

MARIANE EMI SANABE

**Efeito da inibição de metaloproteinases da matriz
dentinária na produção e estabilidade mecânica da
união resina-dentina afetada por cárie**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação, em Ciências Odontológicas, Área
de Concentração em Odontopediatria, da
Faculdade de Odontologia de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista para obtenção
do título de Doutor em Odontopediatria

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

Araraquara

2009

Sanabe, Mariane Emi
Efeito da inibição de metaloproteinases da matriz dentinária na produção
e estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie /
Mariane Emi Sanabe . – Araraquara: [s.n.], 2009.
120 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Odontologia
Orientadora : Profa. Dra. Josimeri Hebling

1. Dentina 2. Cárie dentária 3. Adesivos dentinários
4. Clorexidina 5. Colágeno 6. Longevidade I. Título

MARIANE EMI SANABE

**Efeito da inibição de metaloproteinases da matriz
dentinária na produção e estabilidade mecânica da
união resina-dentina afetada por cárie**

COMISSÃO JULGADORA

Tese para obtenção do Título de Doutor

Presidente e Orientador: Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling

Examinador: Prof^a. Dr^a. Ana Flavia Sanches Borges

Examinador: Prof. Dr. André Figueiredo Reis

Examinador: Prof. Dr. Luis Geraldo Vaz

Examinador: Prof^a. Dr^a. Ângela Cristina Cilense Zuânon

Araraquara, 24 de Março de 2009.

DADOS CURRICULARES

MARIANE EMI SANABE

- Nascimento** 19/10/1977, São Paulo, SP.
- Filiação** Sanae Sanabe
Yoshiyuki Sanabe
- 1998 - 2001** Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP
- 2002** Estágio de Atualização em Odontopediatria na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr - UNESP
- 2003 - 2005** Curso de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Mestrado na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr –UNESP
- 2005 – 2009** Curso de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Doutorado na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr - UNESP
- 2009** Professora em Dentística Restauradora e Materiais Dentários da Universidade Camilo Castelo Branco

DEDICATÓRIA



Prof Josimeri Hebling (Tia Jô)

Esta tese é fruto de longos e prazerosos 8 anos de convivência diária, nos quais você me ensinou a ser pesquisadora, docente, odontopediatra e principalmente um ser humano melhor pelo exemplo de pessoa que é. Agradeço todos os dias por ter tido uma mestre “sem defeitos” que tenho como exemplo de vida pessoal e profissional pra seguir daqui pra frente.

Muito obrigada por tudo

Agradecimentos Especiais

A Deus a quem sempre agradeço o dia de hoje pra poder acreditar no amanhã e por me proporcionar saúde e força pra seguir o meu caminho

Aos meus pais Yoshiyuki e Sanae pelo apoio durante toda a minha vida e por serem meu porto seguro.

As minhas irmãs Assami e Narumi por serem minhas companheiras de todos os momentos, com certeza sem vocês o meu sonho de ser doutora não seria realizado. Tenham essa vitória como suas.

A minha irmã Tchitose e meu cunhado Noel que apesar da distância torcem por mim e dividem as minhas felicidades e angústias

Ao TiTi (Marcos) pela paciência por ter uma namorada a distância sem muito tempo pra se ver, pelos interurbanos diários, por ser tão companheiro e sempre me transmitir tranquilidade. Não poderia querer pessoa melhor ao meu lado.

A família Nakazato pela intensa torcida em todos os momentos da vida

AMO TODOS VOCÊS E MUITO OBRIGADA

Agradecimientos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista, representados pelo digníssimo Diretor. Prof Dr. José Cláudio Martins Segalla e pela Vice - Diretora Prof^a. Dr^a. Andréia Affonso Barretto Montandon;

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP representada pela Chefe de Departamento Prof^a. Dr^a. Ângela Cristina Cílenze Zuanon;

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP, Ângela Cristina Cílenze Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro pela convivência diária e os ensinamentos adquiridos;

À Coordenação da Pós - Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP, representadas pelos Professores Josimeri Hebling e Luiz Gonzaga Gandini;

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP, Totó, Pedrinho, Dulce, Sílvia, Soninha, Celinha, Thanía, Cris e Odete, por nos auxiliarem sempre;

Aos funcionários da Secretaria de Pós - Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP, Mara, Rosângela, Flávia e Alexandre pela atenção que sempre nos dispensaram em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa pela atenção, carinho e disponibilidade em nos auxiliar em várias etapas deste trabalho;

Aos professores da Disciplina de Materiais Dentários Dr. Carlos Cruz, Dr. Gelson Luís Adabo e Dr. Luís Geraldo Vaz pela amizade e atenção que sempre nos foi concedida;

A CAPES e FAPESP pela concessão de bolsa de estudo e auxílio-pesquisa para realização deste trabalho;

Aos funcionários José Antônio Sampaio Zuanon, Juliana Pirolla e Sônia Alves pela ajuda concedida em várias etapas do trabalho sempre com alegria e disposição;

Ao Sakamoto pela generosidade em disponibilizar seu tempo e conhecimento para o conserto da máquina de ensaio mecânicos, mesmo nos finais de semana;

Ao Professores Elliot Watanabe Kitajima e ao Renato Barbosa Salaroli do NAP-MEPA da ESALQ - USP pela disponibilidade durante a utilização do microscópio eletrônico de varredura;

Aos funcionários da Biblioteca Maria Helena, Marley, Ceres, Odete, Silvia, Adriano, Eliane por estarem sempre dispostos a nos ajudar;

Aos colegas da Pós-Graduação em Odontopediatria de 2002 a 2008 pela convivência não só nas atividades científicas como nos bons momentos sociais;

Aos meus amigos queridos Milena e família, Ana Flávia, Bruno, Luciana, Natalia, Livia, Giovanka, Érika, Roberta, Cassiana, Júlia, Fabíola, Ana Paula, Alice Kina e Adriano pelo carinho não importando a distância e pelo incentivo para não desistir dos sonhos;

A minha família-amiga destes últimos anos Michele, Cármen, Márcia, Dulce, Ticiane, Fernanda e Andreza pelos ótimos momentos que passamos juntas, fosse para comemorar coisas boas ou chorar as ruins, mas por incrível que pareça a gente sempre acabava rindo....

A Nancy que sempre foi prestativa e me ajudou com as trocas de soluções quando eu não poderia ir, sem você o meu trabalho teria dado muito mais trabalho;

Ao Murilo e a Hérica pela parceria nos trabalhos e principalmente pelo ótimo convívio diário;

Aos professores da Unicastelo Prof. Imparato, Mariana, Daniella, Helenice e Ricardo por terem me recebido tão bem sem mesmo me conhecerem, por terem acreditado no meu trabalho e me darem a chance de me tornar professora. A Professora Renata por ter aberto as portas de uma Faculdade para iniciar minha carreira docente, confiar em mim e no meu trabalho. Rê sempre serei muitíssimo grata a você.

A todos os pacientes que doaram seus dentes para realização deste trabalho

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho meu muito obrigado.

SUMÁRIO



SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	18
INTRODUÇÃO GERAL	21
PROPOSIÇÃO GERAL	26
PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA	26
CAPÍTULO 1	28
CAPÍTULO 2	52
CAPÍTULO 3	80
CONSIDERAÇÃO FINAL	107
REFERÊNCIAS	113
ANEXOS	120

RESUMO



Sanabe ME. Efeito da inibição de metaloproteinases da matriz dentinária na produção e estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie [Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

RESUMO

Objetivo: O objetivo geral deste trabalho, dividido em três estudos, foi avaliar in vitro o efeito da aplicação da clorexidina na morfologia, resistência de união imediata e em longo prazo da união resina-dentina hígida e dentina afetada por cárie produzida por sistemas adesivos convencionais e autocondicionantes. **Materiais e Métodos:** No estudo 1, espécimes obtidos de interfaces produzidas pelo sistema adesivo Adper Single Bond 2 com a dentina hígida e a dentina afetada por cárie foram armazenados por 24 horas em água, 6 meses em água, clorexidina a 0,12% ou óleo mineral e subsequentemente preparados para a avaliação do colágeno exposto na interface (coloração de Tricrômico de Goldner). Aos dados foram aplicados os testes de ANOVA e Tukey. No estudo 2, sobre a dentina hígida (n=24) ou artificialmente afetada por cárie (n=24), foram aplicados os sistemas adesivos Adper Scotchbond MP, Adper Single Bond 2, Clearfil SE Bond ou Adper Prompt L-Pop, na presença ou ausência de clorexidina. Espécimes para o ensaio mecânico de microtração foram produzidos ($0,81 \text{ mm}^2$) e os valores de resistência de união foram confrontados pelos testes de ANOVA e Tukey, para cada sistema adesivo. No estudo 3, 48 dentes foram artificialmente cariados e divididos segundo os mesmos sistemas adesivos utilizados no estudo 2 e aplicação ou não da clorexidina. Os espécimes produzidos ($0,81 \text{ mm}^2$) foram armazenados em água por 24 horas ou 6 meses sendo em seguida submetidos ao ensaio mecânico de microtração. Os dados obtidos foram analisados pelos testes de ANOVA e Tukey. Para

todos os estudos, os testes estatísticos foram considerados ao nível pré-estabelecido de significância de 5%. **Resultados:** Não houve diferença estatística para as medidas de colágeno exposto dos grupos hígidos e cariados; entretanto foi detectada maior exposição do colágeno no grupo armazenado em água. Os grupos armazenados em clorexidina e em óleo mineral foram estatisticamente não diferentes ao controle. Os valores de resistência de união da dentina afetada por cárie foram estatisticamente inferiores na ausência de clorexidina do que os da dentina hígida. Porém, na presença desse agente, valores similares foram obtidos entre a dentina hígida e a dentina afetada por cárie para todos os sistemas adesivos. Após 6 meses de armazenagem em água, degradação significativa foi observada apenas para os sistemas Scotchbond MP, Single Bond 2 e Prompt na ausência de clorexidina. Quando esse agente foi aplicado, valores de RU obtidos após 6 meses não diferiram dos observados após 24 horas para os sistemas convencionais. **Conclusão:** Fibrilas de colágeno permanecem expostas na união resina-dentina hígida e dentina afetada por cárie. A utilização de clorexidina não interfere na RU imediata de sistemas adesivos convencionais e autocondicionantes à dentina hígida e favorece a mesma quando aplicados à dentina afetada por cárie. Degradação da união resina-dentina afetada por cárie ocorre com menor intensidade quando a clorexidina é incorporada aos protocolos de adesão.

Palavras chaves: Cárie dentária; dentina; adesivos dentinários; colágeno; clorexidina; longevidade

ABSTRACT



Effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on the production and stability of resin-carries affected dentin bonds [Tese de Doutorado] Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

ABSTRACT

Objective: The overall purpose of this work, divided into three studies, was to evaluate the in vitro effect of chlorhexidine application on the morphology, immediate and long-term bond strength of resin-noncarious dentin and resin-carries affected dentin bonds produced by etch-and-rinse and self-etching adhesive systems. **Materials and Methods:** In the first study, specimens obtained from bonds produced by Single Bond 2 applied on noncarious and caries-affected dentin were stored for 24 h in water, 6 m in water, in 0.12 chlorexidine or mineral oil. Subsequently, they were prepared for collagen identification within the bonds (Goldner's Trichrome stain). Data were submitted to ANOVA and Tukey tests. In the second study, Scotchbond MP, Single Bond 2, Clearfil SE Bond and Prompt were applied on noncarious (n=24) or caries-affected dentin (n=24) with or without chlorhexidine. Specimens were produced (0.81 mm²) and microtensile tested. The data for each adhesive system were submitted to ANOVA e Tukey tests. For the third study, 48 artificially decayed teeth were divided according to the same adhesive system used in study 2 and the use or not of chlorhexidine. The produced specimens (0.81 mm²) were stored in water for 24 h or 6 m before being stressed to failure. Data were analyzed by ANOVA and Tukey tests. For all the studies, the statistical tests were considered at the preset level of significance of 5%. **Results:** No statistical significant difference was seen between the width of the exposed collagen zone in bonds produced on noncarious and carious dentin. However,

thicker zones were observed after 6 m of water storage for both substrates. Specimens stored in 0.12 chlorhexidine and mineral oil did not differ from those stored in water for 24 h (control). Bond strengths produced on caries-affected dentin were significantly lower than those produced on noncarious dentin when chlorhexidine was not used. Conversely, when this agent was applied comparable bond strengths were produced in both substrates for all the adhesive systems. After 6 m of aging in water, significantly lower bond strengths were observed for Scotchbond MP, Single Bond 2 and Prompt in the absence of chlorhexidine. In the presence of this agent, bond strengths recorded for the etch-and-rinse adhesive systems did not differ from those observed after 24 h (control). **Conclusion:** Collagen fibrils remain exposed in bonds produced on noncarious and caries-affected dentin. The use of chlorhexidine does not interfere with the immediate bond strengths to noncarious dentin and seems to improve that property to caries-affected dentin. Degradation of bonds produced on caries-affected dentin is decelerated in the presence of chlorhexidine.

Keywords: Dental caries; dentin; dentin bonding agents; collagen; chlorhexidine; longevity

INTRODUÇÃO GERAL



INTRODUÇÃO GERAL

Embora os testes de adesão sejam, em sua maioria, realizados em dentina hígida, a condição clínica mais relevante desse substrato é a superfície resultante após a remoção da lesão de cárie (Kimochi et al.²¹, 1999; Nakajima et al.²⁷, 1995; Yoshiyama et al.⁴⁷, 2000). Devido a fenômenos químicos e fisiológicos que ocorrem durante a evolução do processo carioso, a zona intertubular da dentina afetada por cárie apresenta menor conteúdo mineral'' (Nakajima et al.²⁵, 1999; Yoshiyama et al.⁴⁷, 2000; Zheng et al.⁴⁹, 2003; Wang et al.⁴⁴, 2007), enquanto cristais resistentes à dissolução ácida resultantes da recristalização da apatita dissolvida (Ogawa et al.²⁸, 1983), como os de fosfato tricálcico (Wang et al.⁴⁴, 2007), são depositados no interior dos túbulos dentinários, reduzindo a permeabilidade desse tecido (Tagami et al.⁴⁰, 1992). Se por um lado essa obstrução tubular representa um mecanismo de defesa contra a invasão bacteriana, por outro, também limita a penetração de monômeros resinosos e a formação dos tags de resina (Yoshiyama et al.⁴⁷, 2000). Essas estruturas, conjuntamente com a camada híbrida, ou seja, a rede de fibrilas de colágeno exposta pela ação de componentes ácidos (Nakabayashi et al.²⁴, 1982) infiltrada por monômeros polimerizados in situ, constituem as principais e mais efetivas formas de adesão das resinas à dentina (Pashley, Carvalho³⁰, 1997; Van Meerbeek et al.⁴², 2003).

Consequentemente, as alterações físico-químicas e morfológicas observadas na dentina afetada por cárie influenciam diretamente no desempenho de materiais adesivos sobre ela aplicados (Nakajima et al.²⁷, 1995; Nakajima et al.²⁶, 1999; Yoshiyama et al.⁴⁸, 2002) resultando na inferioridade da resistência de união quando comparada a observada em dentina hígida (Arrais et al.², 2004; Kimochi et al.²¹, 1999; Nakajima et

al.²⁷, 1995; Nakajima et al.²⁶, 1999; Nakajima et al.²⁷, 1999; Xie et al.⁴⁵, 1996; Pereira et al.³², 2006; Erhardt et al.¹², 2008).

Durante os procedimentos adesivos, a desmineralização superficial da dentina é essencial para a formação da camada híbrida. Entretanto, a profundidade de desmineralização da dentina resultante da aplicação de substâncias ácidas, geralmente excede a capacidade de infiltração dos monômeros resinosos, resultando na formação de uma zona de dentina desmineralizada desprovida de proteção na base da camada híbrida (Nakabayashi et al.²⁴, 1998; Hashimoto et al.¹⁷, 2000; Spencer, Wang³⁸, 2002; Wang, Spencer⁴³, 2003; Wang et al.⁴⁴, 2007). Essa zona é observada tanto para sistemas convencionais (Spencer, Wang³⁸, 2002; Wang, Spencer⁴⁴, 2003) como para sistemas autocondicionantes (Sano et al.³⁷, 1995; Oliveira et al.²⁹, 2004; Carvalho et al.⁸, 2005). Devido ao aumento de porosidades e menor conteúdo mineral observado na dentina intertubular afetada por cárie quando comparada à dentina sadia, a difusão do agente ácido é maior, ao mesmo tempo em que sua neutralização pelos minerais dissolvidos da dentina é desfavorecida (Wang et al.⁴⁴, 2007). Desta forma, camadas híbridas mais imperfeitas, contendo um maior número de defeitos intrínsecos são formadas com a dentina alterada pelo processo carioso (Yoshiyama et al.⁴⁷, 2000; Pereira et al.³², 2006; Haj-Ali et al.¹⁵, 2006; Wang et al.⁴⁴, 2007; Erhardt et al.¹², 2008).

Os mecanismos de degradação da interface adesiva envolvem a deterioração tanto dos constituintes poliméricos como das fibrilas de colágeno desprovidas de proteção, presentes na união resina-dentina. Essas são susceptíveis à hidrólise e degradação enzimática via endopeptidases presentes no próprio substrato dentinário e liberadas durante sua dissolução (metaloproteinases da matriz, MMPs) (Pashley et al.³¹, 2004), ou via collagenases produzidas por microrganismos participantes do processo

carioso (Tjäderhane et al.⁴¹, 1998). Além disso, a presença dessa zona de fibrilas de colágeno expostas favorece a nanoinfiltração (Sano et al.³⁷, 1995), a qual permite o ingresso constante de fluídos diversos, produtos do metabolismo bacteriano, e MMPs provenientes da saliva. Em conjunto, todos esses fatores culminam com a degradação hidrolítica e enzimática das fibrilas de colágeno expostas na interface de união, apesar dos mecanismos precisos de ativação das MMPs ainda não estarem totalmente esclarecidos (Tjäderhane et al.⁴¹, 1998).

Metaloproteínases representam um conjunto de 23 endopeptidases zinco e cálcio dependentes que apresentam capacidade de degradação de componentes da matriz extracelular. Na dentina, são encontradas as MMP-2 (gelatinase-A), MMP-8 (colagenase-2), MMP-9 (gelatinase-B), MMP-14 e MMP-20 (enamelisina) (Tjäderhane et al.⁴¹, 1998; Martin-De Las Heras et al.²³, 2000). Tem sido demonstrado que soluções de clorexidina têm a capacidade de inibir completamente a atividade de MMP-2 e MMP-9, mesmo em concentrações tão pequenas quanto 0,03% (Gendron et al.¹⁴, 1999). Recentemente, estudos *in vitro* (Brackett et al.³, 2007; Carrilho et al.⁶, 2007; Campos et al.⁴, 2009) e *in vivo* (Hebling et al.¹⁹, 2005; Carrilho et al.⁷, 2007) têm demonstrado bons resultados na inibição da degradação sub-clínica de camadas híbridas quando da aplicação de soluções de clorexidina (2%) sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico e previamente à utilização de um sistema adesivo convencional monocomponente. Também tem sido demonstrado que a aplicação de soluções de clorexidina sobre a dentina condicionada não influencia negativamente a resistência de união imediata de sistemas adesivos a este substrato (Castro et al.⁹, 2003; Carrilho et al.⁶, 2007; Brackett et al.³, 2007; Ricci et al.³⁶, 2008). Consequentemente, a aplicação de clorexidina após o condicionamento ácido da dentina e previamente à aplicação de

sistemas adesivos tem, além da atuação como procedimento antimicrobiano, mais uma função importante que seria a prevenção ou desaceleração da degradação das fibrilas de colágeno expostas na base da camada híbrida, resultando em interfaces adesivas mais estáveis em longo prazo. Entretanto, apenas um trabalho in vivo (Hebling et al.¹⁹, 2005) e um in vitro (Erhardt et al.¹², 2008) utilizaram como substrato para adesão a dentina afetada por cárie, enquanto outro (Campos et al.⁴, 2009) investigou os benefícios da clorexidina na desaceleração da deterioração de interfaces adesivas produzidas com sistema adesivo autocondicionante.

PROPOSIÇÃO



PROPOSIÇÃO GERAL

A proposição geral desta pesquisa foi avaliar o efeito da inibição de metaloproteinases da matriz dentinária (MMPs) pela clorexidina na produção e estabilidade mecânica de interfaces entre a dentina afetada por cárie e sistemas adesivos convencionais e autocondicionantes.

PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA

Capítulo 1: Identificação do colágeno exposto na união resina-dentina hígida e afetada por cárie após envelhecimento

Identificar, em longo prazo, a zona de colágeno exposta na base da união resina-dentina hígida ou afetada por cárie, produzidas com e sem a utilização de um inibidor de metaloproteinases da matriz dentinária.

Capítulo 2: Efeito da clorexidina na resistência de união de sistemas adesivos à dentina hígida e afetada por cárie.

Avaliar a influência da aplicação de uma solução de clorexidina no desempenho adesivo imediato da união resina-dentina hígida ou afetada por cárie após utilização de sistemas adesivos convencionais e autocondicionantes.

Capítulo 3: Degradação da união resina-dentina afetada por cárie produzida na presença de clorexidina

Avaliar a ação da clorexidina como inibidor de MMPs na degradação (estabilidade mecânica) da união resina-dentina afetada por cárie após a utilização de sistemas adesivos convencionais e autocondicionantes.

Capítulo 1

**Identificação do colágeno exposto na união
resina/dentina hígida e afetada por cárie após
envelhecimento**



Identificação do colágeno exposto na união resina-dentina hígida e afetada por cárie após envelhecimento

Detection of exposed collagen in aged resin-dentin bonds produced on sound and caries-affected dentin

Mariane Emi Sanabe emisanabe@hotmail.com

Cirurgiã Dentista, Mestre e Aluna de Doutorado em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Carlos Alberto de Souza Costa casouzac@foar.unesp.br

Cirurgião Dentista, Mestre, Doutor e Professor Adjunto do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Josimeri Hebling jhebling@foar.unesp.br

Cirurgiã Dentista, Mestre, Doutor e Professor Adjunto do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Endereço para Correspondência:

Josimeri Hebling

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Departamento de Clínica Infantil

Rua Humaitá, 1680, Araraquara/SP CEP14801-903

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

RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar a presença de colágeno na união resina-dentina hígida e afetada por cárie após envelhecimento, na presença ou ausência de clorexidina. Superfícies planas de dentina foram produzidas em dezesseis molares hígidos, dos quais oito foram submetidos ao processo microbiológico de indução à cárie. Após a remoção do tecido cariado ou sobre a dentina hígida foi aplicado o sistema Single Bond 2. Espécimes de dentina (n=6) foram produzidos e armazenados por 24 h em água, 6 meses em água, clorexidina a 0,12% ou óleo mineral. Em seguida, os espécimes foram preparados para a produção de cortes histológicos corados com Tricrômico de Goldner. A zona de colágeno exposta na base da camada híbrida foi quantificada em microscópio óptico e os dados submetidos aos testes estatísticos de ANOVA a dois critérios fixos e Tukey ($\alpha=0,05$). Não foi encontrada diferença estatística para nenhuma das condições de armazenagem entre a dentina hígida e afetada por cárie. Para ambos os substratos, exposição significativamente maior de colágeno foi observada após 6 meses de armazenagem em água. A armazenagem em solução de clorexidina resultou em exposição de colágeno intermediária entre os grupos controle e de envelhecimento por 6 meses em água, enquanto que para a armazenagem em óleo não foi observado aumento da zona de colágeno exposto. Foi concluído que o envelhecimento em solução aquosa resultou em degradação da união resina-dentina, identificada pelo aumento da zona de colágeno exposta na base da camada híbrida. Entretanto, na presença de clorexidina, os efeitos da degradação sobre a exposição de colágeno foram reduzidos.

Palavras-chaves: cárie dentária, dentina, adesivos dentinários, colágeno, clorexidina, longevidade.

INTRODUÇÃO

A produção de uma união resina-dentina estável longitudinalmente ainda é um desafio a ser superado. A degradação dos componentes dessa união ocorre pela ação conjunta da água e de enzimas proteolíticas provenientes do próprio substrato dentinário (MMPs),^{4,6,16,23} ou de fontes exógenas como bactérias e saliva.³² Ambas as formas de degradação hidrolítica e enzimática são indesejáveis e culminam com a falência da funcionalidade da união.

Fibrilas de colágeno permanecem expostas após o estabelecimento da união resina-dentina devido à incompleta infiltração da dentina desmineralizada pelos monômeros resinosos.^{27,37} 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^{10,29} e o gradiente de umidade da dentina,³¹ o que permite a ocorrência da separação de fases.³⁰ Além destes fatores imediatos, fibrilas de colágeno podem ser expostas devido à degradação hidrolítica, em longo prazo, do componente polimérico¹⁵ e lixiviação dos monômeros residuais e polímeros de baixo peso molecular.

Inibidores da atividade das MMPs sobre as fibrilas de colágeno expostas na união resina-dentina têm sido investigados como coadjuvantes no processo de adesão.^{4,6,11,16,23} Esses agentes, entre eles a clorexidina, mimetizam a ação de inibidores teciduais naturais (TIMPs) preservando a integridade do colágeno na presença dessas enzimas proteolíticas²³ e desacelerando a degradação das camadas híbridas.^{6,16}

Maior exposição de colágeno na base da camada híbrida tem sido demonstrada para as interfaces produzidas sobre dentina afetada por cárie.³⁴ Isso ocorre devido à

menor mineralização da dentina intertubular na dentina afetada por cárie, o que favorece a difusão do agente ácido e, conseqüentemente, uma desmineralização mais profunda.^{14,34} Como resultado, menores valores de resistência de união são produzidos com a dentina afetada por cárie quando comparados aos produzidos em dentina hígida.^{1,12,17,20-22,25,38}

Uma das técnicas 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.²⁷. Em seu trabalho pioneiro, seguido de vários outros que validaram a técnica,^{13,28,29,33,35,36} 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 um estudo desenvolvido por Haj-Ali et al.¹⁴ utilizou essa técnica para análise de interfaces produzidas com a dentina afetada por cárie, enquanto nenhum estudo foi encontrado sobre a degradação de interfaces adesivas utilizando essa coloração.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi identificar, por meio da coloração do Tricrômico de Goldner, a presença de colágeno exposto na união adesiva produzida com a dentina hígida e afetada por cárie após 6 meses de armazenagem em água, solução de clorexidina e óleo mineral. As hipóteses nulas testadas foram que (1) o tipo de substrato (hígido ou cariado), assim como, (2) a solução de armazenagem não interferem na presença de colágeno exposto na união resina-dentina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Dezesseis terceiros molares humanos hígidos foram coletados para este estudo após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido assinado, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Protocolo nº. 26/07). Foram incluídos no estudo apenas dentes hígidos que apresentavam coroas sem áreas hipoplásicas. Os dentes, após a remoção dos restos teciduais e profilaxia com pedra pomes em água, foram armazenados em solução de timol a 0,2% sob refrigeração (4°C) e utilizados dentro de três meses após sua obtenção.

Superfícies planas em dentina foram produzidas após a remoção da metade oclusal da coroa por meio de um corte transversal realizado com auxílio de cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltd., Lake Bluf, IL, EUA) equipada com disco diamantado (n.11-4254, Buehler Ltd., Lake Bluf, IL, EUA), sob lubrificação constante (300 rpm e 200gf). As superfícies foram inspecionadas em lupa estereoscópica (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) com 30 vezes de aumento para confirmar a ausência de remanescentes de esmalte.

Indução Artificial da Lesão de Cárie

Oito dentes dos dezesseis inicialmente selecionados tiveram suas raízes seladas com resina composta. Em seguida, foram impermeabilizados com uma camada de adesivo epóxi (ARALDITE, Ciba Especialidades Químicas Ltda., São Paulo, Brasil) e outra de esmalte ácido resistente (Colorama, CEIL Com. Exp. Ind. Ltda, São Paulo, Brasil), deixando apenas a superfície dentinária exposta. Os dentes foram suspensos

com auxílio de um fio ortodôntico em um béquer contendo água destilada para esterilização em autoclave por 20 minutos a 121 °C. A solução cariogênica consistiu de 3,7 g de BHI caldo (Brain Heart Infusion, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), 2 g de sacarose (Synth; LabSynth, São Paulo, SP, Brazil), 1 g glicose (Synth; LabSynth, São Paulo, SP, Brazil) e 0,5 g de extrato de levedura (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) para cada 100 mL de água destilada. Essa solução foi esterilizada (autoclave por 20 minutos a 121 °C) previamente a inoculação de 2% de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC25175 (Coleção de Culturas Tropical Fundação André Toselo) (10^8 UFC/mL). Os dentes foram suspensos no meio cariogênico e o conjunto levado 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, os dentes foram novamente autoclavados. 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.

Procedimentos adesivos e obtenção dos espécimes

A superfície cariada foi removida com auxílio de broca esférica de aço nº 4 (KG Sorensen, Barueri - SP, BR) em baixa rotação, a qual foi trocada por uma nova a cada 4 dentes. A dentina cariada amolecida foi removida até a obtenção de uma dentina mais endurecida e resistente ao toque com sonda exploradora sem pressão. Esse, assim como os demais procedimentos, foi realizado por um único operador previamente treinado.

Um corte adicional de aproximadamente 0,5 mm foi realizado para os dentes mantidos hígidos com o objetivo de compensar a dentina removida dos dentes cariados. Sobre a dentina hígida, brocas esféricas também foram utilizadas por 30 segundos para que a smear layer fosse produzida pelo mesmo tipo de instrumento de corte.

Os dentes foram divididos aleatoriamente segundo o substrato (hígido e cariado) e a solução de armazenagem. O sistema adesivo Adper Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi aplicado segundo a recomendação do fabricante. Desta forma, a dentina foi condicionada por 15 s com ácido fosfórico a 35% (Scotchbond Etchant, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), lavagem por 15 s, secagem com papel absorvente para obtenção de uma superfície úmida. Duas camadas consecutivas do adesivo foram aplicadas, sendo cada uma delas individualmente submetida a leves jatos de ar para remoção do solvente. Ao final, as camadas foram conjuntamente fotoativadas com o aparelho de luz Optilux 500 (Kerr, Danbury, CT, EUA) cuja irradiância foi monitorada com radiômetro ($490 \pm 10 \text{ mW/cm}^2$). Em seguida, quatro camadas adicionais do adesivo foram aplicadas e fotoativadas ao final da última camada para possibilitar a microtomia dos espécimes. Para o grupo armazenado em clorexidina a 0,12%, após o condicionamento ácido foram aplicados 20 μL de solução de clorexidina a 2% (Clorhexidina s – FGM Brasil SC, BR) por 60 s, seguido da remoção dos excessos com papel absorvente previamente a aplicação do sistema adesivo. Os dentes foram mantidos em ambiente com 100% de umidade relativa à 37 °C por 24 horas.

Os dentes foram seccionados na cortadeira metalográfica para obtenção de três espécimes com dimensões de 2 mm de espessura, 2 mm de altura e 5 mm de comprimento para cada dente. Os espécimes, segundo o substrato, foram aleatoriamente divididos (n=6) de acordo com a condição de armazenagem: água destilada por 24 h a

37° C; água destilada acrescida de cristais de timol a 0,2% ou óleo mineral (Nujol, Schering Plough, São Paulo, BR) por 6 meses. Os dentes que receberam aplicação de clorexidina a 2% foram armazenado em solução de clorexidina a 0,12% (Farmácia Escola, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, SP, BR), por 6 meses a 37° C.

Processamento histológico

Decorrido o período de armazenagem 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 4 µm de espessura (820 Spencer Microtome - American Optical Corp, Bufallo, NY – USA) foram corados pelo Tricrômico de Goldner²⁷ Nessa coloração, a dentina mineralizada é corada em verde, a camada de adesivo em bege, o colágeno hibridizado pelo adesivo em laranja e o colágeno exposto em vermelho. Um corte de cada espécime foi aleatoriamente selecionado e analisado em aumento de 400X (Olympus BX51 e Câmera Camedia C5060 – Olympus Corp, Tokio, JP). 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). As leituras foram realizadas em duplicata por um mesmo examinador, com intervalo de uma semana entre elas.

Análise Estatística

A média das seis leituras foi computada para cada espécime. Para análise da reprodutibilidade do examinador foi utilizado o teste de correlação de Pearson. Aos dados de espessura da camada de colágeno foi aplicado o teste estatístico de análise de variância a dois critérios fixos (substrato vs. condição de armazenagem) complementado pelo teste para comparação múltiplas de Tukey. Todos os testes foram considerados ao nível de significância de 5% e foram realizados no programa estatístico SPSS 13.0 (SPSS Inc. Chicago, IL. EUA).

RESULTADOS

O valor da reprodutibilidade do examinador foi de 0,90 ($p < 0,05$). Dados descritivos da espessura da zona de colágeno identificada na base da camada híbrida em função do tipo de substrato e da condição de armazenagem estão apresentados na Tabela 1. Para nenhuma das condições de armazenagem foi identificada diferença estatisticamente significativa entre a dentina hígida e afetada por cárie ($p > 0,05$). Os maiores valores de espessura da zona de colágeno exposta foram observados para os grupos onde os espécimes foram armazenados em água por 6 meses, $3,21 \pm 0,85$ e $3,52 \pm 0,43$ μm , respectivamente para a dentina hígida e afetada por cárie, embora esses valores não tenham diferido estatisticamente dos grupos onde a armazenagem foi feita em solução aquosa de clorexidina 0,12%, $2,78 \pm 0,81$ e $2,80 \pm 0,29$ μm , também respectivamente para a dentina hígida e afetada por cárie. Entretanto, esses últimos grupos não diferiram estatisticamente dos grupos controle, ou seja, armazenagem em água por 24 horas, $2,30 \pm 0,48 \mu\text{m}$ para a dentina hígida e $2,99 \pm 0,67 \mu\text{m}$ para a dentina afetada por cárie. Para os espécimes de dentina hígida e afetada por cárie mantidos por 6

meses em óleo mineral a espessura da zona de colágeno, $2,09 \pm 0,50$ e $2,28 \pm 0,55$ μm , respectivamente, foi comparável àquela observada para a armazenagem em água por 24 horas (controle).

Espécimes corados com o tricrômico de Goldner representativos da união produzida sobre a dentina hígida e afetada por cárie estão apresentados nas Figuras 1 e 2 respectivamente. Nos espécimes submetidos ao desenvolvimento microbiológico de cárie artificial, pôde ser observada a desmineralização parcial do substrato dentinário (Figura 2), quando comparados aos espécimes do grupo de dentina hígida (Figura 1). A melhor condição de hibridização para ambos os substratos, identificada por áreas coradas em laranja, foi observada para os espécimes armazenados em óleo mineral por 6 meses (Figuras 1d e 2d). Contrariamente, áreas coradas em vermelho indicativas da presença de colágeno exposto para reação com o corante, foram observadas com maior frequência e intensidade nos espécimes armazenados por 6 meses em água (Figuras 1b e 2b). Quando comparados aos espécimes armazenados em água por apenas 24 horas (grupos controle, Figuras 1a e 2a) camadas mais espessas de colágeno exposto foram visualizadas. Para os espécimes tratados com clorexidina e posteriormente armazenados em solução de clorexidina a 0,12% por 6 meses, nenhuma diferença significativa pôde ser identificada quando esses foram comparados aos espécimes dos grupos controle (Figuras 1a e 2a).

DISCUSSÃO

Para nenhuma das condições de armazenagem foi observada diferença significativa entre a espessura da zona de colágeno exposta nas interfaces produzidas sobre a dentina hígida e afetada por cárie, embora zonas mais espessas tenham sido

registradas para a última. Consequentemente a primeira hipótese nula não foi rejeitada. Esses resultados diferem dos apresentados por Haj-Ali et al.¹⁴ onde os autores, utilizando a mesma coloração histológica, observaram espessura da zona de colágeno significativamente mais espessa nas interfaces produzidas sobre a dentina afetada por cárie em comparação à dentina hígida. Em seu estudo, a espessura média da zona de colágeno observada para a dentina afetada por cárie foi de $8,6 \pm 1,7 \mu\text{m}$, enquanto que para a dentina hígida foi de $6,01 \pm 1,5 \mu\text{m}$ ($p=0,042$). Comparando esses valores aos obtidos no presente estudo, espessuras médias bastante inferiores foram observadas, $2,99 \pm 0,67 \mu\text{m}$ e $2,30 \pm 0,48 \mu\text{m}$ para a dentina afetada por cárie e hígida, respectivamente ($p=0,057$). Os diferentes resultados observados podem encontrar respaldo nas diferenças metodológicas de ambos estudos. Enquanto no presente estudo foi utilizado um método microbiológico para a produção das lesões artificiais de cárie,⁸ no trabalho de Haj-Ali et al.¹⁴ esse substrato foi produzido pelo método químico de armazenagem dos espécimes em solução ácida tamponada (pH 4,5). Adicionalmente, Haj-Ali et al.¹⁴ utilizaram ácido fosfórico a 38% como agente desmineralizador da dentina, enquanto no presente estudo esse mesmo agente foi utilizado na concentração de 35%. Diferentes concentrações e formulações do mesmo agente condicionador resultam em diferentes padrões morfológicos da dentina.²⁴ Frente a disparidade dos resultados desses estudos, e considerando que a significância estatística de ambos, quando os substratos hígido e afetado por cárie foram confrontados, foi apenas marginal, novos experimentos ainda são necessários para melhor elucidar esses resultados.

Embora a avaliação da qualidade da união resina-dentina em MEV seja questionada uma vez que os procedimentos necessários para o preparo dos espécimes

podem resultar em camadas híbridas com qualidade sobrestimada, Pereira et al.²⁵ e Erhardt et al.¹² demonstraram por meio desta técnica a formação de camadas mais espessas quando essa união foi produzida na dentina afetada por cárie em comparação à dentina hígida. Camadas híbridas mais espessas contêm um maior número de imperfeições¹² com conseqüente maior exposição de fibrilas de colágeno na interface.^{19,39} De fato, tem sido demonstrada ausência de correlação positiva entre a espessura da camada híbrida e a resistência de união de sistemas adesivos à dentina.¹⁵

O tecido dentinário afetado por cárie, em comparação ao hígido, apresenta a dentina intertubular com menor dureza^{12,25} devido a sua desmineralização parcial,³⁴ resultando no aumento de sua porosidade. Em função dessas características, há menos minerais para serem removidos pelo condicionador ácido em adição à menor resistência oferecida pelo tecido contra a difusão desse agente, o que resulta em desmineralização mais profunda desse substrato.^{14,34} A impregnação adequada da dentina desmineralizada torna-se menos provável à medida que a profundidade dessa desmineralização aumenta, em função das limitações inerentes à infiltração monomérica dessa zona.^{10,29,31,34} Como resultado da formação de camadas híbridas apenas parcialmente infiltradas, a união resina-dentina torna-se mais susceptível à degradação hidrolítica e enzimática.

Aumento significativo da espessura da zona de colágeno exposta na base da camada híbrida foi observado no presente estudo após 6 meses de armazenagem dos espécimes em água. Isso demonstra que mais fibrilas de colágeno tornaram-se disponíveis para reação com o corante devido à lixiviação de monômeros residuais, assim como de polímeros hidroliticamente instáveis e de baixo peso molecular plastificados pela ação da água.

Degradação hidrolítica dos componentes poliméricos da interface adesiva tem sido demonstrada em vários estudos.^{5,18} O exato mecanismo de degradação dos componentes da interface adesiva ainda não é totalmente conhecido, mas esse processo pode ser definido como um complexo e intrincado fenômeno que envolve ambos os substratos, resina e dentina, os quais são negativamente afetados pela ação da água (degradação hidrolítica) e de enzimas salivares, bacterianas e da própria dentina (degradação enzimática).^{6,16,23} Embora o processo de degradação possa ser dividido em três estágios, plastificação do polímero pela água, eluição de monômeros e/ou oligômeros da camada híbrida ou de adesivo e degradação hidrolítica e enzimática da matriz dentinária;²⁶ ainda não existe consenso sobre qual componente da interface é mais susceptível a esses eventos.⁵

Embora Carvalho et al.⁹ não tenham observado alteração das propriedades mecânicas, módulo de elasticidade e resistência máxima a tração da matriz dentinária em espécimes completamente desmineralizados em EDTA e armazenados por 4 anos em solução aquosa, no estudo de Hebling et al.¹⁶ foi observado o quase completo desaparecimento das camadas híbridas em interfaces que permaneceram em função da cavidade bucal por 6 meses. Em um estudo recente, Carrilho et al.⁷ quantificaram a solubilização do colágeno em espécimes de dentina completamente desmineralizados, os quais receberam posterior tratamento com clorexidina. Após 4 dias de armazenagem em saliva artificial, os autores observaram que a porcentagem de degradação do colágeno nos espécimes tratados com clorexidina foi de 0,38% enquanto que para os espécimes controle esse valor foi de 2,05%.

A espessura da zona de colágeno exposta na base da união sistema adesivo-dentina para os espécimes armazenados em solução de clorexidina apresentou valor

médio intermediário aos grupos controle (24 horas em água) e de armazenagem em água por 6 meses. Baseados nesses resultados sugerimos que a aplicação de clorexidina pós condicionamento ácido, assim como a armazenagem em solução contendo essa substância, ofereceu alguma proteção contra a degradação enzimática das fibrilas de colágeno, embora a degradação hidrolítica ainda tenha se manifestado. Pode ser especulado, entretanto, que devido à manutenção da integridade das fibrilas de colágeno, parcialmente ou totalmente expostas, a lixiviação dos componentes resinosos pode ter sido dificultada uma vez que a trama de colágeno pode atuar como uma barreira física à saída de componentes da interface. O efeito positivo da clorexidina na proteção das fibrilas de colágeno contra a ação de MMPs tem sido comprovado em estudos *in vitro*^{3,4,23} e *in vivo*.^{2,6,16} O exato mecanismo de ação desse agente catiônico ainda não está totalmente esclarecido, porém sugere-se que devido a sua carga positiva, as moléculas de clorexidina competem com sítios das MMPs que deveriam ser ativados por íons metálicos como cálcio e o zinco, inativando dessa forma sua ação proteolítica.

A manifestação dos fenômenos de degradação no presente estudo foi validada pela armazenagem dos espécimes em óleo mineral. Esse meio de armazenagem teve por objetivo impedir que os mecanismos de degradação enzimática e hidrolítica se manifestassem sobre a interface adesiva, o que foi confirmado para ambos os substratos, uma vez que os resultados desses grupos não diferiram dos grupos onde os espécimes foram armazenados em água por apenas 24 horas. Esses resultados demonstram que na ausência de água tais efeitos não ocorrem, o que também foi observado em estudos prévios.^{5,26} Devido à presença de uma solução hidrófoba a água presente na união adesiva é gradualmente removida favorecendo a conversão monomérica e impedindo a ocorrência da degradação hidrolítica.^{5,26} Adicionalmente, uma vez que as MMPs

dependem da água e da presença de íons zinco e cálcio²³ para serem ativadas, não é esperado que a ação dessas enzimas ocorra quando os espécimes são armazenados em óleo mineral.^{5,26}

Embora os sistemas adesivos contemporâneos apresentem satisfatório desempenho adesivo imediato, os desafios impostos pelas características do tecido dentinário e da cavidade bucal ainda desafiam a estabilidade longitudinal da união resina-dentina. Dessa forma, estudos devem buscar soluções que tornem os componentes dessa união mais resistentes aos mecanismos de degradação. Especificamente para o componente orgânico exposto na interface, a incorporação da clorexidina nos protocolos de adesão tem demonstrado resultados bastante favoráveis^{6,16} e novos estudos são necessários para respaldar o uso clínico de tais protocolos considerando que ambos substratos, dentina hígida e afetada por cárie, coexistem na maioria das cavidades a serem restauradas com compósitos.

CONCLUSÃO

O envelhecimento em solução aquosa resultou em degradação da união resina-dentina, identificada pelo aumento da zona de colágeno exposta na base da camada híbrida. Entretanto, na presença de clorexidina, os efeitos da degradação sobre a exposição de colágeno foram reduzidos.

RELEVÂNCIA CLÍNICA

A exposição de fibrilas de colágeno na união resina-dentina ocorre devido a incompleta impregnação da dentina desmineralizada pelo adesivo ou pela lixiviação do

mesmo pela ação da água circulante na interface. A utilização de clorexidina exerce efeito benéfico na estabilidade longitudinal dessas fibrilas.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela agência brasileira de fomento à pesquisa FAPESP (Pr. nº. 2008/00198-7). Os autores agradecem a CAPES pela concessão de bolsa de Doutorado e aos técnicos Sr. José Antonio Sampaio Zuanon, Sra. Juliana Pirolla e Sra. Sônia Alves pela indispensável colaboração durante as fases experimentais desenvolvidas nos laboratórios de Microbiologia e de Patologia Experimental e Biomateriais.

REFERÊNCIAS

1. Arrais CA, Giannini M, Nakajima M, Tagami J. Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine. Eur J Oral Sci 2004;112:458-464.
2. 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.
3. 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.
4. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjaderhane L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. J Dent Res 2007;86:90-94.

5. Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Effects of storage media on mechanical properties of adhesive systems. *Am J Dent* 2004;17:104-108.
6. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley, D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007;86:529-533.
7. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, Breschi L, Foulger S, Pashley DH. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008 Dec 17.
8. Carvalho FG, Fucio SB, Sinhoreti MA, Correr-Sobrinho L, Puppini-Rontani RM. Confocal laser scanning microscopic analysis of the depth of dentin caries-like lesions in primary and permanent teeth. *Braz Dent J* 2008;19:139-144.
9. Carvalho RM, Tay F, Sano H, Yoshiyama M, Pashley DH. Long-term mechanical properties of EDTA-demineralized dentin matrix. *J Adhes Dent* 2000;2:193-199.
10. 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
11. Erhardt MC, Osorio R, Toledano M. Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin. *J Dent* 2008;36:1068-1073.
12. 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;24:786-798.
13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005;84:741-746.
17. 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;18:437-443.
18. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, Yiu CK, Carrilho MR. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater* 2006;22:973-980.
19. Nakajima M, Kitasako Y, Okuda M, Foxton RM, Tagami J. Elemental distributions and microtensile bond strength of the adhesive interface to normal and caries-affected dentin. *J Biomed Mater Res* 2005;72:268-275.
20. Nakajima M, Ogata M, Okuda M, Tagami J, Sano H, Pashley DH. Bonding to caries-affected dentin using self-etching primers. *Am J Dent* 1999;12:309-314.
21. 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 Dent Res* 1995;74:1679-1688.
22. Nakajima M, Sano H, Zheng L, Tagami J, Pashley DH. Effect of moist vs. dry bonding to normal vs. caries-affected dentin with Scotchbond Multi-Purpose Plus. *J Dent Res* 1999;78:1298-1303.

23. 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.
24. Perdigao J, Lambrechts P, van Meerbeek B, Tome AR, Vanherle G, Lopes AB. Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. *Dent Mater* 1996;12:262-271.
25. 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;31:677-681.
26. Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Long-term TEM analysis of the nanoleakage patterns in resin-dentin interfaces produced by different bonding strategies. *Dent Mater* 2007;23:1164-1672.
27. Spencer P, Swafford JR. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. *Quintessence Int* 1999;30:501-507.
28. Spencer P, Wang Y, Katz JL. Identification of collagen encapsulation at the dentin/adhesive interface. *J Adhes Dent* 2004;6:91-95.
29. Spencer P, Wang Y, Walker MP, Wieliczka DM, Swafford JR. Interfacial chemistry of the dentin/adhesive bond. *J Dent Res* 2000;79:1458-1463.
30. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res* 2002;62:447-456.
31. 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.

32. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions J Dent Res 1998;77:1622-1629.
33. 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.
34. Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. J Biom Mater Res 2007;81A:279-286.
35. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. J Dent Res 2003;82:141-145.
36. Wang Y, Spencer P. Physiochemical interactions at the interfaces between self-etch adhesive systems and dentine. J Dent 2004;32:567-579.
37. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. J Biomed Mater Res 2002;59:46-55.
38. Xie J, Flaitz CM, Hicks MJ, Powers JM. Bond strength of composite to sound and artificial carious dentin. Am J Dent 1996;9:31-33.
39. 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.

Tabela 1. Espessura (μm) da zona de colágeno exposta na base da camada híbrida segundo o substrato e a condição de armazenagem.

Substrato	Condição de armazenagem			
	24 horas água	6 meses água	6 meses CHX	6 meses óleo
Hígido	2,30 $\pm$ 0,48* ^{a**}	3,21 $\pm$ 0,85 ^b	2,78 $\pm$ 0,81 ^{a b}	2,09 $\pm$ 0,50 ^a
Cariado	2,99 $\pm$ 0,67 ^a	3,52 $\pm$ 0,43 ^b	2,80 $\pm$ 0,29 ^{a b}	2,28 $\pm$ 0,55 ^a

* valores são média $\pm$ dp (n=6)

** valores representados por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$)

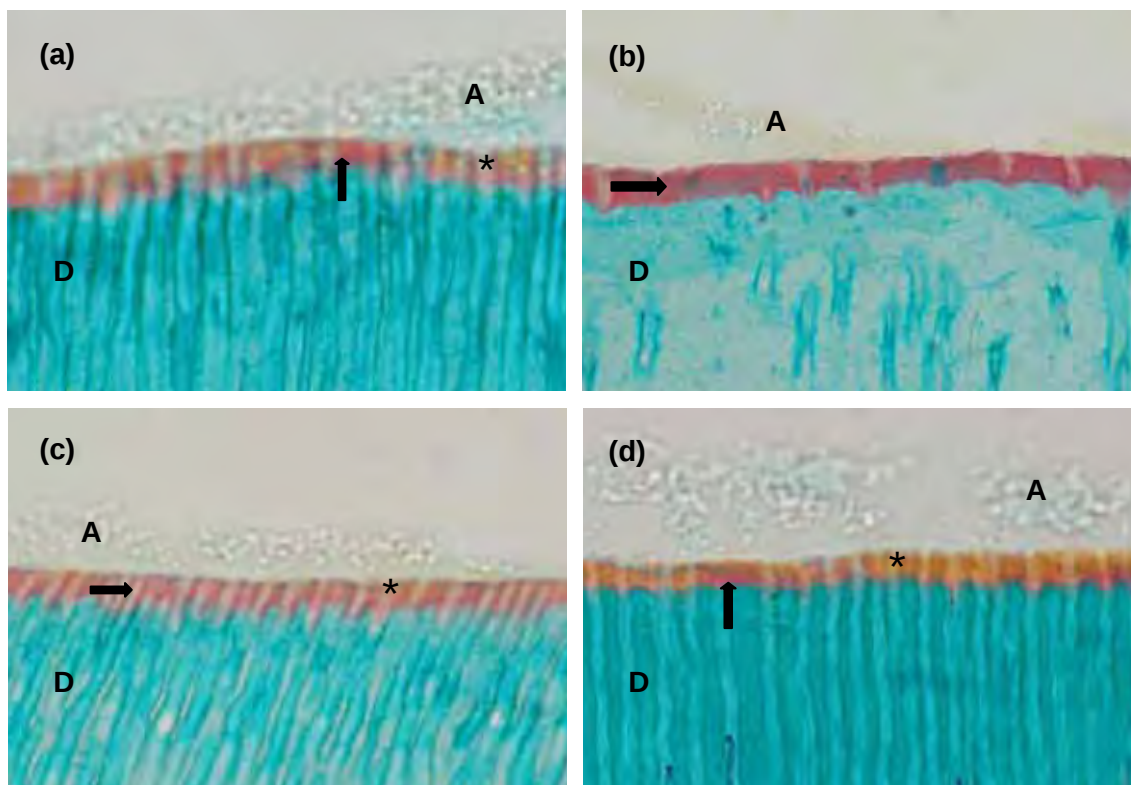


Figura 1. Espécimes de dentina hígida corados com tricrômico de Goldner. (a) Grupo controle (armazenagem em água por 24 h); (b) armazenagem em água por 6 meses; (c) armazenagem em solução de clorexidina 0,12% por 6 meses; e (d) armazenagem em óleo mineral por 6 meses. X400. Camada de adesivo em bege claro (A), colágeno hibridizado pelo adesivo em laranja (*), colágeno exposto em vermelho (seta) e dentina em verde (D).

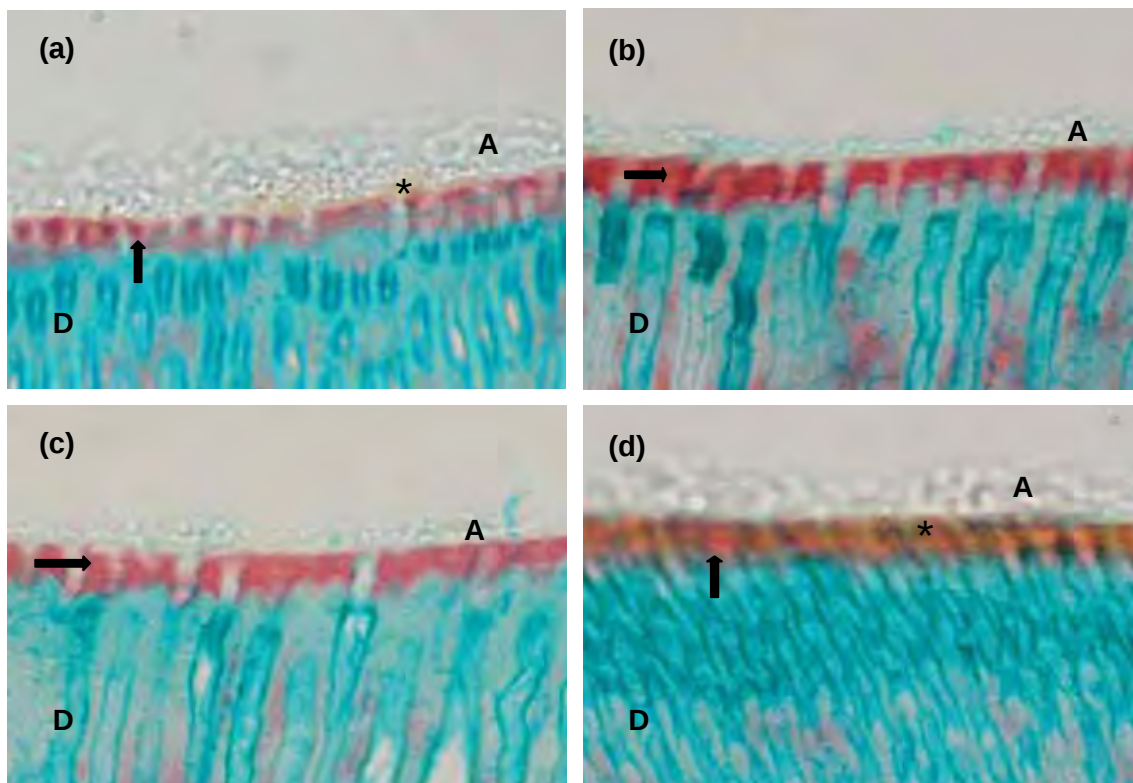


Figura 2. Espécimes de dentina afetada por cárie corados com tricrômico de Goldner. (a) Grupo controle (armazenagem em água por 24 h); (b) armazenagem em água por 6 meses; (c) armazenagem em solução de clorexidina 0,12% por 6 meses; e (d) armazenagem em óleo mineral por 6 meses. X400. Camada de adesivo em bege claro (A), colágeno hibridizado pelo adesivo em laranja (*), colágeno exposto em vermelho (seta) e dentina em verde (D).

Capítulo 2

**Efeito da clorexidina na resistência de união de
sistemas adesivos à dentina hígida e afetada
por cárie**



Efeito da clorexidina na resistência de união de sistemas adesivos à dentina hígida e afetada por cárie

Effect of chlorhexidine on bond strength of adhesive systems to sound and caries-affected dentin

Mariane Emi Sanabe emisanabe@hotmail.com

Cirurgiã Dentista, Mestre e Aluna de Doutorado em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Carlos Alberto de Souza Costa casouzac@foar.unesp.br

Cirurgião Dentista, Mestre, Doutor e Professor Adjunto do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Josimeri Hebling jhebling@foar.unesp.br

Cirurgiã Dentista, Mestre, Doutor e Professor Adjunto do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Endereço para Correspondência:

Josimeri Hebling

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Departamento de Clínica Infantil

Rua Humaitá, 1680, Araraquara/SP CEP14801-903

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

Título reduzido: Efeito da clorexidina na adesão a dentina afetada por cárie

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da clorexidina na resistência de união (RU) imediata de sistemas adesivos convencionais e autocondicionantes à dentina hígida e afetada por cárie. Foram utilizados 48 molares hígidos para a obtenção de superfícies planas em dentina, das quais 24 foram submetidas ao processo microbiológico de indução de cárie. Os dentes foram divididos em 4 grupos de acordo com o sistema adesivo: Adper Scotchbond MP, Adper Single Bond 2, Clearfil SE Bond e Adper Prompt L-Pop. Após remoção do tecido cariado ou sobre a dentina hígida, em 50% dos dentes para cada sistema adesivo (n=4) foi utilizada clorexidina 2% por 60 s. Em seguida, os sistemas adesivos foram aplicados e a coroa reproduzida em resina composta. Os dentes foram seccionados para a produção de espécimes (0,81 mm²), os quais foram submetidos ao ensaio mecânico de microtração. Os valores de resistência de união (RU) foram analisados pelos testes ANOVA a dois critérios e Tukey ($\alpha=0,05$). Os resultados demonstraram que na ausência de clorexidina, os maiores valores de RU foram produzidos sobre a dentina hígida, enquanto valores similares para ambos os substratos foram obtidos na presença desse agente. A clorexidina não influenciou nos valores de RU quando os sistemas adesivos foram aplicados sobre a dentina hígida, porém sobre a dentina afetada por cárie, o uso desse agente resultou em melhora significativa da RU do sistema Adper Prompt L-Pop.

Relevância clínica: Dentina hígida e afetada por cárie são substratos que coexistem na maioria dos preparos cavitários. Assim, a clorexidina pode ser incorporada aos protocolos de adesão uma vez que não interfere negativamente no desempenho adesivo imediato de sistemas aplicados sobre ambos os substratos.

INTRODUÇÃO

A dentina acometida pelo processo carioso apresenta características químicas, físicas e biológicas que a diferem da dentina hígida, resultantes, direta ou indiretamente, da dinâmica do biofilme dentário. É composta de duas camadas denominadas infectada e afetada por cárie, sendo que a primeira apresenta-se clinicamente amolecida, resultante da perda praticamente completa do conteúdo mineral, rede de colágeno irreversivelmente degradada e presença de um grande número de microrganismos proteolíticos.^{1,2} A segunda camada apresenta-se endurecida em relação a primeira, embora ainda com menor conteúdo mineral e maior presença de porosidade na zona de dentina intertubular, em relação à dentina hígida.³⁻⁶ Adicionalmente, apresenta rede de colágeno desorganizada porém passível de remineralização e menor número de microrganismos.^{1,2} Além disso, a dentina cariada apresenta cristais de fosfato tricálcico ácido-resistentes decorrentes da recristalização da apatita,^{6,7} os quais obliteram a entrada dos túbulos dentinários reduzindo a permeabilidade deste tecido.⁸

Todas essas características afetam negativamente a adesão de materiais a esse substrato. Tem sido demonstrada maior desmineralização da dentina em profundidade por soluções ácidas devido ao menor conteúdo mineral intertubular^{6,9} assim como limitações quanto à infiltração monomérica dos túbulos dentinários devido a sua obliteração por cristais ácido resistentes.^{6,8,9} Estudos de adesão à dentina afetada por cárie demonstram a formação de camadas híbridas mais espessas,^{6,10,11} menores valores de resistência de união^{2,4,10-12} e maior exposição da zona de dentina desmineralizada na base da camada híbrida em relação à dentina hígida.^{6,13}

Tem sido demonstrado que a união resina/dentina é susceptível a degradação hidrolítica¹⁴ e enzimática.¹⁵ Essa última é responsável pela deterioração do colágeno

exposto na interface, sendo mediada por endopeptidases zinco-cálcio dependentes denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs).¹⁶ Essas enzimas estão presentes na própria matriz dentinária sendo liberadas pela dissolução mineral durante o processo de formação de cárie,¹⁷ assim como pela dissolução com ácido fosfórico¹⁸ ou monômeros ácido presentes nos sistemas autocondicionantes.¹⁹

A degradação das fibrilas de colágeno expostas na união resina-dentina, embora inevitável, pode ser atenuada por substâncias sintéticas que mimetizam a ação dos inibidores biológicos teciduais (TIMPs) das MMPs. Uma dessas substâncias é a clorexidina, a qual impede a ação das MMP-2 e MMP-9 mesmo em baixas concentrações.²⁰ A aplicação da clorexidina posteriormente ao condicionamento ácido da dentina não influencia negativamente os valores de resistência de união imediata in vitro^{21,22} e em longo prazo in vitro²³ e in vivo.^{15,22,24} Entretanto, dentre os poucos trabalhos envolvendo a utilização da clorexidina como inibidor de MMPs, apenas dois utilizaram espécimes obtidos de dentes cariados^{15,25} e outros dois investigaram sua associação com sistemas autocondicionantes,^{21,26} porém utilizando como substrato a dentina hígida. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da aplicação de clorexidina sobre a resistência de união produzida por diferentes sistemas adesivos sobre a dentina hígida e afetada por cárie. As hipóteses nulas testadas foram que: (1) os sistemas adesivos não diferem no seu desempenho aplicado à dentina hígida e afetado por cárie; e (2) a utilização de clorexidina não exerce efeito sobre esse desempenho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Quarenta e oito terceiros molares humanos hígidos foram coletados para este estudo, cujo protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da

faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Protocolo nº. 26/07). Foram incluídos no estudo apenas dentes hígidos que apresentavam coroas sem áreas hipoplásicas. Os dentes, após a remoção dos restos teciduais e profilaxia com pedra pomes em água, foram armazenados em solução de timol a 0,2% sob refrigeração (4°C) e utilizados dentro de três meses após sua obtenção.

Superfícies planas em dentina foram produzidas após a remoção da metade oclusal da coroa por meio de um corte transversal realizado com auxílio de cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltd., Lake Bluf, IL, EUA) equipada com disco diamantado (n.11-4254, Buehler Ltd., Lake Bluf, IL, EUA), sob lubrificação constante (300 rpm e 200gf). As superfícies foram inspecionadas em lupa estereoscópica (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) com 30 vezes de aumento para comprovar a ausência de remanescentes de esmalte.

Indução artificial da lesão de cárie

Vinte e quatro dos dentes inicialmente selecionados tiveram suas raízes seladas com resina composta. Em seguida, foram impermeabilizados com uma camada de adesivo epóxi (ARALDITE, Ciba Especialidades Químicas Ltda., São Paulo, Brasil) e outra de esmalte ácido resistente (Colorama, CEIL Com. Exp. Ind. Ltda, São Paulo, Brasil), deixando apenas a superfície dentinária exposta. Os dentes foram suspensos com auxílio de um fio ortodôntico em um béquero contendo água destilada para esterilização em autoclave por 20 minutos a 121 °C. A solução cariogênica consistiu de 3,7 g de BHI caldo (Brain Heart Infusion, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), 2 g de sacarose (Synth; LabSynth, São Paulo, SP, Brazil), 1 g glicose (Synth; LabSynth, São Paulo, SP, Brazil) e 0,5 g de extrato de levedura (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) para cada 100 mL de água destilada. Essa solução foi

esterilizada (autoclave por 20 minutos a 121 °C) previamente a inoculação de 2% de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC25175 (Coleção de Culturas Tropical Fundação André Toselo) (10^8 UFC/mL). Os dentes foram suspensos no meio cariogênico e o conjunto levado 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, os dentes foram novamente autoclavados. 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.

Procedimentos adesivos

A superfície cariada foi removida com auxílio de broca esférica de aço nº 4 (KG Sorensen, Barueri - SP, BR) em baixa rotação, a qual foi trocada por uma nova a cada 4 dentes. A dentina cariada amolecida foi removida até a obtenção de uma dentina mais endurecida e resistente ao toque com sonda exploradora sem pressão. Esse, assim como os demais procedimentos, foi realizado por um único operador previamente treinado.

Um corte adicional de aproximadamente 0,5 mm foi realizado para os dentes mantidos hígidos com o objetivo de compensar a dentina removida dos dentes cariados. Sobre a dentina hígida, brocas esféricas também foram utilizadas por 30 segundos para que a smear layer fosse produzida pelo mesmo tipo de instrumento de corte.

Os dentes, hígidos e cariados, foram inicialmente divididos, aleatoriamente, segundo a aplicação ou não de clorexidina (n=12). Em seguida, foram subdivididos segundo o sistema adesivo (Adper Scotchbond Multi Purpose, Adper Single Bond 2,

Clearfil SE Bond e Adper Prompt L-Pop), cujas informações principais estão apresentadas na Tabela 1. Ao final, dezesseis grupos (n=3) foram delineados considerando-se todas as variáveis do estudo.

Dessa forma, em metade dos dentes para cada sistema adesivo foram aplicados 20 µL de clorexidina a 2% ou o mesmo volume de água deionizada posteriormente ao condicionamento ácido para os sistemas convencionais e previamente a aplicação do primer ácido para o sistema Clearfil SE Bond e do sistema Prompt L-Pop. As soluções foram mantidas passivamente sobre a superfície de dentina, previamente condicionada ou não, por 60 segundos. Em seguida, para os sistemas convencionais, o excesso da solução foi removido com papel absorvente para a obtenção de uma superfície úmida, enquanto que para os sistemas autocondicionantes, a superfície foi seca com leves jatos de ar. Os sistemas adesivos foram aplicados segundo as recomendações dos respectivos fabricantes (Tabela 1) e fotoativados com o aparelho de luz Optilux 500 (Kerr, Danbury, CT, EUA), cuja irradiância foi monitorada com radiômetro ($490 \pm 10 \text{ mW/cm}^2$). A reconstrução da coroa foi realizada em resina composta Filtek Z250 em três incrementos de 1 mm fotoativados individualmente por 20 s. Então, os dentes foram armazenados por 24 horas a 37 °C.

Ensaio mecânico de microtração

Os dentes foram seccionados longitudinalmente para a obtenção de espécimes com área transversal de secção de $0,81 \text{ mm}^2$, os quais foram inspecionados em lupa estereoscópica com aproximadamente 30 vezes de aumento. Espécimes que apresentaram defeitos na interface, bolhas ou irregularidades nas proximidades da união resina-dentina, foram excluídos da amostra e os selecionados tiveram sua área adesiva

individualmente mensurada com paquímetro digital (Mod. 500- 144b, Mitutoyo Sul Americana Ltda., São Paulo, Brasil) com resolução de 0,01 mm.

Cada espécime foi fixado em um dispositivo para o ensaio mecânico de microtração com cola de cianoacrilato (Super Bonder Gel e Ativador 7456, Henkel Loctite Ltda, São Paulo, Brasil) e o conjunto acoplado a uma máquina de testes mecânicos (Material Test System, MTS 810; Minneapolis, MN, EUA), previamente ajustada para forças de tração, com célula de carga de capacidade máxima de 1 kN, sendo a velocidade do atuador de 0,5 mm/min.

Imediatamente após o teste de microtração, as metades obtidas de cada espécime foram armazenadas por 48 horas em glutaraldeído 2%. As fraturas foram classificadas em: (1) coesivas da resina ou (2) dentina; (3) adesivas e (4) mistas. A leitura foi realizada em lupa estereoscópica em aumentos variados (entre 30 e 60X), que permitissem a análise adequada.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Três espécimes não fraturados de cada grupo foram aleatoriamente selecionados para análise em MEV. Os espécimes foram embebidos em resina epóxica quimicamente ativada (Epoxicure - Buehler Ltd., Lake Bluf, IL, EUA) e polidos sequencialmente com lixas de carbetto de silício de granulação decrescente (320, 600, 1200 e 2000). Em seguida foram imersos em ácido clorídrico a 6N por 15 s e posteriormente em hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos. Em seguida, os espécimes foram desidratados em soluções de concentração crescente de etanol (30%, 50% e 70 por 30 minutos cada, 95% e 100% por 60 minutos) e imersos em hexametildisilazano (HMDS, Ted Pella, Redding, CA, EUA) por 30 minutos. Os

mesmos foram mantidos em dessecadora a vácuo por 24 horas e posteriormente metalizados com ouro e examinados em MEV (LEO 435VP, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Análise Estatística

Aos valores de resistência de união (MPa) obtidos para cada sistema adesivo foram aplicados os testes estatísticos de análise de variância a dois critérios fixos (substrato dentinário vs. aplicação de clorexidina). Testes de Tukey foram utilizados para comparações múltiplas aos pares quando a hipótese nula de igualdade foi rejeitada. Todos os testes foram considerados ao nível pré-estabelecido de significância de 5%. Os dados referentes à leitura das fraturas foram analisados do modo descritivo.

RESULTADOS

Resistência de união

Os valores médios de resistência de união (MPa) produzidos pelos sistemas adesivos em função do substrato dentinário e da aplicação de clorexidina estão apresentados na Tabela 2. Na ausência de clorexidina, a resistência de união produzida sobre a dentina hígida foi significativamente superior a produzida sobre a dentina afetada por cárie para todos os sistemas adesivos ($p > 0,05$). Entretanto, na presença de clorexidina, os valores de resistência de união obtidos para todos os sistemas adesivos sobre a dentina afetada por cárie não diferiram estatisticamente dos valores obtidos sobre a dentina hígida ($p > 0,05$).

A utilização de clorexidina não influenciou os valores de resistência de união dos sistemas adesivos Scotchbond MP, Single Bond 2 e Clearfil SE Bond quando

aplicados sobre a dentina hígida ou afetada por cárie ($p>0,05$). Por outro lado, os valores de resistência de união produzidos pelo sistema adesivo simplificado Prompt L-Pop quando aplicado sobre a dentina afetada por cárie foram positivamente afetados na presença de clorexidina, resultando em valores estatisticamente superiores aos produzidos sobre o mesmo tipo de substrato sem a utilização desse agente ($p<0,05$).

Análise das Fraturas

A frequência absoluta e em porcentagem dos tipos de fratura detectados para cada grupo está descrita na Tabela 3. Falhas prematuras, ou seja, ocorridas previamente ao ensaio mecânico, foram observadas apenas para os grupos onde a dentina afetada por cárie foi utilizada como substrato para adesão, com exceção dos grupos do sistema adesivo Scotchbond MP. Essas falhas não foram consideradas para a análise estatística dos dados. Fraturas coesivas do substrato dentinário ou da resina composta ocorreram em pequeno número. Predomínio de fraturas envolvendo a união, representadas pelas fraturas adesivas e mistas, foi observado para todos os grupos, independente do sistema adesivo utilizado bem como da aplicação ou não da clorexidina sobre a superfície dentinária hígida ou cariada. Nenhum padrão de distribuição dessas fraturas foi observado em função dessas variáveis.

Morfologia da interface de união (MEV)

Interfaces produzidas pelos sistemas convencionais simplificados Scotchbond MP (Figura 1) e Single Bond 2 apresentaram numerosos e longos tags de resina com ramificações laterais para todas as condições do experimento. Nenhuma distinção morfológica foi observada entre as interfaces produzidas com a dentina hígida (Figuras

1a e 1b) e dentina afetada por cárie (Figuras 1c e 1d), assim como entre espécimes que receberam (Figuras 1b e 1d) ou não (Figuras 1a e 1c) a aplicação de clorexidina. Camada híbrida mais uniforme foi observada para a dentina hígida em comparação a dentina afetada por cárie

Para os sistemas adesivos autocondicionantes Clearfil SE Bond e Prompt L-Pop (Figura 2), de forma geral, tags de resina predominantemente mais curtos foram observados. Especificamente para o último, camadas híbridas mais espessas foram identificadas sobre a dentina afetada por cárie (Figuras 2c e 2d) em comparação as observadas sobre a dentina hígida (Figuras 1a e 1b). Tags de resina mais longos foram vistos quando o sistema Prompt L-Pop foi aplicado na presença de clorexidina (Figuras 2b e 2d) em comparação aos observados na ausência desse agente (Figuras 2a e 2c).

DISCUSSÃO

A maioria dos trabalhos que avaliou o desempenho adesivo de sistemas de união à dentina afetada por cárie utilizou dentes naturalmente cariados.^{2-4,10,11,27,28} Entretanto, devido a dificuldades relacionadas a padronização desse substrato, assim como limitada área para adesão, métodos para o desenvolvimento de lesões artificiais vêm sendo investigados.²⁹ O processo de cárie ocorre devido a desmineralização do componente inorgânico quando o pH se estabelece em níveis abaixo de 5,5 causado pela ação, principalmente, das bactérias *S mutans*²⁹⁻³¹. Esse evento é seguido da degradação da matriz de colágeno, a qual é mediada por proteases bacterianas e pela liberação das MMPs presentes na própria matriz dentinária.^{16,17} No intuito de simular esses eventos, no presente estudo, lesões de cárie dentinária foram produzidas in vitro por meio de um método microbiológico, utilizando *S mutans*. Quando comparado a outros métodos

descritos na literatura, os quais se baseiam exclusivamente em eventos químicos (ciclagem de pH, soluções ou géis ácidos), o método microbiológico resulta em um substrato com características mais semelhantes, como textura e coloração, à dentina cariada naturalmente.²⁹⁻³¹ Além disso, apenas nesse método o processo de degradação do colágeno por esterases bacterianas é reproduzido.

Inferior resistência de união foi observada no presente estudo para todos os sistemas adesivos quando aplicados sobre a dentina afetada por cárie sem clorexidina, em comparação a dentina hígida. Esses resultados corroboram com os de outros estudos que avaliaram sistemas convencionais e autocondicionantes.^{2-4,10,11,27,28,32} Desempenho adesivo imediato inferior à dentina afetada por cárie é atribuído a algumas particularidades desse substrato quando comparado a dentina hígida, como por exemplo, (1) presença de cristais ácido-resistentes no interior dos túbulos dentinários que podem bloquear a infiltração monomérica e subsequente formação dos tags resinosos,^{2,4,28} (2) menor módulo de elasticidade devido ao menor conteúdo mineral^{2,11} e (3) dentina intertubular com maior número de porosidades, o qual está diretamente relacionado à extensão da perda mineral na lesão de cárie.^{7,33} Adicionalmente, na dentina afetada por cárie as fibrilas de colágenos apresentam redução do número de ligações cruzadas^{6,34} e as proteoglicanas apresentam alterações moleculares tais que influenciam a hidratação desse substrato.³⁵ Em conjunto, essas características favorecem a formação de zonas híbridas mais espessas,^{10,11} porém com maior número de imperfeições em seu interior,¹¹ assim como maior zona de colágeno exposto em sua base devido à incompleta infiltração da resina adesiva.^{28,36,37} A maior desmineralização observada quando a dentina afetada por cárie é condicionada com agentes ácidos também resulta em maior retenção de água na interface,⁶ o que favorece a ocorrência do fenômeno de separação

de fases,^{6,38} além de comprometer a polimerização.³⁹ Além de interferirem negativamente na resistência de união imediata, essas características tornam as interfaces produzidas sobre a dentina afetada por cárie menos estáveis longitudinalmente.¹¹

A degradação da interface adesiva é o resultado sinérgico de eventos que envolvem ambos os componentes poliméricos e orgânicos. Os primeiros são afetados exclusivamente pela degradação hidrolítica, enquanto que as fibrilas de colágeno são degradadas também pela ação enzimática.¹⁶ A participação de endopeptidases presentes na própria dentina (MMPs) no processo de degradação do colágeno exposto na união resina-dentina foi demonstrado pela primeira vez por Pashley et al.¹⁶ Nesse mesmo estudo, os autores observaram que a clorexidina atuou como inibidor dessas MMPs, resultando em preservação das fibrilas de colágeno tratadas com esse agente. Estudos têm demonstrado o efeito positivo da aplicação de soluções de clorexidina sobre a dentina previamente condicionada com ácido fosfórico na desaceleração da degradação de interfaces adesivas produzidas *in vitro*^{22,23,26} e *in vivo*.^{15,24}

No presente estudo, a utilização de clorexidina não exerceu efeito negativo sobre a resistência de união imediata de nenhum dos sistemas adesivos quando aplicados à dentina hígida. Esses resultados estão de acordo com os descritos em estudos prévios.^{21-24,26,40} Isso demonstra que, apesar de ser uma molécula relativamente de alto peso molecular (PM = 897,8 g/mol) quando comparada a alguns monômeros constituintes dos sistemas adesivos, como HEMA (PM = 130,0 g/mol) ou Bis-GMA (PM = 512,0 g/mol), o digluconato de clorexidina não influenciou negativamente a infiltração monomérica da dentina desmineralizada. De fato, interfaces observadas em MEV produzidas pelo mesmo sistema adesivo sobre a dentina hígida com ou sem a utilização

de clorexidina apresentaram características morfológicas indistintas. Ainda, para os sistemas convencionais Scotchbond MP e Single Bond 2, uma vez que foi utilizada uma solução aquosa de clorexidina, sua aplicação garantiu a manutenção da expansão da rede de colágeno e, por consequência, dos espaços interfibrilares, os quais constituem as vias de difusão dos monômeros resinosos para posterior polimerização in situ.

Apesar dos favoráveis resultados observados para a dentina hígida,^{21-24,26,40} pouco se tem investigado o efeito da clorexidina sobre a resistência de união de sistemas adesivos aplicados à dentina afetada por cárie, a despeito desse substrato ser, provavelmente, o mais predominante nos preparos cavitários. No presente estudo, a utilização de clorexidina previamente a aplicação dos sistemas adesivos exerceu efeito positivo sobre a resistência de união a dentina afetada por cárie de tal forma que os valores finais não diferiram dos obtidos sobre a dentina hígida também tratada com clorexidina.

Embora aumento dos valores de resistência de união tenha sido observado para todos os sistemas adesivos quando aplicados à dentina afetada por cárie na presença de clorexidina, especificamente para o sistema Adper Prompt, resultados significativamente superiores foram obtidos em comparação a sua aplicação sobre o mesmo substrato, porém sem aplicação desse agente. Efeito positivo da aplicação de clorexidina também foi demonstrado por Erhardt et al.,²⁵ que investigaram a ação de inibidores de MMPs sobre o desempenho adesivo de um sistema convencional simplificado aplicado à dentina naturalmente afetada por cárie. Segundo esses autores, alterações proteicas significantes para o mecanismo de adesão ocorrem nesse substrato. Proteoglicanas, localizadas na superfície do colágeno e responsáveis pela ligação entre fibrilas adjacentes, são importantes proteínas relacionadas à manutenção da expansão da matriz

de dentina na presença de água após sua desmineralização, devido a sua alta afinidade por essas moléculas.⁴¹⁻⁴³ Na dentina afetada por cárie, entretanto, essas proteínas apresentam alterações moleculares tais que dificultam a manutenção da hidratação da matriz desmineralizada.³⁵ Adicionalmente, as fibrilas de colágeno nesse substrato apresentam reduzidas ligações cruzadas quando comparadas as fibrilas da dentina hígida.^{6,34} Uma vez que a clorexidina apresenta propriedades como ligação a grupos fosfato,²⁰ afinidade pela estrutura dentária após condicionamento²⁰ e conseqüentemente aumento da energia livre de superfície desse tecido,⁴⁰ a utilização desse agente sobre a dentina afetada por cárie pode favorecer sua impregnação por monômeros resinosos. A clorexidina poderia interagir com sítios do colágeno exposto e reverter, parcial ou totalmente, a contração da dentina desmineralizada pelo condicionamento ácido e não completamente reexpandida na presença de umidade devido as alterações das proteoglicanas. A carga positiva dos grupos guanidinas presentes na molécula de clorexidina ajudam a regular as alterações estruturais da dentina desmineralizada pelo preenchimento de espaços, união e organização de moléculas de água,^{20,41} funções essas exercidas pelas proteoglicanas na dentina sadia. Entretanto, permanece inconclusivo porque a manifestação dos efeitos benéficos descritos acima foi significativa apenas para o sistema Prompt. Pode ser especulado que o conteúdo mineral residual no substrato condicionado por esse sistema favoreceria a ligação de moléculas de clorexidina, uma vez que esse agente catiônico apresenta afinidade por grupamentos fosfato.²⁰

O efeito da associação da clorexidina ao protocolo de adesão de sistemas autocondicionantes, mesmo aplicados sobre a dentina hígida, tem sido pouco investigado.^{21,26} Campos et al.²⁶ não encontraram diferença estatisticamente significativa nos valores médios de resistência de união de um sistema autocondicionante

simplificado quando aplicado a dentina hígida na presença de clorexidina em diferentes concentrações (0,2 e 2%) quando comparado a dentina hígida. O mesmo foi observado por Castro et al.²¹ para um sistema autocondicionante de dois passos, o que está de acordo com os resultados observados no presente estudo.

As novas propostas de protocolos adesivos devem levar em consideração que ambos os substratos, dentina hígida e afetada por cárie, coexistem na maioria dos preparos cavitários. O presente estudo demonstrou que a incorporação da clorexidina ao protocolo de adesão a dentina hígida não exerceu influência sobre o desempenho adesivo imediato tanto dos sistemas convencionais como autocondicionantes, enquanto que efeito positivo foi verificado quando esses sistemas foram aplicados à dentina afetada por cárie. Baseados nesses resultados promissores novos experimentos devem ser realizados com o objetivo de observar a influência da incorporação da clorexidina nos protocolos adesivos sobre a longevidade das interfaces adesivas produzidas, principalmente, sobre a dentina afetada por cárie, uma vez que essa proposta fundamenta-se na inibição das enzimas responsáveis pela degradação do colágeno exposto na união resina-dentina.

CONCLUSÃO

A clorexidina não interferiu na resistência de união dos sistemas convencionais e autocondicionantes à dentina hígida e melhorou o desempenho adesivo desses materiais quando aplicados à dentina afetada por cárie.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela agência brasileira de fomento à pesquisa FAPESP (Pr. nº. 2008/00198-7). Os autores agradecem a CAPES pela concessão de bolsa de Doutorado e ao Prof. Dr. Elliot W. Kitajima, diretor do Centro de Microscopia Eletrônica NAP/MEPA (Escola de Agronomia Luiz de Queiróz, ESALQ, USP) e Dr. Renato Barbosa Salaroli pelo apoio técnico prestado durante a utilização do microscópio eletrônico.

REFERÊNCIAS

1. Fusayama T (1979) Two layers of carious dentine: Diagnosis and treatment *Operative Dentistry* **4(2)** 63–70.
2. Nakajima M, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Yoshiyama M, Ebisu S, Ciucchi B, Russell CM & Pashley DH (1995) Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesives *Journal of Dental Research* **74(10)** 1679-1688.
3. Nakajima M, Sano H, Zheng L, Tagami J & Pashley DH (1999) Effect of moist vs. dry bonding to normal vs. caries-affected dentin with Scotchbond Multi-Purpose Plus *Journal of Dental Research* **78(7)** 1298-1303.
4. Yoshiyama M, Urayama A, Kimochi T, Matsuo T & Pashley DH (2000) Comparison of conventional vs self-etching adhesive bonds to caries-affected dentin *Operative Dentistry* **25(3)** 163-169.
5. Zheng L, Hilton JF, Habelitz S, Marshall SJ & Marshall GW (2003) Dentin caries activity status related to hardness and elasticity *European Journal of Oral Science* **111(3)** 243-252.

6. Wang Y, Spencer P, Walker MP (2007) Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy *Journal of Biomedical Materials Research* **81A** 279-286.
7. Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T & Fusayama T (1983) The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin *Journal of Dental Research* **62(1)** 7-10.
8. Tagami J, Hosoda H, Burrow MF & Nakajima M (1992) Effect of aging and caries on dentin permeability *Proceedings of the Finnish Dental Society* **88(Suppl 1)** 1491-1454.
9. Arrais CA, Giannini M, Nakajima M & Tagami J (2004) Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine *European Journal of Oral Science* **112(5)** 458-464.
10. Pereira PN, Nunes MF, Miguez PA, Swift EJ, Jr (2006) Bond strengths of a 1-step self-etching system to caries-affected and normal dentin *Operative Dentistry* **31(6)** 677-681.
11. Erhardt MC, Toledano M, Osorio R, Pimenta LA (2008) Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: effects of long-term water exposure *Dental Materials* **24(6)** 786-798.
12. Kimochi T, Yoshiyama M, Urayama A & Matsuo T (1999) Adhesion of a new commercial self-etching/self-priming bonding resin to human caries-infected dentin *Dental Materials Journal* **18(4)** 437-443.
13. Haj-Ali R, Walker M, Williams K, Wang Y, Spencer P (2006) Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces *Journal of Prosthodontics* **15(2)** 82-88.

14. Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR & Pashley DH (2004) Effects of storage media on mechanical properties of adhesive systems *American Journal of Dentistry* **17(2)** 104-108.
15. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L & Tay FR (2005) Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo *Journal of Dental Research* **84(8)** 741-746.
16. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM & Ito S (2004) Collagen degradation by host-derived enzymes during aging *Journal of Dental Research* **83(3)** 216-221.
17. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M & Salo T (1998) The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions *Journal of Dental Research* **77(8)** 1622-1629.
18. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjaderhane L, Toledano M, Pashley E L & Tay FR (2006) Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives *Biomaterials* **27(25)** 4470-4476.
19. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjaderhane L, Tay FR & Pashley DH (2006) Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives *European Journal of Oral Science* **114(2)** 160-166.
20. Gendron R, Grenier D, Sorsa T & Mayrand D (1999) Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8 and 9 by chlorhexidine *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **6(3)** 437-439.

21. de Castro FL, de Andrade MF, Duarte Júnior SL, Vaz LG & Ahid FJ (2003) Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin *Journal of Adhesive Dentistry* **5(2)** 129-138.
22. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ & Pashley DH (2007) The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo *Operative Dentistry* **32(2)** 107-111.
23. Carrilho MR, Carvalho RM, de Góes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH & Tjaderhane L (2007) Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro *Journal of Dental Research* **86(1)** 90-94.
24. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L & Pashley DH (2007) In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine *Journal of Dental Research* **86(6)** 529-533.
25. Erhardt MCG, Osorio R & Toledano M (2008) Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin *Journal of Dentistry* **36(12)** 1068-1073.
26. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC & Zielak JC (2009) Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing *Journal of Dentistry* **37(2)** 108-114.
27. Nakajima M, Ogata M, Okuda M, Tagami J, Sano H & Pashley DH. (1999) Bonding to caries-affected dentin using self-etching primers *American Journal of Dentistry* **12(6)** 309-314.

28. Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Itou K, Carvalho RM, Nakajima M & Pashley DH (2002) Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin *Journal of Dental Research*. **81(8)** 556-560.
29. Carvalho FG, Fucio SBP, Sinhoreti MAC, Correr-Sobrinho L & Puppini-Rontani RM (2008) Confocal laser scanning microscopic analysis of the depth of dentin caries-like lesions in primary and permanent teeth *Brazilian Dental Journal* **19(2)** 139-144.
30. Clarkson BH, Wefel & Miller J (1984) A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacteria in vitro *Journal of Dental Research* **63(10)** 1186-1189.
31. Marsh PD (1995) The role of microbiology in models of dental caries *Advances in Dental Research* **9(3)** 244-254.
32. Omar H, El-Badrawy W, El-Mowafy O, Atta A & Saleem B (2007) Microtensile bond strength of resin composite bonded to caries-affected dentin with three adhesives *Operative Dentistry* **32(1)** 24-30.
33. Marshall GW, Jr., Chang YJ, Gansky SA & Marshall S (2001). Demineralization of caries-affected transparent dentin by citric acid: an atomic force microscopy study. *Dental Materials* **17(1)** 45-52.
34. Spencer P, Wang Y, Katz JL & Misra A (2005) Physicochemical interactions at the dentin/adhesive interface using FTIR chemical imaging *Journal of Biomedical Optics* **10(3)** 031104.
35. Suppa P, Ruggeri A, Jr., Tay FR, Prati C, Biasotto M, Falconi M, Pashley DH & Breschi L (2007) Reduced antigenicity of type I collagen and proteoglycans in sclerotic dentin *Journal of Dental Research* **85(2)** 133-137.

36. Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H & Oguchi H (2000) The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer *Dental Materials* **6(6)** 406-411.
37. Nakajima M, Kitasako Y, Okuda M, Foxton RM & Tagami J (2005) Elemental distributions and microtensile bond strength of the adhesive interface to normal and caries-affected dentin. *Journal of Biomedical Materials Research* **72(2)** 268-275.
38. Spencer P, Wang Y, Walker MP, Wieliczka DM & Swafford JR (2000) Interfacial chemistry of the dentin/adhesive bond *Journal of Dental Research* **79(7)**:1458-63.
39. Wang Y & Spencer P (2005) Interfacial chemistry of class II composite restoration: Structure analysis *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **75A(3)** 580-587.
40. Perdigão J, Denehy GE & Swift EJ Jr (1994) Effects of chlorhexidine on dentin surfaces and shear bond strengths *American Journal of Dentistry* **7(2)** 81-84.
41. Breschi L, Perdigao J, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M & Lopes M (2003) Immunocytochemical identification of type I collagen in acid-etched dentin *Journal Biomedical Materials Research A* **66(4)** 764-769.
42. Breschi L, Prati C, Gobbi P, Pashley D, Mazzotti G, Teti G & Perdigão J (2004) Immunohistochemical analysis of collagen fibrils within the hybrid layer: a FEISEM study *Operative Dentistry* **29(5)** 538-546.
43. Ruggeri Jr A, Prati C, Mazzoni A, Nucci C, Di Lenarda R, Mazzotti G, Mazzotti G & Breschi L (2007) Effects of citric acid and EDTA conditioning on exposed root dentin: An immunohistochemical analysis of collagen and proteoglycans *Archives of Oral Biology* **52(1)**:1-8.

Tabela 1. Tabela da composição (principais componentes), fabricantes, modo de aplicação e lote dos materiais utilizados no estudo.

Nome comercial	Principais componentes	Modo de aplicação	Lote
Adper Scotchbond Multi Purpose <i>(3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)</i>	<u>Primer</u> : água, HEMA e copolímero do ácido polialcenóico	Aplicação de uma camada e jato de ar por 5 s	6BC
	<u>Adesivo</u> : BISGMA, HEMA e fotoiniciador	Aplicação de uma camada e fotoativação por 10s	6PL
Adper Single Bond 2 <i>(3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)</i>	Bis-GMA, HEMA, diuretano dimetacrilato, copolímero do ácido polialcenóico, canforoquinona, água, etanol e glicerol 1.3 dimetacrilato, 10% em peso de nanopartículas de sílica	Aplicação de duas camadas, jatos de ar por 5s e fotoativação por 10s	5EK
Clearfil SE Bond <i>(Kuraray Med Inc, Osaka, Japão)</i>	<u>Primer</u> : 10-MDP, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, canforoquinona, N-N-dietanol toluidina, água	Aplicação por 20s e jatos de ar por 5s	00727A
	<u>Bond</u> : MDP, Bis-GMA, HEMA, dimetacrilato hidrofóbico, canforoquinona, N-N-dietanol-p-toluidina, sílica coloidal silanizada	Aplicação de uma camada e fotoativação por 10s	1044A
Adper Prompt L-Pop <i>(3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)</i>	<u>Blister A</u> : Metacrilatos fosfatados, fotoiniciador, estabilizante	Após mistura dos componentes, aplicação ativa por 15s, secagem por 5 s, aplicação de mais 1 camada por 3 s, jatos de ar por 5s e fotoativação por 10s	257205
	<u>Blister B</u> : Água, fluoretos, estabilizante		
Z250 <i>(3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)</i>	Resinas Bis-GMA, UDMA, Bis-HEMA, zircônia, sílica	3 camadas incrementais de 1mm fotoativadas por 20s cada	7KX
Scotchbond Etchant <i>(3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)</i>	Ácido fosfórico a 35%	Aplicado por 15s, lavagem com água por 10s e secagem com papel absorvente	7JA
Clorexidina s <i>(FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil)</i>	Digluconato de Clorexidina a 2%	Aplicação passiva de 20µL por 60s	050707

Abreviaturas: Bis-GMA: bisfenol-glicidil-dimetacrilato; HEMA: 2-hidroxi-etil-dimetacrilato; MDP: 10-metacriloiloxidecil-dihidrogenio-fosfato; UDMA – uretano dimetracrilato

Tabela 2. Valores médios de resistência de união (MPa) produzidos pelos sistemas adesivos em função do substrato (hígido ou afetado por cárie) e aplicação ou não da clorexidina.

Sistemas adesivos	Substrato	Clorexidina a 2%	
		Sim	Não
Scotchbond MP	Hígido	27,8 (12,6) [29]* ab**	33,5 (13,8) [33] a
	Afetado por cárie	30,5 (9,4) [34] ab	27,1 (10,7) [34] b
Single Bond 2	Hígido	28,2 (11,0) [29] ab	32,8 (9,5) [33] a
	Afetado por cárie	24,2 (9,5) [23] b	23,6 (10,8) [26] b
Clearfil SE Bond	Hígido	32,3 (11,4) [29] a	31,9 (12,1) [30] a
	Afetado por cárie	29,2 (9,6) [26] ab	27,2 (13,2) [29] b
Prompt L-Pop	Hígido	26,3 (10,2) [29] a	28,6 (9,2) [32] a
	Afetado por cárie	25,8 (9,8) [19] a	20,1 (8,5) [22] b

* os valores representam as médias (desvio padrão) em MPa [número de espécimes]

** para cada sistema adesivo, médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, $p > 0,05$)

Tabela 3. Distribuição dos tipos de fraturas em função do substrato, sistema adesivo e aplicação ou não de clorexidina.

Sistema adesivo	Substrato	Aplicação de clorexidina	
		Sim	Não
Adper Scotchbond MP	Hígido	A=23 (79,4%); CR =1 (3,4%); M =5 (17,2%)	A=23 (69,7%); CR =4 (12,1%); M =6 (18,2%)
	Afetado por cárie	A=20 (58,8,%); M =14 (41,2,%)	A=22 (64,7,%); CR =1 (2,9%); M =11 (32,4%)
Adper Bond 2	Hígido	A=21 (72,5%); CR =1 (3,4%); CD =1 (3,4%); M =6 (20,7%)	A = 20 (60,6%); CR =6 (18,2%); M =7 (22,2%)
	Afetado por cárie	A=13 (56,5%); M =10 (43,5%); FP=3	A=19 (73,1%); M =7 (26,9%); FP=4
Clearfil SE Bond	Hígido	A=16 (51,2%); CR =3 (10,3%); M =10 (34,5%)	A=19 (63,3%); CR =2 (6,7%); CD =1 (3,3%); M= 8 (26,7%)
	Afetado por cárie	A=17 (65,4%); CR =2 (7,7%); M =7 (26,9%); FP=3	A=13 (44,9%); CR =1 (3,4%); M =15 (51,7%); FP=5
Adper Prompt L-Pop	Hígido	A=19 (65,5%); CR =1 (3,4%); M =9 (31,1%)	A=29 (90,6%); M =3 (9,4%)
	Afetado por cárie	A=15 (78,9%); M =4 (21,1%); FP=5	A=15 (68,2%); M =7 (31,8%) FP=9

Abreviaturas: A = fratura adesiva; CR = fratura coesiva em resina; CD = fratura coesiva em dentina; M = fratura mista; FP = fratura prematura (ocorrida antes do ensaio mecânico)

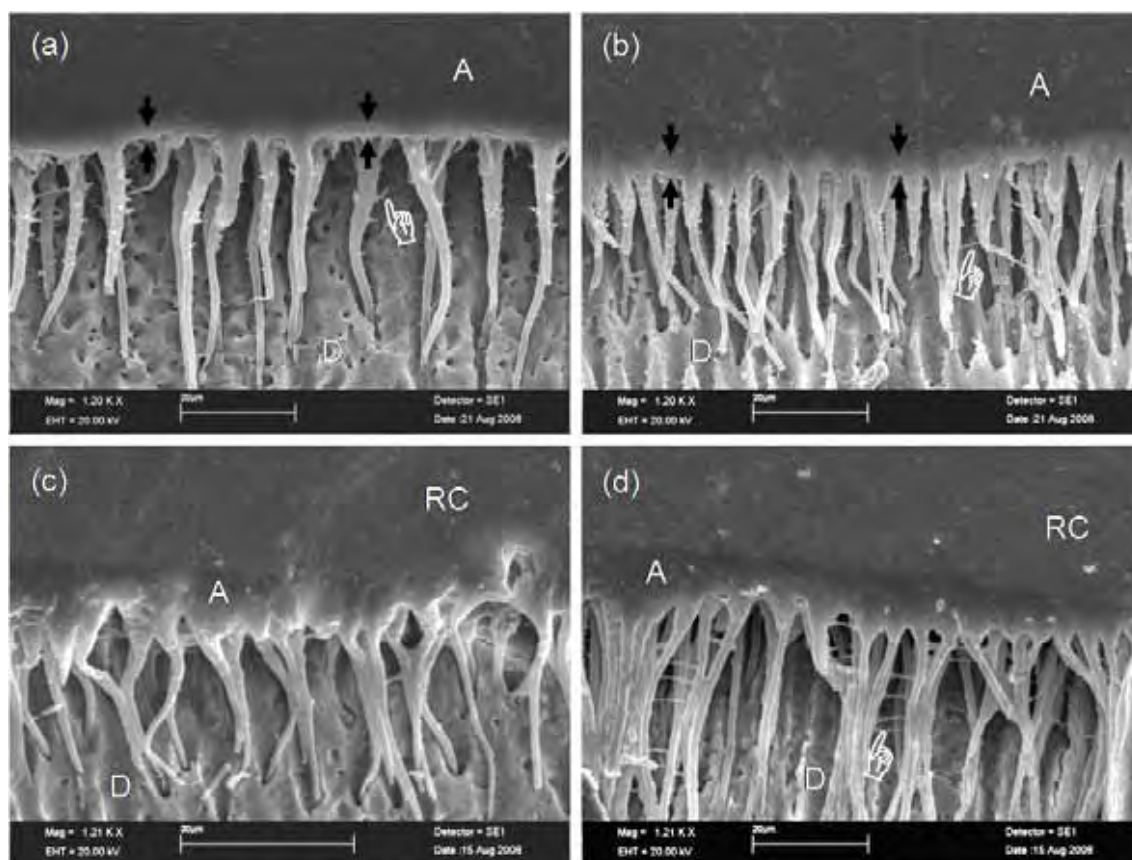


Figura 1. Fotomicrografias em MEV de interfaces produzidas com o sistema adesivo Adper Scotchbond MP. (1a) Dentina hígida sem clorexidina; (1b) dentina hígida com clorexidina; (1c) dentina afetada por cárie sem clorexidina; e (1d) dentina afetada por cárie com clorexidina. Foram observados longos tags de resina com ramificações laterais (*pointers*). Nenhuma diferença morfológica significativa foi observada entre os grupos com e sem clorexidina. D: dentina; A: adesivo; RC: resina composta.

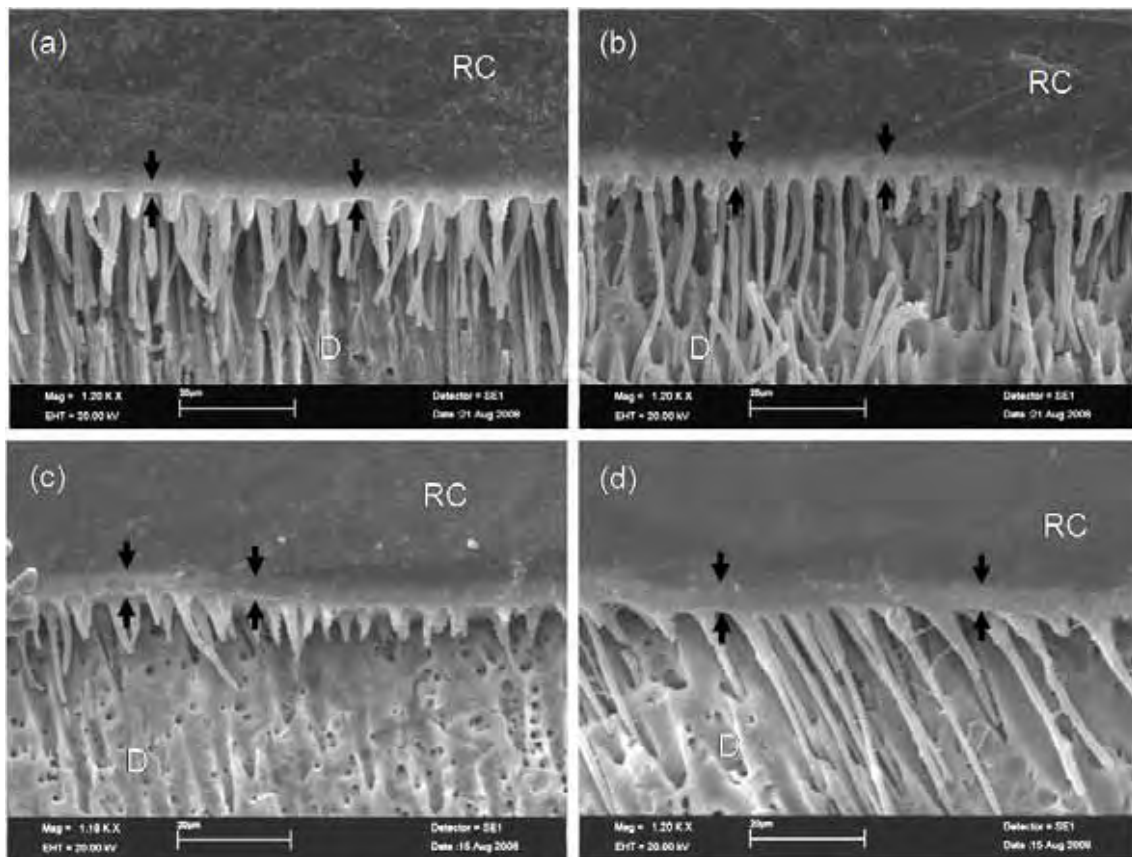


Figura 2. Fotomicrografias em MEV de interfaces produzidas com o sistema adesivo Adper Prompt L-Pop. (2a) Dentina hígida sem clorexidina; (2b) dentina hígida com clorexidina; (c) dentina afetada por cárie sem clorexidina; e (2d) dentina afetada por cárie com clorexidina. Grande número de tags de resina, porém mais curtos na ausência de clorexidina (2a e 2c). Camadas híbrida mais espessas foram observadas para a dentina afetada por cárie (2c e 2d) (entre setas). D: dentina; RC: resina composta.

Capítulo 3

**Degradação da união resina-dentina afetada por
cárie produzida na presença de clorexidina**



Degradação da união resina-dentina afetada por cárie produzida na presença de clorexidina

Degradation of resin-caries affected dentin bonds produced in the presence of chlorhexidine

Mariane Emi Sanabe

Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, São Paulo – Brasil.

Carlos Alberto de Souza Costa

Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, São Paulo – Brasil.

Josimeri Hebling

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

Endereço para Correspondência:

Josimeri Hebling

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Departamento de Clínica Infantil

Rua Humaitá, 1680, Araraquara/SP CEP14801-903

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

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da clorexidina na longevidade da união resina-dentina afetada por cárie. Superfícies planas em dentina foram produzidas em 48 molares hígidos, os quais foram submetidos ao processo microbiológico de indução de cárie. Os dentes foram divididos em 4 grupos de acordo com o sistema adesivo: Scotchbond MP, Single Bond 2, Clearfil SE Bond e Prompt L-Pop. 50% dos dentes para cada sistema (n=4) recebeu a aplicação de clorexidina 2% por 60 s. Após a reconstrução da coroa, os dentes foram seccionados para a produção de espécimes (0,81 mm²), os quais foram armazenados em água por 24 h ou 6 meses previamente ao ensaio mecânico de microtração. Os valores de resistência de união (RU) foram analisados pelos testes ANOVA a dois critérios e Tukey ($\alpha=0,05$). A aplicação da clorexidina não afetou a RU imediata, com exceção para o sistema Prompt onde valores significativamente maiores foram observados. Os valores de RU do sistema Clearfil SE Bond foram os mais estáveis, não sendo afetados pelas variáveis do estudo. Na ausência de clorexidina, valores inferiores de RU foram registrados para Scotchbond MP, Single Bond 2 e Prompt após 6 meses de envelhecimento. Entretanto, na presença desse agente, esses valores não diferiram dos obtidos após 24 h para os sistemas convencionais. Portanto a clorexidina exerceu efeito benéfico na estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie para os sistemas adesivos convencionais. Entre os sistemas autocondicionantes, as interfaces produzidas pelo sistema Clearfil SE Bond foram as mais estáveis, contrariamente ao observado para o sistema Prompt.

Palavras chaves: dentina, cárie dentária, adesivos dentinários, clorexidina, longevidade, resistência à tração

INTRODUÇÃO

Dentina hígida e dentina alterada pelo processo de cárie coexistem na maioria dos preparos cavitários. Idealmente, materiais que utilizam esses tecidos como substrato para adesão deveriam apresentar satisfatório desempenho de retenção e selamento a ambos. Entretanto, resistência de união inferior tem sido demonstrada para a dentina afetada por cárie em comparação à dentina hígida.¹⁻⁵ Isso ocorre em função de características particulares apresentadas por esse tecido como resultado da dinâmica do processo carioso, o qual envolve eventos físico-químicos e biológicos.

Após remoção da dentina infectada, o tecido residual, denominado dentina afetada por cárie,^{2,6} apresenta a dentina intertubular menos mineralizada e com maior número de porosidades,^{3,7-9} e presença de cristais de fosfato tricálcico ácido-resistentes, decorrentes da recristalização da apatita dissolvida, obliterando a entrada dos túbulos dentinários.^{9,10} Adicionalmente, alterações proteicas significantes para o mecanismo de adesão ocorrem nesse substrato. Proteoglicanas, localizadas na superfície do colágeno e responsáveis pela ligação entre fibrilas adjacentes, são importantes proteínas relacionadas à manutenção da expansão da matriz de dentina na presença de água após sua desmineralização, devido a sua alta afinidade por essas moléculas.¹¹⁻¹³ Na dentina afetada por cárie, entretanto, essas proteínas apresentam alterações moleculares tais que dificultam a manutenção da hidratação da matriz desmineralizada.¹⁴ Também, as fibrilas de colágeno nesse substrato apresentam reduzidas ligações cruzadas quando comparadas as fibrilas da dentina hígida.^{9,15}

Em conjunto, essas características favorecem a formação de zonas híbridas mais espessas,^{4,5} porém com maior número de imperfeições em seu interior,⁵ assim como maior zona de colágeno exposto em sua base devido à incompleta infiltração da resina

adesiva.¹⁶⁻¹⁸ Além de interferirem negativamente na resistência de união imediata, essas características tornam as interfaces produzidas sobre a dentina afetada por cárie menos estáveis longitudinalmente.⁵

O quase completo desaparecimento das camadas híbridas após envelhecimento na cavidade bucal tem sido atribuído a ação de metaloproteinases da matriz dentinária (MMPs) sobre as fibrilas de colágeno expostas nessas camadas.¹⁹⁻²² Entretanto, os efeitos indesejáveis dessas enzimas proteolíticas endógenas podem ser minimizados pela ação de inibidores sintéticos como a clorexidina,¹⁹⁻²⁶ os quais mimetizam a ação de inibidores teciduais naturais (TIMPs).²³ Estudos têm demonstrado que, além de não interferir na resistência de união imediata de sistemas adesivos à dentina hígida,^{22,24,27} esse inibidor preserva a integridade da camada híbrida produzida em sua presença.²⁰⁻²²

Entretanto, apesar da desaceleração da degradação da união resina-dentina na presença de clorexidina,²⁰⁻²² apenas o estudo de Hebling et al.²⁰ avaliou o efeito desse inibidor de MMPs na longevidade de camadas híbridas formadas por um sistema convencional simplificado sobre a dentina afetada por cárie in vivo. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar a degradação da união resina-dentina afetada por cárie produzida por sistemas adesivos convencionais e autocondicionantes na presença de clorexidina. A hipótese nula testada foi a aplicação de clorexidina não interfere na resistência de união após o envelhecimento em água.

MATERIAIS E MÉTODOS

Quarenta e oito terceiros molares humanos hígidos foram coletados para este estudo cujo protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Protocolo nº. 26/07). Foram

incluídos no estudo apenas dentes hígidos que apresentavam coroas sem áreas hipoplásicas. Os dentes, após a remoção dos restos teciduais e profilaxia com pedra pomes em água, foram armazenados em solução de timol a 0,2% sob refrigeração (4°C) e utilizados dentro de três meses após sua obtenção.

Superfícies planas em dentina foram produzidas após a remoção da metade oclusal da coroa por meio de um corte transversal realizado com auxílio de cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltd., Lake Bluf, IL, EUA) equipada com disco diamantado (n.11-4254, Buehler Ltd., Lake Bluf, IL, EUA), sob lubrificação constante (300 rpm e 200gf). As superfícies foram inspecionadas em lupa estereoscópica (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) com 30 vezes de aumento para comprovar a ausência de remanescentes de esmalte.

Indução artificial da lesão de cárie

Os dentes selecionados tiveram suas raízes seladas com resina composta. Em seguida, foram impermeabilizados com uma camada de adesivo epóxi (ARALDITE, Ciba Especialidades Químicas Ltda., São Paulo, Brasil) e outra de esmalte ácido resistente (Colorama, CEIL Com. Exp. Ind. Ltda, São Paulo, Brasil), deixando apenas a superfície dentinária exposta. Os dentes foram suspensos com auxílio de um fio ortodôntico em um béquer contendo água destilada para esterilização em autoclave por 20 minutos a 121 °C. A solução cariogênica consistiu de 3,7 g de BHI caldo (Brain Heart Infusion, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), 2 g de sacarose (Synth; LabSynth, São Paulo, SP, Brazil), 1 g glicose (Synth; LabSynth, São Paulo, SP, Brazil) e 0,5 g de extrato de levedura (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) para cada 100 mL de água destilada. Essa solução foi esterilizada (autoclave por 20 minutos a 121 °C) previamente a inoculação de 2% de cepas de *Streptococcus*

mutans ATCC25175 (Coleção de Culturas Tropical Fundação André Toselo) (10^8 UFC/mL). Os dentes foram suspensos no meio cariogênico e o conjunto levado 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, os dentes foram novamente autoclavados. 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.

Procedimentos adesivos

A superfície cariada foi removida com auxílio de broca esférica de aço nº 4 (KG Sorensen, Barueri - SP, BR) em baixa rotação, a qual foi trocada por uma nova a cada 4 dentes. A dentina cariada amolecida foi removida até a obtenção de uma dentina mais endurecida e resistente ao toque com sonda exploradora sem pressão. Esse, assim como os demais procedimentos, foi realizado por um único operador previamente treinado.

Os dentes foram então divididos aleatoriamente segundo os sistemas adesivos Adper Scotchbond Multi Purpose (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), Adper Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), Clearfil SE Bond (Kuraray Med Inc, Osaka, Japão) e Adper Prompt L-Pop (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) e a aplicação ou não de solução de diglucontado de clorexidina a 2%. Algumas informações sobre os materiais utilizados no estudo estão apresentadas na Tabela 1.

Dessa forma, em metade dos dentes para cada sistema adesivo foram aplicados 20 µL de clorexidina a 2% ou o mesmo volume de água deionizada posteriormente ao

condicionamento ácido para os sistemas convencionais e previamente a aplicação do primer ácido para o sistema Clearfil SE Bond ou do sistema Prompt L-Pop. As soluções foram mantidas passivamente por 60 segundos cobrindo completamente toda a superfície de dentina e o excesso removido com papel absorvente para os sistemas convencionais, para a obtenção de uma superfície úmida, e com leves jatos de ar para os sistemas autocondicionantes. Os sistemas adesivos foram aplicados segundo as recomendações dos respectivos fabricantes (Tabela 1) e fotoativados com o aparelho de luz Optilux 500 (Kerr, Danbury, CT, EUA), cuja irradiância foi monitorada com radiômetro ($490 \pm 10 \text{ mW/cm}^2$). A coroa foi reconstruída em resina composta Filtek Z250 em três camadas incrementais de 1 mm cada fotoativadas individualmente por 20 s. Em seguida, os dentes foram armazenados em água destilada por 24 horas a 37 °C.

Ensaio mecânico de microtração

Os dentes foram seccionados longitudinalmente para a obtenção de espécimes com área transversal de $0,81 \text{ mm}^2$, os quais foram inspecionados em lupa estereoscópica com aproximadamente 30 vezes de aumento. Espécimes que apresentaram defeitos na interface, bolhas ou irregularidades nas proximidades da união resina-dentina, foram excluídos da amostra e os selecionados tiveram sua área adesiva individualmente mensurada com paquímetro digital (Mod. 500- 144b, Mitutoyo Sul Americana Ltda., São Paulo, Brasil) com resolução de 0,01 mm. Os espécimes foram armazenados por 24 horas ou 6 meses em água destilada acrescida de cristais de timol a 37 °C.

Após o período de armazenagem, cada espécime foi fixado em um dispositivo para o ensaio mecânico de microtração com cola de cianoacrilato (Super Bonder Gel e Ativador 7456, Henkel Loctite Ltda, São Paulo, Brasil) e o conjunto acoplado a uma

máquina de testes mecânicos (Material Test System, MTS 810; Minneapolis, MN, EUA), previamente ajustada para forças de tração, com célula de carga de capacidade máxima de 1 kN, sendo a velocidade do atuador de 0,5 mm/min.

Imediatamente após o teste de microtração, as metades obtidas de cada espécime foram armazenadas por 48 horas em glutaraldeído 2%. As fraturas foram classificadas em: (1) coesivas da resina ou (2) dentina; (3) adesivas e (4) mistas. A leitura foi realizada em lupa estereoscópica em aumentos variados (entre 30 e 60X), que permitiram a análise adequada.

Análise Estatística

Aos valores de resistência de união (MPa) obtidos para cada sistema adesivo foram aplicados os testes estatísticos de análise de variância a dois critérios fixos (aplicação de clorexidina vs. período de armazenagem). Testes de Tukey foram aplicados para comparações múltiplas aos pares quando a hipótese nula de igualdade foi rejeitada. Todos os testes foram considerados ao nível pré-estabelecido de significância de 5%.

RESULTADOS

Resistência de união

Os valores de resistência de união (MPa) registrados em função das variáveis aplicação de clorexidina e período de envelhecimento para cada sistema adesivo estão apresentados na Tabela 2. A utilização de clorexidina não influenciou os valores de resistência de união imediata (armazenagem em água por 24 horas) dos sistemas adesivos investigados, com exceção do Prompt. Para esse sistema, valores de resistência

de união significativamente superiores foram observados na presença de clorexidina após 24 horas de envelhecimento. Após 6 meses de armazenagem em água, entretanto, a utilização de clorexidina retardou o processo de degradação das interfaces produzidas com os sistemas adesivos Scotchbond MP e Single Bond. Para esses sistemas adesivos, os valores de resistência de união obtidos após esse período, embora inferiores, foram estatisticamente não diferentes dos valores obtidos após 24 horas em água quando a clorexidina foi utilizada. O mesmo não foi observado quando esses sistemas foram aplicados sem a utilização de clorexidina, uma vez que redução significativa da resistência de união foi detectada após 6 meses de armazenagem em água, em comparação ao período de 24 horas.

Para o sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond não foi observada influência de ambas as variáveis, aplicação de clorexidina e período de armazenagem, nos valores de resistência de união resultantes de sua aplicação sobre a dentina afetada por cárie. Entretanto, para o sistema Prompt L-Pop, redução significativa da resistência de união após 6 meses de armazenagem em água foi detectada, independentemente da aplicação ou não de clorexidina.

As porcentagens de redução da resistência de união após 6 meses de envelhecimento em água estão apresentadas na Tabela 2. Essa redução variou entre 11,8% e 29,5%. Entre os sistemas convencionais, os maiores valores de perda de resistência de união foram registrados para o sistema Single Bond 2 (19,9% e 15,7% na ausência e presença de clorexidina, respectivamente), enquanto que entre os sistemas autocondicionantes, as maiores perdas de resistência de união foram observadas para o Prompt, 21,9% na ausência e 29,5% na presença de clorexidina.

Análise dos tipos de fratura

Na Tabela 3 estão apresentadas as frequências absolutas e percentuais das falhas ocorridas para cada sistema adesivo em função das variáveis do estudo. Predomínio de falhas envolvendo a união (adesivas e mistas) foi observado para todos os grupos, independentemente do sistema adesivo, aplicação de clorexidina ou período de envelhecimento. Entretanto, aumento percentual de falhas puramente adesivas foi observado após 6 meses de armazenagem em água, para todos os grupos. Nenhuma falha coesiva em dentina foi registrada em ambos os períodos de armazenagem, assim como falhas coesivas em resina não foram observadas para o período de 6 meses de envelhecimento.

Falhas prematuras foram observadas para todas as condições experimentais, exceto para o sistema Single Bond 2 após 24 horas de armazenagem em água. O valor absoluto desse tipo de falha está incluído na Tabela 2. Esses espécimes não foram considerados para a análise estatística dos dados de resistência de união. O maior número de falhas prematuras foi observado para o grupo Prompt L-Pop em ambos os períodos de armazenagem sem a aplicação de clorexidina.

DISCUSSÃO

A incorporação de clorexidina aos protocolos de adesão não interferiu negativamente sobre os valores de resistência de união imediata à dentina afetada por cárie. Esses resultados estão de acordo com os descritos em estudos prévios para a dentina hígida^{21,22,24,25,27,29} e também para a dentina afetada por cárie.²⁸ Componentes dos sistemas adesivos, incorporados a sua composição com diferentes finalidades, podem influenciar negativamente sua infiltração nos espaços interfibrilares produzidos

pelo agente ácido. O copolímero do ácido polialcenóico, por exemplo, presente na composição do sistema Single Bond, tem sido apontado como um desses componentes devido ao seu elevado peso molecular (PM=14.000-20.000).³⁰⁻³² Da mesma forma, devido ao gradiente de umidade e redução dos espaços fibrilares no sentido da dentina mineralizada subjacente, monômeros hidrófilos de pequeno peso molecular como o HEMA (PM = 130,0 g/mol) tendem a penetrar em maior profundidade na dentina desmineralizada quando comparados aos monômeros hidrófobos de maior peso molecular como o Bis-GMA (PM = 512,0 g/mol). Os resultados do presente estudo, entretanto, permitem sugerir que apesar de ser um composto molecular relativamente de alto peso (PM = 897,8 g/mol) quando comparada a alguns monômeros constituintes dos sistemas adesivos, como HEMA ou Bis-GMA, o digluconato de clorexidina não influenciou negativamente a infiltração monomérica da dentina desmineralizada.

Apesar de aumento dos valores de resistência de união ter sido observado para todos os sistemas adesivos na presença de clorexidina em comparação a sua aplicação sobre a dentina afetada por cárie sem esse agente, apenas para o sistema Adper Prompt resultados significativamente superiores foram obtidos. Segundo Erhardt et al.²⁸, efeito positivo da aplicação de clorexidina sobre a dentina afetada por cárie está relacionado a sua ação sobre proteínas da matriz dentinária que se encontram alteradas em função dos eventos químicos e biológicos do processo carioso, como as proteoglicanas. Essas proteínas localizam-se na superfície das fibrilas de colágeno e são responsáveis pela sua afinidade por água, assim como pela ligação entre fibrilas adjacentes. Em conjunto, essas atuações influenciam diretamente na capacidade da dentina desmineralizada de se manter hidratada e conseqüentemente, plenamente expandida.¹¹⁻¹³ Na dentina afetada por cárie, entretanto, essas proteínas apresentam alterações moleculares tais que

dificultam a manutenção da hidratação da matriz desmineralizada.¹⁴ Adicionalmente, as fibrilas de colágeno nesse substrato apresentam reduzidas ligações cruzadas quando comparadas as fibrilas da dentina hígida, o que também interfere na sua capacidade de ligação a moléculas de água.^{9,15} A clorexidina poderia interagir com sítios do colágeno exposto e reverter, parcial ou totalmente, a contração da dentina desmineralizada pelo condicionamento ácido e não completamente reexpandida na presença de umidade devido as alterações das proteoglicanas. A carga positiva dos grupos guanidinas presentes na molécula de clorexidina ajudam a regular as alterações estruturais da dentina desmineralizada pelo preenchimento de espaços, união e organização de moléculas de água,^{11,23} funções essas exercidas pelas proteoglicanas na dentina sadia. Entretanto, permanece inconclusivo porque a manifestação dos efeitos benéficos descritos acima foi significativa apenas para o sistema Prompt. Pode ser especulado que o conteúdo mineral residual no substrato condicionado por esse sistema favoreceria a ligação de moléculas de clorexidina, uma vez que esse agente catiônico apresenta afinidade por grupamentos fosfato.²³ Adicionalmente, Perdigão et al.²⁹ sugerem que a clorexidina aumenta a energia de superfície do substrato, favorecendo sua posterior umectabilidade.

O efeito da associação da clorexidina ao protocolo de adesão de sistemas autocondicionantes, mesmo aplicados sobre a dentina hígida, tem sido pouco investigado.^{25,27} Campos et al.²⁵ não encontraram diferença estatisticamente significativa nos valores médios de resistência de união de um sistema autocondicionante simplificado quando aplicado a dentina hígida na presença de clorexidina em diferentes concentrações (0,2 e 2%) quando comparado a dentina hígida. O mesmo foi observado

por Castro et al.²⁷ para um sistema autocondicionante de dois passos, o que está de acordo com os resultados observados no presente estudo.

Degradação significativa da união resina-dentina foi observada após 6 meses de armazenagem em água na ausência de clorexidina, com exceção do sistema Clearfil SE Bond. As maiores porcentagens de redução da resistência de união foram observadas para os sistemas adesivos Prompt L-Pop (21,9%) e Single Bond (19,9%). A degradação da interface adesiva é o resultado sinérgico de eventos que envolvem ambos os componentes poliméricos e orgânicos. Segundo Reis et al.,³³ a união resina-dentina se degrada em três estágios: (1) a água é absorvida pelo polímero, iniciando sua degradação hidrolítica; (2) componentes resinosos são lixiviados da camada híbrida e/ou da camada de adesivo,^{34,35} e (3) as fibrilas de colágeno expostas são degradadas por endopeptidases presentes na própria matriz dentinária (MMPs)¹⁹⁻²¹ ou proteinases exógenas provenientes da saliva e bactérias.³⁶

A intensidade da degradação polimérica está diretamente relacionada a qualidade do polímero formado. Tem sido demonstrado que sistemas adesivos simplificados comportam-se como membranas permeáveis a passagem de água mesmo após polimerizados^{37,38} devido ao aumento do seu conteúdo hidrófilo. Isso é verdadeiro especialmente para os sistemas adesivos autocondicionantes simplificados, uma vez que a água é um componente essencial para a ionização dos monômeros funcionais ácidos, responsáveis pela dissolução da smear layer e desmineralização da dentina subjacente.³⁹ Hidrofilia e estabilidade funcional são propriedades inversamente proporcionais.⁴⁰ Aumento significativo de depósitos de nitrato de prata foi observado após 3 meses de armazenagem em água de interfaces produzidas pelo sistema Single Bond³² e após 6 meses para o sistema Prompt L-Pop.³³ A infiltração de nitrato de prata, no caso de

sistemas autocondicionantes, indica não apenas a impregnação incompleta da dentina desmineralizada,^{41,42} mas também áreas no interior do adesivo pobremente polimerizadas devido a presença de água residual,³² uma vez que a água afeta negativamente a conversão polimérica.⁴³ Especialmente na dentina afetada por cárie, a quantidade residual de água no interior da dentina desmineralizada é superior a observada para a dentina hígida⁹ devido a desmineralização ácida mais profunda observada nesse substrato intrinsecamente mais poroso.^{9,44}

Sistemas adesivos não simplificados sejam eles convencionais ou autocondicionantes apresentam como vantagem a aplicação de uma camada individualizada de resina livre de solvente e essencialmente hidrófoba. Essa camada aplicada sobre o primer reduz a sorção de água⁴⁵ e as subsequentes consequências negativas sobre a estabilidade da interface adesiva. No presente estudo, os valores de resistência de união do Clearfil SE Bond mostraram-se estáveis após 6 meses de armazenagem, enquanto que para o sistema Scotchbond MP foram observadas as menores porcentagens de perda dessa propriedade, independentemente da utilização ou não de clorexidina. Omar et al.⁴⁶ também observaram estabilidade da união resina-dentina produzida com o sistema Clearfil SE Bond sobre dentina hígida e dentina afetada por cárie, desafiada pelo método de termociclagem. Um importante aspecto que pode ter contribuído para a estabilidade mecânica das interfaces produzidas pelo sistema Clearfil SE Bond é a união química produzida entre o monômero funcional ácido (MDP)^{47,48} e a hidroxiapatita residual na dentina parcialmente desmineralizada por esse sistema de pH moderado (ca. 2,0),³⁹ resultando na formação de sais de Ca-MDP resistentes a degradação hidrolítica.⁴⁷ Adicionalmente, Carrilho et al.⁴⁹ observaram que espécimes produzidos pelo precursor desse sistema apresentaram estabilidade de

algumas propriedades mecânicas (módulo de elasticidade e resistência máxima à tração) após armazenamento em água por 6 meses, demonstrando que a qualidade do polímero formado também tem uma importante função na resistência à degradação. Essa premissa também justifica as maiores porcentagens de redução de resistência de união observadas para o sistema Prompt L-Pop, 21,9% na ausência e 29,5% na presença de clorexidina, uma vez que esse sistema apresenta comprometido grau de conversão polimérica⁵¹ e elevada sorpção de água.³² Reduzida extensão de polimerização pode resultar em alta susceptibilidade à degradação⁵¹ e favorecer o contínuo condicionamento da dentina subjacente.^{41,51}

A despeito dos maiores valores de resistência de união registrados na presença de clorexidina, a utilização desse agente inibidor de MMPs não foi capaz de impedir a deterioração da união resina-dentina, identificada no presente estudo como redução dos valores de resistência de união. Entretanto, desaceleração da degradação foi observada para os sistemas Scotchbond MP e Single Bond 2 na presença desse agente, de tal forma que os valores de resistência de união obtidos após 6 meses de envelhecimento não diferiram estatisticamente dos valores obtidos após 24 horas. Esses resultados sugerem que a clorexidina exerceu algum efeito positivo no processo de degradação da união.

Tem sido demonstrado que a clorexidina é um efetivo inibidor de metaloproteinases da matriz dentinária (MMPs)^{19,23} e que interfaces produzidas na presença desse agente são menos susceptíveis a degradação via essas enzimas proteolíticas. Hebling et al.²⁰ e Carrilho et al.²¹ demonstraram in vivo que a aplicação pós-condicionamento ácido de uma solução de clorexidina resultou em interfaces menos susceptíveis a degradação após 6 e 14 meses, respectivamente, de função na cavidade bucal. Entretanto, apenas no trabalho de Hebling et al.²⁰ foram utilizados ambos os

substratos para adesão, dentina hígida e dentina afetada por cárie. Ainda no trabalho de Carrilho et al.²¹ manutenção dos valores de resistência de união do sistema Single Bond aplicado sobre a dentina hígida tratada com clorexidina foi observado, diferindo dos resultados do presente estudo. Nos trabalhos mencionados acima, todas as margens das cavidades estavam estabelecidas em esmalte, e o dente como um todo foi submetido à degradação, diferindo dos pequenos espécimes utilizados no presente estudo. Degradação da união resina-dentina não ocorre ou é significativamente reduzida na presença de margens em esmalte.⁵¹⁻⁵³ Quando espécimes com pequena área de secção transversal e sem margens em esmalte são envelhecidos, os efeitos negativos dos fenômenos de degradação são favorecidos. Consequentemente, os resultados observados no presente estudo demonstram que, apesar da clorexidina ter exercido alguma ação sobre a degradação enzimática das fibrilas de colágeno, a degradação hidrolítica desses componentes e dos componentes resinosos prevaleceu, resultando em redução da resistência de união para todos os sistemas adesivos, com exceção do sistema Clearfil SE Bond. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Campos et al.²⁵ que também armazenaram espécimes de dimensões reduzidas por 6 meses em água, porém as interfaces, com ou sem aplicação de clorexidina, foram produzidas sobre dentina hígida.

O exato mecanismo de ação da clorexidina ainda permanece inexplicado. Sugere-se que esse agente catiônico poderia competir com receptores das MMPs que deveriam ser ocupados por íons como cálcio e zinco para sua ativação. Como resultado, a atividade colagenolítica sobre as fibrilas de colágeno é significativamente reduzida quando essas são pré-tratadas com clorexidina.^{19,26} Esse efeito é particularmente

positivo na dentina afetada por cárie, onde collagenases produzidas pelas bactérias cariogênicas³⁶ somam-se as liberadas pelo condicionamento ácido.

Embora redução dos efeitos da degradação enzimática possa ser assegurada com a simples incorporação da clorexidina aos protocolos de adesão à dentina hígida e dentina afetada por cárie, a degradação hidrolítica ainda exerce efeito significativo, e talvez predominante, na deterioração da união resina-dentina, especialmente em cavidades sem margens estabelecidas em esmalte. Consequentemente, estudos futuros devem buscar alternativas para contrapor tais efeitos negativos, em associação ao uso de inibidores de MMPs.

CONCLUSÃO

Após 6 meses de envelhecimento, a clorexidina exerceu efeito benéfico na estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie para os sistemas adesivos convencionais, embora não tenha sido capaz de impedir completamente a degradação das interfaces. Entre os sistemas investigados, as interfaces produzidas pelo sistema Clearfil SE Bond foram as mais estáveis.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela agência brasileira de fomento à pesquisa FAPESP (Pr. nº. 2008/00198-7). Os autores agradecem a CAPES pela concessão de bolsa de Doutorado.

REFERÊNCIAS

1. 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;18:437-443.
2. 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 Dent Res* 1995;74:1679-1688.
3. 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.
4. 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;31:677-681.
5. 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;24:786-798.
6. Fusayama T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. *Oper Dent* 1979;4:63-70.
7. Nakajima M, Sano H, Zheng L, Tagami J, Pashley DH. Effect of moist vs. dry bonding to normal vs. caries-affected dentin with Scotchbond Multi-Purpose Plus. *J Dent Res* 1999;78:1298-1303.
8. 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.
9. Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J Biomater Res* 2007;81A:279-286.
10. 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.

11. Breschi L, Perdigao J, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Lopes M. Immunocytochemical identification of type I collagen in acid-etched dentin. *J Biomed Mater Res A* 2003;66:764-769.
12. Breschi L, Prati C, Gobbi P, Pashley D, Mazzotti G, Teti G, et al. Immunohistochemical analysis of collagen fibrils within the hybrid layer: a FEISEM study. *Oper Dent* 2004;29:538-546.
13. Ruggeri Jr A, Prati C, Mazzoni A, Nucci C, Di Lenarda R, Mazzotti G, Breschi L. Effects of citric acid and EDTA conditioning on exposed root dentin: An immunohistochemical analysis of collagen and proteoglycans. *Arch Oral Biol* 2007;52:1-8.
14. Suppa P, Ruggeri A, Jr., Tay FR, Prati C, Biasotto M, Falconi M, et al. Reduced antigenicity of type I collagen and proteoglycans in sclerotic dentin. *J Dent Res* 2006;85:133-137.
15. Spencer P, Wang Y, Katz JL, Misra A. Physicochemical interactions at the dentin/adhesive interface using FTIR chemical imaging. *J Biomed Opt* 2005;10:031104.
16. 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.
17. Nakajima M, Kitasako Y, Okuda M, Foxton RM, Tagami J. Elemental distributions and microtensile bond strength of the adhesive interface to normal and caries-affected dentin. *J Biomed Mater Res* 2005;72:268-275.
18. 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.
19. 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.
20. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005;84:741-746

21. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley, D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007;86:529-533.
22. 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.
23. 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.
24. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjaderhane L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res* 2007;86:90-94.
25. 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.
26. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, Breschi L, Foulger S, Pashley DH. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008 Dec 17.
27. de Castro FL, de Andrade MF, Duarte Junior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent* 2003;5:129-138.
28. Erhardt MC, Osorio R, Toledano M. Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin. *J Dent* 2008;36:1068-1073.
29. Perdigao J, Denehy GE, Swift EJ, Jr. Effects of chlorhexidine on dentin surfaces and shear bond strengths. *Am J Dent* 1994;7:81-84.
30. Van Meerbeek B, Conn LJ Jr, Duke ES, Eick JD, Robinson SJ, Guerrero D. Correlative transmission electron microscopy examination of nondemineralized and demineralized

resin-dentin interfaces formed by two dentin adhesive systems. *J Dent Res* 1996;75:879-888.

31. 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.
32. Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Long-term TEM analysis of the nanoleakage patterns in resin-dentin interfaces produced by different bonding strategies. *Dent Mater* 2007;23:1164-1672.
33. 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.
34. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. Degradation patterns of different adhesives and bonding procedures. *J Biomed Mater Res* 2003;66B:324-330.
35. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials* 2003;24:3795-37803.
36. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998;77:1622-1629.
37. Hashimoto M, Ito S, Tay FR, Svizero NR, Sano H, Kaga M, Pashley DH. Fluid movement across the resin-dentin interface during and after bonding. *J Dent Res* 2004;83:843-848.
38. Sauro S, Pashley DH, Mannocci F, Tay FR, Pilecki P, Sherriff M, Watson TF. Micropermeability of current self-etching and etch-and-rinse adhesives bonded to deep dentine: a comparison study using a double-staining/confocal microscopy technique. *Eur J Oral Sci* 2008;116:184-193.

39. Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater.* 2001;17:296-308.
40. Yiu CK, King NM, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Carrilho MR, Tay FR. Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. *Biomaterials.* 2004;25:5789-5796.
41. Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials.* 2005;26:1035-1042.
42. Oliveira SS, Marshall SJ, Habelitz S, Gansky SA, Wilson RS, Marshall GW, Jr. The effect of a self-etching primer on the continuous demineralization of dentin. *Eur J Oral Sci* 2004;112:376-3783.
43. Wang Y, Spencer P Interfacial chemistry of class II composite restoration: Structure analysis *J Biomed Mater Res Part A* 2005;75A: 580-587.
44. 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.
45. King NM, Tay FR, Pashley DH, Hashimoto M, Ito S, Brackett WW, Garcya-Godoy F, Sunico M. Conversion of one-step to two-step self-etch adhesives for improved efficacy and extended application. *Am J Dent* 2005;18:126-134.
46. Omar H, El-Badrawy W, El-Mowafy O, Atta O, Saleem B. Microtensile bond strength of resin composite bonded to caries-affected dentin with three adhesives. *Oper Dent* 2007;32:24-30.
47. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res* 2004;83:454-458.

48. Inoue S, Koshiro K, Yoshida Y, De Munck J, Nagakane K, Suzuki K, Sano H, Van Meerbeek B. Hydrolytic stability of self-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2005;84:1160-1164.
49. Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Effects of storage media on mechanical properties of adhesive systems. *Am J Dent* 2004;17:104-108.
50. Nunes TG, Garcia FC, Osorio R, Carvalho R, Toledano M. Polymerization efficacy of simplified adhesive systems studied by NMR and MRI techniques. *Dent Mater* 2006;22:963-972.
51. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003;82:136-140.
52. Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Effects of a peripheral enamel bond on the long-term effectiveness of dentin bonding agents exposed to water in vitro. *J Biomed Mater Res* 2008;85:10-17.
53. Abdalla AI, Feilzer AJ. Four-year water degradation of a total-etch and two self-etching adhesives bonded to dentin. *J Dent* 2008;36:611-617.

Tabela 1. Tabela da composição, fabricantes modo de utilização e lote dos materiais utilizados no estudo

Nome comercial	Principais componentes	Modo de aplicação	Lote
Adper Scotchbond Multi Purpose (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)	<u>Primer</u> : água, HEMA e copolímero do ácido polialcenóico <u>Adesivo</u> : BISGMA, HEMA e fotoiniciador	Aplicação de uma camada e jato de ar por 5 s Aplicação de uma camada e fotoativação por 10s	6BC 6PL
Adper 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	Aplicação de duas camadas, jatos de ar por 5s e fotoativação por 10s	5EK
Clearfil SE Bond (Kuraray Med Inc, Osaka, Japão)	<u>Primer</u> : 10-MDP, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, canforoquinona, N-N-dietanol toluidina, água <u>Bond</u> : MDP, Bis-GMA, HEMA, dimetacrilato hidrofóbico, canforoquinona, N-N-dietanol-p-toluidina, sílica coloidal silanizada	Aplicação por 20s e jatos de ar por 5s Aplicação de uma camada e fotoativação por 10s	00727A 1044A
Adper Prompt L-Pop (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)	<u>Blister A</u> : Metacrilatos fosfatados, fotoiniciador, estabilizante <u>Blister B</u> : Água, fluoretos, estabilizante	Após mistura dos componentes, aplicação ativa por 15s, secagem por 5 s, aplicação de mais 1 camada por 3 s, jatos de ar por 5s e fotoativação por 10s	257205
Z250 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)	Resinas Bis-GMA, UDMA, Bis-HEMA, zircônia, sílica	3 camadas incrementais de 1mm fotoativadas por 20s cada	7KX
Scotchbond Etchant (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)	Ácido fosfórico a 35%	Aplicado por 15s, lavagem com água por 10s e secagem com papel absorvente	7JA
Clorexidina s (FGM Prod Odontológicos, Joinville, SC, BR)	Digluconato de Clorexidina a 2%	Aplicação passiva de 20µL por 60s	050707

Abreviaturas: Bis-GMA: bisfenol-glicidil-dimetacrilato; HEMA: 2-hidroxi-etil-dimetacrilato; MDP: 10-metacrilóiloxidecil-dihidrogenio-fosfato; UDMA – uretano dimetracrilato

Tabela 2. Resistência de união (MPa) produzida pelos sistemas adesivos em função da aplicação ou não de clorexidina e do período de envelhecimento em água.

Sistema adesivo	Clorexidina	Período de envelhecimento		Redução resistência de união (%)
		24 horas	6 meses	
Scotchbond MP	Não	27,1 (10,7) [34] a	23,9 (9,5) [26] b	11,8
	Sim	30,5 (9,4) [34] a	26,8 (11,6) [34] ab	12,1
Single Bond 2	Não	23,6 (10,8) [26] a	18,9 (5,7) [22] b	19,9
	Sim	24,2 (9,5) [23] a	20,6 (6,8) [26] ab	15,7
Clearfil SE Bond	Não	27,2 (13,2) [29] a	24,0 (9,3) [28] a	11,8
	Sim	29,2 (9,6) [26] a	25,1 (9,6) [19] a	14,0
Prompt L-Pop	Não	20,1 (8,5) [22] b	15,7 (7,0) [12] c	21,9
	Sim	25,8 (9,8) [19] a	18,2 (6,2) [18] bc	29,5

* valores representam média (desvio-padrão) em MPa [número de espécimes]

** para cada sistema adesivo, médias representadas pela mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0.05$)

Tabela 3. Frequência absoluta e porcentagem da distribuição dos tipos de fratura produzidos após o ensaio mecânico em função para cada sistema adesivo em função da aplicação de clorexidina e período de envelhecimento.

Sistema adesivo	Clorexidina	Período de envelhecimento em água						
		24 horas				6 meses		
		A *	M	CR	FP***	A	M	FP
Scotchbond	Não	22 ** (64,7)	11 (32,4)	1 (2,9)	0	25 (96,2)	1 (3,8)	5
MP	Sim	20 (58,8)	14 (41,2)	0	0	30 (96,8)	1 (3,2)	2
Single	Não	19 (73,1)	7 (26,9)	0	4	19 (86,4)	3 (13,6)	1
Bond 2	Sim	13 (56,5)	10 (43,5)	0	3	25 (96,2)	1 (3,8)	1
Clearfil SE	Não	13 (44,9)	15 (51,7)	1 (3,4)	5	23 (82,1)	5 (17,9)	4
Bond	Sim	17 (65,4)	7 (26,9)	2 (7,7)	3	17 (94,4)	1 (5,6)	4
Prompt	Não	15 (68,2)	7 (31,8)	0	9	10 (83,3)	2 (16,7)	17
L-Pop	Sim	15 (78,9)	4 (21,1)	0	5	16 (94,1)	1 (5,9)	8

* A=adesiva; M=mista; CR=coesiva de resina; FP=falha prematura

** Frequência absoluta (porcentagem)

*** Espécimes fraturados antes do ensaio mecânico. Esses espécimes não foram incluídos na análise dos dados e, portanto, não participam do número de espécimes do grupo.

CONSIDERAÇÃO FINAL



CONSIDERAÇÃO FINAL

Diversos fatores influenciam a adesão de materiais poliméricos ao substrato dentinário, os quais estão relacionados ao tipo e composição dos sistemas adesivos, sua técnica de aplicação e a heterogeneidade desse tecido. Por essa razão, a adesão à dentina ainda não é considerada tão segura e previsível quanto a adesão ao esmalte^{1,10,34}.

A dinâmica do processo de cárie, a qual envolve eventos químicos e biológicos, resulta em modificações do substrato dentinário que influenciam diretamente o desempenho de sistemas adesivos sobre ele aplicados. Por exemplo, após a remoção da dentina irreversivelmente comprometida (dentina infectada), a dentina remanescente¹³ (dentina afetada) caracteriza-se por menor conteúdo mineral^{25,44,47,49} e conseqüente menor dureza^{12,32,49}, maior porosidade da dentina intertubular⁴⁴, obliteração dos túbulos dentinários por cristais ácido resistentes^{28,44}, desnaturação reversível do colágeno, com redução do número de ligações cruzadas e alterações moleculares das proteoglicanas³⁹. Em conjunto, essas características respondem pela inferior resistência de união de sistemas adesivos à dentina afetada por cárie em comparação à dentina hígida^{2,12,21,25-27,32,45}, assim como pela maior susceptibilidade dessas interfaces à degradação. Isso ocorre porque as camadas híbridas formadas com o substrato afetado por cárie apresentam um maior número de defeitos intrínsecos^{12,15,32,44,47} e maior exposição de fibrilas de colágeno⁴⁴, favorecendo a nanoinfiltração.

Embora aceitáveis valores de resistência de união imediata sejam reportados para os sistemas adesivos comercializados atualmente, a estabilidade longitudinal da união resina-dentina ainda é um desafio a ser superado. Além do mais, esse desempenho adesivo deveria ser igualmente satisfatório quando dentina hígida e dentina afetada por cárie são utilizadas como substrato, uma vez que essas coexistem na maioria dos preparos cavitários. Desta

forma, devido à escassez de trabalhos na literatura, o presente estudo avaliou a adesão à dentina afetada por cárie, com destaque à utilização de um inibidor de metaloproteinases da matriz dentinária (MMPs), no desempenho adesivo imediato e em longo prazo de sistemas adesivos convencionais e autocondicionantes.

No primeiro capítulo foi utilizada a coloração de tricrômico de Goldner para a identificação de colágeno exposto na interface após a aplicação de um sistema adesivo convencional simplificado sobre a dentina hígida e dentina afetada por cárie. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença estatística entre os substratos hígido e afetado por cárie, contrariando o único estudo publicado que também utilizou a coloração de Goldner para avaliar interfaces produzidas sobre a dentina afetada por cárie¹⁵. Diferenças metodológicas como o protocolo de indução da cárie artificial e concentração do ácido fosfórico utilizado para a desmineralização do substrato limitam a comparação direta dos resultados. É importante ressaltar, entretanto, que para ambos os estudos os valores de p obtidos para a comparação do tipo de substrato foram limítrofes, ou seja, próximos do valor de significância de 5%. Desta forma, especulamos que o aumento do número de espécimes do presente estudo (n=6) seria importante para consolidar os resultados obtidos.

Influência do tipo de substrato sobre os valores de resistência de união imediata foram, porém, observados no capítulo 2, na ausência de clorexidina. Valores de resistência de união significativamente inferiores foram obtidos para todos os sistemas adesivos investigados, convencionais e autocondicionantes, quando aplicados sobre a dentina afetada por cárie, concordando com os resultados de outros estudos^{2,12,21,25-27,32,45}.

Ainda no capítulo 1, opostamente ao observado para a variável tipo de substrato, a condição de armazenagem exerceu efeito significativo sobre a espessura da camada de colágeno exposta na interface. Aumento significativo dessa espessura foi observado após 6 meses de armazenagem em água, demonstrando a ocorrência de degradação dos

constituintes da união, resultados esses que concordam com os observados em outros estudos, embora não utilizando o mesmo método de análise^{4,5,16,19,33,35}. Contrariamente, manutenção da espessura da camada de colágeno exposto foi observado para os espécimes armazenados em óleo mineral por 6 meses, uma vez que nesse meio de armazenagem ambas as formas de degradação, hidrolítica e enzimática, são minimizadas ou impedidas de ocorrer^{5,33}.

Degradação da união resina-dentina afetada por cárie também foi observada no capítulo 3 após 6 meses de envelhecimento em água, por meio da redução significativa dos valores de resistência de união comparados aos obtidos após 24 horas de armazenamento, na ausência de clorexidina. Isso foi verdadeiro para todos os sistemas adesivos investigados, com exceção do sistema Clearfil SE Bond, provavelmente devido a duas principais características, aplicação de uma camada hidrófoba de adesivo não solvatado²² e união química ao substrato dentinário com a formação de sais de cálcio (MDPCa) resistentes à hidrólise, resultantes da reação entre o monômero funcional ácido presente nesse sistema (MDP) e cristais de hidroxiapatita^{20,46}.

Apesar de inevitável, a deterioração da união resina-dentina pode ser desacelerada, por exemplo, protegendo-se o componente orgânico exposto na interface contra a degradação enzimática. Uma vez que tem sido demonstrado que a clorexidina melhora significativamente a longevidade da união resina-dentina^{3,4,6,7,19}, a influência desse agente inibidor de MMPs sobre a produção e estabilidade mecânica dessa união estabelecida sobre a dentina afetada por cárie foi o foco central do presente trabalho.

Durante os procedimentos restauradores adesivos, mais especificamente durante a cura dos materiais poliméricos, as tensões geradas pela contração de polimerização representam o primeiro desafio à interface adesiva recém-produzida. Portanto, é importante que a resistência de união imediata seja forte o suficiente para suportar essas tensões.

Também, a análise da resistência de união imediata se faz necessária para a comparação de materiais e modificações das técnicas adesivas, como a incorporação da clorexidina aos protocolos de adesão, investigada no presente estudo. É imprescindível que essas modificações não influenciem negativamente os valores de resistência de união imediata. Partindo desse pressuposto, no capítulo 2 foi avaliada a resistência de união imediata de sistemas adesivos convencionais e autocondicionantes aplicados sobre a dentina hígida e dentina afetada por cárie na presença de clorexidina.

Assim como observado em outros estudos para a dentina hígida^{3,4,6,9} e em um único estudo para a dentina afetada por cárie¹¹, os resultados do capítulo 2 demonstraram que a utilização de clorexidina não interferiu na resistência de união dos sistemas Scotchbond MP, Single Bond 2 e Clearfil SE Bond para ambos os substratos, e resultou em aumento significativo da resistência de união do sistema Prompt L-Pop à dentina afetada por cárie. Também pôde ser observado que na presença de clorexidina houve melhora dos valores de resistência de união à dentina afetada por cárie de tal forma que esses grupos passaram a não diferir dos grupos produzidos com a dentina hígida. Esse efeito positivo da clorexidina sobre a adesão à dentina afetada por cárie é explicado por Erhardt et al.¹¹ (2008) como sendo resultado da ação desse agente sobre a capacidade de hidratação da dentina, a qual está prejudicada nesse substrato devido à alterações moleculares das proteoglicanas³⁹.

Apesar do efeito positivo da aplicação de clorexidina sobre a resistência de união à dentina afetada por cárie, este agente não foi capaz de impedir completamente a degradação da união resina-dentina⁴, identificada no capítulo 1 como pequeno aumento da espessura da zona de colágeno exposto na base da camada híbrida e no capítulo 3 como redução da resistência de união, após 6 meses de envelhecimento em água. Esses resultados diferem dos obtidos por Hebling et al.¹⁹ (2005) e Carrilho et al.⁷ (2007) que demonstraram efeito significativo da clorexidina na estabilidade da união resina-dentina in vivo, após 6 e 14

meses, respectivamente. Entretanto, no presente estudo, assim como no trabalho de Campos et al.⁴ (2009), espécimes de pequenas dimensões e sem margens estabelecidas em esmalte foram armazenados, diferentemente dos estudos mencionados acima onde toda a restauração com margens em esmalte foi envelhecida na cavidade bucal. Conseqüentemente, nos capítulos 1 e 3, o desafio imposto sobre a união foi muito mais severo, sendo que os resultados obtidos sugerem o predomínio da degradação hidrolítica sobre a enzimática, demonstrando que o selamento promovido pelos sistemas adesivos é tão ou mais importante do que sua retenção.

Como conclusão geral, considerando-se os resultados obtidos em cada estudo conjuntamente, a incorporação da clorexidina aos protocolos de adesão à dentina, além de favorecer a resistência de união à dentina afetada por cárie, também favorece a estabilidade da união resina-dentina. Dessa forma, modificações nos protocolos de adesão visando a incorporação desse agente inibidor de MMPs devem ser considerados e investigados em estudos clínicos. Também, uma vez que a degradação da união resina-dentina é o resultado sinérgico de eventos enzimáticos e hidrolíticos que envolvem todos os componentes dessa união, é importante que se investiguem mecanismos que minimizem ambas as formas de degradação.

REFERÊNCIAS



Referências*

1. Abdalla AI, Feilzer AJ. Four-year water degradation of a total-etch and two self-etching adhesives bonded to dentin. *J Dent.* 2008; 36: 611-7.
2. Arrais CA, Giannini M, Nakajima M, Tagami J. Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112: 458-64.
3. 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.
4. 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.
5. Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Effects of storage media on mechanical properties of adhesive systems. *Am J Dent.* 2004; 17: 104-8.
6. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* 2007; 86: 90-4.
7. 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.
8. Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials.* 2005; 26: 1035-42.

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

9. de Castro FL, de Andrade MF, Duarte Junior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent*. 2003; 5: 129-38.
10. 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.
11. Erhardt MC, Osorio R, Toledano M. Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin. *J Dent*. 2008; 36: 1068-73.
12. 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.
13. Fusayama T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. *Oper Dent*. 1979; 4: 63-70.
14. 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.
15. 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: 82-8.
16. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials*. 2003; 24: 3795-803.

17. 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.
18. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Sano H, Tay FR, Oguchi H, et al. Over-etching effects on micro-tensile bond strength and failure patterns for two dentin bonding systems. *J Dent.* 2002; 30: 99-105.
19. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005; 84: 741-6.
20. Inoue S, Koshiro K, Yoshida Y, De Munck J, Nagakane K, Suzuki K, et al. Hydrolytic stability of self-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res.* 2005; 84: 1160-4.
21. 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.
22. King NM, Tay FR, Pashley DH, Hashimoto M, Ito S, Brackett WW, et al. Conversion of one-step to two-step self-etch adhesives for improved efficacy and extended application. *Am J Dent.* 2005; 18: 126-34.
23. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol.* 2000; 45: 757-65.
24. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982; 16: 265-73.

25. Nakajima M, Sano H, Zheng L, Tagami J, Pashley DH. Effect of moist vs. dry bonding to normal vs. caries-affected dentin with Scotchbond Multi-Purpose Plus. *J Dent Res.* 1999; 78: 1298-303.
26. Nakajima M, Ogata M, Okuda M, Tagami J, Sano H, Pashley DH. Bonding to caries-affected dentin using self-etching primers. *Am J Dent.* 1999; 12:309-14.
27. 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: 1679-88.
28. 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.
29. Oliveira SS, Marshall SJ, Habelitz S, Gansky SA, Wilson RS, Marshall GW, Jr. The effect of a self-etching primer on the continuous demineralization of dentin. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112: 376-83.
30. Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent.* 1997; 25: 355-72.
31. 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: 216-21.
32. 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.
33. Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Long-term TEM analysis of the nanoleakage patterns in resin-dentin interfaces produced by different bonding strategies. *Dent Mater.* 2007; 23: 1164-72.

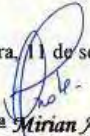
34. Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Effects of a peripheral enamel bond on the long-term effectiveness of dentin bonding agents exposed to water in vitro. *J Biomed Mater Res.* 2008; 85: 10-7.
35. Reis AF, Bedran-Russo AK, Giannini M, Pereira PN. Interfacial ultramorphology of single-step adhesives: nanoleakage as a function of time. *J Oral Rehabil.* 2007; 34: 213-21.
36. Ricci H. Influência do substrato, dentes decíduos e permanentes, e da aplicação de clorexidina na resistência de união de sistemas adesivos à dentina [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNEP; 2008.
37. 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: 160-7.
38. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62: 447-56.
39. Suppa P, Ruggeri A, Jr., Tay FR, Prati C, Biasotto M, Falconi M, et al. Reduced antigenicity of type I collagen and proteoglycans in sclerotic dentin. *J Dent Res.* 2006; 85: 133-7.
40. Tagami J, Hosoda H, Burrow MF, Nakajima M. Effect of aging and caries on dentin permeability. *Proc Finn Dent Soc.* 1992; 88: 149-54.
41. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998; 77: 1622-9.

42. Van Meerbeek B, De Munck J, Mattar D, Van Landuyt K, Lambrechts P. Microtensile bond strengths of an etch&rinse and self-etch adhesive to enamel and dentin as a function of surface treatment. *Oper Dent*. 2003; 28: 647-60.
43. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res*. 2003; 82: 141-5.
44. 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.
45. Xie J, Flaitz CM, Hicks MJ, Powers JM. Bond strength of composite to sound and artificial carious dentin *Am J Dent*. 1996; 9: 31-3.
46. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res*. 2004; 83: 454-8.
47. 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.
48. 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; 81:556-0.
49. 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: 243-52.

ANEXOS



Anexo 1 - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr – UNESP), para o desenvolvimentos dos experimentos 1, 2 e 3.

		UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"	
		FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA	
		Comitê de Ética em Pesquisa	
Certificado			
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "DEGRADAÇÃO DA UNIÃO RESINA-DENTINA AFETADA POR CÁRIE", sob o protocolo nº 26/07, de responsabilidade do Pesquisador (a) JOSIMERI HEBLING, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 02 (dois) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.			
Certify that the research project titled "DEGRADATION OF RESIN-CARIES AFFECTED DENTIN BONDS", protocol number 26/07, under Dr JOSIMERI HEBLING, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 02 (two) years when the final review of this study will occur.			
Araraquara, 11 de setembro de 2007.			
Prof^ª Dr^ª  Mirian Aparecida Onofre Coordenadora			

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

Araraquara, 24 de março de 2009.

MARIANE EMI SANABE