

Hérica Adad Ricci

**Efeito de diferentes soluções de
clorexidina na produção e estabilidade
mecânica da união resina-dentina
afetada por cárie**



HÉRICA ADAD RICCI

**Efeito de diferentes soluções de clorexidina na
produção e estabilidade mecânica da união
resina-dentina afetada por cárie**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Josimeri Hebling

2º Examinador: Profa. Dra. Daniela Prócida Raggio

3º Examinador: Profa. Dra. Regina Maria Puppim Rontani

4º Examinador: Prof. Dr. Edson Alves de Campos

5º Examinador: Prof. Dr. Welington Dinelli

Araraquara, 31 de janeiro de 2012.



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Faculdade de Odontologia de Araraquara

HÉRICA ADAD RICCI

**Efeito de diferentes soluções de clorexidina na
produção e estabilidade mecânica da união
resina-dentina afetada por cárie**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação – Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, como pré-requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling

Araraquara

- 2012 -

Ricci, Hérica Adad.

Efeito de diferentes soluções de clorexidina na produção e
estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie / Hérica

Adad Ricci. – Araraquara: [s.n.], 2012.

137 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

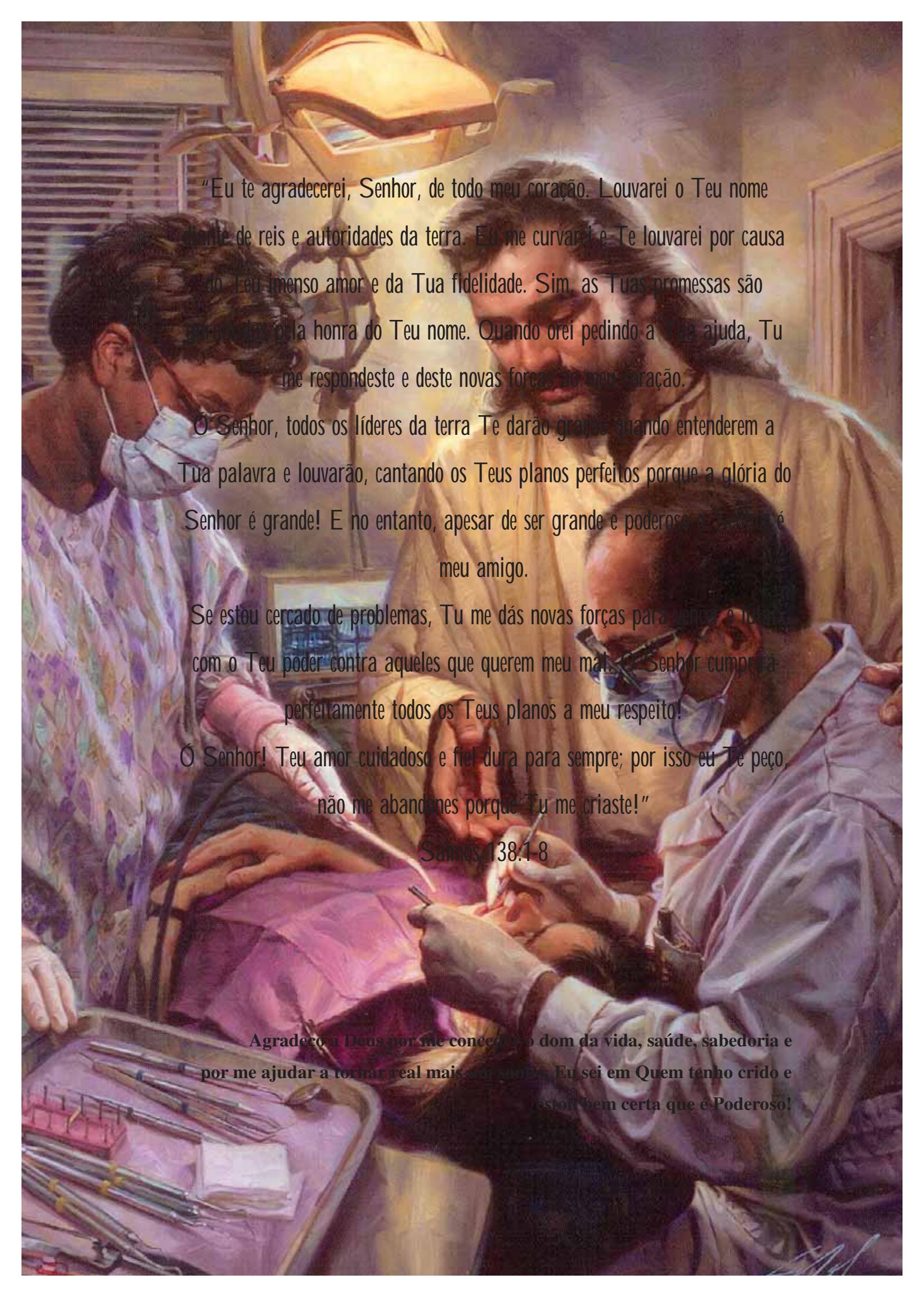
Orientadora : Profa. Dra. Josimeri Hebling

1. Cárie dentária 2. Adesivos dentinários 3. Dentina 4. Etanol
5. Clorexidina. I. Título.

Hérica Adad Ricci

DADOS CURRICULARES

Nascimento	20/ 01/ 1982, São Carlos, SP
Filiação	Humberto Paulo Ricci Sandra Adad Ricci
2001a 2004	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP
2005	Estágio de Aperfeiçoamento em Urgência em Odontopediatria pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP
2006 a 2008	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr – UNESP
2008 a 2011	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP



"Eu te agradecerei, Senhor, de todo meu coração. Louvarei o Teu nome diante de reis e autoridades da terra. Eu me curvarei e Te louvarei por causa do Teu imenso amor e da Tua fidelidade. Sim, as Tuas promessas são garantidas pela honra do Teu nome. Quando orei pedindo a Tua ajuda, Tu me respondeste e deste novas forças ao meu coração.

Ó Senhor, todos os líderes da terra Te darão graças quando entenderem a Tua palavra e louvarão, cantando os Teus planos perfeitos porque a glória do Senhor é grande! E no entanto, apesar de ser grande e poderoso o Senhor é meu amigo.

Se estou cercado de problemas, Tu me dás novas forças para vencer e lutar com o Teu poder contra aqueles que querem meu mal. Ó Senhor cumprirá perfeitamente todos os Teus planos a meu respeito!

Ó Senhor! Teu amor cuidadoso e fiel dura para sempre; por isso eu Te peço, não me abandones porque Tu me criaste!"

Salmos 138:1-8

Agradeço a Deus por me conceder o dom da vida, saúde, sabedoria e por me ajudar a tornar real mais um sonho. Eu sei em Quem tenho crido e estou bem certa que é Poderoso!



Dedicatória

Dedico esta tese à minha orientadora, Profa. Dra. Josimeri Hebling. Meus esforços na tentativa de fazer sempre o melhor em todas as pesquisas realizadas durante estes anos de pós-graduação, e tantos anos, sem dúvida alguma é porque vi na senhora esforço e dedicação sem tamanho em tudo o que estava sob sua responsabilidade e também porque sempre recebi constante incentivo e confiança! Muito obrigada professora, por todo carinho, pelos seus ensinamentos e por cada oportunidade oferecida, todas elas inesquecíveis.

Que Deus lhe abençoe.

Aos cirurgiões-dentistas de nosso país, deixo a minha contribuição.



Agradecimentos Especiais

Ao meu querido esposo Netto, por tanto amor, carinho e atenção. Muito obrigada por todo o seu apoio e incentivo, por pacientemente entender a minha constante ausência em casa, por abrir mão de muitos dos seus sonhos para a realização dos meus, por tornar nosso lar um porto seguro e onde Deus se faz sempre presente. Obrigada por me fazer tão feliz. Amo muito você!

Aos meus pais, Humberto e Sandra, por serem verdadeiros batalhadores nesta vida para educarem cada um dos seus filhos, por me mostrarem a importância e o verdadeiro sentido da palavra família, por serem minha fonte de inspiração, pelos exemplos, pelos ensinamentos e melhor ainda é ter a certeza de saber que posso contar sempre. Acima de tudo, agradeço por me educarem não somente para esta vida, mas para a eternidade.

Ao meu irmão Weber, por seu meu eterno professor. Muito obrigada pela disposição em me ensinar, pela atenção e pelos conselhos. Agradeço também a Gi, pela amizade sincera e pela Giovanna, que veio para trazer muitas alegrias a nossa família.

Ao meu irmão Heddie, pelo imenso carinho e incentivo. E agradeço a Bruna, que também se tornou uma amiga. Saibam que mesmo um pouco distante, vocês estão sempre presentes no meu coração e nas minhas orações.

Ao meu querido vó Nestor, exemplo vivo de que a vida é uma longa lição de humildade. Obrigada por me mostrar, a cada dia, que embora a vida nos traga tristezas ainda é possível sorrir.

Aos meus tios e primos, pois sei que estão sempre torcendo pelos meus sonhos.

Aos meus sogros, Vavau e Waldete, e a minha cunhada Amanda. Muito obrigada pelo amor e carinho de vocês.

À querida amiga Débora, que colaborou para a realização deste trabalho e esteve presente em grandes sonhos que realizei nesta jornada. Muito obrigada pela sua amizade e ajuda. Um dia você escreveu que tornei o seu mestrado mais fácil e hoje sou eu que retribuo suas palavras: Você tornou o meu doutorado mais fácil!

Muito Obrigada.

Às minhas amigas da turma de doutorado, Ana Luísa, Camila e Laine. Muito obrigada pela amizade e pelo convívio há tantos anos.

Às amigas Indri e Lícia, que fizeram parte da turma de mestrado, mas a vida mostrou outros caminhos e então nos distanciamos. Mas vocês moram no meu coração.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto, colaborador deste trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade em sempre nos auxiliar, por disponibilizar o laboratório para a realização de várias etapas deste trabalho e pelo carinho e atenção concedidos.

Ao Prof. Dr. David Pashley e ao Prof. Dr. Franklin Tay, pela oportunidade inesquecível que me concederam de conhecer a Geórgia Health Sciences University – Medical College of Georgia.

Ao meu eterno “diretor”, Prof. Dr. Welington Dinelli. Muito obrigada pelo carinho e pela confiança depositada em mim.

Às minhas amigas de docência, Profa. Dra. Jaqueline Braga Barbosa Cerqueira-Leite e Profa. Dra. Patrícia Aleixo dos Santos Domingos. Muito obrigada pela amizade e por compreenderem cada etapa que tive de realizar.

A todos os meus amigos de pós-graduação. Obrigada pela amizade, pelo convívio e ajuda nos momentos em que precisei.



Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho, representados pelo digníssimo diretor Prof. Dr. José
Cláudio Martins Segalla e pela vice-diretora, Andréia Affonso Barretto
Montandon.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia
de Araraquara –FOAr –UNESP, Profa. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon,
Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida, Prof. Dr.
Fábio César de Abreu-e-Lima, Profa. Dra. Josimeri Hebling, Profa. Dra. Lourdes
Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Profa. Dra. Rita de Cássia Loiola Cordeiro,
meu respeito e gratidão pelos ensinamentos e pela convivência agradável.

À coordenação do programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas – Área
de concentração Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara –
FOAr – UNESP, representada pela Profa. Dra. Josimeri Hebling e pelo vice-
coordenador Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

Ao Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Patologia e
Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, coordenado
pelo Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, pela disponibilidade de sua
estrutura física, materiais e equipamentos. Agradeço imensamente aos técnicos do
laboratório, Juliana e José Antonio por me ajudarem em várias etapas deste
trabalho.

À Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio, por disponibilizar o uso do
laboratório de Microbiologia para a realização do protocolo de indução artificial
de cárie e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. André Reis que gentilmente sanou algumas dúvidas metodológicas
durante a execução deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka e ao Sr. Renato Barbosa Salaroli pertencentes ao Núcleo de Apoio à Pesquisa/ Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária – MAP/MEPA, da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz) da Universidade de São Paulo – USP, pelo auxílio a microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Dr. Miguel Jefelicci Jr e ao Dr. Francisco pertencentes ao Instituto de Química de Araraquara, pelo auxílio no uso do goniômetro para a realização de uma das pesquisas.

Aos colegas Adriano e Cyntia da UNICAMP – Piracicaba, que gentilmente me ajudaram em alguns passos desta pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr- UNESP, Soninha, Cris, Márcia, Tânia, Odete, Dulce, Pedrinho, Diego e Totó, pelo convívio amigável e por me ajudarem sempre que precisei.

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr- UNESP, Mara , Alexandre, Rosângela, Flávia e Sérgio, pela disposição em servir.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr- UNESP, Marley, Ceres, Silvia, Maria, Disleide, Eliane, Inês e Adriano. Muito obrigada pela simpatia, pelo carinho, pela atenção, pela ajuda constante e pela amizade que desenvolvemos.

Aos pacientes que doaram seus dentes, fundamentais para a minha pesquisa, meu
profundo respeito.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse
trabalho.



Sumário

SUMÁRIO

RESUMO	16
ABSTRACT	20
INTRODUÇÃO	24
PROPOSIÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODO	30
ESTUDO 1. Influência da clorexidina na capacidade de umectabilidade da dentina hígida e afetada por cárie por um sistema adesivo	32
ESTUDO 2. Efeito da clorexidina em excipiente aquoso e alcoólico na exposição de colágeno em interfaces produzidas em dentina hígida e afetada por cárie	59
ESTUDO 3. Efeito da clorexidina associada ao etanol na degradação da união resina-dentina afetada por cárie	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
REFERÊNCIAS	123
APÊNDICES	132
ANEXO	136



Resumo

Ricci HA. Efeito de diferentes soluções de clorexidina na produção e estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

RESUMO

Proposição. O objetivo geral deste trabalho, o qual foi dividido em três estudos, foi avaliar o efeito da clorexidina (CLX) em diferentes excipientes, etanol e água, na produção e estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie. **Materiais e Métodos.** No primeiro estudo foi avaliada a influência da CLX em solução aquosa ou alcoólica na umectabilidade da dentina hígida e afetada por cárie por um sistema adesivo. Foram preparadas superfícies planas de dentina em 100 terceiros molares hígidos, das quais 50 foram submetidas ao processo microbiológico de indução de cárie. Dentro de cada condição de substrato, hígido e afetado por cárie, as superfícies foram divididas em 5 grupos (n=10): com *smear layer* (SL), sem *smear layer* impregnada com água, sem *smear layer* impregnada com CLX em água, sem *smear layer* impregnada com etanol e sem *smear layer* impregnada com CLX em etanol. Ângulos de contato entre a superfície de dentina e o sistema adesivo Single Bond 2 foram mensurados por meio de um goniômetro, e os dados submetidos aos testes de ANOVA e Tukey ($\alpha=0,05$). No segundo estudo foi avaliado o efeito da solução de CLX em diferentes excipientes, etanol ou água, na presença de colágeno exposto na união resina-dentina hígida e dentina afetada por cárie. Foram produzidas superfícies planas de dentina em 24 molares humanos hígidos, sendo metade delas cariadas artificialmente. Os dentes foram divididos em 8 grupos (n=3) segundo o tratamento da dentina após o

condicionamento ácido (CLX associada a etanol, CLX associada a água, somente etanol ou somente água) e segundo o tipo de substrato utilizado para a adesão. Espécimes foram produzidos de cada dente e preparados histologicamente para coloração com tricrômico de Goldner. A zona de colágeno exposta (ZC) foi quantificada (μm) em microscópio óptico e os dados submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). No terceiro estudo foi testada a hipótese nula de que a utilização de diferentes soluções de CLX não interfere na produção e na estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie. Superfícies planas em dentina foram produzidas em 72 molares hígidos, as quais foram submetidas ao protocolo biológico de produção de cárie por *S. mutans*. Os dentes foram divididos em 12 grupos ($n=6$) segundo o sistema adesivo (Single Bond 2, Prime & Bond NT e Excite) e o tratamento da dentina após condicionamento com ácido fosfórico (os mesmos dos estudos anteriores). Após aplicação dos adesivos, foram produzidos espécimes com $0,81 \text{ mm}^2$ de área adesiva os quais foram submetidos ao ensaio mecânico de microtração imediatamente após sua obtenção (24 horas) ou 6 meses após armazenagem em saliva artificial. Os dados de resistência de união foram submetidos aos testes de ANOVA a dois critérios fixos e Tukey ($\alpha=0,05$). **Resultados.** No primeiro estudo, maiores ângulos de contato foram obtidos sobre a dentina hígida em comparação a afetada por cárie, independente do tratamento da superfície. Para ambas, dentina hígida e afetada por cárie, ângulos de contato estatisticamente superiores foram obtidos para a dentina coberta com SL. Os solventes água e etanol não diferiram entre si quanto a umectabilidade da dentina e o mesmo resultado foi observado

quando comparadas as soluções de CLX aquosa e alcóolica. No segundo estudo, independente da solução de impregnação, a dentina afetada por cárie apresentou maior ZC na base da camada híbrida quando comparada à dentina hígida. Para ambos os substratos, o etanol interferiu negativamente na infiltração monomérica quando comparado a água, exceto quando associado a CLX. Nenhuma diferença foi observada entre as soluções contendo CLX, assim como quando essas soluções foram comparadas aos seus respectivos solventes. No terceiro estudo, nenhuma das soluções de impregnação da dentina influenciou negativamente os valores de resistência de união imediata. Apenas para Excite, a utilização de solução alcoólica de CLX resultou em aumento significativo desses valores. Redução significativa da resistência de união foi observada para Prime&Bond NT e Single Bond 2 após 6 meses de armazenamento em água quando a dentina foi impregnada por água. O mesmo não foi observado para as demais soluções de impregnação da dentina. **Conclusão:** A umectabilidade da dentina afetada por cárie foi maior do que a da dentina hígida e não foi influenciada pela utilização de CLX. A CLX em excipiente alcoólico ou aquoso não interferiu negativamente na exposição de fibrilas de colágeno nas uniões adesivas produzidas em dentina hígida e afetada por cárie ou na resistência de união imediata dos sistemas adesivos investigados. Entretanto, essas soluções foram capazes de desacelerar a degradação da união resina-dentina afetada por cárie.

Palavras-chave: cárie dentária; adesivos dentinários; dentina; etanol, clorexidina.



Abstract

Ricci HA. Effect of different solutions of chlorhexidine on the production and mechanical stability of resin-caries affected dentin bonds [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

ABSTRACT

Purpose. The overall purpose of this work, divided into three studies, was to evaluate the effect of chlorhexidine (CHX) in different excipients, ethanol and water, on the production and mechanical stability of resin-caries affected dentin bonds. **Materials and Methods.** In the first study, it was evaluated the influence of aqueous and alcoholic solution of CHX on the wettability of noncarious and caries-affected dentin by an adhesive system. Flat dentin surfaces (n=100) were produced, and 50 were submitted to a biological method of artificial caries induction. Within each type of substrate, noncarious and caries-affected dentin, the surfaces were divided into 5 groups (n=10): with smear layer, smear layer-free impregnated with water, smear layer-free impregnated with CHX in water, smear layer-free impregnated with ethanol and smear layer-free impregnated with CHX in ethanol. Contact angles between the dentin surface and the adhesive system Single Bond Plus were measured by using a goniometer and the data were submitted to ANOVA and Tukey tests ($\alpha=0.05$). In the second study, it was evaluated the effect of CHX in different excipients, ethanol or water, on the collagen exposure in interfaces produced on noncarious and caries-affected dentin. Flat dentin surfaces were prepared in 24 noncarious human molars, and half of them were artificially decayed. The surfaces were divided into 8 groups (n=3) according to the treatment of the dentin after its conditioning with

phosphoric acid (CHX in ethanol, CHX in water, water and ethanol) and to the type of substrate used for the adhesive procedures. Specimens were produced from each tooth and histologically prepared to be stained by Goldner's trichrome. The zone of exposed collagen (CZ) was quantified (μm) under a light microscope and the data submitted to Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ($\alpha=0.05$). In the third study, it was tested the null hypothesis that the use of different solutions of CHX do not interfere in the production and mechanical stability of resin-carries affected dentin bonds. Flat dentin surfaces of obtained from 72 noncarious teeth and then artificially decayed by using *S. mutans*. The teeth were divided into 12 groups ($n=6$) according to the adhesive system (Single Bond Plus, Prime&Bond NT and Excite) and to the treatment of the dentin after the conditioning with phosphoric acid (as previously described). Beam specimens with $0,81 \text{ mm}^2$ of cross-sectional area were produced and microtensile tested after 24 hours or 6 months of artificial saliva storage. Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey tests ($\alpha=0.05$). **Results.** In the first study, higher contact angles were obtained on noncarious dentin compared to caries-affected dentin, regardless the treatment of the surface. For both, noncarious and carious dentin, statistically higher angles were seen in the presence of the smear layer. Water and ethanol did not differ between each other and the same was observed when aqueous and alcoholic solutions of CHX were compared. In the second study, irrespective of the impregnation solution, resin-dentin bonds produced on caries-affected dentin presented larger CZ at the base of the hybrid layer when compared to noncarious dentin. For both substrates, ethanol negatively influenced the monomeric

infiltration of the demineralized dentin, except when combined with CHX. No difference was noted when comparing the CHX solutions with their respective solvents. In the third study, none of the impregnation solutions was detrimental to the immediate bond strength of all adhesive systems. However, higher bond strength was seen for Excite after 24 hour-storage when the dentin was treated with CHX in ethanol. After 6 months of aging in artificial saliva, significant reduction in bond strength was observed for Prime&Bond NT and Single Bond Plus when only water was used to impregnate the dentin. The same was not noted when the dentin was impregnated by the experimental solutions, including ethanol. **Conclusion.** A better wettability was achieved for caries-affected dentin when compared to noncarious dentin. That property was not influenced by CHX. Both water and ethanol-based CHX solutions did not interfere with the amount of collagen fibrils exposed at the resin-dentin bonds produced on noncarious and caries-affected dentin. In the same way, there was no interference in the immediate bond strength to caries-affected dentin. However, the CHX solutions were able to arrest the degradation of resin-caries affected dentin bonds.

Keywords: dental caries; dentin bonding agents; dentin; ethanol, chlorhexidine.



Introdução

INTRODUÇÃO

A condição clínica mais frequente do substrato dentinário no momento da adesão de materiais poliméricos é a superfície resultante após a remoção da lesão de cárie^{31,36,64}. Dessa forma, dentina hígida e dentina afetada pelo processo carioso coexistem na grande maioria dos preparos cavitários. Embora, idealmente, sistemas adesivos devessem apresentar satisfatório desempenho em ambos os substratos, estudos sobre a resistência de união desses materiais à dentina afetada por cárie reportam desempenho adesivo inferior em comparação ao alcançado sobre a dentina hígida^{21,31,32,36,42,52,64}. Em função das alterações físico-químico-mecânicas do substrato dentinário em resposta à evolução do processo carioso, observa-se para esse substrato a formação de camadas híbridas mais espessas^{23,62} e interfaces contendo maior exposição de fibrilas de colágeno desprovidas de reforço mineral e/ou polimérico na base da camada híbrida^{21,42,62}, culminando com menores valores de resistência de união quando comparados aos obtidos com a dentina hígida^{21,31,32,36,42,52,64}. Todos esses fatores contribuem negativamente à estabilidade da união resina-dentina quando submetida aos desafios impostos pela cavidade bucal.

A degradação da união resina-dentina tem sido demonstrada em vários estudos *in vitro*^{7,9,10,12,13,19,34,43,54} e *in vivo*^{6,7,14,26,28,45}. Embora o exato mecanismo de deterioração da interface adesiva ainda não seja totalmente conhecido, sabe-se que seus componentes estão sujeitos aos efeitos deletérios da presença de água circulante na interface (degradação hidrolítica) e da ação de enzimas proteolíticas.

A degradação enzimática pode ser mediada por um grupo de enzimas que representam uma família de endopeptidases metal-dependentes capazes de degradar componentes da matriz extracelular denominadas de metaloproteinases da matriz dentinária (MMPs). Essas hidrolases atuam nas fibrilas de colágeno expostas na base da camada híbrida^{14,28} devido a discrepância entre a profundidade de desmineralização ácida da dentina e a infiltração monomérica durante os procedimentos adesivos^{20,55,57}, ou ainda devido à lixiviação de componentes poliméricos resinosos em longo prazo, que ocorre como resultado da degradação hidrolítica²⁵.

A clorexidina apresenta, além de comprovado efeito antimicrobiano, a propriedade de inibir metaloproteinases^{16,22,37} e a conseqüente degradação das fibrilas de colágeno expostas na união resina-dentina. Quando utilizada a solução aquosa de clorexidina a 2% como agente coadjuvante no processo de adesão polimérica ao substrato dentinário, observou-se que ela não interferiu negativamente no desempenho adesivo imediato^{6,9,10,12-14,17,34,40,44} e a longo prazo^{6,9,10,12,14,28,34,45} dos materiais resinosos. Até mesmo maiores valores de resistência de união foram observados para alguns sistemas adesivos quando aplicados sobre a dentina condicionada e impregnada pela clorexidina⁴⁴.

Entretanto, se por um lado a utilização de clorexidina favorece a estabilidade das fibrilas de colágeno expostas na união, por outro, o componente resinoso continua vulnerável à degradação hidrolítica. Devido à condição naturalmente úmida da dentina, os sistemas adesivos contem componentes hidrófilos em sua composição. Adicionalmente, devido à simplificação das

técnicas adesivas, quantidades ainda maiores desses componentes são incorporadas aos materiais de tal forma que os polímeros formados constituem membranas permeáveis²⁷. Porém, hidrofília e estabilidade hidrolítica são propriedades antagônicas⁵⁸.

A possibilidade de infiltração da dentina desmineralizada com monômeros mais hidrófobos e, portanto, mais resistentes a degradação hidrolítica, tem sido investigada^{11,29,33,49-51,53,59}. Entretanto, para que tais monômeros, como o BisGMA (bisfenol A glicidil metacrilato), BisEMA (bisfenol-etil-dimetacrilato) e UDMA (uretano dimetacrilato) possam permear os espaços interfibrilares é necessário tornar o meio menos hidrófilo, condição essa que pode ser temporariamente alcançada pela substituição da água, a qual mantém a matriz de colágeno expandida e por conseqüência as vias para difusão do adesivo, por etanol. Essa técnica foi denominada “ethanol wet-bonding”³⁸. Adicionalmente, o uso de diferentes alcoóis, incluindo o etanol, tem se mostrado efetivos na tentativa de inibir as MMPs *in vitro*⁶⁰.

Uma vez que tanto a utilização de clorexidina quanto a impregnação da dentina desmineralizada por etanol têm demonstrado resultados favoráveis quanto à estabilidade da união resina-dentina, é plausível acreditar que poderia haver um sinergismo com a associação de ambos. Essa hipótese, entretanto, ainda necessita de suporte científico uma vez que poucos estudos demonstraram efeito significativo positivo dessa associação tanto na resistência de união imediata quanto na estabilidade mecânica de interfaces produzidas em dentina hígida^{15,48}. Em dentina afetada por cárie, entretanto, essa hipótese ainda não foi investigada.

Além do mais, existem outros aspectos a serem validados quanto a utilização de clorexidina como coadjuvante nos procedimentos adesivos. Perdigão et al.⁴⁰ (1994) sugerem que a aplicação de clorexidina sobre a dentina desmineralizada pode aumentar sua energia livre de superfície à semelhança do observado para o esmalte⁴¹. Embora não exista comprovação científica para tal suposição, o aumento da energia de superfície da dentina desmineralizada favoreceria sua umectabilidade pelos sistemas adesivos, o que poderia justificar os maiores valores de resistência de união imediata para os grupos tratados com clorexidina em alguns estudos^{13,17,44}, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa para todos^{13,17}.

Desta forma, o objetivo geral do presente projeto, o qual está dividido em três estudos, foi avaliar se intervenções que visam minimizar os efeitos dos mecanismos de deterioração da união resina-dentina (degradação enzimática e hidrolítica), associados ou isoladamente, interferem na produção e estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie.



Proposição

PROPOSIÇÃO GERAL

A proposição geral deste estudo foi investigar se a utilização de clorexidina, em diferentes excipientes, como coadjuvante no processo de adesão ao substrato dentinário, interfere na produção e na estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie.

PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

ESTUDO 1

Investigar se a impregnação da dentina por clorexidina em diferentes excipientes, água ou etanol, influencia na umectabilidade da dentina hígida e da dentina afetada por cárie por um sistema adesivo convencional simplificado.

ESTUDO 2

Investigar o efeito da impregnação da dentina por clorexidina em excipiente aquoso ou alcoólico na exposição de fibrilas de colágeno em uniões produzidas em dentina hígida e dentina afetada por cárie.

ESTUDO 3

Investigar o efeito da clorexidina associada ao etanol na produção e estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie.



Material e Método

Estudo 1

Influência da clorexidina na capacidade de umectabilidade da dentina hígida e afetada por cárie por um sistema adesivo



UMECTABILIDADE DA DENTINA HÍGIDA E AFETADA POR CÁRIE POR UM SISTEMA ADESIVO

Hérica Adad Ricci

Doutoranda em Odontopediatria, Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Débora Lopes Salles Scheffel

Doutoranda em Odontopediatria, Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Carlos Alberto de Souza Costa

Professor Titular, Departamento de Fisiologia e Patologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Francisco José dos Santos

Doutor em Físico-Química pelo Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Miguel Jafelicci Jr

Professor Adjunto, Departamento de Físico-Química, do Instituto de Química de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Josimeri Hebling[✉]

Professor Adjunto, Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

✉ Autor Correspondente:

Profa. Dra. Josimeri Hebling

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Rua Humaitá, 1680

Araraquara, SP, Brasil 14.801-903

e-mail: jhebling@foar.unesp.br

Fone: (16) 3301 6334 Fax: (16) 3301 632

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da clorexidina (CLX) em diferentes excipientes na capacidade de umectabilidade da dentina hígida e afetada por cárie por um sistema adesivo. **Materiais e métodos:** Foram preparadas superfícies planas de dentina em 100 molares hígidos, das quais 50 foram artificialmente cariadas. Para cada condição de substrato, hígido e afetado por cárie, as superfícies foram divididas em 5 grupos (n=10): com *smear layer* (SL), sem SL impregnada com água, sem SL impregnada com etanol, sem SL impregnada com CLX aquosa a 1% e sem SL impregnada com CLX alcoólica a 1%. A dentina infectada foi removida com lixa d'água de granulação 320. A remoção da SL foi realizada pela aplicação de ácido fosfórico por 15 s, seguida da aplicação de 20 uL de cada solução por 60 s. Em seguida, uma gota de Single Bond 2 foi depositada sobre a superfície e o ângulo de contato entre a superfície da dentina e o adesivo foi mensurado por meio de um goniômetro. Os dados foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey ($\alpha=0,05$). **Resultados:** Maiores ângulos de contato foram obtidos sobre a dentina hígida em comparação a afetada por cárie ($p<0,05$), independente do tratamento da superfície. Para ambas, dentina hígida e afetada por cárie, ângulos de contato estatisticamente superiores foram obtidos para a dentina coberta com SL ($p<0,05$). Os solventes água e etanol não diferiram entre si quanto a umectabilidade da dentina e o mesmo resultado foi observado quando comparadas as soluções de CLX aquosa e alcoólica. **Conclusão:** Pôde ser concluído que a umectabilidade da dentina afetada por cárie foi maior do que a da dentina hígida e que a utilização das soluções de clorexidina não interferiram nesta propriedade.

INTRODUÇÃO

A discrepância existente entre a profundidade de desmineralização da dentina e a capacidade de infiltração monomérica, resulta na formação de uma zona de colágeno exposto não reforçada por resina na base da camada híbrida^{21,41,43,44,50}, suscetível a degradação hidrolítica e enzimática^{7,14,22,34}, mediada pelas metaloproteinases (MMPs) do próprio substrato^{18,46}, assim como pelas MMPs salivares e collagenases de origem bacteriana. Este fato é agravado na dentina afetada por cárie⁴, na qual a maior profundidade de desmineralização gerada pelo condicionamento ácido culmina em maior exposição de fibrilas de colágeno na base da camada híbrida em relação à dentina hígida^{20,49}.

A ação das MMPs sobre as fibrilas de colágeno expostas na união resina-dentina é atualmente reconhecida como um importante mecanismo de degradação dessas interfaces^{7,8,13,22,34,38}, degradando os componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno tipo I, mesmo na sua forma hígida^{6,16,33}. Trabalhos tem demonstrado que a clorexidina desempenha um papel importante na inibição destas enzimas^{7,8,13,22,38}, não interferindo negativamente na resistência de união de diferentes sistemas adesivos a dentina hígida^{9-12,15,26,37} e afetada por cárie^{24,28}, podendo até gerar maiores valores de resistência de união^{12,15,37}.

Perdigão *et al.*³⁵ (1994) sugerem que a aplicação de clorexidina sobre a dentina desmineralizada pode aumentar sua energia livre de superfície à semelhança do observado para o esmalte³⁶. Embora não exista comprovação científica para tal especulação, o aumento da energia de superfície da dentina desmineralizada favoreceria sua umectabilidade pelos sistemas adesivos, o que

poderia justificar os maiores valores de resistência de união para os grupos tratados com clorexidina.

A umectabilidade de uma superfície é pré-requisito para a adesão e é fortemente dependente da rugosidade, da composição química e da condição de hidratação do substrato⁴⁷. Enquanto o esmalte condicionado permite que a resina “molhe” prontamente sua superfície, devido a sua alta energia superficial, a dentina condicionada apresenta baixa energia superficial¹⁷, uma vez que o conteúdo inorgânico é removido, ficando exposto apenas o conteúdo orgânico (fibrilas de colágeno). Entretanto, ainda não existe consenso na literatura quanto a este fato. Alguns estudos que investigaram a capacidade de molhamento da dentina demonstraram que o condicionamento ácido promove o aumento da umectabilidade deste substrato devido ao aumento da energia superficial^{1,3,39,40,48}, enquanto outros demonstraram não haver alteração significativa⁵ ou haver redução desta umectabilidade em função do condicionamento ácido¹⁹.

Dessa forma, as informações divergentes existentes na literatura, assim como a ausência de evidência sobre o efeito da clorexidina na umectabilidade da dentina condicionada com ácido fosfórico, instigaram o desenvolvimento do presente estudo. Adicionalmente, não existem informações sobre o efeito do condicionamento ácido na umectabilidade da dentina afetada por cárie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos dentes

Cem (n=100) terceiros molares humanos hígidos foram coletados para este estudo junto ao Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara

- UNESP (com aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP; protocolo no. 61/09, Anexo 1). Os dentes foram inspecionados macroscopicamente após a limpeza para remoção de debris (quando necessário) e lavagem abundante em água, e apenas foram selecionados os que apresentaram coroas anatomicamente normais e sem áreas hipoplásicas. Os dentes selecionados permaneceram armazenados em solução de timol 0,1% a 4° C até o momento de sua utilização.

Obtenção da superfície de dentina

Superfícies de dentina coronária foram produzidas por meio de desgaste do terço oclusal em politriz (Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA), equipada com lixas de carbetto de silício de granulação 320, em velocidade de 500 rpm e refrigeração constante. O desgaste foi concluído quando da obtenção de uma superfície plana completamente em dentina, ou seja, sem a presença de remanescentes de esmalte, o que foi verificado em lupa estereoscópica (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil), em aumento entre 10 e 40X.

Indução artificial da lesão de cárie

Metade dos dentes selecionados (n=50) tiveram uma das raízes perfuradas com o auxílio de uma fresa diamantada na região apical e um fio ortodôntico foi transfixado neste orifício para permitir, futuramente, que os mesmos ficassem suspensos na solução cariogênica. Então, foram impermeabilizados com uma camada de adesivo epóxi (Araldite, Ciba Especialidades Químicas, São Paulo, Brasil) e outra de esmalte ácido resistente (Colorama, Ceil, Com Exp Ind Ltda, São Paulo, Brasil), deixando apenas a superfície dentinária exposta e foram

esterelizados com óxido de etileno. A solução cariogênica é composta de 3,7 g de BHI caldo (*Brain Heart Infusion*, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA), 2 g de sacarose (Synth; LabSynth, São Paulo, Brasil), 1 g de glicose (Synth; LabSynth, São Paulo, Brasil) e 0,5 g de extrato de levedura (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA) para cada 100 mL de água destilada. Essa solução foi autoclavada (20 minutos a 121 °C) previamente a inoculação de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC25175 (Coleção de Culturas Tropical Fundação André Toselo) (2% do conteúdo de um tubo de ensaio contendo 5 mL da cultura à 10⁸ UFC/mL). Os dentes esterelizados foram suspensos no meio cariogênico (25 mL/dente) e o conjunto mantido em jarra de microaerofilia por 14 dias, em estufa a 37°. Durante esse período, a solução cariogênica foi substituída a cada 48 horas, porém sem a inoculação de novos microrganismos. Após o período de incubação, o biofilme foi removido com gaze e os materiais isolantes (adesivo epóxi e esmalte) removidos manualmente com lâminas de bisturi. Os dentes foram abundantemente lavados em água deionizada, possibilitando a constatação de uma superfície de dentina escurecida e amolecida ao toque com sonda exploradora aplicada sem pressão (Apêndice).

Remoção da dentina cariada infectada

Lixas de carbetto de silício de granulação 320 foram utilizadas manualmente para remoção da dentina cariada, possibilitando desta forma, a manutenção da superfície plana. Foi removida toda a dentina infectada, mantendo-se a dentina contaminada. O limite de remoção da dentina cariada foi estabelecido

por meio de inspeção visual e tátil com auxílio de uma cureta sem pressão. Dessa forma, a dentina resultante após a remoção do tecido infectado deveria apresentar-se escurecida e ligeiramente resistente ao toque com cureta, aplicada com leve pressão. Esse procedimento foi realizado por um único operador previamente treinado.

Com o objetivo de compensar a espessura de dentina removida para os dentes cariados, a dentina hígida dos dentes pertencentes ao grupo controle (n=50) sofreu um desgaste adicional de aproximadamente 0,5 mm, realizado em politriz equipada com lixas de carbetto de silício de granulação 320, em velocidade de 500 rpm e refrigeração constante.

Todos os dentes foram, adicionalmente, lixados manualmente com lixas de carbetto de silício 320 lubrificadas em água, por 15 segundos, com objetivo de padronizar a formação da *smear layer*.

Tratamentos da superfície de dentina e obtenção do ângulo de contato

O ângulo de contato (θ) é definido como o ângulo formado na interseção entre um plano tangente à gota e a superfície onde o líquido se encontra depositado. Os ângulos de contato foram obtidos usando o Goniômetro Optical Contact Angle Measurements OCA20 (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Baden-Württemberg, Alemanha). Este equipamento é constituído por uma plataforma móvel com parafusos de nivelamento onde a amostra é colocada, uma seringa de 1 mL fixada no aparelho para dispensar a gota, um sistema de iluminação com fibra ótica, uma câmera CCD (*Charge-Coupled Device*) e um

microcomputador que processa a imagem da gota captada pela câmera, através de um programa específico (SCA 20 – Software for OCA e PCA - DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Baden-Württemberg, Alemanha).

Os dentes pertencentes ao grupo dentina hígida (n=50) e dentina afetada por cárie (n=50) foram divididos aleatoriamente de acordo com o tipo de tratamento do substrato dentinário. Os tratamentos aos quais os dentes foram alocados estão apresentados logo a seguir. As soluções aquosa e alcoólica de clorexidina a 1% foram manipuladas nas proporções descritas na Tabela 1. Na mesma tabela também podem ser visualizadas algumas informações sobre os materiais usados nesse estudo.

- Dentina coberta por *smear layer* – controle (n=10)

Sobre a dentina coberta com *smear layer* foi aplicado o volume de 2,0 µL do sistema adesivo Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) com auxílio de uma seringa de 1 mL pré-ajustada para dispensar o volume determinado, seguida da captura da imagem nos primeiros 10 s após a aplicação da gota de adesivo e posteriormente, a medição do ângulo de contato.

- Dentina sem *smear layer* impregnada por água (n=10)

A superfície coberta por *smear layer* foi condicionada com ácido fosfórico a 35% (Ultradent Products INC, South Jordan, Utah, EUA) durante 15 segundos, seguido da lavagem por 10 segundos e remoção dos excessos de água com papel absorvente para a obtenção de uma superfície úmida. Em seguida, foram aplicados

sobre a dentina condicionada 20 µL de água deionizada, mantida passivamente por 60 segundos e os excessos removidos com papel absorvente. Em seguida, foi dispensado o mesmo volume do sistema adesivo Single Bond 2 sobre a superfície e o ângulo de contato mensurado.

- Dentina sem *smear layer* impregnada com clorexidina em água (n=10)

Seguido o condicionamento ácido da dentina coberta com *smear layer* e obtida a mesma condição de umidade com a remoção dos excessos de água com papel absorvente, foram aplicados sobre a dentina condicionada 20 µL de uma solução aquosa de diacetato de clorexidina a 1% (0,25 g/ 25 mL). A solução foi mantida passivamente por 60 segundos e os excessos removidos com papel absorvente. Sobre a superfície úmida tratada com clorexidina foi dispensada a gota do sistema adesivo para medição do ângulo de contato.

- Dentina sem *smear layer* impregnada por etanol (n=10)

A superfície coberta por *smear layer* foi condicionada com ácido fosfórico a 35% durante 15 segundos, seguido da lavagem por 10 segundos e remoção dos excessos de água com papel absorvente para a obtenção de uma superfície úmida. Em seguida, 20 µL de etanol anidro (J.T.Baker - Mallinckrodt, S.A., Xalostoc, México) foram aplicados sobre a superfície e mantidos passivamente por 60 segundos. Após remoção dos excessos com papel absorvente, a gota do sistema adesivo foi dispensada sobre a superfície e o ângulo de contato mensurado.

- Dentina sem *smear layer* impregnada com clorexidina em etanol (n=10)

Seguido o condicionamento ácido da dentina coberta com *smear layer* e obtida a mesma condição de umidade com a remoção dos excessos de água com papel absorvente, foram aplicados sobre a dentina condicionada 20 µL de uma solução de diacetato de clorexidina a 1% preparada em laboratório com etanol anidro como solvente (0,19 g/ 25 mL). A solução foi mantida passivamente por 60 segundos e os excessos removidos com papel absorvente. Sobre a superfície úmida tratada com clorexidina em etanol, foi dispensada a gota do sistema adesivo para medição do ângulo de contato.

Análise estatística

Os ângulos de contato registrados para os lados esquerdo e direito foram submetidos a análise de correlação de Pearson. Devido a alta correlação existente ($R^2 = 0,94$), a média entre esses ângulos foi computada. Aos ângulos médios foram aplicados os testes de análise de variância a dois critérios fixos (substrato e solução de impregnação da dentina), complementados por testes de Tukey para comparação múltipla dos grupos. O nível de significância de 5% foi estabelecido para todos os testes estatísticos.

RESULTADOS

Ângulos de contato formados entre a gota do sistema adesivo Single Bond 2 e a dentina hígida e dentina afetada por cárie estão apresentados na Tabela 2 em função das diferentes soluções de impregnação da dentina, após sua

desmineralização com ácido fosfórico. Ambas as variáveis independentes, substrato e tratamento, exerceram efeito significativo na umectabilidade da dentina, enquanto o mesmo não foi verdadeiro para a interação dessas variáveis.

Para ambos os substratos, a remoção da smear layer com ácido fosfórico exerceu efeito positivo na umectabilidade, uma vez que menores ângulos de contato foram formados sobre a superfície na ausência dessa estrutura, independentemente da solução de impregnação da dentina desmineralizada (Tabela 2, colunas). Da mesma forma, para todas as condições investigadas, menores ângulos de contato foram obtidos sobre a dentina afetada por cárie quando comparados aos formados sobre a dentina hígida (Tabela 2, linhas), demonstrando que a umectabilidade da primeira foi maior.

A impregnação da dentina hígida e da dentina afetada por cárie com a solução de clorexidina aquosa a 1% previamente a aplicação da gota do sistema adesivo Single Bond 2 resultou em ângulos de contato estatisticamente comparáveis aos observados para a a clorexidina alcóolica a 1% (Tabela 2, colunas). O mesmo resultado foi observado quando comparados os solventes água e etanol pois não diferiram entre si quanto a umectabilidade da dentina, uma vez que ângulos de contato também foram comparáveis para ambos os substratos (Tabela 2, colunas). As Figuras 1 e 2 são imagens representativas de cada condição da superfície avaliada para os diferentes substratos.

DISCUSSÃO

Uma condição indispensável para o estabelecimento da adesão é o íntimo contato e espalhamento do adesivo no substrato. A capacidade de molhamento e a extensão no qual o adesivo penetra na dentina apresenta um papel importante na qualidade da interface adesiva²⁷. A determinação do ângulo de contato entre um líquido e um sólido reflete o grau de propagação deste líquido sobre a superfície, expressando desta forma a medida de sua umectabilidade. Este ângulo é fortemente influenciado pela rugosidade, condição de hidratação, heterogeneidade química e física do sólido³⁹ e parece ser a técnica mais adequada para prover informações quanto a capacidade de molhamento de uma determinada superfície¹⁹.

A lesão de cárie estabelecida em dentina é composta por duas zonas distintas em vários aspectos, quanto a coloração, dureza, conteúdo microbiológico, potencial de remineralização, composição molecular. A zona externa da lesão, denominada de dentina infectada, é constituída de tecido dentinário necrótico, com perda praticamente completa do seu conteúdo mineral, rede de colágeno irreversivelmente degradada e presença de um grande número de microrganismos essencialmente proteolíticos^{31,32}. A zona interna, denominada de dentina afetada ou contaminada, apresenta-se endurecida em relação a primeira, embora ainda com menor conteúdo mineral e maior número de porosidades na zona de dentina intertubular, quando comparada a dentina hígida^{30,49,51,52}. Essas diferenças constitucionais poderiam justificar os menores valores dos ângulos de contato obtidos para a dentina afetada por cárie observados no presente estudo,

independente do tratamento realizado na superfície dentinária, indicando assim uma maior capacidade de molhamento desta superfície.

Quanto a presença de smear layer, os resultados do presente estudo demonstraram haver melhora da umectabilidade da dentina, hígida e afetada por cárie, após a remoção desta camada pelo ácido fosfórico, uma vez que menores ângulos de contato foram formados sobre a dentina condicionada em comparação a dentina coberta por smear layer. Esses resultados concordam com estudos prévios^{1,3,39,40,48} nos quais foi demonstrado que a umectabilidade da dentina foi significativamente aumentada. Esse aumento pode ser justificado pelo fato da dentina condicionada aprisionar em seu interior um maior conteúdo de água na dentina intertubular e também dentro dos túbulos dentinários ampliados em seu diâmetro pela remoção da dentina peritubular pelo ácido fosfórico¹. O conteúdo aquoso da dentina mineralizada é por volta de 25% (v/v) enquanto que da dentina desmineralizada pelo ácido fosfórico gira em torno de 75% (v/v)²⁹. A manutenção da dentina desmineralizada úmida é fundamental para garantir que as vias para difusão do sistema adesivo, ou seja, os espaços interfibrilares produzidos com a remoção do conteúdo mineral sejam preservados, garantindo desta forma a infiltração monomérica e formação da camada híbrida após polimerização in situ desses monômeros¹⁹. Adicionalmente ao fato de o condicionamento ácido promover a abertura dos túbulos e o aumento da quantidade de água na dentina, tornando-a mais hidrófila, o sistema adesivo avaliado neste estudo (Single Bond 2) apresenta monômeros hidrofílicos, água e etanol em sua composição, o que facilita seu espalhamento no substrato dentinário².

Apesar de Perdigão et al.³⁵ (1994) sugerirem que, a semelhança do que foi observado para o esmalte, a clorexidina poderia aumentar a energia livre da superfície dentinária resultando em sua maior umectabilidade, os resultados do presente estudo demonstraram que a impregnação da dentina desmineralizada com esse agente, tanto em solução aquosa como alcoólica a 1%, não influenciou a umectabilidade deste substrato. Apesar dos resultados mostrarem ausência de relação entre a aplicação de clorexidina e umectabilidade, tem sido demonstrado, tanto em estudos *in vitro*^{7-12,15,26,37} como *in vivo*^{7,8,13,22,38}, que a impregnação da dentina com uma solução aquosa de clorexidina foi capaz de desacelerar a degradação da interface resina-dentina, porém, não há até o momento trabalhos que demonstrem o mesmo para a solução alcoólica de clorexidina. No entanto, a clorexidina atua como inibidor de metaloproteinases (MMPs), enzimas endógenas liberadas pela desmineralização da dentina, quer pelo processo cariioso ou pelo condicionamento ácido, aprisionadas na interface, justificando desta forma sua incorporação nos protocolos de adesão a esse substrato.

Os solventes água e etanol não diferiram entre si quanto a umectabilidade da dentina, uma vez que os ângulos de contato foram comparáveis para ambos os substratos. No entanto, foi observada uma tendência de menores valores de ângulo de contato para a dentina impregnada com etanol. O único estudo presente na literatura que correlacionou ângulo de contato com a técnica adesiva (water vs ethanol wet-bonding), também observou menores ângulos de contato para o grupo tratado com etanol, porém essa diferença foi estatisticamente significativa²⁵. Isto que pode ser explicado em função de diferenças metodológicas entre os estudos,

no presente trabalho as imagens foram capturadas nos primeiros 10 s após a aplicação da gota de adesivo, assim como realizado por Aguilar-Mendoza et al.² (2008), enquanto que no trabalho de Li et al.²⁵ (2011), as imagens foram obtidas durante os 60 s iniciais, o que poderia proporcionar uma melhor penetração da gota no substrato.

O etanol é um solvente adequado para a maioria dos monômeros hidrófobos e ainda considerado melhor do que a água como solvente para os monômeros hidrófilos⁴². Assim, os sistemas adesivos atuais, que apresentam uma mistura de monômeros hidrófilos e hidrófobos, são capazes de infiltrar os espaços interfibrilares previamente ocupados por etanol, produzindo um melhor encapsulamento dessas fibrilas pelo adesivo. Além disso, tem sido demonstrado que o etanol é capaz de produzir contração no diâmetro das fibrilas de colágeno maior que a contração total no volume da matriz dentinária, ampliando os espaços interfibrilares e otimizando a penetração dos monômeros hidrófobos^{23,45}, proporcionando melhor selamento resinoso, reduzindo a permeabilidade e assim aumentando a resistência à degradação da união resina-dentina.

O efeito positivo da técnica úmida com etanol (*ethanol-wet bonding*) pode ser influenciado pela composição do sistema adesivo utilizado, visto que a tensão superficial do líquido (adesivo) exerce papel importante na umectabilidade do substrato^{23,45}. O sistema adesivo Single Bond 2, tem como solventes a água e o etanol, que apresentam tensão superficial de 72,0 mN/m e 22,4 mN/m, respectivamente¹⁹. A maior tensão superficial da água reduz a capacidade de penetração deste solvente no substrato, quando comparado a adesivos que

apresentam somente etanol em sua composição¹⁹. Apesar dos resultados de Li et al.²⁵ (2011) terem apresentado maior capacidade de umectabilidade para a técnica do *etanol-wet bonding* o adesivo que continha água na composição (SB) apresentou os maiores valores de ângulo de contato, o que também foi observado no presente estudo, apesar de não ter havido diferença estatística entre os grupos água/etanol.

CONCLUSÃO

Dentro das limitações do presente trabalho, pode-se concluir que melhor capacidade de umectabilidade foi apresentada pela dentina afetada por cárie do que pela dentina hígida, independente da solução de impregnação da dentina e que a remoção da *smear layer* pelo ácido fosfórico favoreceu a umectabilidade de ambos os substratos. Também pode ser concluído que a aplicação da solução aquosa ou alcoólica de clorexidina 1%, bem como as técnicas adesivas com água e etanol não exerceram influência sobre a umectabilidade da dentina condicionada.

AGRADECIMENTOS

Os autores reconhecem a importância do apoio financeiro provido pelas agências de fomento brasileiras, CNPq (Pr. no. 305204/2010-6) e FAPESP (Pr. no. 2010/09802-4 e 2010/20495-6), para o desenvolvimento deste trabalho. Os autores também reconhecem a indispensável colaboração da Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio, responsável pelo laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

REFERÊNCIAS

1. Aguilar-Mendoza JA, Rosales-Leal JI, Rodríguez-Valverde MA, Cabrerizo-Vílchez MA. Effect of acid etching on dentin wettability and roughness: self-etching primers versus phosphoric acid. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008; 84: 277-285.
2. Aguilar-Mendoza JA, Rosales-Leal JI, Rodríguez-Valverde MA, González-López S, Cabrerizo-Vílchez MA. Wettability and bonding of self-etching dental adhesives. Influence of the smear layer. *Dent Mater.* 2008; 24: 994-1000.
3. Armengol V, Laboux O, Weiss P, Jean A, Hamel H. Effects of Er:YAG and Nd:YAP laser irradiation on the surface roughness and free surface energy of enamel and dentin: an in vitro study. *Oper Dent.* 2003; 28: 67-74.
4. Arrais CA, Giannini M, Nakajima M & Tagami J. Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine. *Euro J Oral Sci.* 2004; 112: 458-464.
5. Attal JP, Asmussen E, Degrange M. Effects of surface treatment on the free surface energy of dentin. *Dent Mater.* 1994; 10: 259-264.
6. Birkedal-Hansen, H. Matrix metalloproteinases. *Adv Dent Res.* 1995; 9 (3 Suppl): 16.
7. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S et al. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent.* 2009; 34: 379-383.
8. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The

- effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent.* 2007; 32: 107-111.
9. Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent.* 2009; 11: 191-198.
 10. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater.* 2010; 26: 320-325.
 11. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent.* 2009; 37: 108-114.
 12. Carrilho MR, Carvalho RM, de Góes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* 2007; 86: 90-94.
 13. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007; 86: 529-533.
 14. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 90: 373-380.
 15. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006; 85: 22-32.

16. de Castro FL, de Andrade MF, Duarte Júnior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent.* 2003; 5: 129-138.
17. Erickson RL. Surface interactions of dentin adhesive materials. *Oper Dent.* 1992; Suppl 5: 81-94.
18. Fanchon S, Bourd K, Septier D, Everts V, Beertsen W, Menashi S, et al. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112: 171-176.
19. Farge P, Alderete L, Ramos SM. Dentin wetting by three adhesive systems: influence of etching time, temperature and relative humidity. *J Dent.* 2010; 38: 698-706.
20. Haj-Ali R, Walker M, Williams K, Wang Y, Spencer P. Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. *J Prosthodonts.* 2006; 15: 82-88.
21. Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H, Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater.* 2000; 16: 406-411.
22. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005; 84: 741-746.
23. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA et al. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. *J Dent Res.* 2009; 88: 146-151.
24. Komori PC, Pashley DH, Tjäderhane 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; 34: 157-165.
25. Li F, Liu XY, Zhang L, Kang JJ, Chen JH. Ethanol-wet Bonding Technique May Enhance the Bonding Performance of Contemporary Etch-and-Rinse Dental Adhesives. *J Adhes Dent*. 2011 jun 29. [Epub ahead of print]
26. 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; 117: 587-596.
27. Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent*. 1997; 25: 441-458.
28. Mobarak EH, El-Korashy DI, Pashley DH. Effect of chlorhexidine concentrations on micro-shear bond strength of self-etch adhesive to normal and caries-affected dentin. *Am J Dent*. 2010; 23: 217-222.
29. Nakabayashi and D.H. Pashley, Hybridization of dental hard tissues. Quintessence. Tokyo. Japan. 1998.
30. Nakajima M, Ogata M, Okuda M, Tagami J, Sano H, Pashley DH. Bonding to caries-affected dentin using a self-etching primers. *Am J Dent* 1999; 12: 309-314.
31. 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 Dental Res*. 1995; 74: 1679-1688.
32. Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. *J Dent Res*. 1983;

62: 7-10.

33. Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111: 117-127.
34. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004; 83: 216-221.
35. Perdigão J, Denehy GE, Swift EJ Jr. Effects of chlorhexidine on dentin surfaces and shear bond strengths. *Am J Dent.* 1994; 7: 81-84.
36. Perdok JF, van der Mei HC, Genet MJ, Rouxhet PG, Busscher HJ. Elemental surface concentration ratios and surface free energies of human enamel after application of chlorhexidine and adsorption of salivary constituents. *Caries Res.* 1989; 23: 297-302.
37. Ricci HA, Sanabe ME, Costa CAS, Hebling J. Effect of chlorhexidine application on bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems of primary and permanent teeth. *Am J Dent.* 2010; 23:128-132.
38. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118: 411-416.
39. Rosales JI, Marshall GW, Marshall SJ, Watanabe LG, Toledano M, Cabrerizo MA, et al. Acid-etching and hydration influence on dentin roughness and wettability. *J Dent Res.* 1999; 78: 1554-1559.
40. Rosales-Leal JI, Osorio R, Holgado J, Cabrerizo M, Toledano M. Dentin

wetting by four adhesive systems. *Dent Mater.* 2001; 17: 526–532.

41. Sanabe ME, Costa CA, Hebling J. Exposed collagen in aged resin-dentin bonds produced on sound and caries-affected dentin in the presence of chlorhexidine. *J Adhes Dent.* 2011; 13: 117-124.
42. Sauro S, Toledano M, Aguilera FS, Mannocci F, Pashley DH, Tay FR, Watson TF, Osorio R. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. *Dent Mater.* 2010; 26 :368-379.
43. Scheffel DLS. Tempo de condicionamento da dentina hígida e afetada por cárie de dentes decíduos e permanentes. Efeito na desmineralização do substrato, na produção e na resistência da união resina-dentina. [Tese de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.
44. Spencer P, Wang Y, Katz JL. Identification of collagen encapsulation at the dentin/adhesive interface. *J Adhes Dent.* 2004; 6: 91-95.
45. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, Tay KC. Bonding BisGMA to dentin- a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res.* 2007; 86: 1034-1039.
46. Tjärderhane 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; 1622-1629.
47. Toledano M, Osorio R, Moreira MA, Cabrerizo-Vilchez MA, Gea P, Tay FR, et al. Effect of the hydration status of the smear layer on the wettability and bond strength of a self-etching primer to dentin. *Am J Dent.* 2004; 17: 310-314.

48. Toledano M, Osorio R, Perdigao J, Rosales JI, Thompson JY, Cabrerizo-Vilchez MA. Effect of acid etching and collagen removal on dentin wettability and roughness. *J Biomed Mater Res.* 1999; 47: 198-203.
49. Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 81:279-286.
50. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res* 2003; 82: 141-145.
51. Yoshiyama M, Urayama A, Kimochi T, Matsuo T, Pashley DH. Comparison of conventional vs. self-etching adhesive bonds to caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2000; 25: 163–169.
52. Zheng L, Hilton JF, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. Dentin caries activity status related to hardness and elasticity. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111: 243- 252.

Tabela 1- Nome comercial, fabricante e principais componentes dos materiais utilizados no estudo

Nome comercial (fabricante)	Principais componentes
Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)	Bis-GMA, HEMA, diuretano dimetacrilato, copolímero do ácido polialcenóico, canforoquinona, água, etanol e glicerol 1.3 dimetacrilato, 10% em peso de nanopartículas de sílica
Etchant (Ultradent Products INC, South Jordan, Utah, EUA)	Ácido fosfórico 35%
Clorexidina aquosa 1% (manipulada)	Pó: diacetato de clorexidina Líquido: água deionizada (0,25 g/25 mL)
Clorexidina alcoólica 1% (manipulada)	Pó: diacetato de clorexidina Líquido: etanol anidro (0,19 g/25 mL)

Abreviaturas. Bis-GMA: bisfenol-glicidil-dimetacrilato; HEMA: hidroxietil metacrilato.

Tabela 2. Ângulos de contato obtidos com a superfície de dentina hígida e dentina afetada por cárie impregnada por diferentes soluções de clorexidina após o condicionamento ácido.

Solução de impregnação da dentina	Substrato	
	Dentina hígida	Dentina afetada por cárie
<i>Smear layer</i> (SL) presente	63,8 (5,2) a B	57,4 (12,4) b B
Água	47,5 (7,3) a A	39,5 (13,1) b A
Clorexidina aquosa 1%	48,4 (4,8) a A	38,0 (8,0) b A
Etanol	38,1 (17,2) a A	34,1 (7,1) b A
Clorexidina alcoólica 1%	36,0 (7,3) a A	32,2 (7,6) b A

^a valores são média (desvio-padrão), n=10. Letras minúsculas permitem comparações nas linhas enquanto letras maiúsculas permitem comparações nas colunas. Médias seguidas por letras iguais identificam grupos que não diferem estatisticamente (Tukey, $p > 0,05$).

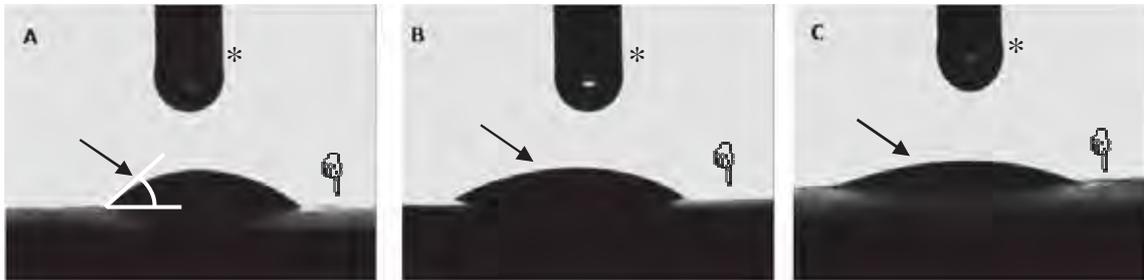


FIGURA 1 - (A) Dentina hígida coberta por *smear layer* - controle ; (B) dentina hígida sem *smear layer* impregnada por água; (C) Dentina hígida sem *smear layer* impregnada com clorexidina.

☞ Superfície de dentina; ➔ gota de adesivo; * extremidade da seringa; \triangle ângulo de contato.

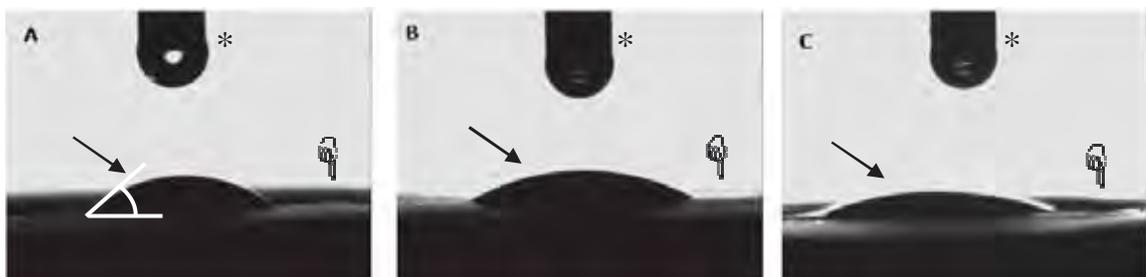


FIGURA 2 - (A) Dentina afetada por cárie coberta por *smear layer* - controle ; (B) dentina afetada por cárie sem *smear layer* impregnada por água; (C) Dentina afetada por cárie sem *smear layer* impregnada com clorexidina.

☞ Superfície de dentina; ➔ gota de adesivo; * extremidade da seringa; \triangle ângulo de contato.

Estudo 2

Efeito da clorexidina em excipiente aquoso e alcoólico na exposição de colágeno em interfaces produzidas em dentina hígida e afetada por cárie



**EFEITO DA CLOREXIDINA EM EXCIPIENTE AQUOSO E
ALCOÓLICO NA EXPOSIÇÃO DE COLÁGENO EM INTERFACES
PRODUZIDAS EM DENTINA HÍGIDA E AFETADA POR CÁRIE**

Hérica Adad Ricci

Pós-graduanda em Odontopediatria, Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Débora Lopes Salles Scheffel

Pós-graduanda em Odontopediatria, Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Matheus Racy Mariusso

Graduando em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Carlos Alberto de Souza Costa

Professor Titular, Departamento de Fisiologia e Patologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Josimeri Hebling✉

Professor Adjunto, Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

✉ **Autor Correspondente:**

Profa. Dra. Josimeri Hebling

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Rua Humaitá, 1680

Araraquara, SP, Brasil 14.801-903

e-mail: jhebling@foar.unesp.br

Fone: (16) 3301 6334 Fax: (16) 3301 6329

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da impregnação da dentina desmineralizada por clorexidina em excipiente aquoso e alcoólico na exposição de fibrilas de colágeno em uniões produzidas sobre dentina hígida e afetada por cárie. **Materiais e métodos:** Foram preparadas superfícies planas de dentina em 24 molares hígidos, das quais 12 foram submetidas ao protocolo microbiológico de indução artificial de cárie. Dentro de cada condição de substrato, hígido e afetado por cárie, as superfícies foram divididas em 4 grupos (n=3) de acordo com a solução de impregnação da dentina desmineralizada: água, clorexidina em água, etanol ou clorexidina em etanol. A dentina contaminada foi removida por desgaste em lixa. Após o condicionamento com ácido fosfórico, ambos os substratos foram impregnados com 20 uL de uma das soluções teste por 60 s previamente à aplicação do adesivo Single Bond 2. Os espécimes foram processados para coloração com Tricrômico de Goldner, a espessura da zona de colágeno (ZC) exposta nas interfaces mensurada em microscopia de luz e os dados submetidos aos testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). **Resultados:** Independente da solução de impregnação, a dentina afetada por cárie apresentou maior espessura da ZC exposto na base da camada híbrida quando comparada à dentina hígida. Para ambos os substratos, o etanol interferiu negativamente na infiltração monomérica quando comparado a água, exceto quando associado a CLX. Nenhuma diferença foi observada entre as soluções contendo clorexidina, assim como quando essas soluções foram comparadas aos seus

respectivos solventes. **Conclusão:** A utilização de CLX em excipiente alcoólico ou aquoso não interferiu na exposição de fibrilas de colágeno nas uniões adesivas produzidas em dentina hígida e afetada por cárie.

INTRODUÇÃO

Fibrilas de colágeno permanecem expostas após o estabelecimento da união resina-dentina devido à incompleta infiltração da dentina desmineralizada pelos monômeros resinosos^{37,49}. Isso ocorre como resultado conjunto de uma série de fatores tais como a redução gradual dos espaços interfibrilares no sentido da dentina mineralizada, o alto peso molecular e baixa hidrofília de alguns monômeros resinosos presentes nos adesivos dentinários^{9,40} e o gradiente de umidade da dentina,⁴² o que permite a ocorrência da separação de fases.⁴⁰ Adicionalmente a estes fatores imediatos, fibrilas de colágeno podem ser expostas devido à degradação hidrolítica, em longo prazo, do componente polimérico¹⁴ e lixiviação dos monômeros residuais e polímeros de baixo peso molecular.

Uma maior exposição desse colágeno na base da camada híbrida tem sido demonstrada para as interfaces produzidas sobre dentina afetada por cárie.⁴⁶ Isso ocorre devido à menor mineralização e maior porosidade da dentina intertubular no substrato afetado por cárie, o que favorece a difusão do agente ácido e, conseqüentemente, uma desmineralização mais profunda.^{13,46}

Os componentes da interface adesiva estão sujeitos à degradação hidrolítica e enzimática. A degradação enzimática é mediada por um grupo de enzimas que representam uma família de endopeptidases metal-dependentes capazes de degradar componentes da matriz extracelular denominadas de metaloproteinasas da matriz dentinária (MMPs). Estas enzimas podem ser oriundas do próprio substrato^{10,26,44} assim como da saliva^{41,44}. Uma vez que o tecido dentinário sofre desmineralização, quer seja pelo processo cariioso⁴⁴ ou pela utilização de agentes ácidos como parte do processo de adesão,²⁶ as MMPs são liberadas e participam diretamente do processo de degradação do conteúdo orgânico da dentina.

A clorexidina apresenta a propriedade de inibir as MMPs,^{11,26} além de apresentar boa substantividade, ligando-se a dentina desmineralizada. Embora essa ligação seja de natureza eletrostática e reversível, é mantida mesmo após os procedimentos adesivos,¹⁷ esta pode ser a razão para a eficácia em longo prazo da CLX como um inibidor de MMP na interface adesiva.¹⁹

A aplicação da solução aquosa de clorexidina a 2% previamente aos procedimentos adesivos tem demonstrado satisfatório efeito imediato^{1,3,4,6,7,20,28} e em longo prazo^{1,3,4,6,8,15,20,29} na desaceleração da degradação da interface resina-dentina. No entanto, a clorexidina atua apenas sobre a degradação do conteúdo orgânico (fibrilas de colágeno) exposto na interface, enquanto a parte resinosa permanece susceptível à degradação hidrolítica. Assim, estudos têm sido realizados na tentativa de favorecer a estabilidade do componente resinoso por meio da infiltração de monômeros essencialmente hidrófobos, como por exemplo o BisGMA, na dentina

condicionada,^{5,18,30,32,36,43} sendo que esta condição pode ser alcançada substituindo-se a água da matriz de colágeno desmineralizada por etanol, técnica esta denominada “ethanol wet-bonding”.²⁵

Um dos métodos para detecção de fibrilas de colágeno expostas na união resina-dentina é a coloração pelo Tricrômico de Goldner, utilizada com essa finalidade pela primeira vez por Spencer et al.³⁷ (1999). Em seu trabalho pioneiro, seguido de vários outros que validaram a técnica,^{12,38,39,45,47,48} esses autores demonstraram que fibrilas de colágeno não completamente envolvidas por adesivo estavam disponíveis para reagir com o corante e podiam ser facilmente identificadas nas lâminas por sua coloração vermelha. Entretanto, apenas dois estudos utilizaram essa técnica para análise de interfaces produzidas com a dentina afetada por cárie.^{13,33}

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar, por meio da coloração do Tricrômico de Goldner, se a associação da inibição exercida pela clorexidina e a infiltração da dentina desmineralizada por monômeros mais hidrófobos, pela ação do etanol presente na solução alcoólica de clorexidina, interfere na infiltração da dentina desmineralizada e consequente exposição de colágeno na base da camada híbrida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos dentes

Vinte e quatro (n=24) terceiros molares humanos hígidos foram coletados para este estudo junto ao Banco de Dentes (com aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP; Protocolo no. 61/09) da Faculdade de Odontologia de Araraquara -

UNESP. Após a obtenção, os dentes foram limpos para a remoção de debris e lavados em água corrente para a inspeção macroscópica da coroa dentária. Somente foram utilizados aqueles que apresentaram coroas anatomicamente normais e sem áreas hipoplásicas. Os dentes foram armazenados em solução de timol 0,1% em temperatura de 4° C até o momento de sua utilização.

Obtenção da superfície de dentina

Superfícies de dentina coronária foram produzidas por meio de desgaste da superfície oclusal em politriz (Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA), equipada com lixas de carbetto de silício de granulação 320, em velocidade de 500 rpm e refrigeração constante. O desgaste foi concluído quando da obtenção de uma superfície plana completamente em dentina, ou seja, sem a presença de remanescentes de esmalte, o que foi verificado em lupa estereoscópica (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil), em aumento entre 10 e 40X.

Indução artificial da lesão de cárie

Metade dos dentes selecionados (n=12) tiveram uma das raízes perfuradas com o auxílio de uma fresa diamantada na região apical e um fio ortodôntico foi transfixado neste orifício para permitir que os mesmos ficassem suspensos na solução cariogênica. Então, foram impermeabilizados com uma camada de adesivo epóxi (Araldite, Ciba Especialidades Químicas, São Paulo, Brasil) e outra de esmalte ácido

resistente (Colorama, Ceil, Com Exp Ind Ltda, São Paulo, Brasil), deixando apenas a superfície dentinária exposta e foram esterelizados com óxido de etileno.

A solução cariogênica foi composta de 3,7 g de BHI caldo (*Brain Heart Infusion*, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA), 2 g de sacarose (Synth; LabSynth, São Paulo, Brasil), 1 g de glicose (Synth; LabSynth, São Paulo, Brasil) e 0,5 g de extrato de levedura (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA) para cada 100 ml de água destilada. Essa solução foi autoclavada (20 minutos a 121 °C) previamente a inoculação de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC25175 (Coleção de Culturas Tropical Fundação André Toselo) (2% do conteúdo de um tubo de ensaio contendo 5 mL da cultura à 10^8 UFC/mL). Os dentes esterelizados foram suspensos no meio cariogênico e o conjunto mantido em jarra de microaerofilia por 14 dias. Durante esse período, a solução cariogênica foi substituída a cada 48 horas, porém sem a inoculação de novos microrganismos. Após o período de incubação, o biofilme foi removido com gaze e os materiais isolantes (adesivo epóxi e esmalte) removidos manualmente com lâminas de bisturi. Os dentes foram abundantemente lavados em água deionizada, possibilitando a constatação de uma superfície de dentina escurecida e amolecida ao toque com sonda exploradora aplicada sem pressão.

Remoção da dentina cariada infectada

Lixas de carbetto de silício de granulação 320 foram utilizadas para remoção da dentina cariada, possibilitando desta forma, a manutenção da superfície plana. Foi

removida toda a dentina infectada, mantendo-se a dentina contaminada. O limite de remoção da dentina cariada foi estabelecido por meio de inspeção visual e táctil com auxílio de uma cureta aplicada sem pressão. Dessa forma, a dentina resultante após a remoção do tecido infectado deveria apresentar-se escurecida e ligeiramente resistente ao toque com a cureta. Esse procedimento foi realizado por um único operador previamente treinado.

Com o objetivo de compensar a espessura de dentina removida para os dentes cariados, a dentina hígida dos dentes pertencentes ao grupo controle (n=12) sofreu um desgaste adicional de aproximadamente 0,5 mm, realizado em politriz equipada com lixas de carbetto de silício de granulação 320, em velocidade de 500 rpm e refrigeração constante.

Todos os dentes foram, adicionalmente, lixados manualmente com lixas de carbetto de silício 320 lubrificadas em água, por 15 segundos, com objetivo de padronizar a formação da *smear layer*.

Procedimentos Adesivos

Os dentes foram divididos aleatoriamente segundo o substrato (hígido ou cariado) e a solução de impregnação da dentina desmineralizada (água, clorexidina em água, etanol ou clorexidina em etanol). Desta forma, a dentina foi inicialmente condicionada por 15 segundos com ácido fosfórico a 35% (Ultradent Products INC, South Jordan, Utah, EUA), o qual foi removido por meio de lavagem abundante com água também por 10 segundos. Em seguida, o excesso de água foi removido com

papel absorvente para obtenção de uma superfície úmida. Sobre essa superfície serão aplicados 20 µL das soluções em estudo, ou seja, água deionizada, clorexidina aquosa 1%, 100% etanol (J.T.Baker - Mallinckrodt, S.A., Xalostoc, México), ou clorexidina 1% em etanol. A solução foi mantida em contato com a dentina por 60 segundos sem agitação, sendo em seguida removidos os excessos com papel absorvente para a manutenção do aspecto úmido. As soluções de clorexidina foram manipuladas na proporção descrita na Tabela 1. Na mesma Tabela 1 também podem ser visualizadas algumas informações sobre os materiais usados nesse estudo.

Em seguida, duas camadas consecutivas do adesivo Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foram aplicadas, sendo cada uma delas individualmente submetidas a leves jatos de ar para remoção do solvente (5 s a 10 cm de distância). Ao final, as camadas foram conjuntamente fotoativadas por 10 segundos com o aparelho de luz Optilux 500 (Kerr, Danbury, CT, EUA) cuja irradiância foi monitorada com radiômetro, não devendo ser inferior a 300 mW/cm². Quatro camadas adicionais do adesivo foram aplicadas e fotoativadas ao final da aplicação da última camada para possibilitar a microtomia dos espécimes. Os dentes foram mantidos em ambiente com 100% de umidade relativa à 37 °C por 24 horas.

Processamento histológico

Os dentes foram seccionados na cortadeira metalográfica (ISOMET 1000) para obtenção de espécimes (*ca.* 3 por dente) com dimensões de 2 mm de espessura, 2 mm de altura e 5 mm de comprimento. Os espécimes foram fixados em solução de

formol a 10% por 48 horas e levemente desmineralizados em solução de Morse a 10% por 48 horas sem agitação. Em seguida, foram lavados, neutralizados em solução de sulfato de sódio a 5% por 24 horas, novamente lavados em água corrente por 24 horas, para posterior desidratação em soluções crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização e inclusão à vácuo em parafina. Cortes de aproximadamente 5 µm de espessura (820 Spencer Microtome - American Optical Corp, Buffalo, NY – EUA) foram corados pelo Tricrômico de Goldner³⁷. Nessa coloração, a dentina mineralizada foi corada em verde, a camada de adesivo em bege, o colágeno hibridizado pelo adesivo em laranja e o colágeno exposto em vermelho (Figura 2).

Análise em microscopia de luz

Um corte de cada espécime foi aleatoriamente selecionado e analisado em aumento de 400X (Olympus BX51 e Câmera Camedia C5060 – Olympus Corp, Tokio, Japão). Três medidas da espessura da zona de colágeno exposto foram realizadas para cada lâmina/espécime com auxílio do programa UTHSCSA Image Tool (The University of Texas Health Science Center, Santo Antonio, TX, EUA). Foi determinado um ponto central e dois pontos equidistantes a este, um do lado esquerdo e outro do lado direito. As leituras foram realizadas em duplicata por um mesmo examinador previamente calibrado ($r \geq 0,80$), com intervalo de uma semana entre elas, e as médias foram computadas.

Análise Estatística

O teste de correlação intraclasse (ICC) foi aplicado para a determinação da concordância intra-examinador para as duas leituras da espessura da zona de colágeno (variável resposta) presente nas uniões adesivo-dentina. A média das duas leituras foi computada e aos dados obtidos foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis complementados por testes de Mann-Whitney, considerando-se como fatores de variação do estudo o “tipo de substrato” e a “solução de impregnação da dentina”. O nível de 5% foi estabelecido para todos os testes estatísticos.

RESULTADOS

A correlação intra-examinador obtida para as leituras da espessura da zona de colágeno exposta na base da camada híbrida foi de 98% ($r^2=0,98$). Os dados de espessura de colágeno estão apresentados na Tabela 2 como mediana e percentis 25-75, em função do tipo de substrato e da solução de impregnação da dentina desmineralizada pelo condicionamento com ácido fosfórico.

Fibrilas de colágeno expostas (coradas em vermelho) foram identificadas em todas as interfaces avaliadas, como ilustrado nas figuras 1 e 2. Independente da solução utilizada para saturar a dentina desmineralizada pelo ácido fosfórico, na dentina afetada por cárie a espessura da zona de colágeno exposta nas uniões adesivas foi estatisticamente maior do que a espessura observada para a dentina hígida (Tabela 2, linhas).

Para ambos os tipos de substrato, dentina hígida e afetada por cárie, a utilização de etanol para a impregnação da dentina interferiu negativamente na infiltração monomérica desses substratos quando comparada com a utilização de água, exceto quando associado à clorexidina. Nesse caso, valores equivalentes ao grupo impregnado com água foram obtidos (Tabela 2, colunas). Nenhuma diferença estatística foi observada entre as soluções contendo clorexidina, assim como quando essas soluções foram comparadas aos seus respectivos solventes. Dessa forma, pode ser afirmado que a adição de clorexidina ao etanol, assim como a adição de clorexidina a água não interferiu negativamente na infiltração da dentina pelo sistema adesivo Single Bond 2. Em outras palavras, a espessura da zona de fibrilas de colágeno exposta na união resina-dentina formada com o uso adjunto das soluções contendo clorexidina não diferiu estatisticamente (Tabela 2, colunas).

DISCUSSÃO

A odontologia adesiva somada a filosofias mais conservadoras de intervenção sobre o substrato afetado pelo processo carioso faz com que cada vez mais interfaces adesivas sejam estabelecidas em cavidades onde coexistem tecido dentinário hígido e afetado por cárie. A dentina afetada por cárie apresenta menor conteúdo mineral, maior número de porosidades e obliteração dos túbulos dentinários pela deposição de dentina intratubular, quando comparada a dentina hígida.^{22,23,46,50-52} No entanto, apesar destas peculiaridades e alterações apresentadas por este tecido, que interferem diretamente sobre a qualidade da interface adesiva, a maioria dos estudos

relacionados a adesão tem utilizado a dentina hígida como suporte para o estabelecimento das interfaces adesivas a serem avaliadas.⁴⁶

No presente estudo foi utilizado um protocolo microbiológico de indução artificial de cárie. Este método pretende simular o processo de cárie utilizando cepas bacterianas, reproduzindo algumas características da lesão de cárie natural em dentina como coloração, degradação do colágeno e a presença de duas camadas distintas, sendo que a camada mais externa se assemelha a dentina infectada, com consistência amolecida, sendo facilmente removida, expondo a camada interna, semelhante a afetada, mais resistente ao corte. Essa zona interna é aquela que predomina após o procedimento de escavação e é submetida aos procedimentos adesivos.²¹

Após o condicionamento ácido da dentina, há o surgimento de uma zona desmineralizada, a qual deveria, idealmente, ser completamente impregnada pelos monômeros resinosos do sistema adesivo. No entanto, devido a fatores como tamanho e peso molecular, presença de umidade no substrato,^{9,40,42} além da degradação hidrolítica do componente polimérico em longo prazo,¹⁴ há a manutenção de uma zona de colágeno exposto na base da camada híbrida, esta região propicia uma via de infiltração de fluidos e bioprodutos bacterianos, denominada nanoinfiltração.³⁴ Esse fenômeno favorece a degradação, hidrolítica e enzimática, dos constituintes da união resina-dentina, culminando em sua falência funcional.

Os resultados deste estudo mostraram que independentemente da solução de impregnação na dentina e do tipo de substrato avaliado, fibrilas de colágeno

permaneceram expostas na interface adesiva. No entanto, na dentina afetada por cárie a espessura da zona de colágeno exposta sempre foi estatisticamente maior do que a espessura observada para a dentina hígida, concordando com os resultados apresentados por Haj-Ali et al.¹³ (2006), onde mesma coloração histológica foi utilizada. Isso pode ser explicado devido a dentina afetada por cárie apresentar menor conteúdo mineral e maior número de porosidades na dentina intertubular,^{22,27} facilitando a difusão do agente ácido ao mesmo tempo que seu tamponamento pelos minerais dissolvidos fica comprometido pelo inferior conteúdo mineral que esse tecido apresenta em comparação a dentina hígida. Entretanto, estes resultados discordam do trabalho de Sanabe et al.³³ (2011), onde não foi observada diferença estatística da zona de colágeno exposto entre a dentina hígida e afetada por cárie, apesar do mesmo método de indução da lesão de cárie e a mesma concentração do ácido fosfórico terem sido utilizados. Sendo o único fator que diferencia as metodologias e seria capaz de explicar as diferenças entre os resultados ser a utilização de broca esférica em baixa rotação para a remoção da dentina infectada enquanto no presente trabalho foi utilizada lixa de carbeto de silício de granulação 320, a qual permite maior controle durante a remoção da dentina infectada, resultando em uma superfície plana de dentina afetada, já com a utilização da broca esta remoção é mais grosseira, dificultando a verificação do limiar entre dentina afetada e dentina hígida, de modo que os procedimentos adesivos do trabalho de Sanabe et al.³³ podem ter sido realizados sobre uma superfície predominantemente hígida.

Ethanol wet-bonding é uma filosofia criada para os sistemas adesivos

convencionais, que busca a substituição da água presente nos espaços inter e intra-fibrilares por etanol, buscando a formação de um ambiente hidrófobo, capaz de melhorar a infiltração dos monômeros resinosos com maior hidrofobia.²⁵ A infiltração de monômeros hidrófobos na matriz de colágeno diminui a sorção de água, a plastificação da resina e a clivagem hidrolítica do colágeno por enzimas,^{16,31} criando uniões adesivas mais estáveis. O presente trabalho buscou avaliar se o uso do etanol aplicado após o condicionamento ácido e previamente a aplicação do sistema adesivo auxiliaria na penetração monomérica de forma a reduzir a zona de fibrilas de colágeno exposta. Porém, para ambos os substratos, dentina hígida e afetada por cárie, o etanol interferiu negativamente na infiltração monomérica quando comparada a água, exceto quando associado a clorexidina, nesse caso, valores equivalentes ao grupo impregnado com água foram obtidos.

O efeito negativo do etanol sobre a infiltração monomérica observado neste estudo pode ser explicado pelos resultados de Osorio et al.²⁴ (2010). Estes autores avaliaram diferentes protocolos de substituição da água presente na matriz de colágeno por etanol após o condicionamento ácido e observaram que a aplicação de etanol absoluto por 1 min, sobre a dentina, produziu colapso e contração das fibrilas de colágeno, o que gera dificuldade para infiltração dos monômeros do adesivo por entre a rede desmineralizada. Por outro lado os mesmos autores concluíram que uma sequência ascendente das concentrações de etanol não causou colapso da matriz e a contração das fibrilas foi menor do que quando utilizado o etanol absoluto.

Além disso, o Single Bond 2, utilizado no presente trabalho, é um sistema

adesivo convencional simplificado que apresenta em sua composição uma mistura de monômeros hidrófobos e hidrófilos, além de água e etanol como solventes. Os monômeros hidrófobos são mais resistentes a degradação hidrolítica, no entanto apresentam estruturas moleculares maiores o que restringe sua penetração por entre as fibrilas de colágeno, este fato é agravado pela contração da matriz gerada pelo etanol absoluto.²⁴ Somado a isso, a remoção da água presente nos espaços interfibrilares pelo etanol absoluto, gera um ambiente temporariamente hidrófobo, dificultando assim a penetração dos monômeros hidrófilos, gerando uma maior zona de colágeno exposto na base da camada híbrida, tanto para a dentina hígida quanto para a dentina afetada por cárie.

Quando a clorexidina em solução aquosa foi comparada com a água, não houve diferença, tanto para a dentina hígida quanto para a afetada por cárie. O mesmo foi observado para a clorexidina em solução alcoólica em comparação a superfície impregnada com etanol absoluto. Quando foram comparadas as soluções de clorexidina, aquosa ou alcoólica, nenhuma diferença estatística foi observada para ambos os substratos quanto a espessura de colágeno exposto. Levando em consideração o efeito positivo da clorexidina na inibição das MMPs e consequentemente sobre a redução da degradação da interface adesiva^{1-4,6,8,15,20,29} e que a adição de clorexidina a água ou ao etanol não exerceu efeito negativo sobre a infiltração monomérica por entre a rede de fibrilas de colágeno, a aplicação desta substância se faz pertinente nos procedimentos adesivos.

Embora a técnica do *ethanol wet-bonding* vise melhorar a penetração de monômeros mais hidrófobos na matriz de colágeno desmineralizada, estudos tem demonstrado que alguns fatores podem interferir na efetividade da técnica, como a composição química do sistemas adesivo utilizado³⁵ e o protocolo de aplicação do etanol.²⁴ Desta forma, são necessários mais estudos com a finalidade de estabelecer parâmetros que garantam a eficácia da técnica para posterior aplicação clínica.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que a adição de clorexidina ao etanol e a água não interferiu negativamente na infiltração da dentina pelo adesivo, enquanto o uso do etanol absoluto promoveu maior exposição de colágeno na base da camada híbrida quando comparado à água, independente do tipo de substrato, dentina hígida e afetada por cárie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a inestimável colaboração da Sra. Juliana Pirola e do Sr. José Antonio Sampaio Zuanon, técnicos do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara, na obtenção das lâminas coradas com Tricrômico de Goldner. Também agradecem o apoio financeiro do CNPq (Pr. no. 305204/2010-6) e da FAPESP (Pr. no. 2010/09802-4 e 2010/20495-6). Os autores reconhecem a indispensável colaboração

da Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio, responsável pelo laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

REFERÊNCIAS

1. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent* 2007; 32:107-111.
2. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, et al. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent* 2009; 34:379-383.
3. Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent* 2009; 11:191-198.
4. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater* 2010; 26: 320-325.
5. Cadenaro M, Breschi L, Rueggeberg FA, Agee K, Di Lenarda R, Carrilho M, Tay FR, Pashley DH. Effect of adhesive hydrophilicity and curing time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol-saturated acid-etched dentin. *Dent Mater* 2009; 25:39-47.
6. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent* 2009; 37:

108-114.

7. Carrilho MR, Carvalho RM, de Góes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res* 2007; 86:90-94.
8. 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* 2007; 86:529-533.
9. Eliades G, Vougiouklakis G, Palaghias G. Heterogeneous distribution of single-bottle adhesive monomers in the resin-dentin interdiffusion zone. *Dent Mater* 2001; 17: 277-283.
10. Fanchon S, Bourd K, Septier D, Everts V, Beertsen W, Menashi S, et al. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci* 2004; 112:171-176.
11. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8 and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 437-439.
12. Guo X, Spencer P, Wang Y, Ye Q, Yao X, Williams K. Effects of a solubility enhancer on penetration of hydrophobic component in model adhesives into wet demineralized dentin. *Dent Mater* 2007; 23: 1473- 1481.
13. Haj-Ali R, Walker M, Williams K, Wang Y, Spencer P. Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. *J Prosthodont* 2006; 15: 82-88.
14. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res*

2000; 79:1385-1391.

15. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005; 84:741-746.
16. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, et al. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol- saturated dentin. *J Dent Res* 2009; 88:146-151.
17. Kim J, Gu L, Breschi L, Tjäderhane L, Choi KK, Pashley DH, et al. Implication of ethanol wet-bonding in hybrid layer remineralization. *J Dent Res* 2010; 89:575-580.
18. Li F, Liu XY, Zhang L, Kang JJ, Chen JH. Ethanol-wet Bonding Technique May Enhance the Bonding Performance of Contemporary Etch-and-Rinse Dental Adhesives. *J Adhes Dent*. 2011 Jun 29. [Epub ahead of print]
19. Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, Pashley DH, Tay FR. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res* 2011; 90: 953-968.
20. 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; 117: 587-596.
21. Marquezan M, Corrêa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol* 2009; 54: 1111-1117.
22. Nakajima M, Ogata M, Okuda M, Tagami J, Sano H, Pashley DH. Bonding

- to caries-affected dentin using a self-etching primers. *Am J Dent* 1999; 12: 309- 314.
23. Nakajima M, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Yoshiyama M, Ebisu S, et al. Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesives. *J Dent Res* 1995; 74: 1679-1688.
24. Osorio E, Toledano M, Aguilera FS, Tay FR, Osorio R. Ethanol wet-bonding technique sensitivity assessed by AFM. *J Dent Res* 2010; 89: 1264-1269.
25. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent* 2007; 20:7-20.
26. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; 83: 216-221.
27. Reis AF, Bedran-Russo AK, Giannini M, Pereira PN. Interfacial ultramorphology of single-step adhesives: nanoleakage as a function of time. *J Oral Rehabil* 2007; 34: 213-221.
28. Ricci HA, Sanabe ME, Costa CAS, Hebling J. Effect of chlorhexidine application on bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems of primary and permanent teeth. *Am J Dent* 2010; 23:128-132.
29. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci* 2010; 118: 411-416. Erratum in *Eur J Oral Sci* 2010; 118: 535.
30. Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol wet

- bonding challenges current anti-degradation strategy. *J Dent Res* 2010; 89:1499-1504.
31. Sadek FT, Castellan CS, Braga RR, Mai S, Tjäderhane L, Pashley DH, et al. One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dent Mater* 2010; 26: 380-386.
 32. Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, et al. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res* 2008; 84: 19-29.
 33. Sanabe ME, Costa CA, Hebling J. Exposed collagen in aged resin-dentin bonds produced on sound and caries-affected dentin in the presence of chlorhexidine. *J Adhes Dent* 2011; 13: 117-124.
 34. Sano H, Yoshiyama M, Ebisu S, Burrow MF, Takatsu T, Ciucchi B, et al. Comparative SEM and TEM observations of nanoleakage within the hybrid layer. *Oper Dent* 1995; 20: 160-167.
 35. Sauro S, Toledano M, Aguilera FS, Mannocci F, Pashley DH, Tay FR, et al. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. *Dent Mater* 2010; 26: 368-379.
 36. Shin TP, Yao X, Huenergardt R, Walker MP, Wang Y. Morphological and chemical characterization of bonding hydrophobic adhesive to dentin using ethanol wet bonding technique. *Dent Mater* 2009; 25:1050-1057.
 37. Spencer P, Swafford JR. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. *Quintessence Int* 1999; 30: 501-507.
 38. Spencer P, Wang Y, Katz JL. Identification of collagen encapsulation at the

- dentin/adhesive interface. *J Adhes Dent* 2004; 6:91-95.
39. Spencer P, Wang Y, Walker MP, Wieliczka DM, Swafford JR. Interfacial chemistry of the dentin/adhesive bond. *J Dent Res* 2000; 79: 1458-1463.
 40. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res* 2002; 62:447-456.
 41. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res* 2001; 80:1545–1549.
 42. Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SH. The overwet phenomenon: a transmission electron microscopic study of surface moisture in the acid-conditioned, resin-dentin interface. *Am J Dent* 1996; 9:161-166.
 43. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, Tay KC. Bonding BisGMA to dentin- a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res* 2007; 86: 1034-1039.
 44. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998; 77:1622-1629.
 45. Wang Y, Spencer P, Hager C, Bohaty B. Comparison of interfacial characteristics of adhesive bonding to superficial versus deep dentine using SEM and staining techniques. *J Dent* 2006; 34: 26-34.
 46. Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J Biomater Res* 2007; 81A: 279-286.

47. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res* 2003; 82: 141-145.
48. Wang Y, Spencer P. Physiochemical interactions at the interfaces between self-etch adhesive systems and dentine. *J Dent* 2004; 32: 567-579.
49. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res* 2002; 59: 46-55.
50. Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Itou K, et al. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. *J Dent Res* 2002; 81: 556-560.
51. Yoshiyama M, Urayama A, Kimochi T, Matsuo T, Pashley DH. Comparison of conventional vs self-etching adhesive bonds to caries-affected dentin. *Oper Dent* 2000; 25: 163-169.
52. Zheng L, Hilton JF, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. Dentin caries activity status related to hardness and elasticity. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 243- 252.

Tabela 1- Nome comercial, fabricante e principais componentes dos materiais utilizados no estudo

Nome comercial (fabricante)	Principais componentes
<p>Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)</p>	<p>Bis-GMA, HEMA, diuretano dimetacrilato, copolímero do ácido polialcenólico, canforoquinona, água, etanol e glicerol 1.3 dimetacrilato, 10% em peso de nanopartículas de sílica</p>
<p>Etchant (Ultradent Products INC, South Jordan, Utah, EUA)</p>	<p>Ácido fosfórico 35%</p>
<p>Clorexidina aquosa 1% (manipulada)</p>	<p>Pó: diacetato de clorexidina Líquido: água deionizada (0,25 g/25 mL)</p>
<p>Clorexidina alcoólica 1% (manipulada)</p>	<p>Pó: diacetato de clorexidina Líquido: etanol anidro (0,19 g/25 mL)</p>

Abreviaturas. Bis-GMA: bisfenol-glicidil-dimetacrilato; HEMA: hidroxietil metacrilato.

Tabela 2. Espessura da zona de colágeno (μm) exposta na base de camadas híbridas produzidas sobre dentina hígida ou afetada por cárie, impregnada por água, solução aquosa de clorexidina 1%, etanol ou solução alcoólica de clorexidina 1%, após o condicionamento com ácido fosfórico.

Solução de impregnação	Substrato	
	Dentina hígida	Dentina afetada por cárie
Água	2,26 (1,87-2,30) ** [7] ^{A, a}	10,01 (8,76-10,99) [9] ^{A, b}
Solução aquosa CLX*	2,62 (2,26-2,78) [6] ^{AB, a}	7,04 (4,67-8,01) [6] ^{A, b}
Solução alcoólica CLX	2,65 (2,30-2,84) [6] ^{AB, a}	9,47 (7,95-14,39) [9] ^{AB, b}
Etanol	2,91 (2,63-3,23) [6] ^{B, a}	16,83 (13,56-18,17) [9] ^{B, b}

*CLX = clorexidina 1%

**valores são mediana (percentil 25-percentil 75) [n]. Letras maiúsculas permitem comparações nas colunas enquanto que letras minúsculas permitem comparações nas linhas. Grupos identificados com letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

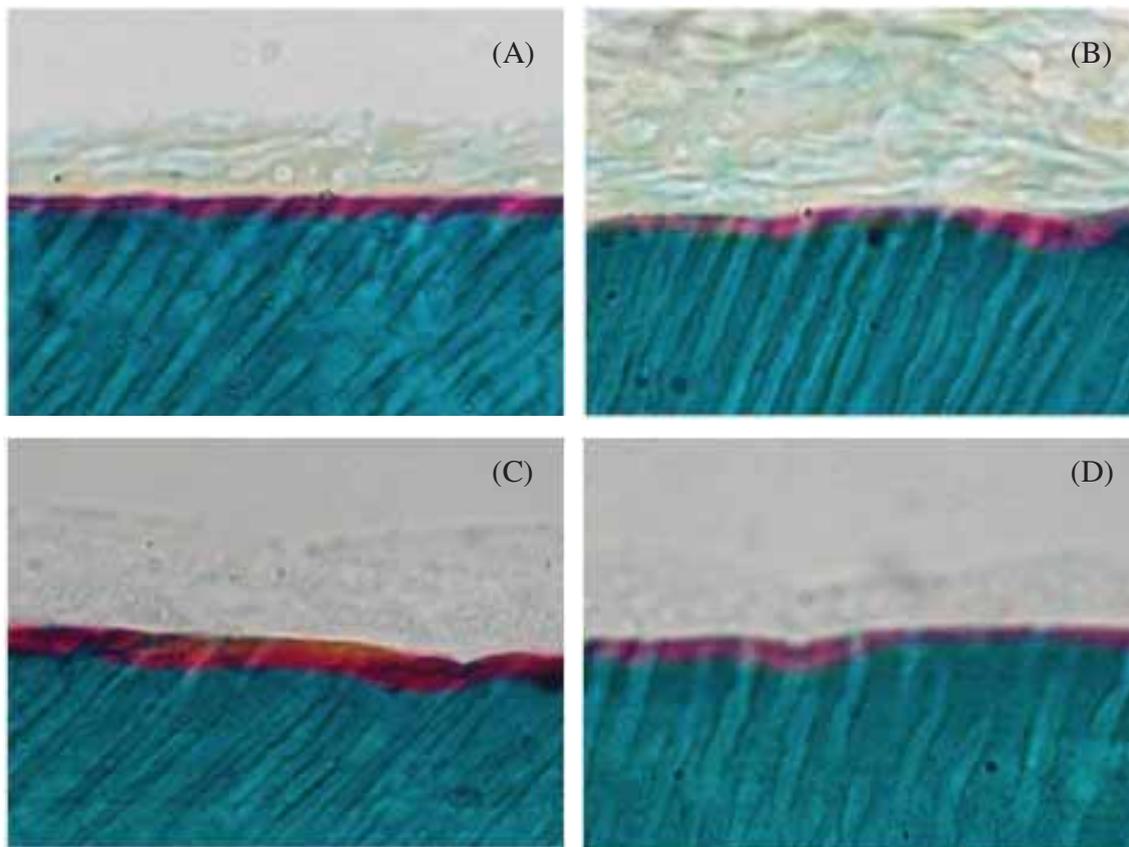


Figura 1. Espécimes de dentina hígida corados com Tricrômico de Goldner. Soluções de impregnação: (A) água; (B) solução aquosa de clorexidina; (C) etanol; e (D) solução alcoólica de clorexidina. X400. Camada de adesivo em bege claro, colágeno hibridizado pelo adesivo em laranja, colágeno exposto em vermelho e dentina mineralizada em verde.

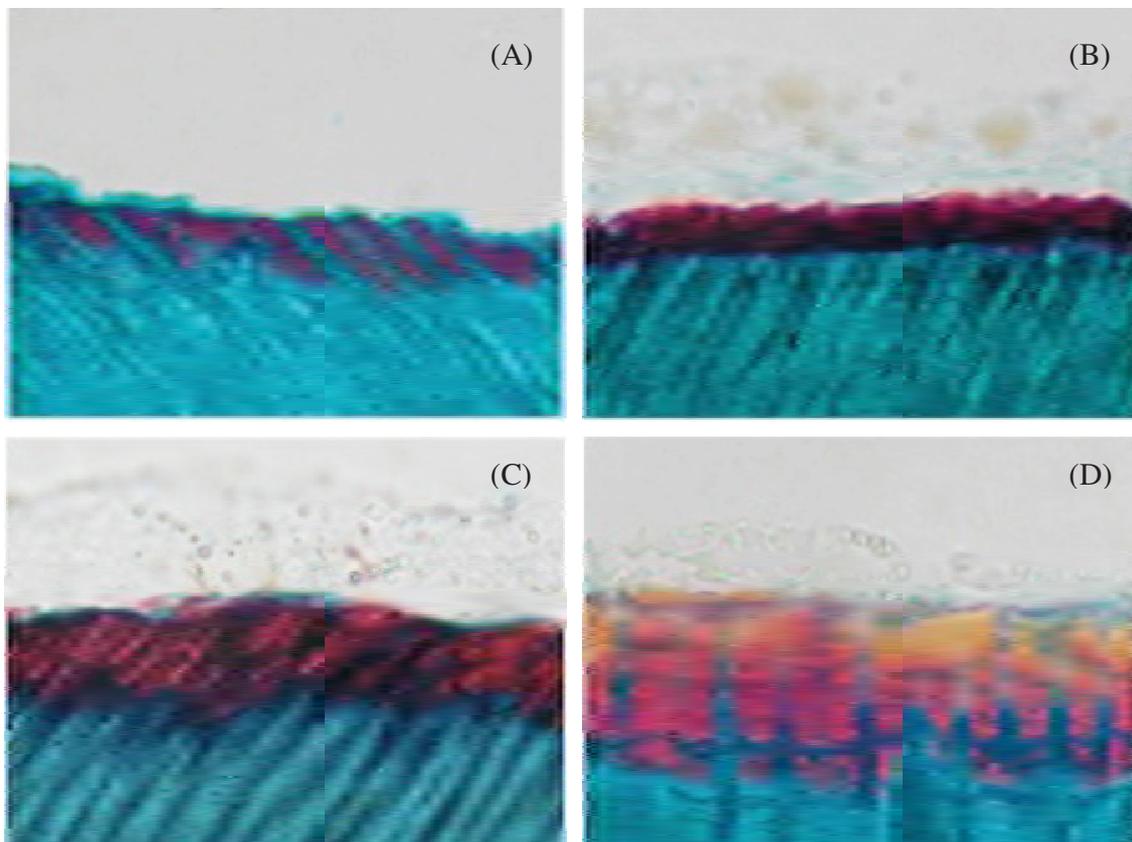
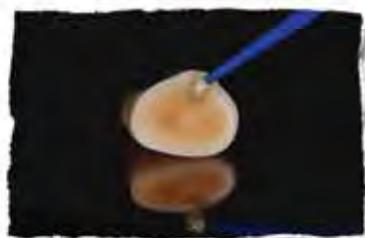


Figura 2. Espécimes de dentina afetada por cárie corados com Tricrômico de Goldner. Soluções de impregnação: (A) água; (B) solução aquosa de clorexidina; (C) etanol; e (D) solução alcoólica de clorexidina. X400. Camada de adesivo em bege claro, colágeno hibridizado pelo adesivo em laranja, colágeno exposto em vermelho e dentina mineralizada em verde.

Estudo 3

**Efeito da clorexidina associada ao etanol
na degradação da união resina-dentina
afetada por cárie**



EFEITO DA CLOREXIDINA ASSOCIADA AO ETANOL NA DEGRADAÇÃO DA UNIÃO RESINA-DENTINA AFETADA POR CÁRIE

Hérica Adad Ricci, DDS, MS, PhD Student

Pós-graduanda em Odontopediatria, Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Débora Lopes Salles Scheffel, DDS, MS, PhD Student

Pós-graduanda em Odontopediatria, Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Elcilaine Rizzato Azevedo, DDS, MS, PhD Student

Pós-graduanda em Odontopediatria, Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Denise Madalena Palomari Solidorio

Professor Adjunto, Departamento de Fisiologia e Patologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Carlos Alberto de Souza Costa, DDS, MS, PhD

Professor Titular, Departamento de Fisiologia e Patologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

Josimeri Hebling, DDS, MS, PhD[✉]

Professor Adjunto, Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, Brasil

✉ Autor Correspondente:

Profa. Dra. Josimeri Hebling

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Rua Humaitá, 1680 Araraquara, SP, Brasil 14.801-903

e-mail: jhebling@foar.unesp.br Fone: (16) 3301 6334 Fax: (16) 3301 6329

RESUMO

Objetivo: Avaliar se a aplicação de diferentes soluções de clorexidina (CLX) interfere na produção e estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie. **Materiais e métodos:** Superfícies planas em dentina foram produzidas (n=72) em molares hígidos e submetidas à produção de cárie por *S. mutans*. Os dentes foram divididos em grupos (n=6) segundo o sistema adesivo: Single Bond 2(SB), Prime&Bond NT(PB) e Excite(EX), e o tratamento da dentina: água, etanol, 1% CLX em água e 1% CLX em etanol. Após remoção da dentina infectada, a superfície foi condicionada com H₃PO₄ (15s). As soluções foram aplicadas (20µL) por 60s. Após 24h da produção da interface adesiva, foram obtidos espécimes (0,81mm²), os quais foram submetidos ao ensaio mecânico de microtração imediatamente após sua obtenção ou 6 meses após armazenagem em saliva artificial. Para cada sistema adesivo, os dados de RU (MPa) foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey (p>0.05). **Resultados:** Nenhum dos tratamentos da dentina influenciou a RU imediata do SB, enquanto que para os demais adesivos, a associação de CLX ao etanol aumentou significativamente esses valores em relação a sua associação à água. Após 6 meses de envelhecimento, redução significativa da RU foi observada apenas para a água, quando SB e PB foram aplicados. Para EX, não houve redução da RU. **Conclusão:** As soluções de CLX não interferiram negativamente na RU à dentina afetada por cárie, e produziram uniões mais estáveis longitudinalmente.

Descritores: cárie dentária; adesivos dentinários; dentina; etanol, clorexidina.

INTRODUÇÃO

O estabelecimento da união resina-dentina é uma forma única de engenharia tecidual, na qual a matriz de dentina desmineralizada se combina com componentes resinosos do sistema adesivo, formando uma estrutura híbrida¹, capaz de proporcionar retenção micromecânica entre dentina e resina, denominada camada híbrida.² Apesar de seu papel fundamental na união, a camada híbrida não é estabelecida de forma ideal, apresentando imperfeições e irregularidades internas provenientes do momento de seu estabelecimento e da degradação sofrida por seus constituintes ao longo do tempo.

A degradação da união resina-dentina ocorre por duas vias, envolvendo ambos os componentes resinoso e orgânico da interface. Os polímeros formados a partir dos monômeros resinosos dos sistemas adesivos sofrem ao longo do tempo deterioração devido ao processo de hidrólise.³ Enquanto a matriz orgânica, composta basicamente por colágeno tipo I, é degradada, não apenas pela água, mas também por meio da ação de enzimas salivares, bacterianas ou provenientes da própria dentina.³⁻⁸ Essas últimas são expostas durante a síntese da matriz extracelular e aprisionadas no tecido dentinário após a finalização do processo de mineralização ou podem estar presentes no fluido dentinário.^{1,9,10}

As enzimas que tem sido mais relacionadas ao processo de degradação dos constituintes orgânicos da união adesiva são as metaloproteinases da matriz dentinária (MMPs) e as catepsinas. As MMPs estão presentes em tecidos mineralizados humanos maduros, incluindo a dentina^{4,11-13} e são liberadas durante sua

dissolução pelo condicionador ácido⁵ ou pelo processo cariioso.⁴ Quando ativadas, por elevação do pH, são capazes de degradar constituintes da matriz extracelular, incluindo o colágeno tipo I em sua forma nativa (atividade colagenolítica) ou desnaturada (atividade gelatinolítica).^{14,15}

As catepsinas, outra classe de enzimas colagenolíticas, são expressas por odontoblastos e estão presentes tanto na dentina sadia¹⁶ quanto na dentina cariada.¹⁷ Essas enzimas podem ser ativadas em pH ácido¹⁸, participando da degradação da matriz extracelular, incluindo fibrilas de colágeno expostas na união resina-dentina, assim como as MMPs.¹⁹

Visando aumentar a estabilidade funcional da união resina-dentina por meio da inativação destas enzimas, o uso de substâncias sintéticas, como a clorexidina, tem sido investigado. A clorexidina aplicada após o condicionamento ácido da dentina e previamente à aplicação de sistemas adesivos tem, além de ação antimicrobiana²⁰, a importante função de reduzir a degradação de fibrilas de colágeno expostas na base da camada híbrida.²¹⁻²⁴ Adicionalmente, a clorexidina também tem se mostrado efetiva contra as catepsinas produzidas por *Porphyromonas gingivalis*^{25,26} e outras catepsinas humanas²⁷, embora ainda não existam estudos que comprovem o efeito inibidor da CLX sobre as catepsinas presentes no substrato dentinário.

Ainda no sentido de melhorar a estabilidade longitudinal da interface adesiva, uma nova filosofia de adesão a dentina para os sistemas adesivos convencionais, denominada de *ethanol wet-bonding*, foi descrita por Pashley et al.²⁸, (2007). Segundo o protocolo proposto pelos autores, após a desmineralização pelo

condicionador ácido, a água presente na matriz de colágeno, nos espaços inter e intrafibrilares, deve ser substituída por etanol, modificando o caráter hidrófilo da dentina desmineralizada em hidrófobo, na tentativa de favorecer a penetração de monômeros resinosos com essa característica²⁸⁻³⁰. Assim, a infiltração desses monômeros na matriz de colágeno reduz a sorção de água pelo polímero, a plastificação da resina e a clivagem hidrolítica do colágeno por enzimas, resultando em uniões adesivas mais estáveis.^{31,32}

Desta forma, objetivando associar o efeito benéfico da clorexidina como inibidor enzimático à proposta da técnica do *ethanol wet-bonding* de melhorar a infiltração monomérica, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da clorexidina associada ao etanol na produção e estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie.

MATERIAL E MÉTODO

Seleção e distribuição dos dentes

Setenta e dois (n=72) terceiros molares humanos hígidos foram coletados para este estudo junto ao Banco de Dentes (com aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP; protocolo no. 61/09) da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Após limpeza para a remoção de debris (quando necessário) e lavagem abundante em água corrente, somente foram selecionados os dentes que apresentaram coroas anatomicamente normais e sem áreas hipoplásicas. Os dentes foram

armazenados em solução de timol 0,1% em temperatura de 4° C até o momento de sua utilização.

Os dentes foram divididos aleatoriamente em 12 grupos (n= 6) de acordo com o sistema adesivo aplicado e a solução de impregnação da dentina desmineralizada. Os sistemas adesivos selecionados foram Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), Prime & Bond NT (Dentsply, Milford, DE, EUA) e Excite (Ivoclar Vivadent, Schaan Liechtenstein). Algumas informações sobre os sistemas adesivos e outros materiais usados nesse estudo estão apresentadas na Tabela 1.

Obtenção da superfície de dentina

Superfícies de dentina coronária foram produzidas por meio de desgaste da superfície oclusal em politriz (Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA), equipada com lixas de carbetto de silício de granulação 320, em velocidade de 500 rpm e refrigeração constante. O desgaste foi concluído quando da obtenção de uma superfície plana completamente em dentina, ou seja, sem a presença de remanescentes de esmalte, o que foi verificado em lupa estereoscópica (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil), em aumento entre 10 e 40X.

Indução artificial da lesão de cárie

Todos os dentes selecionados (n=72) tiveram uma das raízes perfuradas com o auxílio de uma fresa diamantada na região apical e um fio ortodôntico foi transfixado neste orifício para permitir que os mesmos ficassem suspensos na solução

cariogênica. Então, foram impermeabilizados com uma camada de adesivo epóxi (Araldite, Ciba Especialidades Químicas, São Paulo, Brasil) e outra de esmalte ácido resistente (Colorama, Ceil, Com Exp Ind Ltda, São Paulo, Brasil), deixando apenas a superfície dentinária exposta e foram esterelizados com óxido de etileno.

A solução cariogênica foi composta de 3,7 g de BHI caldo (*Brain Heart Infusion*, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA), 2 g de sacarose (Synth; LabSynth, São Paulo, Brasil), 1 g de glicose (Synth; LabSynth, São Paulo, Brasil) e 0,5 g de extrato de levedura (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA) para cada 100 ml de água destilada. Essa solução foi autoclavada (20 minutos a 121 °C) previamente a inoculação de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC25175 (Coleção de Culturas Tropical Fundação André Toselo) (2% do conteúdo de um tubo de ensaio contendo 5 mL da cultura à 10^8 UFC/mL). Os dentes esterelizados foram suspensos no meio cariogênico e o conjunto mantido em jarra de microaerofilia por 14 dias. Durante esse período, a solução cariogênica foi substituída a cada 48 horas, porém sem a inoculação de novos microrganismos. Após o período de incubação, o biofilme foi removido com gaze e os materiais isolantes (adesivo epóxi e esmalte) removidos manualmente com lâminas de bisturi. Os dentes foram abundantemente lavados em água deionizada, possibilitando a constatação de uma superfície de dentina escurecida e amolecida ao toque com sonda exploradora aplicada sem pressão.

Remoção da dentina cariada infectada

Lixas de carbetto de silício de granulação 320 foram utilizadas para remoção da dentina cariada, possibilitando desta forma, a manutenção da superfície plana. Foi removida toda a dentina infectada, mantendo-se a dentina contaminada. O limite de remoção da dentina cariada foi estabelecido por meio de inspeção visual e tátil com auxílio de uma cureta aplicada sem pressão. Dessa forma, a dentina resultante após a remoção do tecido infectado deveria apresentar-se escurecida e ligeiramente resistente ao toque com a cureta. Esse procedimento foi realizado por um único operador previamente treinado.

Ao final da remoção da dentina infectada, os dentes foram adicionalmente desgastados manualmente com lixas de carbetto de silício 320 lubrificadas em água, por 15 segundos, com objetivo de minimizar diferenças quanto as características da *smear layer*.

Procedimentos adesivos

Inicialmente, a superfície dentinária de todos os dentes foi condicionada com ácido fosfórico 35% (Ultradent Products INC, South Jordan, Utah, EUA) durante 15 segundos. Em seguida, a superfície foi abundantemente lavada com água por 10 segundos e seca com papel absorvente para a obtenção de uma superfície úmida.

Sobre essa superfície foram aplicados 20 µL das soluções em estudo, ou seja, água deionizada, clorexidina aquosa 1%, 100% etanol (J.T.Baker- Mallinckrodt, S.A., Xalostoc, México), ou clorexidina 1% em etanol. A solução foi mantida em contato

com a dentina por 60 segundos sem agitação, sendo em seguida removidos os excessos com papel absorvente para a manutenção do aspecto úmido. As soluções de clorexidina foram manipuladas na proporção descrita na Tabela 1.

Em seguida, o sistema Single Bond 2 foi aplicado em duas camadas, cada uma delas individualmente submetida a leves jatos de ar (5 s a uma distância de 10 cm) para evaporação dos solventes, e então fotoativadas conjuntamente por 10 segundos. Para o sistema Excite foi aplicada uma camada do adesivo mantido sob agitação com auxílio do próprio *microbrush* durante 10 segundos, seguido de fotoativação por 10 segundos. Finalmente, para o sistema Prime & Bond NT foi aplicada uma primeira camada de adesivo, a qual foi mantida em contato com a dentina por 20 segundos antes da aplicação da segunda camada, então submetida a leves jatos de ar e fotoativada por 10 segundos. Após a aplicação dos sistemas adesivos, a superfície dentinária apresentava um aspecto homogêneo e brilhante, verificada visualmente.

Na sequência, um bloco em resina composta de 3 mm de altura foi confeccionado (Z250, cor A3, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) incrementalmente, sendo cada incremento (1mm) individualmente fotoativado por 20 segundos. Todos os procedimentos envolvendo fotoativação foram realizados com o mesmo aparelho Optilux 500 (Demetron Research Co., Danbury, Connecticut, EUA), cuja intensidade de luz (irradiância) deveria ser superior a 300 mW/cm^2 (Optilux Radiometer, mod.100; Danbury, CT, EUA). Os dentes foram mantidos em estufa a 37 °C por 24 h antes de serem preparados para o ensaio mecânico de microtração.

Preparo dos espécimes para microtração

Inicialmente, para facilitar o posicionamento dos dentes em uma base de madeira, dois cortes no sentido transversal foram feitos: um na superfície da coroa reconstruída em resina e outro, paralelo ao primeiro, na raiz (aproximadamente 3 mm da junção esmalte-cementária no sentido apical). Esses cortes, e os subsequentes, foram realizados em uma máquina para cortes (ISOMET 1000, Buehler Ltd, Lake Bluf, IL, EUA) equipada com disco diamantado de 0,3 mm de espessura (Diamond Wafering Blade, Buehler Ltd, Lake Bluf, IL, EUA), sob refrigeração constante, peso de 250 gf e velocidade de 350 rpm.

Logo após, o dente foi posicionado na máquina de tal forma que seu longo eixo ficasse paralelo ao longo eixo do disco diamantado. O dente foi cortado no sentido vestibulo-lingual em fatias de 0,9 mm de espessura, sendo que os cortes foram iniciados junto a uma das superfícies proximais, até ser atingida a superfície oposta. Após rotação do dente em 90°, nova série de cortes foi feita, também com 0,9 mm de espessura. Ao final, os espécimes tinham a forma de paralelogramos (“palitos”), com área transversal de seção de aproximadamente 0,81 mm². Todos os espécimes foram inspecionados em lupa estereoscópica (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) com aproximadamente 30 vezes de aumento. Aqueles que apresentaram defeitos na interface, presença de esmalte, bolhas ou irregularidades nas proximidades da união resina-dentina, foram excluídos da amostra. Os espécimes selecionados tiveram sua área adesiva individualmente mensurada com paquímetro

digital (Mod. 500- 144b, Mytutoyo Sul Americana Ltda., SP, Brasil) com resolução de 0,01 mm.

Armazenagem dos espécimes (envelhecimento)

Os espécimes obtidos de cada dente foram aleatoriamente divididos de acordo com o tempo de armazenagem. Assim, alguns espécimes foram tracionados imediatamente após sua obtenção e os restantes após 6 meses de armazenagem em saliva artificial contendo timol à 0,1%, a 37°. A saliva não foi trocada durante o período de 6 meses e seu pH foi mensalmente monitorado com auxílio de um pHmetro (modelo 8010, Qualxtron, São Paulo, SP, Brasil). Em caso de queda de pH, a saliva de todos os espécimes seria trocada, mas não foi necessário.

Ensaio Mecânico de Microtração

Os testes de microtração foram realizados em máquina de ensaios mecânicos (DL (Digital Line, EMIC, Paraná, Brasil) ajustada para forças de tração com célula de carga de capacidade máxima de 100 N.

Os espécimes foram individualmente fixados a um dispositivo metálico, com adesivo de cianoacrilato associado a um acelerador à base de cianoacrilato (Super Bonder Gel e Ativador 7456, Henkel Loctile Ltda, São Paulo, SP). Este dispositivo metálico era adaptado à máquina de ensaios mecânicos para o teste de microtração, a qual atuava com velocidade de 0,5 mm/min. Os movimentos de tração foram iniciados por meio de um programa computadorizado específico (Tesc-Test Script,

EMIC Equipamentos de ensaio Ltda., São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) até que o espécime fosse rompido, quando o movimento era cessado e os valores de carga máxima registrados. Esses valores foram divididos pela área de secção transversal do respectivo espécime para a obtenção dos dados em megapascal (MPa).

Análise das Fraturas

Após o teste de microtração, as metades obtidas para cada espécime foram mantidas secas em recipientes a temperatura ambiente até o momento da leitura das fraturas. Esta leitura foi realizada em microscópio de luz (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) em aumentos variados, que permitiram a análise adequada. As fraturas foram classificadas em: (1) coesivas da resina ou dentina; (2) adesivas; e (3) mistas.

Tratamento Estatístico dos Dados

A média dos valores de resistência de união (RU) dos espécimes pertencentes ao mesmo dente foi computada e a unidade experimental utilizada para a análise estatística foi o dente (n=6). Para cada sistema adesivo, o conjunto de dados de resistência de união (MPa) foi submetido a análise de variância a dois critérios fixos (“tratamento da dentina” e “período de envelhecimento”), a qual foi complementada pelo teste de Tukey para comparações múltiplas aos pares. O nível de significância de 5% foi adotado para as inferências estatísticas. Os dados referentes ao tipo de fratura foram apresentados de forma descritiva como valores absolutos e porcentagens.

RESULTADOS

Os valores de resistência de união (MPa) foram registrados em função das variáveis “tratamento da dentina” e “período de envelhecimento” para cada sistema adesivo e estão apresentados na Tabela 2.

A utilização de diferentes soluções de impregnação da dentina desmineralizada (1% clorexidina aquosa, 1% clorexidina alcoólica e 100% etanol) não influenciou negativamente os valores de resistência de união imediata (24 horas) dos sistemas adesivos investigados, quando esses valores foram comparados ao do grupo controle (água). Para Single Bond 2, valores estatisticamente semelhantes foram obtidos para todos os tratamentos da dentina, enquanto que para os demais sistemas houve variação em função desse tratamento. Para o sistema adesivo Prime & Bond NT, o uso de clorexidina associada ao etanol apresentou valores de RU (média $25,7 \pm 7,3$ MPa) estatisticamente superiores aos observados quando da utilização da clorexidina em água (média $16,3 \pm 4,3$ MPa), embora nenhum desses tratamentos tenha diferido do controle (média $19,4 \pm 4,9$ MPa). Os valores de RU do sistema Excite foram estatisticamente superiores quando a dentina foi impregnada por clorexidina em etanol (média $34,9 \pm 7,1$ MPa) do que quando clorexidina em água foi utilizada (média $21,4 \pm 4,7$ MPa) ou mesmo apenas água (controle, média $20,6 \pm 9,1$ MPa) (Tabela 2, coluna).

Ainda quanto a RU imediata, para todos os sistemas adesivos, nenhuma

diferença estatística foi observada entre o solvente (água ou etanol) puro e sua associação a clorexidina, assim como entre os solventes (Tabela 2, coluna).

Após 6 meses de armazenagem em saliva artificial, redução da RU foi observada para os três sistemas adesivos quando água foi utilizada como solução de impregnação da dentina (grupos controle). Essa redução foi de 35% para Prime & Bond NT, 37,3% para Single Bond 2 e 17,9% para Excite. Apenas para este último, essa redução não atingiu níveis significantes. Para todos os demais grupos de tratamento da dentina, foi observada redução não significativa dos valores de RU após o envelhecimento em saliva artificial (Tabela 2, linhas), a qual variou entre 0,4% e 14,4%.

Na tabela 3 pode ser visualizada a distribuição dos tipos de fratura observados para cada sistema adesivo em função do tratamento da dentina e do período de envelhecimento dos espécimes. Fraturas adesivas foram predominantes em todas as situações, com aumento de frequência após 6 meses de envelhecimento em saliva artificial comparado a 24 horas de armazenamento.

DISCUSSÃO

Devido à instabilidade longitudinal da união resina-dentina, novas técnicas e materiais são constantemente propostos sob o prisma de melhoria da resistência dessa união aos processos de degradação hidrolítica e enzimática. Os efeitos desses fenômenos são agravados quando a dentina afetada por cárie é utilizada como

substrato, a qual, infelizmente, constitui a situação clínica mais frequente. Entretanto, essas novas técnicas não devem influenciar negativamente a resistência de união imediata dos sistemas adesivos, a ponto de comprometer sua tolerância frente as tensões geradas pela contração de polimerização do compósito restaurador.

Os tratamentos alternativos realizados sobre a superfície da dentina desmineralizada pelo ácido fosfórico (etanol, clorexidina aquosa ou alcoólica) não influenciaram negativamente a resistência de união imediata, para todos os sistemas adesivos avaliados. Em investigações prévias já foi comprovado que soluções aquosas de clorexidina, com concentrações que variaram de 0,2 à 2%, não interferem na resistência de união à dentina hígida^{33,34} e afetada por cárie.³⁵ Da mesma forma, no presente estudo, foi demonstrado que uma solução aquosa de diacetato de clorexidina a 1% resultou em valores de RU comparáveis aqueles produzidos no controle, ou seja, quando apenas água foi utilizada para impregnação da dentina previamente à aplicação dos sistemas adesivos.

A utilização de clorexidina associada ao etanol também resultou em valores de RU semelhantes ao controle (água) para todos os adesivos exceto para o Excite onde valores estatisticamente maiores foram produzidos. Também foi observado que para dois dos três sistemas adesivos investigados, a associação da clorexidina ao etanol resultou em aumento significativo da RU quando comparada à obtida para o grupo onde a clorexidina foi associada a água. A técnica úmida com etanol (*ethanol wet bonding*)²⁹ baseia-se em dois princípios: aumento da hidrofobia do substrato dentinário por meio da substituição da água por etanol e aumento da hidrofilia do

BisGMA quando solvatado em etanol de modo a colocá-lo dentro da faixa de miscibilidade da matriz de colágeno saturada com etanol. Após a infiltração da matriz de colágeno e a evaporação do etanol, o BisGMA assume sua característica hidrófoba original, resultando em uma interface adesiva relativamente hidrófoba, conseqüentemente mais resistente a degradação hidrolítica. Utilizando sistemas adesivos comerciais, os poucos trabalhos disponíveis na literatura^{36,37} também demonstraram efeitos positivos da associação da clorexidina com etanol.

Apenas para Single Bond 2, não foi observado efeito benéfico inicial quando da utilização da clorexidina em etanol. Pode ser sugerido que devido ao fato desse sistema apresentar também água como solvente, além de etanol, tenha havido maior resistência à evaporação desses solventes uma vez que as forças de interação intermoleculares são maiores nessa mistura do que nas substâncias puras originais. A presença de solvente residual na interface adesiva prejudica a conversão monomérica, a qual pode interferir negativamente na RU. Portanto, os resultados do presente estudo parecem apontar para o fato de que sistemas adesivos que contenham solventes outros que não a água possam responder melhor a técnica úmida com etanol.

De modo geral, a redução dos valores de RU após 6 meses de envelhecimento em saliva artificial para os grupos controle (entre 17,9 e 37,3%) demonstrou a ocorrência de degradação da união resina-dentina afetada por cárie, embora essa redução tenha sido estatisticamente significante apenas para os sistemas Prime & Bond NT e Single Bond. Após o condicionamento ácido da dentina a concentração de

água, em relação ao volume, aumenta de 20% (dentina mineralizada) para 70% (dentina desmineralizada).³⁸ A presença desta água mantém os espaços interfibrilares, impedindo que as fibrilas de colágeno entrem em colapso dificultando a infiltração dos monômeros resinosos durante os procedimento adesivos, sendo necessário a manutenção de uma dentina úmida.³⁹ No entanto, apesar de ser necessária para garantir uma união efetiva, a água também é considerada uma das principais responsáveis pelo mecanismo de degradação da parte orgânica e inorgânica da interface adesiva.³

Quimicamente, a água participa de duas reações que ocorrem na degradação da união resina-dentina, hidrólise e plastificação dos componentes resinosos.⁴⁰ Adicionalmente, as endopeptidases presentes na dentina (metaloproteinases e catepsinas) são consideradas hidrolases e, portanto, necessitam da presença de água para sua ação proteolítica. A hidrólise é responsável pela quebra de ligações covalentes, existentes tanto nas fibrilas de colágeno quanto nos polímeros resinosos.³ Os produtos provenientes da degradação do componente resinoso associados aos monômeros residuais diminuem a mecânica interfacial e permitem que mais água ingresse nessa interface. Essa água reduz as forças de atrito entre as cadeias poliméricas, prejudicando as propriedades mecânicas da parte resinosa, sendo este processo conhecido como plastificação.⁴⁰

A degradação do componente orgânico da interface adesiva (fibrilas de colágeno) ocorre predominantemente pela ação de enzimas liberadas por bactérias⁴¹ ou presentes no próprio substrato⁴⁻⁶ assim como por enzimas salivares^{4,7} conhecidas

como metaloproteinases da matriz (MMPs). Essas enzimas são liberadas do tecido dentinário ao ser solubilizado, quer seja pelo processo cariioso⁴ ou pela utilização de agentes ácidos como parte do processo de adesão.⁵ Embora Mazzoni et al.⁴² (2006) tenham demonstrado que a utilização de ácido fosfórico por 15 segundos inativa quase que completamente a atividade proteolítica da dentina (98,1%), os mesmos autores também observaram que os sistemas adesivos convencionais simplificados apresentam potencial de reativação das enzimas endógenas (MMPs) presentes na dentina, previamente inativadas pelo ácido fosfórico.

As soluções experimentais de impregnação da dentina (etanol, clorexidina aquosa ou alcoólica) foram capazes de melhorar a resistência à degradação da união resina-dentina afetada por cárie, capacidade esta demonstrada por meio da redução não significativa da RU após o armazenamento por 6 meses em saliva artificial. Esse mesmo efeito protetor promovido pela técnica úmida com etanol, entretanto sem clorexidina, tem sido demonstrado em outros estudos.^{31,32}

Como esclarecido anteriormente, a técnica úmida com etanol, associado ou não à clorexidina, busca a transformação temporária do caráter hidrófilo da dentina para uma condição hidrófoba, possibilitando dessa forma a impregnação desse tecido por monômeros com essa mesma natureza.²⁹ Conseqüentemente, os polímeros integrantes da camada híbrida apresentam melhores qualidades como, menor grau de hidrofília, maior número de ligações cruzadas e maior grau de conversão monomérica. Conjuntamente, todas essas características resultam em melhoria da qualidade da camada híbrida, a qual está diretamente relacionada à sua estabilidade

funcional. A maior conversão monomérica reduz a quantidade de monômeros residuais, os quais são altamente susceptíveis a lixiviação na presença de água, e a formação de polímeros a partir de monômeros hidrófobos reduz a susceptibilidade da camada híbrida, em longo prazo, à degradação hidrolítica. Como consequência, espera-se uma menor exposição de fibrilas de colágeno, sendo que, as poucas expostas estariam protegidas da ação das enzimas endógenas da dentina, inativadas pela presença da clorexidina incorporada ao etanol. Apesar dessa suposição, dados de um trabalho prévio demonstraram não haver diferença na espessura da zona de colágeno exposta na base de camadas híbridas formadas quando da utilização de etanol associado a clorexidina em comparação à associação desse agente à água (dados não publicados). Tem sido demonstrado, entretanto, que o etanol promove contração no diâmetro das fibrilas de colágeno maior que a contração total do volume da matriz dentinária, ampliando os espaços interfibrilares e otimizando a penetração dos monômeros hidrófobos^{29,31}, proporcionando melhor selamento resinoso, reduzindo a permeabilidade e assim aumentando a resistência à degradação da união resina-dentina.

Segundo os resultados do presente estudo *in vitro*, a associação de clorexidina a um excipiente alcoólico demonstrou ser promissora na desaceleração da deterioração de uniões produzidas entre a dentina afetada por cárie e sistemas adesivos convencionais simplificados, sinalizando positivamente para o desenvolvimento de outros trabalhos *in vitro* e, principalmente, *in vivo*. Os dados obtidos também são encorajadores do ponto de vista de resistência de união imediata

ao tecido dentinário alterado pelo processo cariioso. Estudos tem demonstrado que a adesão a dentina afetada por cárie é inferior àquela obtida a dentina não cariada.^{35,43-48}

Pelo menos para o sistema Excite, o qual apresenta etanol como solvente, houve um aumento significativo nos valores de RU imediata quando a dentina foi previamente impregnada pela solução alcoólica de clorexidina.

CONCLUSÃO

Assim como a solução aquosa, a solução alcoólica de clorexidina a 1% não interferiu negativamente na resistência de união imediata dos sistemas adesivos à dentina afetada por cárie e tornou as uniões produzidas menos susceptíveis a degradação.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela agência brasileira de fomento a pesquisa FAPESP (Processo# 305204/2010-6). Os autores agradecem a disponibilização do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara para a produção das lesões artificiais de cárie em dentina.

REFERÊNCIAS

1. Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. J Dent

Res. 2011; 90: 953-68.

2. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982;16:265-273.

3. Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H, Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater*. 2000; 16: 406-11.

4. Tjärderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*. 1998; 77: 1622-9.

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

6. Fanchon S, Bourd K, Septier D, Everts V, Beertsen W, Menashi S, et al. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci* 2004; 112:171-176.

7. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res* 2001; 80:1545-9.

8. Toledano M, Osorio R, Osorio E, Aguilera F, Yamauti M, Pashley DH. Effect of bacterial collagenase on resin-dentin bond degradation. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18(12):2355-2361.

9. Boskey AL. The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; 2: 369-87.
10. Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997; 25: 441-58.
11. Martin-de Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 757-65.
12. Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Ronka H, Sorsa T, Salo T et al. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. *J Dent Res.* 2000; 79: 77-84.
13. Palosaari H, Rennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111: 117-27.
14. Birkedal-Hansen, H. Matrix metalloproteinases. *Adv Dent Res.* 1995; 9 (3 Suppl):16.
15. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006; 85: 22-32.
16. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J. Endod.* 2010; 36:

475-81.

17. Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res.* 2011; 90: 506-11.

18. Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1477:98-111.

19. Obermajer N, Jevnikar Z, Doljak B, Kos J. Role of cysteine cathepsins in matrix degradation and cell signalling. *Connect Tissue Res.* 2008; 49:193-6.

20. Matthijs S, Adriaens PA. Chlorhexidine varnishes: a review. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 1-8.

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

22. 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* 2007; 86: 529- 533.

23. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, Pashley DH. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent.* 2009; 34: 379-83.

24. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118: 411-6.

25. Houle MA, Grenier D, Plamondon P, Nakayama K. The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 221: 181-5.
26. Sela MN, Babitski E, Steinberg D, Kohavi D, Rosen G. Degradation of collagen-guided tissue regeneration membranes by proteolytic enzymes of *Porphyromonas gingivalis* and its inhibition by antibacterial agents. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20:496-502.
27. Scaffa P, Barros N, Vidal C, Tersariol IL, Pashley D, Tjäderhane L, et al. Chlorhexidine inhibits cysteine cathepsins [abstract]. *J Dent Res (SpecIss):* 4554; 2010 URL available at: <http://iadr.confex.com/iadr/2010barce/webprogramschedule/Paper140222.html> (accessed 10/19/2011)
28. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent.* 2007; 20: 7-20.
29. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, Tay KC. Bonding BisGMA to dentin- a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res.* 2007; 86: 1034-9.
30. Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, et al. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res.* 2008; 84: 19-29.

31. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, et al. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol- saturated dentin. *J Dent Res.* 2009; 88: 146-51.
32. Sadek FT, Castellan CS, Braga RR, Mai S, Tjäderhane L, Pashley DH, et al. One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dent Mater.* 2010; 26: 380-6.
33. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent.* 2009; 37: 108-14.
34. Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent.* 2009;11: 191-8.
35. Komori PC, Pashley DH, Tjäderhane 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; 34: 157-65.
36. Carrilho MR, Carvalho RM, Breschi L, Mazzoni A, Tjaderhane L, Geraldelli S, et al. Effect of ethanol-based chlorhexidine on the durability of resin-dentin bonds. In: IADR meeting 2009:Abstr 284, Miami.
37. Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol wet-bonding challenges current anti-degradation strategy. *J Dent Res.* 2010; 89: 1499-504.

38. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 2011; 27:1-16.
39. Kanca III, J. Effect of resin primer solvents and surface wetness on resin composite bond strength to dentin. *Am J. Dent.* 1992; 5: 213-15.
40. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res.* 2005; 84:118-32.
41. Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12: 136-51.
42. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 2006; 27: 4470- 6.
43. Nakajima M, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Yoshiyama M, Ebisu S, Ciucchi B, Russell CM & Pashley DH. Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesives *J Dental Res.* 1995; 74: 1679-88.
44. Kimochi T, Yoshiyama M, Urayama A, Matsuo T. Adhesion of a new commercial self-etching/self-priming bonding resin to human caries-infected dentin. *Dent Mater J.* 1999; 18: 437-43.
45. Yoshiyama M, Urayama A, Kimochi T, Matsuo T, Pashley DH. Comparison of

conventional vs self-etching adhesive bonds to caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2000; 25: 163-9.

46. Pereira PN, Nunes MF, Miguez PA, Swift EJ, Jr. Bond strengths of a 1-step self-etching system to caries-affected and normal dentin. *Oper Dent.* 2006; 31: 677-81.

47. Erhardt MC, Toledano M, Osorio R, Pimenta LA. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: effects of long-term water exposure. *Dent Mater.* 2008; 24: 786-98.

48. Scholtanus JD, Purwanta K, Dogan N, Kleverlaan CJ, Feilzer AJ. Microtensile bond strength of three simplified adhesive systems to caries-affected dentin. *J Adhes Dent.* 2010; 12: 273-8.

Tabela 1. Nome comercial, fabricante e principais componentes dos materiais utilizados no estudo.

Nome comercial (fabricante)	Principais componentes
Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)	Bis-GMA, HEMA, diuretano dimetacrilato, copolímero do ácido polialcenóico, canforoquinona, água, etanol e glicerol 1.3 dimetacrilato, 10% em peso de nanopartículas de sílica
Prime & Bond NT (Dentsply, Milford, DE, EUA)	Resinas de di e trimetacrilato, sílica coloidal, PENTA, fotoiniciadores, estabilizantes, hidrofluoreto de cetilamina, acetona
Excite (Ivoclar-Vivadent, Schaan Liechtenstein)	HEMA, acrilato do ácido fosfínico, dimetacrilatos, dióxido de silício altamente disperso, iniciadores e estabilizadores, etanol
Filtek Z250 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)	Resinas Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA, zircônia, sílica
Etchant (Ultradent Products INC, South Jordan, Utah, EUA)	Ácido fosfórico 35%
Clorexidina aquosa 1% (manipulada)	Pó: diacetato de clorexidina Líquido: água deionizada (0,25 g/25 mL)
Clorexidina alcoólica 1% (manipulada)	Pó: diacetato de clorexidina Líquido: etanol anidro (0,19 g/25 mL)

Abreviaturas. Bis-GMA: bisfenol-glicidil-dimetacrilato; HEMA: hidroxietil metacrilato; PENTA: dipentaeritritol-pentacrilato éster fosfato; UDMA: uretana dimetacrilato; Bis-EMA: bisfenol-etil-dimetacrilato.

Tabela 2. Resistência de união (MPa) imediata (24 horas) e após 6 meses, à dentina afetada por cárie impregnada por diferentes soluções após o condicionamento ácido.

Sistema adesivo	Tratamento da dentina	Período de envelhecimento		% Redução RU
		24 horas	6 meses	
Prime&Bond NT	Água	19,4±4,9** AB a	12,6±4,8 b	35,0
	Etanol	20,1±7,3 AB a	21,9±8,7 a	-8,9
	Água + CLX*	16,3±4,3 B a	16,1±4,1 a	1,2
	Etanol + CLX	25,7±7,3 A a	22,0±9,5 a	14,4
Single Bond	Água	17,7±4,5 A a	11,1±4,6 b	37,3
	Etanol	16,2±3,8 A a	14,4±5,2 a	11,1
	Água + CLX*	14,7±4,5 A a	13,7±5,3 a	6,8
	Etanol + CLX	20,8±6,9 A a	19,0±4,3 a	8,6
Excite	Água	20,6±9,1 B a	16,9±3,4 a	17,9
	Etanol	25,1±6,3 AB a	25,0±8,8 a	0,4
	Água + CLX*	21,4±4,7 B a	18,7±2,4 a	12,6
	Etanol + CLX	34,9±7,1 A a	30,9±5,3 a	11,5

* Clorexidina 1%; ** valores são média±desvio-padrão, n=6 (unidade experimental = dente)

^{Aa} Para cada sistema adesivo, letras minúsculas permitem comparações nas linhas, enquanto que letras maiúsculas permitem comparações nas colunas. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, p>0,05).

Tabela 3. Distribuição dos tipos de fraturas em função do tratamento da dentina e do período de envelhecimento.

Sistema Adesivo	Tratamento da dentina	Período de envelhecimento			
		24 horas	D/P**	6 meses	F/P
Prime&Bond NT	Água	A=38 (95%)*; CR=1 (2,5%); CD=1 (2,5%)	6/40	A=34 (100%)	6/34
	Etanol	A=62 (92,5%); CR=1 (1,5%); CD=1 (1,5%); M=3 (4,5%)	6/67	A=50 (100%)	6/50
	Água + CLX*	A=42 (93,4%); CD=2 (4,4%); M=1 (2,2%)	6/45	A=24 (100%)	6/24
	Etanol + CLX	A=49 (89,1%); CR=4 (7,3%); CD=2 (3,6%)	6/55	A=40 (95,2%); CR=1 (2,4%); CD=1 (2,4%)	6/42
Single Bond	Água	A=43 (100%)	6/43	A=26 (100%)	6/26
	Etanol	A=50 (98,0%); M=1 (2,0%)	6/51	A=16 (100%)	6/16
	Água + CLX	A=34 (91,9%); CD=1 (2,7%); M=2 (5,4%)	6/37	A=30 (96,8%); M=1 (3,2%)	6/31
	Etanol + CLX	A=43 (93,4%); CR=1 (2,2%); CD=1 (2,2%); M=1 (2,2%)	6/46	A=32 (100%)	6/32
Excite	Água	A=40 (88,9%); CR=3 (6,7%); CD=1 (2,2%); M=1 (2,2%)	6/45	A=35 (94,6%); M=2 (5,4%)	6/37
	Etanol	A=59 (92,1%); CD=4 (6,3%); M=1 (1,6%)	6/64	A=61 (92,5%); CR=2 (3,0%); CD=3 (4,5%)	6/66
	Água + CLX	A=39 (90,7%); CR=2 (4,7%); CD=1 (2,3%); M=1 (2,3%)	6/43	A=39 (95,1%); CD=2 (4,9%)	6/41
	Etanol + CLX	A=51 (82,3%); CR=10 (16,1%); CD=1 (1,6%)	6/62	A=48 (90,5%); CR=3 (5,7%); M=2 (3,8%)	6/53

*Clorexidina 1%; **número de dentes/palitos por grupo; ***frequência absoluta/porcentagem em relação ao número de espécimes do grupo Tipo de fratura: A=adesiva; M=mista; CR=coesiva de resina; CD=coesiva de dentina



Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sistemas adesivos contemporâneos tem apresentado resultados imediatos satisfatórios, especialmente quanto a retenção à dentina, suportando as tensões geradas pela contração de polimerização da resina restauradora⁸. Entretanto, a estabilidade longitudinal dessas interfaces ainda representa um desafio à funcionalidade mecânica e biológica das restaurações adesivas⁸.

Na tentativa de preservar a integridade da camada híbrida tem sido incorporada a aplicação de clorexidina nos procedimentos adesivos, protocolo este proposto pela primeira vez por Pashley et al.³⁷ (2004), uma vez que já existe evidência científica que essa substância apresenta potencial de inibição de metaloproteinases (MMPs)²², enzimas presentes na própria dentina (MMPs), as quais são liberadas e ativadas durante os procedimentos adesivos^{35,37}. Essas hidrolases atuam sobre as fibrilas de colágeno expostas nas interfaces, quer seja pela infiltração incompleta da dentina desmineralizada^{20,55,57} ou pela eluição, em longo prazo, do conteúdo resinoso²⁵, resultando na degradação da camada híbrida^{6,13,14,28}. Exposição de fibrilas de colágeno devido a infiltração incompleta da dentina desmineralizada pelo ácido fosfórico foi demonstrada no segundo estudo, sendo que na dentina afetada por cárie essa exposição foi significativamente maior. Nesse sentido, os trabalhos tem demonstrado que a clorexidina não interfere negativamente nos valores de resistência de união imediata, podendo até mesmo melhorar o desempenho adesivo e favorecer a estabilidade do componente orgânico da dentina, oferecendo segurança para que esse

procedimento possa ser efetivamente considerado na prática clínica^{6,13,44}. Este benefício frente a degradação foi ratificado pelos resultados do terceiro estudo quando da utilização da clorexidina em solução aquosa ou alcoólica, a despeito do fato dessas soluções não terem sido capazes de melhorar a umectabilidade da superfície da dentina desmineralizada (estudo 1), ou mesmo a infiltração monomérica da rede de colágeno exposta (estudo 2).

Ainda na tentativa de promover a longevidade da união adesiva, a técnica úmida com etanol (*ethanol-wet bonding*) foi desenvolvida para os sistemas adesivos convencionais³⁸. Nessa técnica, como resultado da desidratação da matriz de dentina desmineralizada pelo etanol, há um encolhimento das fibrilas de colágeno acarretando em aumento dos espaços interfibrilares e redução do grau de hidrofília da matriz³⁹. Isto pôde ser confirmado no estudo de Tay et al.⁵⁹ (2007), no qual foi demonstrado alta resistência de união com o uso de BisGMA, um monômero insolúvel em água. Adicionalmente, outros estudos tem demonstrado resultados favoráveis^{11,29,33,49-50,53,59}.

A somatória desses efeitos benéficos, tanto da clorexidina como do etanol, foi avaliada pelo presente trabalho, em dentina hígida e também em dentina afetada por cárie, pois embora a maioria dos estudos relacionados a adesão ao substrato dentinário seja realizado sobre uma superfície hígida, na prática clínica o substrato mais prevalente para adesão é a dentina acometida pelo processo carioso⁶².

No primeiro estudo foi avaliado se a clorexidina associada à água ou ao etanol interferiria na umectabilidade da dentina e foi demonstrado, por meio da medida dos

ângulos de contato, que a umectabilidade da dentina afetada por cárie foi, para todas as soluções investigadas, sempre maior do que da dentina hígida. Também foi demonstrado que a remoção da *smear layer* pelo ácido fosfórico favoreceu a umectabilidade de ambos os substratos, corroborando com outros trabalhos da literatura^{2,46,47,61}. Pôde ser concluído que a aplicação da solução aquosa ou alcoólica de clorexidina 1%, bem como das técnicas adesivas com água e etanol, não exerceram influência sobre a umectabilidade da dentina condicionada. Portanto, contrariamente ao sugerido por Perdigão et al.⁶¹ (1994), a clorexidina não influenciou na capacidade de molhamento da dentina pelo sistema adesivo Single Bond 2. Isso pôde ser, indiretamente, observado no segundo estudo, uma vez que a utilização das mesmas soluções de clorexidina não impediram que fibrilas de colágeno permanecessem expostas na base da camada híbrida, formando zonas tão espessas quanto as observadas para o grupo controle, onde apenas água foi utilizada como solução de impregnação da dentina. Curiosamente, quando foi utilizada para a mesma finalidade 100% etanol, houve um aumento na espessura da zona de colágeno exposto, tanto para a dentina hígida como para a dentina afetada por cárie.

Uma vez demonstrado nos estudos 1 e 2 que as soluções de clorexidina, em excipiente aquoso e alcoólico, não interferiram na umectabilidade da dentina e na infiltração monomérica, avaliada indiretamente por meio da quantificação da zona de colágeno exposto na base das camadas híbridas, no terceiro estudo foi investigada a influência dessas soluções na resistência imediata e em longo prazo de interfaces produzidas por sistemas adesivos (Prime&Bond NT, Single Bond 2 e Excite)

contendo diferentes solventes orgânicos, com a dentina afetada por cárie. Os resultados demonstraram que a utilização de clorexidina em excipiente aquoso desacelerou a degradação das interfaces produzidas, como já demonstrado em estudos prévios^{6,14,28,45}. Redução da porcentagem de perda da resistência de união também foi observada quando da utilização da solução alcoólica de clorexidina. Entretanto, não existem estudos na literatura utilizando como substrato a dentina afetada por cárie, que permitam a comparação dos resultados obtidos neste último experimento. Foi observado, porém, que a utilização de clorexidina em etanol não interferiu negativamente nos valores de resistência de união imediata, e assim como a solução aquosa, a solução alcoólica de clorexidina também desacelerou o processo de degradação da interface adesiva.

Recentemente, novas substâncias tem sido estudadas visando melhorar a longevidade da união resina-dentina, sendo que uma das técnicas busca atuar diretamente na fibrila de colágeno. Na formação da fibrila de colágeno ocorre a união, interna e externa, das moléculas de colágeno por meio de ligações cruzadas (*cross-links*) e essas promovem estabilidade e resistência estrutural as fibrilas^{18,63}. Assim, algumas substâncias (denominadas de *cross-linkers*) tais como o glutaraldeído (GD), a proantocianidina (PA) e a carbodiimida (hidroclorito de carbodiimida ou EDC)^{1,3,4}, tem sido incorporadas durante os procedimentos adesivos visando aumentar o número de *cross-links*²⁴, e como resultado melhorar as propriedades mecânicas e a resistência à degradação hidrolítica e enzimática das fibrilas de colágeno⁵.

Uma outra técnica desenvolvida foi a técnica da remineralização biomimética da união resina-dentina⁵⁶. Essa técnica incorpora análogos biomiméticos que guiam a deposição gradual de cristais de hidroxiapatita intra e interfibrilar, preenchendo os espaços deixados devido a incompleta infiltração dos monômeros resinosos, de tal forma que a água desses compartimentos (intra e interfibrilares) é substituída pelos minerais³⁰.

Assim, a tarefa de produzir uniões efetivas e estáveis entre materiais poliméricos e um substrato heterogêneo e intrinsecamente úmido como a dentina, vem desafiando a ciência. Os estudos desenvolvidos no presente trabalho contribuem no sentido de demonstrar que é possível utilizar a clorexidina associada ao etanol, assim como à água, para obter interfaces mais resistentes aos fenômenos de degradação, os quais podem culminar com a falência biológica e funcional dessas interfaces. Entretanto, os trabalhos demonstraram não haver sinergismo entre os benefícios demonstrados na literatura para a clorexidina e para a técnica úmida com etanol. Obviamente, estudos clínicos ainda devem ser desenvolvidos para ratificar os resultados obtidos neste trabalho, e garantir a segurança de utilização de novos protocolos adesivos.



Referências

REFERÊNCIAS *

1. Al-Ammar A, Drummond JL, Bedran-Russo AK. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 91: 419-24.
2. Armengol V, Laboux O, Weiss P, Jean A, Hamel H. Effects of Er:YAG and Nd:YAP laser irradiation on the surface roughness and free surface energy of enamel and dentin: an in vitro study. *Oper Dent.* 2003; 28: 67-74.
3. Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 94: 250-5.
4. Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen cross-linkers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008; 86B: 330-4.
5. Bedran-Russo AK, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. *Acta Biomater.* 2011; 7: 1735-41.
6. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent.* 2007; 32: 107-11.
7. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, et al. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent.* 2009; 34: 379-83.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: http://nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

8. 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; 24: 90-101.
9. Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent.* 2009;11: 191-8.
10. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater.* 2010; 26: 320-5.
11. Cadenaro M, Breschi L, Rueggeberg FA, Agee K, Di Lenarda R, Carrilho M, et al. Effect of adhesive hydrophilicity and curing time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol-saturated acid-etched dentin. *Dent Mater.* 2009; 25: 39-47.
12. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent.* 2009; 37: 108-14.
13. Carrilho MR, Carvalho RM, de Góes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* 2007; 86:90-4.
14. 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.* 2007; 86: 529-33.

15. Carrilho MR, Carvalho RM, Breschi L, Mazzoni A, Tjaderhane L, Geraldelli S, et al. Effect of ethanol-based chlorhexidine on the durability of resin-dentin bonds. [Abstract 284]. 87th General Session & Exhibition of the IADR; 2009 April 1-4; Miami. Available from:
<http://iadr.confex.com/iadr/2009miami/webprogram/Paper118202.html>.
16. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 90: 373-80.
17. de Castro FL, de Andrade MF, Duarte Júnior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent.* 2003; 5: 129-38.
18. Charulatha V, Rajaram A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials.* 2003; 24:759–67.
19. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res.* 2003; 82: 136-40.
20. Eliades G, Vougiouklakis G, Palaghias G. Heterogeneous distribution of singlebottle adhesive monomers in the resin-dentin interdiffusion zone. *Dent Mater.* 2001; 17: 277-83.
21. Erhardt MC, Toledano M, Osorio R, Pimenta LA. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: effects of long-term water exposure. *Dent Mater.* 2008; 24: 786-98.

22. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8 and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6: 437-9.
23. Haj-Ali R, Walker M, Williams K, Wang Y, Spencer P. Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. *J Prosthodonts.* 2006; 15: 82-8.
24. Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 65:118 –24.
25. Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H, Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater.* 2000; 16: 406-11.
26. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res.* 2000; 79: 1385-91.
27. Hashimoto M, Tay FR, Ito S, Sano H, Kaga M, Pashley DH. Permeability of adhesive resin films. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005; 74: 699-705.
28. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005; 84: 741-6.

29. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, et al. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. *J Dent Res.* 2009; 88: 146-51.
30. Kim J, Gu L, Breschi L, Tjäderhane L, Choi KK, Pashley DH, et al. Implication of ethanol wet-bonding in hybrid layer remineralization. *J Dent Res.* 2010; 89: 575-80.
31. Kimochi T, Yoshiyama M, Urayama A, Matsuo T. Adhesion of a new commercial self-etching/self-priming bonding resin to human caries-infected dentin. *Dent Mater J.* 1999; 18: 437-43.
32. Komori PC, Pashley DH, Tjäderhane 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; 34: 157-65.
33. Li F, Liu XY, Zhang L, Kang JJ, Chen JH. Ethanol-wet bonding technique may enhance the bonding performance of contemporary etch-and-rinse dental adhesives. *J Adhes Dent.* 2011 jun 29. [Epub ahead of print].
34. 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; 117: 587-96.
35. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley EL, Tay FR. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials.* 2006; 27: 4470-6.

36. Nakajima M, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Yoshiyama M, Ebisu S, Ciucchi B, Russell CM & Pashley DH. Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesives J Dental Res. 1995; 74: 1679-88.
37. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. J Dent Res. 2004; 83: 216-21.
38. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. Am J Dent. 2007; 20: 7-20.
39. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. Dent Mater. 2011; 27:1-16.
40. Perdigão J, Denehy GE, Swift EJ Jr. Effects of chlorhexidine on dentin surfaces and shear bond strengths. Am J Dent. 1994; 7: 81-4.
41. Perdok JF, van der Mei HC, Genet MJ, et al. Elemental surface concentration ratios and surface free energies of human enamel after application of chlorhexidine and adsorption of salivary constituents. Caries Res. 1989; 23: 297-302.
42. Pereira PN, Nunes MF, Miguez PA, Swift EJ, Jr. Bond strengths of a 1-step self-etching system to caries-affected and normal dentin. Oper Dent. 2006; 31: 677-81.

43. Reis AF, Giannini M, Pereira PNR. Effects of a peripheral enamel bond on the long-term effectiveness of dentin bonding agents exposed to water in vitro. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater.* 2008; 85B: 10-7.
44. Ricci HA, Sanabe ME, Costa CAS, Hebling J. Effect of chlorhexidine application on bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems of primary and permanent teeth. *Am J Dent.* 2010; 23:128-32.
45. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci.* 2010b; 118: 411-6. Erratum in *Eur J Oral Sci.* 2010; 118: 535.
46. Rosales JI, Marshall GW, Marshall SJ, Watanabe LG, Toledano M, Cabrerizo MA, et al. Acid-etching and hydration influence on dentin roughness and wettability. *J Dent Res.* 1999; 78: 1554-9.
47. Rosales-Leal JI, Osorio R, Holgado J, Cabrerizo M, Toledano M. Dentin wetting by four adhesive systems. *Dent Mater.* 2001; 17: 526–32.
48. Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol wet-bonding challenges current anti-degradation strategy. *J Dent Res.* 2010; 89: 1499-504.
49. Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, et al. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res.* 2008; 84: 19-29.

50. Sadek FT, Castellan CS, Braga RR, Mai S, Tjäderhane L, Pashley DH, et al. One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dent Mater.* 2010; 26: 380-6.
51. Sauro S, Toledano M, Aguilera FS, Mannocci F, Pashley DH, Tay FR, Watson TF, Osorio R. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. *Dent Mater.* 2010; 26: 368-79.
52. Scholtanus JD, Purwanta K, Dogan N, Kleverlaan CJ, Feilzer AJ. Microtensile bond strength of three simplified adhesive systems to caries-affected dentin. *J Adhes Dent.* 2010; 12: 273-8.
53. Shin TP, Yao X, Huenergardt R, Walker MP, Wang Y. Morphological and chemical characterization of bonding hydrophobic adhesive to dentin using ethanol wet bonding technique. *Dent Mater.* 2009; 25: 1050-7.
54. Soares CJ, Pereira CA, Pereira JC, Santana FR, do Prado CJ. Effect of chlorhexidine application on microtensile bond strength to dentin. *Oper Dent.* 2008; 33: 183-8.
55. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62: 447-56.
56. Tay FR, Pashley DH. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. *J Dent Res.* 2009; 88: 719-24.

57. Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SH. The overwet phenomenon: an optical, micromorphological study of surface moisture in the acid-conditioned, resin-dentin interface. *Am J Dent.* 1996; 9: 43-8.
58. Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res.* 2002; 81: 471-6.
59. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, et al. Bonding BisGMA to dentin- a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res.* 2007; 86: 1034-9.
60. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Uchiyama T, Tjäderhane L, Breschi L, et al. Inhibition of MMPs by alcohols *Dent Mater.* 2011; 27: 926-33.
61. Toledano M, Osorio R, Perdigao J, Rosales JI, Thompson JY, Cabrerizo-Vilchez MA. Effect of acid etching and collagen removal on dentin wettability and roughness. *J Biomed Mater Res.* 1999; 47: 198-203.
62. Wang Y, Spencer P, Walker MP Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy *J Biomed Mater Res.* 2007; 81A: 279-86.
63. Yamauchi M. Collagen biochemistry: an overview. In: Phillips GO, editor. *Advances in tissue Banking.* New Jersey: World Scientific; 2000. p. 455–500.

64. Yoshiyama M, Urayama A, Kimochi T, Matsuo T, Pashley DH. Comparison of conventional vs self-etching adhesive bonds to caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2000; 25: 163-9.



Apêndices

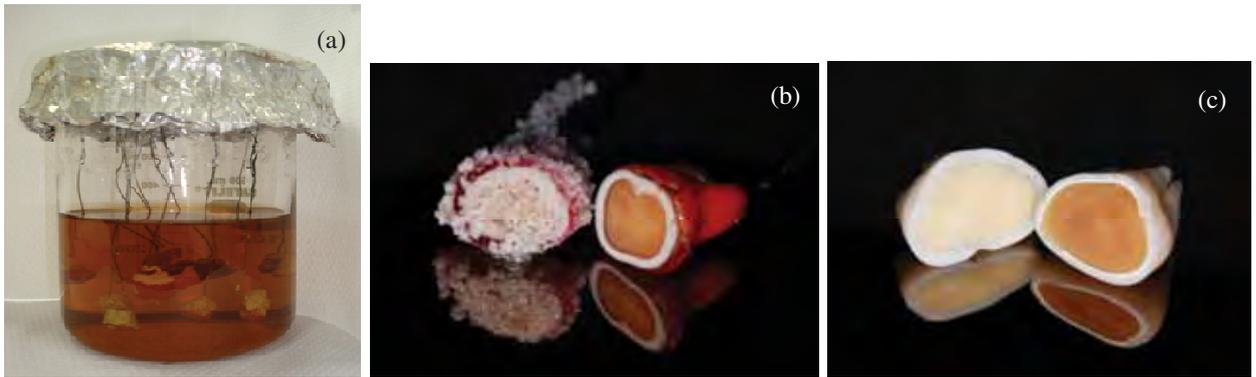


Figura 1.1. Protocolo de cárie artificial realizado nos três experimentos. (a) Dentes imersos em solução cariogênica contendo *S. Mutans*; (b) superfície de dentina coberta por biofilme; (c) aspecto da dentina hígida comparada à dentina cariada após a conclusão do protocolo de indução de cárie artificial por 14 dias.

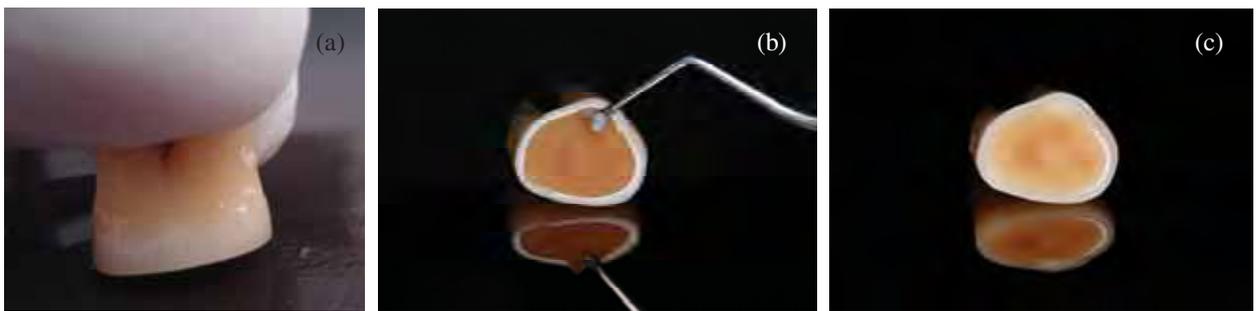


Figura 1.2. Passos realizados nos três experimentos. Remoção da dentina infectada com lixa de carbeto de silício (granulação 320); (b) cureta foi usada para confirmar a textura da dentina; (c) aspecto da superfície de dentina após a remoção dentina infectada.



Figura 1.3. Procedimentos adesivos realizados nos três experimentos. (a) Aplicação do ácido fosfórico recobrendo toda a superfície exposta de dentina, durante por 15 segundos; (b) secagem da superfície com papel absorvente após lavagem do ácido fosfórico; (c) aplicação de 20 μL da solução de impregnação da dentina (água ou etanol ou clorexidina aquosa a 1% ou clorexidina alcoólica a 1%), mantida passivamente por 60 segundos.



Figura 1.4 Procedimentos realizados somente no experimento três. (a) Aplicação do sistema adesivo, segundo a recomendação do fabricante. Observar o aspecto brilhante e homogêneo; (b) aspecto final da coroa reconstruída em resina composta; (c) espécimes com área de secção transversal de $0,81 \text{ mm}^2$ para a realização do ensaio mecânico de microtração.



Figura 2.1- Ilustração do ângulo de contato (θ). Quando a gota está em equilíbrio θ é dado $\cos \theta = (\gamma_{SV} - \gamma_{SL}) / \gamma_{LV}$, onde γ_{LV} , γ_{SV} e γ_{SL} são as tensões superficiais nas interfaces líquido/vapor, sólido/vapor e sólido/líquido, respectivamente.

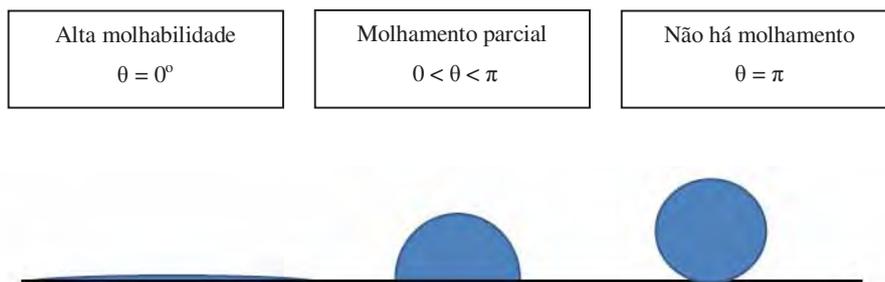


Figura 2.2 - Interações gota-superfície. (a) alta molhabilidade com ângulo de contato nulo; (b) molhamento parcial com ângulo de contato diferente de zero; e (c) ausência de molhamento.



Figura 2.3. Goniômetro Ramé-Hart 200-F1



Anexo

Anexo 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.



Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 31 de janeiro de 2012.

HÉRICA ADAD RICCI