toda a superfície dentinária

Figura 4h - Fotoativação de cada incremento de resina composta por 20 segundos

Figura 4i - Aplicação do segundo incremento (2mm) de resina composta aplicado sobre o primeiro

4.2.6 Seccionamento dos espécimes e obtenção dos palitos

Os espécimes foram levados à máquina de corte Isomet 1000 Precision Saw (Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA) para seccionamento e obtenção de palitos constituídos de dentina e resina composta, unidos pela interface adesiva, com área de seção transversal de aproximadamente $0,80\text{mm}^2$. Para tanto, foram fixados com cera pegajosa, pela porção radicular seccionada, ao dispositivo metálico que era acoplado à máquina de corte e, perpendicularmente à interface adesiva, a partir da superfície do último incremento de resina, fatiados pelo disco diamantado dupla face (ExtecCorp., Enfield, CT, EUA), sob refrigeração com água deionizada, a uma velocidade de 150 rpm. Posteriormente, girando-se a base em que estavam fixados em 90° , foram, da mesma maneira, novamente seccionados. Cada palito obtido foi individualmente extraído do conjunto, com auxílio de uma pinça clínica (Duflex Pinça Univer, SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), e aqueles situados à periferia,

onde poderia haver presença de esmalte, foram desconsiderados. Em média, 15 a 20 palitos foram obtidos de cada dente (Figuras 5a - 5d).

Figura 5a - Espécime fixado com cera pegajosa pela porção radicular, ao dispositivo metálico na máquina de corte, para seccionamento perpendicular à interface adesiva em sentido mesiodistal

Figura 5b - Vista oclusal do seccionamento no sentido mesiodistal (fatias com aproximadamente 0,80mm) cortados somente em fatias

Figura 5c - Seccionamento do espécime no sentido vestibulolingual

Figura 5d - Cada palito foi extraído do conjunto, com auxílio de uma pinça clínica. Em média, 15 a 20 palitos foram obtidos de cada dente

4.3 TESTE DE MICROTRAÇÃO

Um terço dos palitos obtidos de cada dente foi testado imediatamente (I); um terço foi armazenado em saliva artificial (substituída a cada 14 dias) a 37°C, por 6 meses (6m), e um terço, por 1 ano (1a), para então serem testados.

Cada palito foi individualmente fixado com um adesivo à base de cianocrilato (SuperBonder Flex Gel Loctite®; Henkel Ltda., São Paulo, SP, Brasil), pelas extremidades, a um dispositivo tipo Bencor Multi T, levado à uma máquina de testes universal EMIC DL 500 BF® (EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda., São

José dos Pinhais, PR, Brasil) e testado, sob força de tração (célula de carga de 50Kgf) perpendicular à interface adesiva, a uma velocidade de 0,5mm/min, até o rompimento dessa interface.

A tensão necessária para causar a ruptura da interface adesiva de cada palito foi determinada pela razão entre a carga (Kgf) máxima e a área da seção transversal do palito (cm^2), aferida com um paquímetro digital (Série/Código 500-144, Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), com precisão de 0,01mm. A resistência de união (RU) foi calculada dividindo-se o valor de força máxima (Kgf) pela área (cm^2) e, posteriormente, convertida em megapascals (MPa).

Aos palitos que fraturaram prematuramente, no interior do próprio recipiente em que estavam armazenados, foi atribuído o valor 0 (zero) como valor de RU, já que a resistência adesiva falhou sem intervenção de nenhuma força externa. Àqueles que fraturaram prematuramente, por quaisquer outros motivos seja na manipulação do espécime ao fixar ou deslocamento do dispositivo, nenhum valor foi atribuído e foram excluídos do estudo (Figuras 6a - 6c).

Figura 6a - Fixação de um palito, pelas extremidades, com um adesivo à base de cianocrilato, a um dispositivo tipo Bencor

Figura 6b - Ruptura da interfase adesiva do espécime

Figura 6c - Máquina de testes Universal EMIC

4.3.1 Análise dos padrões de fratura

As superfícies fraturadas de ambos os segmentos de cada palito foram analisadas com o auxílio de um microscópio digital (Dino-Lite Digital Microscope®; AnMo Electronics Corp., New Taipei City, San-Chung District, Taiwan), com 50x de aumento, para determinação do padrão de fratura (Figuras 7a e 7b).

As fraturas foram classificadas em tipo adesiva, mista ou coesiva:

- Tipo adesiva (A): quando a fratura ocorreu na interface adesiva;
- Tipo mista (M): fratura adesiva e coesiva;
- Tipo coesiva em dentina (CD): quando a fratura ocorreu no substrato dentinário (dentina);
- Tipo coesiva em resina composta (CR): quando a fratura ocorreu no material restaurador (resina composta).

Figura 7a - Microscópio Digital Dino-Lite Digital Microscope®

Figura 7b - Superfícies fraturadas

4.3.2 Análise em microscopia confocal de varredura a laser

Adicionou-se um dente para cada grupo experimental (6 dentes) para análise em microscopia confocal de varredura a laser, para observação da interface adesiva após 24 horas, 6 meses e 1 ano. Os espécimes selecionados receberam os mesmos tratamentos de cada grupo com relação ao desafio erosivo, a reidratação e tempo de armazenagem. Para isso, o sistema adesivo foi previamente marcado por um corante fluorescente, a rodamina B (Rhodamine B®; Sigma-AldrichChemie

GmbH, Gillingham, New Rd, Reino Unido), adicionado na concentração de 0,16 mg/ml que permitiu a análise das características de hibridização. O espécime de cada grupo hibridizado não foi seccionado em palitos, mas, sim, em fatias obtidas pelo corte do espécime no sentido mesiodistal. As fatias obtidas de cada espécime/grupo foram analisadas nos períodos de 24 horas, 6 meses e 1 ano, em um mesmo ponto de referência de incidência do laser do microscópio em todas as leituras. Essas fatias foram armazenadas em saliva artificial entre as leituras. As interfaces adesivas das superfícies foram analisadas em microscopia confocal de varredura a laser (Microscópio Leica TCS SPE[®], Leica Microsystems, Mannheim, Bade-Vurtemberg, Alemanha) (Figura 8), com 40x de aumento; imagens com 1,0 x 1,0 mm e 1024 *pixels* / 0,976µm de resolução. As análises foram realizadas imediatamente, após 6 meses e após 1 ano de envelhecimento, para avaliação da qualidade da hibridização. Ex.: espessura e homogeneidade da camada híbrida, assim como a formação, distribuição e presença dos *tags* ao longo do tempo.

Figura 8 - As interfaces adesivas foram qualitativamente analisadas com um microscópio confocal de varredura a laser (40x de aumento, 0,976µm de resolução); Microscópio Leica TCS SPE[®], Leica Microsystems, Mannheim/ Bade-Vurtemberg – Alemanha

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados obtidos de resistência de união (RU) considerando-se cada dente, e não cada palito, como unidade experimental, foi realizado um teste para verificação da normalidade da distribuição amostral (Kolmogorov-Smirnov; Systat Software Inc., Chicago, IL, EUA). Constatando-se aderência à curva normal, os testes de Análise de Variância a três critérios

(substrato dentinário; tratamento após condicionamento ácido; tempo de envelhecimento) e de comparações múltiplas de Tukey foram aplicados, com nível de significância de 5% (Apêndice A). O programa estatístico utilizado foi o SigmaPlot for Windows Version 12.0[®] (Systat Software Inc., Chicago, IL, EUA).

Os testes de Kruskal-Wallis (variável quantitativa) e de Tukey ($p < 0,05$) foram aplicados para determinação dos tipos de falhas predominantemente observados (% de falhas do tipo A, M, CD ou CR; Apêndice B) em cada grupo experimental.

As imagens obtidas pela avaliação em microscopia confocal foram apresentadas em forma ilustrativa (observação visual), observando a espessura e homogeneidade da camada híbrida, assim como a formação, distribuição e presença dos *tags* nos períodos de 24 horas, 6 meses e 1 ano de avaliação nas diferentes condições testadas.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 1°. FATOR: SUBSTRATO – EROÇÃO

5.1.1 Grupo controle vs grupo refrigerante Coca-Cola

Analisando-se os dados obtidos pôde-se observar significância estatística para todas as variáveis observadas: substrato dentinário ($p=0,000$), tratamento com solução Chx a 2% ($p=0,000$) e tempo de envelhecimento dos espécimes ($p=0,000$). Também houve a observação de significância de interações entre fatores: a interação entre as variáveis substrato dentinário e tempo de envelhecimento dos espécimes ($p=0,000$) e entre as variáveis tratamento com a solução de Chx a 2% e tempo de envelhecimento dos espécimes ($p=0,000$). Não foi observada significância da interação substrato dentinário e tratamento com a solução de Chx a 2% ($p=0,177$).

Os valores médios de RU e respectivos desvios padrão à dentina controle e à dentina erodida com Coca-Cola, em função da aplicação das soluções de Chx a 2% e do tempo de envelhecimento dos espécimes, são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios $\pm$ desvio padrão de resistência de união (Mpa $\pm$ dp) à dentina controle e à dentina erodida com refrigerante tipo cola (Coca-Cola), em função da aplicação de solução de Chx 2% ou água deionizada (controle) e do tempo de envelhecimento dos espécimes (inicial, 6 meses, 1 ano)

Grupos	Substrato	Tratamento	Tempo	RU (MPa) Média $\pm$ dp	Comparação estatística
1	Hígido	Água	Inicial	38,57 $\pm$ 15,36	EF
2	Hígido	Água	6 meses	26,67 $\pm$ 19,37	BC
3	Hígido	Água	1 ano	12,21 $\pm$ 11,24	AD
4	Hígido	Clorexidina	Inicial	41,93 $\pm$ 9,97	F
5	Hígido	Clorexidina	6 meses	31,12 $\pm$ 17,02	CE
6	Hígido	Clorexidina	1 ano	11,86 $\pm$ 10,4	A
7	Coca-Cola	Água	Inicial	21,80 $\pm$ 7,09	B
8	Coca-Cola	Água	6 meses	8,33 $\pm$ 10,71	A
9	Coca-Cola	Água	1 ano	4,70 $\pm$ 9,04	A
10	Coca-Cola	Clorexidina	Inicial	19,85 $\pm$ 7,87	BD
11	Coca-Cola	Clorexidina	6 meses	24,32 $\pm$ 11,7	BC
12	Coca-Cola	Clorexidina	1 ano	6,19 $\pm$ 12,37	A

• Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significante ($p<0,05$)

Considerando-se a variável substrato dentinário (hígida x CC), os valores de RU da dentina erodida por Coca-Cola (CC) foram inferiores aos respectivos valores de RU à dentina controle, no tempo inicial e 6 meses, demonstrando que o desafio erosivo foi capaz de afetar negativamente a qualidade da adesão à dentina.

Quanto à comparação entre os grupos hígidos (1 a 6), reidratados com água deionizada ou com a solução de Chx 2%, o tratamento com clorexidina a 2% sempre foi estatisticamente similar ao seu respectivo grupo, apenas reidratado com água deionizada. Na comparação entre os grupos erodidos com CC (7 a 12), apenas aos 6 meses, observou-se diferença estatisticamente significativa para o grupo reidratado com Chx 2%, sendo este com valores de RU maiores.

Em relação à variável tempo de envelhecimento, nota-se que houve influência significativa, tanto para a dentina hígida, quanto para a dentina erodida com CC. Para o grupo controle (hígido), os valores de RU à dentina apresentaram redução significativa e progressiva para os três tempos de envelhecimento analisados, quando foram reidratados com água deionizada ou com Chx 2%. Para a dentina erodida com CC, grupos reidratados com água deionizada reduziram os valores de RU do tempo inicial para os demais tempos, que não diferiram significativamente entre si. Quando reidratados com Chx 2%, a RU se manteve estável dos até os 6 meses, reduzindo para o tempo de 1 ano.

5.1.2 Grupo controle vs grupo refrigerante Coca-Cola Light

Analisando-se os dados obtidos pôde-se observar que houve significância estatística para as variáveis substrato dentinário ($p=0,000$), tratamento com solução Chx a 2% ($p=0,000$) e tempo de envelhecimento dos espécimes ($p=0,000$). Na avaliação das interações, houve significância para a interação entre as variáveis substrato dentinário e tempo de envelhecimento dos espécimes ($p=0,000$) e na interação substrato dentinário e tratamento com a solução de Chx a 2% ($p=0,036$). Apenas não se observou significância na interação do tratamento com a solução de Chx a 2% e tempo de envelhecimento dos espécimes ($p=0,058$).

Os valores médios de RU da resina composta à dentina controle e à dentina erodida com Coca-Cola Light, em função da aplicação da solução de Chx a 2% e do tempo de envelhecimento dos espécimes são descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores médios $\pm$ desvio padrão de resistência de união (MPa $\pm$ dp) à dentina controle e à dentina erodida com refrigerante tipo cola (Coca-Cola Light), em função da aplicação de solução de Chx 2% ou água deionizada e do tempo de envelhecimento dos espécimes (inicial, 6 meses, 1 ano)

Grupos	Substrato	Tratamento	Tempo	RU (MPa) Média $\pm$ dp	Comparação estatística
1	Hígido	Água	Inicial	38,57 $\pm$ 15,36	FG
2	Hígido	Água	6 meses	26,67 $\pm$ 19,37	DE
3	Hígido	Água	1 ano	12,21 $\pm$ 11,24	AB
4	Hígido	Clorexidina	Inicial	41,93 $\pm$ 9,97	G
5	Hígido	Clorexidina	6 meses	31,12 $\pm$ 17,02	EF
6	Hígido	Clorexidina	1 ano	11,86 $\pm$ 10,4	AB
7	Coca Light	Água	Inicial	22,70 $\pm$ 9,63	CD
8	Coca Light	Água	6 meses	10,25 $\pm$ 15,6	AB
9	Coca Light	Água	1 ano	4,93 $\pm$ 5,54	A
10	Coca Light	Clorexidina	Inicial	22,40 $\pm$ 9,63	CD
11	Coca Light	Clorexidina	6 meses	20,94 $\pm$ 14,68	CD
12	Coca Light	Clorexidina	1 ano	16,05 $\pm$ 13,91	BC

• Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

Considerando-se a variável substrato dentinário, em todas as situações do tempo inicial e de 6 meses, os valores de RU à dentina erodida por Coca-Cola Light (CL) foram inferiores nos valores de RU à dentina controle demonstrando que o desafio erosivo foi capaz de afetar negativamente a qualidade da adesão à dentina. Não houve diferenças significativas na comparação de 1 ano.

Em relação à variável tratamento, para os grupos de dentina hígida (1 a 6), nota-se na comparação dos respectivos grupos tratados com água ou com Chx 2%, que não houve influência significativa dos valores de RU.

No fator tempo, para a dentina hígida (grupos 1 a 6), tanto para os grupos com aplicação de água deionizada ou de Chx 2% revelaram que o tempo exerceu diferença de RU ao longo do tempo de forma significativa.

Quando a dentina foi erodida por CL (grupos 7 a 12), nota-se que os valores de RU reduziram quando tratados com água deionizada (sem diferenças entre 6

meses e 1 ano). Quando tratado com Chx 2%, não houve diferença significativa para nenhuma das comparações entre os tempos.

5.2 2°. FATOR: BEBIDAS

5.2.1 Grupo refrigerante Coca-Cola vs grupo Coca-Cola Light

Analisando-se os dados obtidos pôde-se observar que houve significância estatística entre as variáveis bebidas ($p=0,03$), tratamento com solução Chx a 2% ($p=0,000$) e tempo de envelhecimento dos espécimes ($p=0,000$) e não significância nas interações entre a variável bebida e variável tratamento com a solução de Chx a 2% ($p=0,28$) e entre as variáveis bebidas e tempo de envelhecimento dos espécimes ($p=0,05$).

Os valores médios de RU e respectivos desvios padrão da dentina erodida com Coca-Cola vs dentina erodida com Coca-Cola Light, em função da aplicação das soluções de Chx a 2%, e do tempo de envelhecimento dos espécimes, são descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios $\pm$ desvio padrão de resistência de união (MPa $\pm$ dp) à dentina erodida com refrigerante tipo cola Coca-Cola vs refrigerante tipo Coca-Cola Light, em função da aplicação de solução de Chx 2% ou água deionizada e do tempo de envelhecimento dos espécimes (inicial, 6 meses, 1 ano)

Grupos	Substrato	Tratamento	Tempo	RU (MPa) Média $\pm$ dp	Comparação estatística
1	Coca-Cola	Água	Inicial	21,80 $\pm$ 7,09	AB
2	Coca-Cola	Água	6 meses	8,33 $\pm$ 10,71	C
3	Coca-Cola	Água	1 ano	4,70 $\pm$ 9,04	C
4	Coca-Cola	Clorexidina	Inicial	19,85 $\pm$ 7,87	AB
5	Coca-Cola	Clorexidina	6 meses	24,32 $\pm$ 11,7	B
6	Coca-Cola	Clorexidina	1 ano	6,19 $\pm$ 12,37	C
7	Coca Light	Água	Inicial	22,70 $\pm$ 9,63	AB
8	Coca Light	Água	6 meses	10,25 $\pm$ 15,6	CD
9	Coca Light	Água	1 ano	4,93 $\pm$ 5,54	C
10	Coca Light	Clorexidina	Inicial	22,40 $\pm$ 7,34	AB
11	Coca Light	Clorexidina	6 meses	20,94 $\pm$ 14,68	AB
12	Coca Light	Clorexidina	1 ano	16,05 $\pm$ 13,91	AD

• Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$)

Considerando-se a variável substrato (desafiado com CC ou CL), apenas na comparação de 1 ano é que se verificou valor reduzido de RU estatisticamente significante, sendo inferior para o substrato desafiado com CC.

Ao se analisar o fator tratamento, para os grupos desafiados com CC (grupos 1 a 6), apenas aos 6 meses se verificou valores de RU estatisticamente diferentes, com superioridade ao grupo tratado com Chx 2%. Quando considerados os grupos desafiados com CL (grupos 7 a 12), os valores de RU nos tempos de 6 meses e 1 ano foram significativamente superiores quando tratados com Chx 2%. Tal desempenho revela que o desafio erosivo reidratado com AD foi capaz de afetar negativamente a qualidade da adesão à dentina em todos os tempos.

O fator tempo apresentou-se como fator significante, de forma que para os grupos desafiados com CC ou CL e hidratados com água deionizada, os valores de RU reduziram estatisticamente a partir dos 6 meses, sem diferenças com os valores do tempo de 1 ano. Para os grupos desafiados com CC, a Chx 2% foi capaz de estabilizar os valores de RU apenas até 6 meses, reduzindo os valores após 1 ano. Já para os grupos desafiados com CL e tratados com Chx 2%, houve similaridade em todos os tempos comparados.

O efeito da ação erosiva de ambas as bebidas, Coca-Cola e Coca-Cola Light, na dentina afetaram de forma diferente a RU quando a dentina foi reidratada com a solução de Chx 2% após 6 meses e 1 ano.

Em relação à variável tratamento com a solução de Chx 2%, nota-se que não exerceu influência significante para nenhuma das bebidas no tempo inicial. No tempo de 6 meses, não houve diferença significante entre as duas bebidas, mantendo-se os valores de RU. Após 1 ano, foi possível observar a diminuição dos valores de RU apenas para a dentina erodida com Coca-Cola. Não houve influência da solução de Chx 2% nos valores de RU da dentina erodida pela Coca-Cola Light após 6 meses e 1 ano.

5.3 3°. FATOR: TODOS OS GRUPOS

5.3.1 Controle, Coca-Cola e Coca-Cola Light, solução de Clorexidina e tempo

Analisando-se os dados obtidos pôde-se observar que houve significância estatística para a interrelação entre bebidas e tempo de envelhecimento ($p=0,000$), entre aplicação da solução de Chx 2% e tempo de envelhecimento ($p=0,000$). Não houve diferença significativa entre bebidas e solução de Chx 2% ($p=0,070$).

Os valores médios de RU entre os grupos em função da aplicação da solução de Chx a 2% e do tempo de envelhecimento dos espécimes são descritos na Tabela 4 e Gráfico 1.

Tabela 4 - Valores médios $\pm$ desvio padrão de RU (MPa $\pm$ dp) entre os grupos em função da aplicação de solução de Chx 2% ou água deionizada e do tempo de envelhecimento dos espécimes (inicial, 6 meses, 1 ano)

Tempo	Inicial		6 meses		1 ano	
	AD	Chx 2%	AD	Chx 2%	AD	Chx 2%
Controle	38,57 $\pm$ 15,36 Aa*	41,93 $\pm$ 9,97 Aa*	26,67 $\pm$ 19,37 Ba*	31,12 $\pm$ 17,02 Ba+	12,21 $\pm$ 11,24 Ca*	11,86 $\pm$ 10,4 Cab*
Coca-Cola	21,80 $\pm$ 7,09 Ab*	19,85 $\pm$ 7,87 Ab*	8,33 $\pm$ 10,71 Bb*	24,32 $\pm$ 11,7 Aa+	4,70 $\pm$ 9,04 Ba*	6,19 $\pm$ 12,37 Ba*
Coca-Cola Light	22,70 $\pm$ 9,63 Ab*	22,40 $\pm$ 7,34 Ab*	10,25 $\pm$ 15,6 Bb*	20,94 $\pm$ 14,68 Ab+	4,93 $\pm$ 5,54 Ba*	16,05 $\pm$ 13,91 Ab+

* Diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) na mesma linha entre colunas para o variável tempo de envelhecimento (inicial, 6 meses, 1 ano). Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre linhas de uma mesma coluna para o variável substrato erodido ou não erodido. Diferentes símbolos (+,*) indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre as linhas e colunas para a variável aplicação de Chx 2%

Gráfico 1 - Valores médios de RU (MPa) entre os grupos comparados em função da aplicação de solução de Chx 2% ou água deionizada e do tempo de envelhecimento dos espécimes (inicial, 6 meses, 1 ano)

No Gráfico 1, podemos observar a representação em forma metodológica das RU (MPa) entre os grupos (H, CC, CL) comparando em função da aplicação de solução de Chx 2% ou água deionizada (Controle) e do tempo de envelhecimento dos espécimes (inicial, 6 meses, 1 ano).

5.4 ANÁLISE DO PADRÃO DE FRATURAS

O modo de fratura é um dado importante nos teste de microtração, pois demonstra a real medida da resistência adesiva. Segundo o tipo de fratura, as fraturas adesivas, ou seja, que ocorrem na interface adesiva registram valores reais, enquanto que fraturas mistas ou coesivas sugerem interferências no momento do teste, na execução do preparo cavitário ou no preparo dos espécimes. Foi possível observar que as falhas foram predominantemente adesivas e/ou mistas, para todos os grupos experimentais, independente do tempo de envelhecimento dos espécimes

($p < 0,001$). A distribuição dos tipos de fratura dos espécimes estão representados em forma percentual no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Porcentagem (%) de falhas do tipo adesiva (A), mista (M), coesiva em dentina (CD) ou coesiva em resina (CR) para os diferentes grupos experimentais, em função do tempo de envelhecimento dos espécimes (inicial, 6 meses, 1 ano)

5.5 IMAGENS ANALISADAS NA MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER

As fatias obtidas de cada espécime foram analisadas na mesma área nos diferentes tempos de avaliação. Uma marca foi realizada em uma área específica paralela à interface adesiva das fatias, de forma a que o laser incidisse sobre esse ponto sempre que fosse analisado. Qualitativamente, observando-se as interfaces adesivas das superfícies seccionadas das metades vestibular e lingual dos espécimes de cada grupo com a dentina hibridizada pelo sistema adesivo marcado com rodamina B, não se pôde notar diferenças entre os grupos experimentais, ainda que seja possível sugerir que a espessura da hibridização para a dentina erodida é menor à espessura da hibridização para a dentina normal, independentemente da

solução com que foram reidratadas ou do tempo de envelhecimento dos respectivos espécimes. Além disso, podemos especular, que pela degradação colagenolítica da interfase adesiva, sistema adesivo + rodamina B poderia desvanecer-se e dissolver-se no meio aquoso, alterando a estrutura da hibridização.

Figura 9 - A-C: Imagens obtidas em microscopia confocal de varredura a laser das fatias de cada grupo (C-CC-CL) tratado com água deionizada analisadas durante o tempo de envelhecimento

Podemos observar que independente dos substratos erodidos em comparação ao grupo controle tratados com água deionizada existe uma diminuição

na qualidade da camada híbrida e formação de *tags* através do tempo de envelhecimento (inicial, 6 meses e 1 ano).

Figura 10 - A-C: Imagens obtidas em microscopia confocal de varredura a laser das fatias de cada grupo (C-CC-CL) tratado com Chx 2% analisadas durante o tempo de envelhecimento

Podemos observar que independente dos substratos tratados (erodidos ou não) tratados com Chx 2% existe uma diminuição na qualidade da camada híbrida e formação de *tags* a traves do tempo de envelhecimento, especificamente no tempo inicial a 6 meses, mantendo-se estas características até o tempo de 1 ano.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 SOBRE A ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma distribuição aleatória dos dentes selecionados nos grupos de teste foi realizada, utilizando-se o programa Microsoft Excel. Para análise estatística dos dados obtidos, foram considerados os valores médios de resistência de união ($MPa \pm dp$) por dente, considerado a unidade experimental. Os palitos de cada dente em cada situação foram considerados para o cálculo da média de cada dente. Os dados obtidos passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição amostral.

Constatando-se aderência dos dados à curva normal, foi aplicado o teste de análise de variância a três critérios: substrato dentinário (hígido – erodido), tratamento após condicionamento ácido (solução de clorexidina 2% - água deionizada) e tempo de envelhecimento (inicial, 6 meses e 1 ano) que evidenciou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos diferentes grupos. Para determinação dessas diferenças, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Tukey, ao mesmo nível de significância. O teste de análise de Variância a três critérios permitiu analisar os valores de resistência de união ($MPa \pm dp$) dos diferentes grupos segundo os seguintes fatores: a) fator substrato, onde foi possível comparar o grupo controle (dentina normal) com cada um dos grupos erodidos separadamente com Coca-Cola e Coca-Cola Light; b) fator bebida erosiva, onde se verificou a diferença entre os grupos erodidos entre si, Coca-Cola e Coca-Cola Light nos critérios tratamento após condicionamento ácido e tempo de envelhecimento e, finalmente, de uma maneira genérica, c) todos os grupos, Controle, Coca-Cola e Coca-Cola Light, mostrando a influência da aplicação de solução de clorexidina 2% e o tempo de envelhecimento (inicial, 6 meses e um ano). Com esse teste, foi possível analisar os grupos com os mesmos critérios, segundo os fatores mencionados. Considerando-se o terceiro fator, se realizou a estatística ($p < 0,05$) referente a todos os grupos, onde se comparou o grupo controle vs erodidos, aplicação da solução Clorexidina 2%, e os tempos de envelhecimento. Dessa maneira, se registrou em forma conceitual a influência desses fatores entre si. O programa estatístico utilizado

foi o SigmaPlot for Windows Version 12.0[®] (Systat Software Inc., Chigaco, IL, EUA). Como dado complementar, as tabelas da análise estatística das médias de resistência de união (MPa $\pm$ dp) se encontram no Apêndice A.

Já para a análise de tipos de falhas (fraturas da interface), primeiro se elaborou uma análise de frequências de falhas, em termos percentuais (%), para determinar a predominância de falhas do tipo adesiva (A), mista (M), coesiva em dentina (CD) ou coesiva em resina (CR) em cada grupo experimental. Segundo, se realizou uma análise de variância por tipos de falhas e teste de Kruskal-Wallis e o de Tukey ($p < 0,05$) para comparações múltiplas, confirmando que houve diferença ($p = < 0,001$) entre as frequências de falhas nos diferentes grupos. A falha adesiva foi a mais predominante em todos os grupos, seguida das falhas mistas e, subsequentemente, as coesivas em dentina e resina composta. Como dado complementar, as tabelas da análise estatística das falhas deste trabalho, se encontram no Apêndice B.

Em relação às imagens obtidas (18 imagens) pela avaliação em microscopia confocal, elas foram apresentadas em forma ilustrativa para observar a caracterização da camada híbrida e formação de *tags* ao longo do tempo de armazenamento nas diferentes condições testadas. Não foi realizado nenhum tipo de análise estatística. Foi possível observar a degradação de camada híbrida e a manutenção e/ou diminuição de *tags* ao longo do tempo de avaliação, em cada grupo, respectivamente.

6.2 SOBRE OS RESULTADOS

6.2.1 Da resistência adesiva

A efetividade dos sistemas adesivos e a aplicabilidade de novas estratégias para alcançar a estabilidade de uniões ao substrato dentário, inclusive em lesões cervicais não cariosas, tem sido alvo de importantes investigações (HEMMINGS; DARBAR; VAUGHAN, 2000; BARTLETT; SHAH, 2006; MAGNE; MAGNE; BELSER, 2007; SPREAFICO, 2010; DIETSCHI; ARGENTE, 2011b).

Existem evidências de que os dados da resistência adesiva gerada em estudos laboratórios, de alguma maneira, se correlacionam com os resultados clínicos das restaurações em lesões cervicais não cariosas, porém é questionável se esses resultados laboratoriais podem justificar o comportamento clínico das ligações adesivas (SHELLIS et al., 2011; HEINTZE, 2013). Tem se evidenciado diferenças morfológicas e estruturais significantes entre a dentina utilizada em testes *in vitro* e a dentina de lesões não cariosas. Essas características qualificam a dentina de lesões não cariosas como substratos desfavoráveis para adesão (CARVALHO et al., 2012).

Diversos estudos têm avaliado o desempenho dos materiais resinosos utilizados para restaurações de lesões não cariosas com diferentes etiologias e em diferentes substratos, seja esmalte ou dentina (EL-DIN; MILLER; GRIGGS, 2004; TAY; PASHLEY, 2004; BRACKETT et al., 2005; HONÓRIO et al., 2008a) e associados à abrasão mecânica (GANSS et al., 2007; DIETSCHI; ARGENTE, 2011a), porém existem na literatura poucos estudos que evidenciam a relação entre a adesão ao substrato dentinário afetado pela erosão dental (FEDERLIN et al., 1998; DIETSCHI; ARGENTE, 2011b; ZIMMERLI et al., 2012).

Diante desses fundamentos, este estudo se propôs a avaliar e comparar a resistência adesiva em dentina normal e dentina submetida a desafios erosivos realizados em laboratório.

Para a melhor organização, os resultados serão discutidos de acordo com os fatores estudados.

6.2.1.1 Fator substrato- erosão: Hígidos (C) vs Erodidos (CC-CL)

No capítulo de resultados, este fator foi descrito como grupo controle vs grupo Coca-Cola e grupo controle vs grupo Coca Light, considerando que as duas bebidas refrigerantes apresentam diferentes potenciais erosivos, pH e composição. Porém, nesta etapa serão discutidos os resultados dos grupos relacionados aos substratos dentina hígida e dentina erodida tanto por CC como por CL.

Considerando a variável substrato dentinário, os valores de resistência de união da dentina erodida foram inferiores aos respectivos valores de resistência de

união à dentina normal, nos tempo inicial e seis meses, demonstrando que o desafio erosivo foi capaz de afetar negativamente a qualidade da adesão à dentina. Isto é esperado, já que a dentina erodida apresenta características morfológicas e ultraestruturais diferentes, portanto seus padrões de adesão diferem da dentina normal. Quando a dentina é exposta a ácidos, dependendo da concentração e o meio bucal, o componente mineral se dissolve rapidamente enquanto a porção orgânica é mantida. Após 30s de imersão em ácido cítrico de baixo pH, uma pequena zona de uma matriz colágeno densa, fibrosa começa a formar-se (BRESCHI et al., 2002). Essa zona aumenta com o tempo de erosão e depende da desmineralização do agente e tempo de exposição, criando uma zona desmineralizada entre dentina parcialmente desmineralizada e dentina normal (KINNEY et al., 1995). Comparada a uma área não erodida, a superfície da porção orgânica é mantida desde que permaneça hidratada, porém é propensa a uma rápida contração (MIGUEZ et al., 2004; PASHLEY et al., 2004; CARRILHO et al., 2005b; BRESCHI et al., 2008; GANSS et al., 2009; CARVALHO et al., 2012). Essa dentina apresenta estrutura preservada mesmo em experimentos de escovação simulada com força de escovação de 2N (GANSS et al., 2007). Assim, os resultados obtidos nesse trabalho podem ser consistentes com os resultados de Ganss et al. (2009), que observou que o material orgânico pode ter uma considerável resistência à tração, onde a dentina completamente desmineralizada pode apresentar uma resistência adesiva de 9-17 MPa (GANSS et al., 2009), dependendo da direção relativa dos túbulos (MIGUEZ et al., 2004). A dentina normal apresenta valores de 26-32 MPa (SANO et al., 1994; PASHLEY et al., 1999).

O tempo de exposição aos agentes erosivos foi de 5min/3vezes por dia/5 dias. Esse tempo pode estar associado aos valores inferiores de RU em superfícies erodidas comparados com os de dentina normal. Kinney et al. (1995) afirmaram que a dentina peritubular e intertubular em situações de erosão, retrocede na mesma proporção, mas após o primeiro minuto de exposição, a dentina peritubular é dissolvida enquanto a região intertubular fica menos estável. Com o aumento do tempo de exposição ao agente erosivo, o índice de desmineralização também aumenta.

Analisando os resultados dos grupos erodidos em geral, observou-se que os valores de resistência de união reduziram quando se trataram com água deionizada

entre os tempos. Estes resultados são consistentes com os de diversos estudos que demonstraram a efetividade da solução de digluconato de clorexidina para manter a estabilidade da camada híbrida ao longo do tempo (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009; BRESCHI et al., 2010a; BRESCHI et al., 2010b). De acordo com os estudos *in vitro* e *in vivo*, Carrilho et al. (2007a); Carrilho et al. (2007b) demonstraram que a clorexidina na matriz desmineralizada separara-se dos fluidos intersticiais através dos *tags* de resina que obliteram os túbulos dentinários, pela penetração dos monômeros resinosos nas fibrilas de colágeno. Esse mecanismo poderia produzir a retenção prolongada da Clorexidina e a inibição das MMPs.

Além das MMPs existentes na matriz dentinária e no complexo dentinopulpar, outras proteases também são responsáveis pela degradação da matriz dentinária extracelular como as proteases cisteína catepsina B da família das catepsinas (TURK; TURK; TURK, 1997; DICKINSON, 2002; TERSARIOL et al., 2010). Scaffa et al. (2012) demonstraram que a clorexidina preserva a integridade do colágeno dentinário, não só pela inibição das MMPs, mas também pela inibição das catepsinas cisteínas dentinárias responsáveis também pela degradação collagenolítica (SCAFFA et al., 2012).

Podemos especular, de acordo aos nossos resultados, que a resistência adesiva depois de 6 meses, tanto das superfícies híidas quanto das erodidas tem sido preservada pelo efeito da aplicação de Clorexidina, o que também foi observado por Carrilho et al. (2007a); Carrilho et al. (2007b). Porém, após 1 ano, a ação da clorexidina não pode ser comprovada, uma vez que não houve diferença da resistência de união para os grupos com e sem aplicação da clorexidina.

6.2.1.2 Fator bebidas: CC vs CL

O potencial erosivo das bebidas tipo cola tem um efeito diferente na resistência adesiva nos substratos erodidos, predominantemente a Coca-Cola. Diversos estudos têm demonstrado os diferentes potenciais erosivos especificamente dessas duas bebidas Coca-Cola e Coca-Cola Light (JENSDOTTIR

et al., 2006; HONÓRIO et al., 2008a; MAGALHÃES et al., 2008a; MAGALHÃES et al., 2009a; RIOS et al., 2009; RIOS et al., 2011).

No entanto, o potencial erosivo de uma bebida não depende de seu pH exclusivamente, depende também de seu conteúdo mineral, da capacidade tampão e da propriedade quelante (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; BARBOUR; LUSI; SHELLIS, 2011) que favorece a desmineralização da superfície pela união com os íons cálcio que são retirados do substrato dentinário e própria saliva (LUSSI; JAEGGI, 2006). De igual maneira, quanto maior a capacidade tampão da bebida, maior será o tempo que a saliva levará para neutralizar o ácido, aumentando a dissolução do substrato dentário (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; WIEGAND et al., 2008a). De outra maneira, a erosão dependerá também da influência de estimulação do agente erosivo e o nível de saturação da dissolução do dente (HONÓRIO et al., 2008b).

A diferente composição das bebidas tipo cola determina diferente comportamento. A Coca-Cola é considerada mais cariogênica e mais erosiva (RIOS et al., 2009; HONÓRIO et al., 2010) por conter 8% de sacarose e uma mistura de açúcar de HFCS (high fructose corn syrup) com 27g/ 240ml, calorias 100/240ml. Já a Coca-Cola Light contém aspartame 24mg/100ml, usada como adoçante de baixa caloria, e o aspartame pode se quebrar em fenilalanina, um aminoácido que atua no nível do cérebro inibindo o centro da fome (<http://www.coca-colacompany.com/brands/nutrition-information-us>).

Com relação à dureza, observou-se que o esmalte exposto à ação da Coca-Cola, com pH2.4, apresentou grande perda da dureza comparada com a Coca-Cola Light, com pH3 (MAGALHÃES et al., 2008a; RIOS et al., 2011). A associação dos processos cariogênicos e erosivos demonstra menor alteração do esmalte quando comparados a cada um desses processos individualmente. O metabolismo da placa bacteriana é inibido pela bebida ácida (pH<3.0) (HONÓRIO et al., 2010). Em base a todos estes fundamentos, especula-se então que em dentina essa desmineralização seria mais acentuada devido ao fato de que as estruturas orgânicas, seriam mais factíveis de serem diluídas nesse meio ácido da bebida refrigerante, em especial com maiores efeitos na Coca-Cola.

A aplicação de clorexidina não afetou a resistência de união nos tempos iniciais e após 6 meses. No entanto, após 1 ano, a aplicação da clorexidina foi eficaz

para os grupos erodidos com CL. Isto pode ser associado ao pH e ao potencial erosivo das bebida refrigerantes utilizadas neste estudo. A ativação da MMPs e das catepsinas é pH dependente. Essas catepsinas, por sua vez, podem ativar as MMPs. Diversos autores explicaram que a inibição das catepsinas por Clorexidina é mais efetiva em pH 6.7. De igual maneira, a MMP-9 presente em dentina é ativada por pH ácidos, concluindo que em condições de meio ácido, tanto as MMPs, como as catepsinas podem ser ativadas, porém inibidas pela presença de Chx (TJADERHANE et al., 1998; TJADERHANE et al., 2001; MAZZONI et al., 2007; SCAFFA et al., 2012).

Pode-se acreditar que nos desafios erosivos *in vitro*, que o pH baixo dessas bebidas possa ativar as MMPs da dentina e saliva (MAGALHÃES et al., 2009b; KATO et al., 2010). Porém, MMPs não são capazes de degradar a matriz de dentina orgânica em pH ácido, uma vez que as MMPs são proteases neutras e funcionam nesse meio. Os períodos entre desmineralização da dentina em contato com as bebidas e os períodos de neutralização do pH devido à capacidade tampão da saliva artificial, expõem as fibrilas de colágeno e sua posterior degradação pela MMPs (TJADERHANE et al., 1998). A esse fator relacionado ao pH, poderíamos acrescentar que a imersão dos espécimes em saliva artificial antes e durante os desafios erosivos *in vitro* cumpre um papel importante, pois a presença da película adquirida é um fator biológico importante na prevenção da erosão dental (MEURMAN; FRANK, 1991; RIOS et al., 2006a, RIOS et al., 2006b; MAGALHÃES et al., 2008a; MAGALHÃES et al., 2009c) da mesma maneira que a saliva desempenha no processo de remineralização, tentando reproduzir as condições bucais mais próximas às reais (PASHLEY et al., 2004; HARA; LUSSI; ZERO, 2006; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b).

Essa condição realizada após os desafios erosivos e o armazenamento ao longo do tempo poderia ter influenciado na capacidade de remineralização da superfície dental, porém essa proteção é limitada aos pequenos desafios erosivos na superfície do esmalte, já que o nível de proteção da película adquirida proveniente da saliva é diretamente proporcional a sua composição, espessura e tempo de maturação (AMAECHI; HIGHAM, 2001; ZERO; LUSSI, 2005). Por tanto, devemos ressaltar que os fatores preventivos e reparadores da saliva artificial podem não ser suficientes para conter o desenvolvimento da erosão *in vitro* e

influenciar os resultados obtidos neste trabalho, já que não existe formação de película adquirida.

Durante o tempo de envelhecimento de 6 meses e 1 ano, muitos dos palitos dos diferentes grupos sofreram a separação da interface adesiva antes de serem levado à máquina de ensaios universal. Isso pode ter acontecido pela degradação da interface, ocasionado por diversos fatores: ação da saliva artificial, degradação dos monômeros resinosos, grau de conversão, fibrilas de colágeno expostas após o condicionamento ácido etc.

6.2.1.3 Todos os grupos

Analizando todos os grupos foi possível observar a influência da clorexidina 2% nos diferentes grupos durante os três tempos de envelhecimento, com diferença para a interrelação entre bebidas e tempo de envelhecimento, entre aplicação da solução de clorexidina 2% e tempo de envelhecimento. Porém não existiu diferença entre bebidas e solução de clorexidina 2%. O tempo de envelhecimento foi um dos fatores mais significativos comparados neste estudo. Avaliados em três tempos diferentes (inicial, 6 meses e 1 ano), observou-se a preservação da resistência adesiva. Comparando-se estes resultados aos diversos trabalhos, que existem avaliando a resistência adesiva ao longo do tempo e desaceleração da degradação da interfase por meio de aplicação de soluções de clorexidina, porém com o tempo de seis meses (PASHLEY et al., 2004; CARRILHO et al., 2007a; LOGUERCIO et al., 2009).

Esses autores, em estudo *in vitro* demonstraram que as resistências adesivas dos dentes tratados com clorexidina após condicionamento ácido não apresentaram alterações até os seis meses, e *in vivo* não apresentaram alterações após 14 meses (CARRILHO et al., 2007b). No entanto, as resistências adesivas do grupo controle com água deionizada (1,5ul) diminuíram em 38% no mesmo de avaliação no estudo *in vitro* e 45.3% no estudo *in vivo*. (CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; BRESCHI et al., 2010b). Estudos *in vitro* demonstraram que as resistências adesivas dos dentes tratados com clorexidina não apresentaram diferença até os 6 meses (PASHLEY et al., 2004; CARRILHO et al., 2007a;

LOGUERCIO et al., 2009). Após 1 ano de armazenagem, os resultados deste trabalho mostraram que a solução de clorexidina 2% não foi capaz de evitar diminuição dos valores de RU, tanto nos grupos erodidos como os hígidos. Esses resultados diferem dos de Breschi et al. (2010b) que, ao avaliarem o efeito da aplicação de soluções de clorexidina a 0,2% e a 2% na estabilidade de interfaces adesivas por um período de dois anos, verificaram a manutenção da resistência de união e ausência de nanoinfiltração nas interfaces após dois anos.

Podemos especular que mesmo que a clorexidina tenha a capacidade de desacelerar o processo de degradação da interface, esse efeito não parece ser duradouro, de acordo com os resultados após armazenagem por 1 ano. Outro fator a ser considerado é a solubilização seletiva de certos constituintes da camada híbrida, assim como dos componentes do sistema adesivo em meio aquoso. Esse fator tem sido significativo em estudos de resistência de união, com diminuição reportada.

Em relação aos espécimes, existem diferenças entre os palitos que poderiam ser obtidos e seccionados no momento do teste, já que a influência do envelhecimento artificial não afetaria diretamente a interface (CARRILHO et al., 2007a). Porém os palitos que foram cortados e depois expostos ao envelhecimento artificial, como neste estudo, uma área pequena sofre a ação direta da saliva artificial sobre a interface adesiva, podendo ser facilmente penetrada pela água e demais componentes, a qual poderia desempenhar um efeito particular na degradação das fibrilas de colágeno pelas MMPs (KOMORI et al., 2009), além de afeitar a integridade dos componentes resinosos da camada híbrida (CARRILHO et al., 2005a), associando-se também à degradação hidrolítica dos sistemas adesivos.

Os palitos que sofreram separação da interface adesiva antes de serem levados a teste foram contabilizados com valor zero dentro deste estudo.

Em relação à análise de fratura dos palitos testados, houve uma maior incidência de fraturas adesivas, seguida por fraturas mistas, coesivas em dentina ou resina em todos os tempos de armazenagem testados, em concordância com os obtidos por (CARRILHO et al., 2005a; CARRILHO et al., 2007a; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009; BRESCHI et al., 2010b). Dessa maneira podemos validar que os valores de RU podem ser interpretados com segurança, porque refletem o valor real da resistência adesiva da interface adesiva (SANO et al., 1994). A análise estatística não estabeleceu diferença significativa entre elas.

6.2.2 Das imagens obtidas pela microscopia confocal

A análise dos valores de resistência de união ao substrato dentinário em diferentes condições e no tempo de armazenamento foi complementada pela observação e apreciação qualitativa da interface dos espécimes através de microscopia confocal de varredura a laser (D'ALPINO et al., 2006a). Nesta avaliação, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais, ainda que seja possível sugerir que a qualidade da hibridização para a dentina erodida é inferior à qualidade da hibridização para a dentina hígida, independentemente das soluções aplicadas ou do tempo de envelhecimento nos grupos experimentais. Nas imagens é observada que a penetração do sistema adesivo e formação de *tags* diferem entre os diferentes tipos de dentina estudados. Provavelmente, a dentina erodida apresente uma matriz de colágeno mais alterado, resultado da dissolução da dentina pelos agentes erosivos ou pelas condições de armazenagem a que foram expostas em saliva artificial. Além disso, estudos *in vitro* avaliados por TEM demonstraram que alterações ultraestruturais em camadas híbridas em dentina normal requerem mais de 5 anos para mostrar o tipo de degradação (HASHIMOTO et al., 2000; DE MUNCK et al., 2003), porém estudos realizados por Hebling et al. (2005) de 6 meses e por Carrilho et al. (2007b) de 14 meses puderam comprovar alterações na integridade estrutural na camada híbrida em espécimes avaliados por TEM (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007b).

O conhecimento sobre a estrutura histológica das lesões erosivas são de importância para fundamentar o delineamento de experimentos que visam a simular laboratorialmente as condições, para poder extrapolar e interpretar os resultados dos estudos. No entanto, existe pouca informação disponível em relação a estas superfícies e com as restaurações adesivas e relacionando a concentração da clorexidina ao efeito inibitório das MMPs aos substratos erodidos. Futuros estudos devem determinar quanto de clorexidina poderia apresentar uma ação contínua na camada híbrida, assim como a concentração ideal para inibir a atividade proteolítica das MMPs em dentina.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que os agentes erosivos Coca-Cola e Coca-Cola Light provocam alterações na dentina como substrato à adesão. A aplicação da solução de clorexidina a 2% pode ser um tratamento interessante no retardo da diminuição dos valores de união à dentina erodida e dentina hígida, mas apenas até os 6 meses.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abrahamsen TC. The worn dentition--pathognomonic patterns of abrasion and erosion. *Int Dent J*. 2005;55(4 Suppl 1):268-76.

Al-Dlaigan YH, Shaw L, Smith A. Dental erosion in a group of British 14-year-old, school children. Part I: Prevalence and influence of differing socioeconomic backgrounds. *Br Dent J*. 2001 Feb 10;190(3):145-9.

Amaechi BT, Higham SM. Eroded enamel lesion remineralization by saliva as a possible factor in the site-specificity of human dental erosion. *Arch Oral Biol*. 2001 Aug;46(8):697-703.

Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffoon JE, et al. Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. *Oper Dent*. 2004 Nov-Dec;29(6):705-12.

Barbour ME, Lussi A, Shellis RP. Screening and prediction of erosive potential. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:24-32.

Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel erosion in constant composition citric acid solutions as a function of degree of saturation with respect to hydroxyapatite. *J Oral Rehabil*. 2005 Jan;32(1):16-21.

Bartlett DW, Shah P. A critical review of non-carious cervical (wear) lesions and the role of abfraction, erosion, and abrasion. *J Dent Res*. 2006 Apr;85(4):306-12.

Bertassoni LE, Orgel JP, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix - limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta Biomater*. 2012 Jul;8(7):2419-33.

Bertassoni LE, Stankoska K, Swain MV. Insights into the structure and composition of the peritubular dentin organic matrix and the lamina limitans. *Micron*. 2012 Feb;43(2-3):229-36.

Brackett WW, Brackett MG, Dib A, Franco G, Estudillo H. Eighteen-month clinical performance of a self-etching primer in unprepared class V resin restorations. *Oper Dent*. 2005 Jul-Aug;30(4):424-9.

Brackett WW, Tay FR, Looney SW, Ito S, Haisch LD, Pashley DH. The effect of subject age on the microtensile bond strengths of a resin and a resin-modified glass ionomer adhesive to tooth structure. *Oper Dent*. 2008 May-Jun;33(3):282-6.

Breschi L, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Ellis TH, Stangel I. High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic and citric acid. *Dent Mater*. 2002 Jan;18(1):26-35.

Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater*. 2010a Jun;26(6):571-8.

Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjaderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year *in vitro* study. *Dent Mater*. 2010b Apr;26(4):320-5.

Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008 Jan;24(1):90-101.

Cairns AM, Watson M, Creanor SL, Foye RH. The pH and titratable acidity of a range of diluting drinks and their potential effect on dental erosion. *J Dent*. 2002 Sep-Nov;30(7-8):313-7.

Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*. *J Dent Res*. 2007a Jan;86(1):90-4.

Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater*. 2010 Aug;26(8):779-85.

Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Yiu C, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *Am J Dent*. 2005a Dec;18(6):315-9.

Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, et al. *In vivo* preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res*. 2007b Jun;86(6):529-33.

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

Carvalho RM, Manso AP, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH. Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. *Dent Mater*. 2012 Jan;28(1):72-86.

Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res*. 2006 Jan;85(1):22-32.

D'Alpino PH, Pereira JC, Svizero NR, Rueggeberg FA, Carvalho RM, Pashley DH. A new technique for assessing hybrid layer interfacial micromorphology and integrity: two-photon laser microscopy. *J Adhes Dent*. 2006a Oct;8(5):279-84.

D'Alpino PH, Pereira JC, Svizero NR, Rueggeberg FA, Pashley DH. Use of fluorescent compounds in assessing bonded resin-based restorations: a literature review. *J Dent*. 2006b Oct;34(9):623-34.

Davis WB, Winter PJ. The effect of abrasion on enamel and dentine and exposure to dietary acid. *Br Dent J*. 1980 Jun 3-17;148(11-12):253-6.

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

De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*. 2003 Feb;82(2):136-40.

Deery C, Wagner ML, Longbottom C, Simon R, Nugent ZJ. The prevalence of dental erosion in a United States and a United Kingdom sample of adolescents. *Pediatr Dent*. 2000 Nov-Dec;22(6):505-10.

Diaspro A, Robello M. Two-photon excitation of fluorescence for three-dimensional optical imaging of biological structures. *J Photochem Photobiol B*. 2000 Mar;55(1):1-8.

Dickinson DP. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(3):238-75.

Dietschi D, Argente A. A comprehensive and conservative approach for the restoration of abrasion and erosion. Part II: clinical procedures and case report. *Eur J Esthet Dent*. 2011a Summer;6(2):142-59.

Dietschi D, Argente A. A comprehensive and conservative approach for the restoration of abrasion and erosion. Part I: concepts and clinical rationale for early intervention using adhesive techniques. *Eur J Esthet Dent*. 2011b Spring;6(1):20-33.

Eccles JD. Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. J Prosthet Dent. 1979 Dec;42(6):649-53.

El-din AK, Miller BH, Griggs JA. Resin bonding to sclerotic, noncarious, cervical lesions. Quintessence Int. 2004 Jul-Aug;35(7):529-40.

Federlin M, Thonemann B, Schmalz G, Urlinger T. Clinical evaluation of different adhesive systems for restoring teeth with erosion lesions. Clin Oral Investig. 1998 Jun;2(2):58-66.

Gambon DL, Brand HS, Nieuw Amerongen AV. Soft drink, software and softening of teeth - a case report of tooth wear in the mixed dentition due to a combination of dental erosion and attrition. Open Dent J. 2010;4:198-200.

Ganss C, Klimek J, Giese K. Dental erosion in children and adolescents--a cross-sectional and longitudinal investigation using study models. Community Dent Oral Epidemiol. 2001 Aug;29(4):264-71.

Ganss C, Klimek J, Starck C. Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. Arch Oral Biol. 2004 Nov;49(11):931-5.

Ganss C, Lussi A, Scharmann I, Weigelt T, Hardt M, Klimek J, et al. Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosion in dentine. Caries Res. 2009;43(6):422-9.

Ganss C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J. Effects of toothbrushing on eroded dentine. Eur J Oral Sci. 2007 Oct;115(5):390-6.

Ganss C, Schlueter N, Klimek J. Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions--A comparison of *in vitro* and *in situ* results. Arch Oral Biol. 2007 Jan;52(1):9-14.

Garcia-Godoy F, Tay FR, Pashley DH, Feilzer A, Tjaderhane L, Pashley EL. Degradation of resin-bonded human dentin after 3 years of storage. Am J Dent. 2007 Apr;20(2):109-13.

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 May;6(3):437-9.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007 Feb;65(1):1-13.

Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate *in vitro*. *Arch Oral Biol*. 2005 Jun;50(6):541-52.

Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological factors. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:88-99.

Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. *In vivo* degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res*. 2000 Jun;79(6):1385-91.

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. Degradation patterns of different adhesives and bonding procedures. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2003 Jul 15;66(1):324-30.

Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. *J Dent Res*. 2005 Aug;84(8):741-6.

Heintze SD. Clinical relevance of tests on bond strength, microleakage and marginal adaptation. *Dent Mater*. 2013 Jan;29(1):59-84.

Hemmings KW, Darbar UR, Vaughan S. Tooth wear treated with direct composite restorations at an increased vertical dimension: results at 30 months. *J Prosthet Dent*. 2000 Mar;83(3):287-93.

Holbrook WP, Arnadottir IB, Kay EJ. Prevention. Part 3: prevention of tooth wear. *Br Dent J*. 2003 Jul 26;195(2):75-81.

Honório HM, Rios D, Francisconi LF, Magalhães AC, Machado MA, Buzalaf MA. Effect of prolonged erosive pH cycling on different restorative materials. *J Oral Rehabil*. 2008a Dec;35(12):947-53.

Honório HM, Rios D, Santos CF, Magalhães AC, Buzalaf MA, Machado MA. Effects of erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges on human enamel: an *in situ/ex vivo* study. *Caries Res*. 2008b;42(6):454-9.

Honório HM, Rios D, Santos CF, Magalhães AC, Delbem AC, Buzalaf MA, et al. Cross-sectional microhardness of human enamel subjected to erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges. *Caries Res*. 2010;44(1):29-32.

Imfeld T. Prevention of progression of dental erosion by professional and individual prophylactic measures. *Eur J Oral Sci.* 1996 Apr;104(2 (Pt 2)):215-20.

Jensdottir T, Arnadottir IB, Thorsdottir I, Bardow A, Gudmundsson K, Theodors A, et al. Relationship between dental erosion, soft drink consumption, and gastroesophageal reflux among Icelanders. *Clin Oral Investig.* 2004 Jun;8(2):91-6.

Jensdottir T, Holbrook P, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A. Immediate erosive potential of cola drinks and orange juices. *J Dent Res.* 2006 Mar;85(3):226-30.

Kato MT, de Moraes Italiani F, de Araujo JJ, Garcia MD, de Carvalho Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Preventive effect of an iron varnish on bovine enamel erosion *in vitro*. *J Dent.* 2009a Mar;37(3):233-6.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion *in situ*. *J Dent Res.* 2010 May;89(5):468-72.

Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J Appl Oral Sci.* 2009b Nov-Dec;17(6):560-4.

Kim J, Mai S, Carrilho MR, Yiu CK, Pashley DH, Tay FR. An all-in-one adhesive does not etch beyond hybrid layers. *J Dent Res.* 2010 May;89(5):482-7.

Kinney JH, Balooch M, Haupt DL, Jr., Marshall SJ, Marshall GW, Jr. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res.* 1995 May;74(5):1179-84.

Komori PC, Pashley DH, Tjaderhane L, Breschi L, Mazzoni A, de Goes MF, et al. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2009 Mar-Apr;34(2):157-65.

Kunzel W, Cruz MS, Fischer T. Dental erosion in Cuban children associated with excessive consumption of oranges. *Eur J Oral Sci.* 2000 Apr;108(2):104-9.

Lambrechts P, Van Meerbeek B, Perdigão J, Gladys S, Braem M, Vanherle G. Restorative therapy for erosive lesions. *Eur J Oral Sci.* 1996 Apr;104(2 (Pt 2)):229-40.

Lessa FC, Nogueira I, Vargas Fda S, Spolidorio DM, Hebling J, Garcia-Godoy F, et al. Direct and transdentinal antibacterial activity of chlorhexidine. *Am J Dent.* 2010 Oct;23(5):255-9.

- Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci.* 2009 Oct;117(5):587-96.
- Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res.* 2004;38 Suppl 1:34-44.
- Lussi A, Jaeggi T. Chemical factors. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:77-87.
- Lussi A, Jaeggi T. Erosion--diagnosis and risk factors. *Clin Oral Investig.* 2008 Mar;12 Suppl 1:S5-13.
- Lussi A, Kohler N, Zero D, Schaffner M, Megert B. A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an *in vitro* model. *Eur J Oral Sci.* 2000 Apr;108(2):110-4.
- Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:2-12.
- Lussi A, von Salis-Marincek M, Ganss C, Hellwig E, Cheaib Z, Jaeggi T. Clinical study monitoring the pH on tooth surfaces in patients with and without erosion. *Caries Res.* 2012;46(6):507-12.
- Magalhães AC, Moraes SM, Rios D, Buzalaf MA. Effect of ion supplementation of a commercial soft drink on tooth enamel erosion. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2009a Feb;26(2):152-6.
- Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Jorge AM, Jr., Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of 4% titanium tetrafluoride solution on dental erosion by a soft drink: an *in situ/ex vivo* study. *Arch Oral Biol.* 2008a May;53(5):399-404.
- Magalhães AC, Rios D, Moino AL, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA. Effect of different concentrations of fluoride in dentifrices on dentin erosion subjected or not to abrasion *in situ/ex vivo*. *Caries Res.* 2008b;42(2):112-6.
- Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion *in situ*. *J Dent.* 2009b Dec;37(12):994-8.
- Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2009c Mar-Apr;17(2):75-86.

Magne P, Magne M, Belser UC. Adhesive restorations, centric relation, and the Dahl principle: minimally invasive approaches to localized anterior tooth erosion. *Eur J Esthet Dent*. 2007 Autumn;2(3):260-73.

Marshall GW, Jr., Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent*. 1997 Nov;25(6):441-58.

Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol*. 2000 Sep;45(9):757-65.

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 May;86(5):436-40.

Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjaderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*. 2006 Sep;27(25):4470-6.

Meurman JH, Frank RM. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res*. 1991;25(1):1-6.

Meurman JH, ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci*. 1996 Apr;104(2 (Pt 2)):199-206.

Miguez PA, Pereira PN, Atsawasuwon P, Yamauchi M. Collagen cross-linking and ultimate tensile strength in dentin. *J Dent Res*. 2004 Oct;83(10):807-10.

Mirkarimi M, Toomarian L. Effect of green tea extract on the treatment of dentin erosion: an *in vitro* study. *J Dent (Tehran)*. 2012 Fall;9(4):224-8.

Moss SJ. Dental erosion. *Int Dent J*. 1998 Dec;48(6):529-39.

Nakabayashi N, Nakamura M, Yasuda N. Hybrid layer as a dentin-bonding mechanism. *J Esthet Dent*. 1991 Jul-Aug;3(4):133-8.

Nakabayashi N. The hybrid layer: a resin-dentin composite. *Proc Finn Dent Soc*. 1992;88 Suppl 1:321-9.

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 Oct;74(10):1679-88.

Nunn J, Shaw L, Smith A. Tooth wear--dental erosion. Br Dent J. 1996 May 11;180(9):349-52.

Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakajima M, Yoshiyama M, Shono Y, et al. The microtensile bond test: a review. J Adhes Dent. 1999 Winter;1(4):299-309.

Pashley DH, Sano H, Ciucchi B, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents: a review. Dent Mater. 1995 Mar;11(2):117-25.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. J Dent Res. 2004 Mar;83(3):216-21.

Perdigão J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. Dent Mater. 2010 Feb;26(2):e24-37.

Pioch T, Stotz S, Staehle HJ, Duschner H. Applications of confocal laser scanning microscopy to dental bonding. Adv Dent Res. 1997 Nov;11(4):453-61.

Reis A, Higashi C, Loguercio AD. Re-anatomization of anterior eroded teeth by stratification with direct composite resin. J Esthet Restor Dent. 2009;21(5):304-16.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Buzalaf MA, Palma-Dibb RG, Machado MA, et al. Influence of toothbrushing on enamel softening and abrasive wear of eroded bovine enamel: an *in situ* study. Braz Oral Res. 2006a Apr-Jun;20(2):148-54.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, et al. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an *in situ/ex vivo* study. Caries Res. 2006b;40(3):218-23.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Silva SM, Delbem AC, Machado MA, et al. Scanning electron microscopic study of the *in situ* effect of salivary stimulation on erosion and abrasion in human and bovine enamel. Braz Oral Res. 2008 Apr-Jun;22(2):132-8.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Wiegand A, de Andrade Moreira Machado MA, Buzalaf MA. Light cola drink is less erosive than the regular one: an *in situ/ex vivo* study. J Dent. 2009 Feb;37(2):163-6.

Rios D, Santos FC, Honório HM, Magalhães AC, Wang L, de Andrade Moreira Machado MA, et al. An *in situ/ex vivo* comparison of the ability of regular and light colas to induce enamel wear when erosion is combined with abrasion. *Quintessence Int.* 2011 Mar;42(3):e44-50.

Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, et al. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater.* 1994 Jul;10(4):236-40.

Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res.* 2012 Apr;91(4):420-5.

Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:13-23.

Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:69-77.

Spreatico RC. Composite resin rehabilitation of eroded dentition in a bulimic patient: a case report. *Eur J Esthet Dent.* 2010 Spring;5(1):28-48.

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 Feb;52(2):121-7.

Tahmassebi JF, Duggal MS, Malik-Kotru G, Curzon ME. Soft drinks and dental health: a review of the current literature. *J Dent.* 2006 Jan;34(1):2-11.

Tay FR, Pashley DH. Resin bonding to cervical sclerotic dentin: a review. *J Dent.* 2004 Mar;32(3):173-96.

Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Paakkonen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod.* 2010 Mar;36(3):475-81.

Tjaderhane 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 Aug;77(8):1622-9.

Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldini S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater*. 2013 Jan;29(1):116-35.

Tjaderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larman M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res*. 2001 Aug;15:55-8.

Turk B, Turk V, Turk D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem*. 1997 Mar-Apr;378(3-4):141-50.

Watson TF, Boyde A. Confocal light microscopic techniques for examining dental operative procedures and dental materials. A status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent*. 1991 Aug;4(4):193-200.

Watson TF. Applications of confocal scanning optical microscopy to dentistry. *Br Dent J*. 1991 Nov 9;171(9):287-91.

West NX, Davies M, Amaechi BT. *In vitro* and *in situ* erosion models for evaluating tooth substance loss. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:43-52.

West NX, Hughes JA, Addy M. The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids *in vitro*. *J Oral Rehabil*. 2001 Sep;28(9):860-4.

Wiegand A, Attin T. Occupational dental erosion from exposure to acids: a review. *Occup Med (Lond)*. 2007 May;57(3):169-76.

Wiegand A, Meier W, Sutter E, Magalhães AC, Becker K, Roos M, et al. Protective effect of different tetrafluorides on erosion of pellicle-free and pellicle-covered enamel and dentine. *Caries Res*. 2008a;42(4):247-54.

Wiegand A, Schwerzmann M, Sener B, Magalhães AC, Roos M, Ziebolz D, et al. Impact of toothpaste slurry abrasivity and toothbrush filament stiffness on abrasion of eroded enamel - an *in vitro* study. *Acta Odontol Scand*. 2008b Aug;66(4):231-5.

Wiegand A, Waldheim E, Sener B, Magalhães AC, Attin T. Comparison of the effects of TiF₄ and NaF solutions at pH 1.2 and 3.5 on enamel erosion *in vitro*. *Caries Res*. 2009;43(4):269-77.

Wongkhantee S, Patanapiradej V, Maneenut C, Tantbirojn D. Effect of acidic food and drinks on surface hardness of enamel, dentine, and tooth-coloured filling materials. *J Dent*. 2006 Mar;34(3):214-20.

Yip KH, Smales RJ, Kaidonis JA. The diagnosis and control of extrinsic acid erosion of tooth substance. *Gen Dent*. 2003 Jul-Aug;51(4):350-3; quiz 4.

Zero DT, Lussi A. Erosion--chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J*. 2005;55(4 Suppl 1):285-90.

Zero DT. Etiology of dental erosion--extrinsic factors. *Eur J Oral Sci*. 1996 Apr;104(2(Pt 2)):162-77.

Zimmerli B, De Munck J, Lussi A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Long-term bonding to eroded dentin requires superficial bur preparation. *Clin Oral Investig*. 2012 Oct;16(5):1451-61.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Análise estatística das médias de RU (MPa±dp) de todos os grupos segundo os fatores substrato, bebidas e todos os grupos.

a) Fator substrato

Grupo controle vs. Grupo Coca-Cola

"Univariate Tests of Significance for resistência Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition"

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	263595.5	1	263595.5	1720.014	0.000000
substrato	25623.8	1	25623.8	167.200	0.000000
Clorexidina	2274.5	1	2274.5	14.841	0.000129
tempo	50412.7	2	25206.4	164.477	0.000000
substrato*Clorexidina	280.1	1	280.1	1.827	0.176922
substrato*tempo	4340.8	2	2170.4	14.162	0.000001
Clorexidina*tempo	3120.3	2	1560.1	10.180	0.000045
substrato*Clorexidina	1893.1	2	946.6	6.176	0.002208
Error	94863.0	619	153.3		

"Breakdown Table of Descriptive Statistics" N=631 (No missing data in dep. var. list)"

substrato	Clorexidina	tempo	resistência Mean	resistência N	resistência Std.Dev.
higido	agua	inicial	38.56721	47	15.35934
higido	clorexidina	inicial	41.92539	59	9.96746
erodido	agua	inicial	21.79971	66	7.08514
erodido	clorexidina	inicial	19.84857	58	7.87005
higido	agua	6 MESES	26.66605	59	19.36939
higido	clorexidina	6 MESES	31.11886	56	17.02419
erodido	agua	6 MESES	8.32569	39	10.70608
erodido	clorexidina	6 MESES	24.31527	52	11.70495
higido	agua	1 ANO	12.20579	47	11.24032
higido	clorexidina	1 ANO	11.85660	48	10.39618
erodido	agua	1 ANO	4.69505	50	9.03831
erodido	clorexidina	1 ANO	6.18612	50	12.38642
All Grps			21.34414	631	16.97915

Three Way Analysis of Variance

General Linear Model

Dependent Variable: resistência

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Failed ($p < 0,050$)

Equal Variance Test: Failed ($p < 0,050$)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
substrato	1	25623.752	25623.752	167.2	<0,001
Clorexidina	1	2274.464	2274.464	14.841	<0,001
tempo	2	50412.744	25206.372	164.477	<0,001
substrato x Clorexidina	1	280.061	280.061	1.827	0.177
substrato x tempo	2	4340.794	2170.397	14.162	<0,001
Clorexidina x tempo	2	3120.27	1560.135	10.18	<0,001
substrato x Clorexidina x temp	2	1893.108	946.554	6.176	0.002
Residual	619	94862.989	153.252		
Total	630	181623.735	288.292		

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: substrato

Comparison	Diff of Means	p	q	p	p<0,050
higido vs. erodido	12.862	2	18.287	<0,001	Yes

Comparisons for factor: Clorexidina

Comparison	Diff of Means	p	q	P	p<0,050
clorexidina vs. agua	3.832	2	5.448	<0,001	Yes

Comparisons for factor: tempo

Comparison	Diff of Means	p	q	p	p<0,050
inicial vs. 1 ANO	21.799	3	25.489	<0,001	Yes
inicial vs. 6 MESES	7.929	3	9.345	<0,001	Yes
6 MESES vs. 1 ANO	13.871	3	15.758	<0,001	Yes

Three Way Interaction Term Analysis:

Evaluated substrato x Clorexidina across levels of tempo:

The effect of the substrato x Clorexidina interaction depends on what level of tempo is present.

There is a significant substrato x Clorexidina interaction at level inicial of tempo.(p=<0,001)

There is not a significant substrato x Clorexidina interaction at level 6 MESES of tempo.(p=0,092)

There is a significant substrato x Clorexidina interaction at level 1 ANO of tempo.(p=<0,001)

Valores médios das resistências e as diferenças estatísticas entre os grupos: Substrato/Erosão

substrato	Clorexidina	tempo	resistência média	a	b	c	d	e	f
higido	agua	inicial	38.56721					****	****
higido	agua	6 MESES	26.66605		****	****			
higido	agua	1 ANO	12.20579	****			****		
higido	clorexidina	inicial	41.92539						****
higido	clorexidina	6 MESES	31.11886			****		****	
higido	clorexidina	1 ANO	11.85660	****					
erodido	agua	inicial	21.79971		****				
erodido	agua	6 MESES	8.32569	****					
erodido	agua	1 ANO	4.69505	****					
erodido	clorexidina	inicial	19.84857		****		****		
erodido	clorexidina	6 MESES	24.31527		****	****			
erodido	clorexidina	1 ANO	6.18612	****					

b) Grupo controle vs Grupo Coca-Cola Light

"Univariate Tests of Significance for resistência Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition"

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	270617.8	1	270617.8	1506.222	0.000000
substrato	17001.6	1	17001.6	94.629	0.000000
Clorexidina	3369.0	1	3369.0	18.751	0.000017
tempo	36811.5	2	18405.8	102.444	0.000000
substrato*Clorexidina	791.8	1	791.8	4.407	0.036210
substrato*tempo	6089.7	2	3044.9	16.947	0.000000
Clorexidina*tempo	1022.2	2	511.1	2.845	0.058941
substrato*Clorexidina*tempo	1409.2	2	704.6	3.922	0.020317
Error	107800.0	600	179.7		

"Breakdown Table of Descriptive Statistics" N=631 (No missing data in dep. var. list)"

			Mean	N	Std.Dev.
substrato	Clorexidina	tempo	resistência	resistência	resistência
higido	agua	inicial	38.56721	47	15.35934
higido	clorexidina	inicial	41.92539	59	9.96746
erodido	agua	inicial	22.70027	57	9.62958
erodido	clorexidina	inicial	22.39662	57	7.34203
higido	agua	6 MESES	26.66605	59	19.36939
higido	clorexidina	6 MESES	31.11886	56	17.02419
erodido	agua	6 MESES	10.25476	50	15.60390
erodido	clorexidina	6 MESES	20.94462	57	14.68192
higido	agua	1 ANO	12.20579	47	11.24032
higido	clorexidina	1 ANO	11.85660	48	10.39618
erodido	agua	1 ANO	4.92735	24	5.54270
erodido	clorexidina	1 ANO	16.04547	51	13.90961
All Grps			22.80830	612	16.91969

Three Way Analysis of Variance

General Linear Model

Dependent Variable: resistência

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Failed (p<0,050)

Equal Variance Test: Failed (p<0,050)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
substrato	1	17001.58	17001.58	94.629	<0,001
Clorexidina	1	3368.974	3368.974	18.751	<0,001
tempo	2	36811.54	18405.77	102.444	<0,001
substrato x Clorexidina	1	791.786	791.786	4.407	0.036
substrato x tempo	2	6089.748	3044.874	16.947	<0,001
Clorexidina x tempo	2	1022.169	511.085	2.845	0.059
substrato x Clorexidina x temp	2	1409.193	704.596	3.922	0.02
Residual	600	107800	179.667		
Total	611	174914.6	286.276		

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: substrato

Comparison	Diff of Means	p	q	p	p<0,050
higido vs. erodido	10.845	2	13.757	<0,001	Yes

Comparisons for factor: Clorexidina

Comparison	Diff of Means	p	q	p	p<0,050
clorexidina vs. agua	4.828	2	6.124	<0,001	Yes

Comparisons for factor: tempo

Comparison	Diff of Means	p	q	p	p<0,050
inicial vs. 1 ANO	20.139	3	20.219	<0,001	Yes
inicial vs. 6 MESES	9.151	3	10.119	<0,001	Yes
6 MESES vs. 1 ANO	10.987	3	11.061	<0,001	Yes

Three Way Interaction Term Analysis:

Evaluated substrato x Clorexidina across levels of tempo:

The effect of the substrato x Clorexidina interaction depends on what level of tempo is present.

There is a significant substrato x Clorexidina interaction at level inicial of tempo. ($p < 0,00$)

There is not a significant substrato x Clorexidina interaction at level 6 MESES of tempo. ($p = 0,065$)

There is a significant substrato x Clorexidina interaction at level 1 ANO of tempo. ($p < 0,001$)

Valores médios das resistências e as diferenças estatísticas entre os grupos: Substrato/Erosão

substrato	Clorexidina	tempo	resistência média	a	b	c	d	e	f	g
higido	agua	inicial	38.56721						****	****
higido	agua	6 MESES	26.66605				****	****		
higido	agua	1 ANO	12.20579	****	****					
higido	clorexidina	inicial	41.92539							****
higido	clorexidina	6 MESES	31.11886					****	****	
higido	clorexidina	1 ANO	11.85660	****	****					
erodido	agua	inicial	22.70027			****	****			
erodido	agua	6 MESES	10.25476	****	****					
erodido	agua	1 ANO	4.92735	****						
erodido	clorexidina	inicial	22.39662			****	****			
erodido	clorexidina	6 MESES	20.94462			****	****			
erodido	clorexidina	1 ANO	16.04547		****	****				

c) Fator bebidas

Univariate Tests of Significance for resistência Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	132516.1	1	132516.1	1098.634	0.000000
bebida	582.8	1	582.8	4.832	0.028325
Clorexidina	5460.5	1	5460.5	45.270	0.000000
tempo	17861.9	2	8931.0	74.043	0.000000
bebida*Clorexidina	142.1	1	142.1	1.178	0.278135
bebida*tempo	724.8	2	362.4	3.005	0.050302
Clorexidina*tempo	5609.6	2	2804.8	23.253	0.000000
bebida*Clorexidina*tempo	1213.5	2	606.8	5.030	0.006815
Error	72250.7	599	120.6		

Breakdown Table of Descriptive Statistics N=631 (No missing data in dep. var. list)

			Mean	N	Std.Dev.
bebida	Clorexidina	tempo	resistência	resistência	resistência
normal	agua	inicial	21.79971	66	7.08514
normal	clorexidina	inicial	19.84857	58	7.87005
light	agua	inicial	22.70027	57	9.62958
light	clorexidina	inicial	22.39662	57	7.34203
normal	agua	6 MESES	8.32569	39	10.70608
normal	clorexidina	6 MESES	24.31527	52	11.70495
light	agua	6 MESES	10.25476	50	15.60390
light	clorexidina	6 MESES	20.94462	57	14.68192
normal	agua	1 ANO	4.69505	50	9.03831
normal	clorexidina	1 ANO	6.18612	50	12.38642
light	agua	1 ANO	4.92735	24	5.54270
light	clorexidina	1 ANO	16.04547	51	13.90961
All Grps			16.26323	611	13.01093

Three Way Analysis of Variance

quinta-feira, agosto 30, 2012, 09:34:15

Data source: Data 1 in Notebook3

General Linear Model

Dependent Variable: resistência

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Failed ($p < 0,050$)

Equal Variance Test: Failed ($p < 0,050$)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
bebida	1	582.783	582.783	4.832	0.028
Clorexidina	1	5460.45	5460.45	45.27	<0,001
tempo	2	17861.942	8930.971	74.043	<0,001
bebida x Clorexidina	1	142.128	142.128	1.178	0.278
bebida x tempo	2	724.845	362.423	3.005	0.05
Clorexidina x tempo	2	5609.552	2804.776	23.253	<0,001
bebida x Clorexidina x tempo	2	1213.509	606.754	5.03	0.007
Residual	599	72250.749	120.619		
Total	610	103263.363	169.284		

There is a statistically significant interaction between bebida, Clorexidina and tempo ($p=0,007$). This indicates that the effect of one factor is not consistent at all combinations of the two other factors; and, therefore, an unambiguous interpretation of the main effects is not possible. SigmaStat will evaluate significant interactions as appropriate.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: bebida

Comparison	Diff of Means	p	q	p	p<0,050
light vs. normal	2.016	2	3.109	0.028	Yes

Comparisons for factor: Clorexidina

Comparison	Diff of Means	p	q	p	p<0,050
clorexidina vs. agua	6.172	2	9.515	<0,001	Yes

Comparisons for factor: tempo

Comparison	Diff of Means	p	q	p	p<0,050
inicial vs. 1 ANO	13.723	3	17.206	<0,001	Yes
inicial vs. 6 MESES	5.726	3	7.618	<0,001	Yes
6 MESES vs. 1 ANO	7.997	3	9.61	<0,001	Yes

Three Way Interaction Term Analysis:

Evaluated bebida x Clorexidina across levels of tempo:

The effect of the bebida x Clorexidina interaction depends on what level of tempo is present.

There is a significant bebida x Clorexidina interaction at level inicial of tempo. ($p=<0,001$)

There is not a significant bebida x Clorexidina interaction at level 6 MESES of tempo. ($p=0,062$)

There is a significant bebida x Clorexidina interaction at level 1 ANO of tempo. ($p=<0,001$)

Valores médios das resistências e as diferenças estatísticas entre os grupos: Bebidas

	bebida	Clorexidina	tempo	resistência média	a	b	c	d
1	normal	agua	inicial	21.79971	****	****		
2	normal	agua	6 MESES	8.32569			****	
3	normal	agua	1 ANO	4.69505			****	
4	normal	clorexidina	inicial	19.84857	****	****		
5	normal	clorexidina	6 MESES	24.31527		****		
6	normal	clorexidina	1 ANO	6.18612			****	
7	light	agua	inicial	22.70027	****	****		
8	light	agua	6 MESES	10.25476			****	****
9	light	agua	1 ANO	4.92735			****	
10	light	clorexidina	inicial	22.39662	****	****		
11	light	clorexidina	6 MESES	20.94462	****	****		
12	light	clorexidina	1 ANO	16.04547	****			****

d) Todos os grupos

Univariate Tests of Significance for resistência Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	324511.9	1	324511.9	2145.992	0.000000
grupo	29375.3	2	14687.6	97.129	0.000000
tempo	49765.7	2	24882.8	164.550	0.000000
Clorexidina	5404.8	1	5404.8	35.742	0.000000
grupo*tempo	7349.1	4	1837.3	12.150	0.000000
grupo*Clorexidina	805.6	2	402.8	2.664	0.070224
tempo*Clorexidina	4092.7	2	2046.3	13.532	0.000002
grupo*tempo*Clorexidina	2913.3	4	728.3	4.816	0.000756
Error	137456.9	909	151.2		

Breakdown Table of Descriptive Statistics N=927 (No missing data in dep. var. list)

grupo	Clorexidina	tempo	resistência Mean	resistência N	resistência Std.Dev.
nada	agua	inicial	38.56721	47	15.35934
nada	clorexidina	inicial	41.92539	59	9.96746
normal	agua	inicial	21.79971	66	7.08514
normal	clorexidina	inicial	19.84857	58	7.87005
light	agua	inicial	22.70027	57	9.62958
light	clorexidina	inicial	22.39662	57	7.34203
nada	agua	6 MESES	26.66605	59	19.36939
nada	clorexidina	6 MESES	31.11886	56	17.02419
normal	agua	6 MESES	8.32569	39	10.70608
normal	clorexidina	6 MESES	24.31527	52	11.70495
light	agua	6 MESES	10.25476	50	15.60390
light	clorexidina	6 MESES	20.94462	57	14.68192
nada	agua	1 ANO	12.20579	47	11.24032
nada	clorexidina	1 ANO	11.85660	48	10.39618
normal	agua	1 ANO	4.69505	50	9.03831
normal	clorexidina	1 ANO	6.18612	50	12.38642
light	agua	1 ANO	4.92735	24	5.54270
light	clorexidina	1 ANO	16.04547	51	13.90961
All Grps			20.15300	927	16.00244

Three Way Analysis of Variance

quinta-feira, agosto 30, 2012, 09:35:34

Data source: Data 1 in Notebook4

General Linear Model

Dependent Variable: resistência

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Failed (p<0,050)

Equal Variance Test: Failed (p<0,050)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
grupo	2	29375.282	14687.641	97.129	<0,001
Clorexidina	1	5404.841	5404.841	35.742	<0,001
tempo	2	49765.65	24882.825	164.55	<0,001
grupo x Clorexidina	2	805.638	402.819	2.664	0.07
grupo x tempo	4	7349.083	1837.271	12.15	<0,001
Clorexidina x tempo	2	4092.693	2046.347	13.532	<0,001
grupo x Clorexidina x tempo	4	2913.323	728.331	4.816	<0,001
Residual	909	137456.856	151.218		
Total	926	237128.28	256.078		

APÊNDICE B - Análise de frequências e análise estatística dos tipos de falhas

Análise de frequências

	INICIAL						6 MESES						1 ANO					
	C	C-chx2%	CC	CC-chx2%	CL	CL-chx2%	C	C-chx2%	CC	CC-chx2%	CL	CL-chx2%	C	C-chx2%	CC	CC-chx2%	CL	CL-chx2%
A	70%	41%	70%	55%	42%	44%	49%	66%	54%	38%	60%	44%	53%	60%	66%	62%	67%	51%
M	23%	59%	29%	45%	56%	56%	44%	32%	46%	58%	40%	53%	47%	40%	32%	34%	29%	49%
CD	6%	0%	2%	0%	2%	0%	3%	2%	0%	2%	0%	0%	0%	0%	2%	2%	4%	0%
CR	0%	0%	0%	0%	0%	0%	3%	0%	0%	2%	0%	4%	0%	0%	0%	2%	0%	0%

Análise estatística dos tipos de falhas

One Way Analysis of Variance

segunda-feira, setembro 10, 2012, 09:26:33

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed ($p < 0,050$)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks segunda-feira, setembro 10, 2012, 09:26:33

Data source: Data 1 in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
A	18	0	27,500	24,000	32,250
M	18	0	21,000	17,750	30,000
CD	18	0	0,500	0,000	1,000
CR	18	0	0,000	0,000	0,250

H = 56,661 with 3 degrees of freedom. ($p = < 0,001$)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($p = < 0,001$)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	p<0,05
A vs CR	751,500	8,464	Yes
A vs CD	669,500	7,540	Yes
A vs M	125,000	1,408	No
M vs CR	626,500	7,056	Yes
M vs CD	544,500	6,132	Yes
CD vs CR	82,000	0,924	No

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

ANEXOS

ANEXO A - Declaração de doação de dentes por pacientes das clínicas de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

DECLARAÇÃO DE DOAÇÃO DE DENTES

Senhor(a) doador(a) ou seu representante legal,

A Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, desenvolve pesquisas que requerem a utilização de dentes humanos extraídos. Desta forma, quando ocorrer, após análise clínica e realização do seu plano de tratamento, a necessidade de extrair (arrancar) um ou mais dentes, solicitamos que o(a) senhor(a) faça a doação do(s) seu(s) dente(s) ou dos dentes do paciente de quem é representante legal. Esta doação não é obrigatória. É assegurado ao doador(a) que seu nome não será divulgado. Caso não queira fazer a doação não será excluído (retirado) do tratamento para o qual foi triado anteriormente. Também, a doação não dará ao doador(a) qualquer prioridade em tratamentos futuros, na Faculdade de Odontologia de Bauru (USP).

Declaro, portanto, ter sido esclarecido sobre quais os motivos que levaram a necessidade de remoção do(s) dente(s) _____ (código) e concordo que os mesmos sejam utilizados na pesquisa de título "**Avaliação da influencia da solução de clorexidina a 2% na adesão de resina composta à dentina previamente erodida com refrigerante tipo cola**", que objetiva avaliar a resistência adesiva em dentina erodida tratada com solução de clorexidina a 2%. *na união, ao longo do tempo, de um material restaurador a dentes hígidos e sadios ou alterados por bebidas.* Fui, ainda, esclarecido pelo pesquisador que minha identidade não será divulgada por qualquer meio e que o material recolhido será utilizado unicamente para a presente pesquisa.

Identificação do doador:

Nome (legível): _____
Data de nascimento: ____/____/____ Local de nascimento: _____ UF: _____
RG nº: _____ CPF nº: _____
Endereço (Rua ou Avenida, nº, Bairro e Complemento): _____
Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____
Telefones para contato: (____) _____; (____) _____; (____) _____
e-mail: _____

Bauru, ____ de ____ de ____.

Assinatura

ANEXO B - Termo de doação de dentes humanos por cirurgiões-dentistas que atendem em consultórios particulares

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73

PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS POR CIRURGIÕES-DENTISTAS

Eu, _____,
Cirurgião(ã)-dentista, inscrito no CRO sob o número _____,
com consultório situado à _____,
no bairro _____, na cidade de _____,
UF _____, CEP _____, telefone _____, doo _____
dentes para a Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São
Paulo, a fim de contribuir para a realização da pesquisa intitulada: **“Avaliação
da influencia da solução de clorexidina a 2% na adesão de resina composta à
dentina previamente erodida com refrigerantes tipo cola”** de autoria de
MARCELA PAGANI CALABRIA, LESLIE CAROLL CASAS-APAYCO, ANA CAROLINA
MAGALHÃES, RAFAEL FRANCISCO LIA MONDELLI, MARCELA ROCHA DE
OLIVEIRA CARRILHO e LINDA WANG. Declaro que estes dentes foram extraídos
por indicação terapêutica, cujos históricos fazem parte dos prontuários dos
pacientes de quem se originam, arquivados sob minha responsabilidade. Estou
ciente de que o material recolhido será utilizado pelos pesquisadores desta
Faculdade unicamente para a realização da presente pesquisa.

_____, _____ de _____ de _____.

Cirurgião(ã) - Dentista

ANEXO C - Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, sob processo nº 131/2009

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 131/2009

Bauru, 1 de outubro de 2009.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "Avaliação da influência da solução de clorexidina a 2% na adesão de resina composta à dentina previamente erodida com refrigerantes tipo cola.", de autoria de Marcela Pagani Calabria, Leslie Caroli Casas-Apayco, Ana Carolina Magalhães, Rafael Francisco Lia Mondelli, Marcela Rocha de Oliveira Carrilho, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 30 de setembro de 2009 o parecer do relator, aprovando o projeto, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que qualquer alteração efetuada no trabalho de pesquisa, o pesquisador/orientador deverá comunicar ao CEP-FOB/USP, bem como ao final do trabalho enviar um Relatório para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta
Coordenadora

Profª Drª Linda Wang

Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários

ANEXO D - Aprovação final do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, sob processo nº 131/2009

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru Comitê de Ética em Pesquisa
<p>Proc. CEP nº 131/2009</p> <p>Bauru, 16 de outubro de 2012.</p>		
<p>Senhora Professora,</p>		
<p>Informamos a Vossa Senhoria que após análise por um Relator deste Comitê de Ética em Pesquisa, o Relatório Final do trabalho de pesquisa Avaliação da influência da solução de clorexidina a 2% na adesão de resina composta à dentina previamente erodida com refrigerantes tipo cola, de autoria de Marcela Pagani Calabria, Leslie Caroll Casas-Apayco, Ana Carolina Magalhães, Rafael Francisco Lia Mondelli, Marcela Rocha de Oliveira Carrilho, sob sua orientação, foi enviado ao relator e considerado aprovado em reunião deste Comitê, realizada no dia 26 de setembro de 2012.</p>		
<p>Aprovou-se também a inclusão da pesquisadora Maria Teresa Atta como co-autora do trabalho, considerando não haver impedimentos éticos.</p>		
<p>Atenciosamente,</p>
Prof. Dr. Márcio Augusto Cardoso de Faria Coordenador		
<p>Profª Drª Linda Wang Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários</p>		
<hr/>		
<p>Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73 e-mail: cep@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356 http://www.fob.usp.br</p>		